



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus der Fraunhofer Einrichtung für Marine Biotechnologie (EMB)

Direktor: Prof. Dr. G. Fuhr

Standortleiter: Prof. Dr. C. Kruse

***In vitro* generierte spontan kontrahierende
Kardiomyozytenverbände aus der Regenbogenforellenlarve
als Modellsystem in der humanen Herzforschung**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von

Bianka Grunow

aus Rostock

Lübeck 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Juli 2011

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof Dr. Christian Hübner (Institut für Physik,
Universität zu Lübeck)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Charli Kruse (Fraunhofer Einrichtung für
Marine Biotechnologie)

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Matthias Klinger (Institut für Anatomie,
Universität zu Lübeck)

Die vorliegende Arbeit wurde unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. C. Kruse im Zeitraum zwischen April 2008 und Februar 2011 an der Fraunhofer Einrichtung für Marine Biotechnologie in Lübeck angefertigt.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Lübeck, den

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fraunhofer EMB, vertreten durch Prof. Dr. C. Kruse, u. a. in den folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Artikel

Grunow B., Gebert M., Kruse C.: Heart Regeneration versus Heart Development. *Regenerative Medicine, Nov 4 (6), 187 2 (2009); ISSN 1746-0751*

Rakers, S., **Grunow, B.**, Gebert, M., Kruse, C.: Fish Cells grown *in vitro* are able to build Organoid-like Bodies and can be used for 3D-Cell Cultures. *European Aquaculture Society Special Publication 507-508 (2009)*

Grunow B., Ciba P., Rakers S., Klinger M., Anders E., Kruse C.: *In vitro* expansion of autonomously contracting, cardiomyogenic structures from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of fish biology* (2010) 76, 427-434

Grunow B., Wenzel J., Gebert M. & Kruse C.: *In vitro* generated autonomously contracting cardiomyocytes from rainbow trout as a model system for human heart research. *Journal of Biotechnology* (2010) 150 (1), 6-7

Grunow B., Wenzel J., Terlau H., Langner S., Gebert M., Kruse C.: *In vitro* developed spontaneously contracting cardiomyocytes from rainbow trout as a model system for human heart research. *Cellular Physiology and Biochemistry* (2011) 27, 01-12

Grunow B., Noglick S., Kruse C., Gebert M.

Isolation of Cells from Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) and Optimization of Culture Conditions for their Use in Biotechnology.

Eingereicht in *Fish Physiology and Biochemistry*

Poster

Grunow B., Langner S., Kruse C.: Etablierung von kontrahierenden Zellverbänden aus Fischembryonen/ -larven; *Doktorandentag Uni Lübeck 2009, Lübeck*

Grunow B., Noglick S., Kruse C.: Optimization of Culture Conditions for Larvae Cells from Atlantic Sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*); *Genomics in Aquaculture 2009, Bodø (Norwegen)*

Gebert M., Rakers S., **Grunow B.**, Kruse C.: Fraunhofer Einrichtung für Marine Biotechnologie – Aquakultur trifft Zellkultur; *“Neues aus dem Meer” 2009, Biusum*

Rakers S., **Grunow B.**, Gebert M., Kruse C.: Fish Cells Grown *in vitro* are able to build Organoid-Like Bodies and can be used for 3D-Cell Cultures; *Aquaculture Europe 2009, Trondheim (Norwegen)*

Grunow B., Ciba P., Rakers S., Klinger M., Kruse C.: *In vitro* Expansion of Autonomously Contracting Cardiomyogenic Structures from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*); *World Aquaculture Conference 2009, Veracruz (Mexiko)*

Rakers S., **Grunow B.**, Gebert M., Kruse C.: Epidermal Outgrowth in a New Fish Skin Culture Model; *World Aquaculture Conference 2009, Veracruz (Mexiko)*

Gebert M., Rakers S., Weber C., **Grunow B.**, Kruse C.: Fish cell culture: Novel techniques and applications; *World Aquaculture Conference 2009, Veracruz (Mexiko)*

Grunow B., Gebert M., Kruse C.: Heart Regeneration versus Heart Development; *World Conference on regenerative Medicine 2009, Leipzig*

Grunow B., Wenzel J., Gebert M., Kruse C.: *In vitro* generated autonomously contracting Kardiomyozyten from rainbow trout as a model system for human heart research; *Birth, Life and Death of the Cardiac Myocyte Conference 2010, Napa Valley (USA)*

Lüllwitz L., Hoffmann D., **Grunow B.**, Noglick S., Gebert M., Kruse C.: A novel fish cell line converts n-3 polyunsaturated fatty acids into n-3 highly unsaturated fatty acids *in vitro*; *First International Marine Ingredients Conference 2010, Oslo (Norwegen)*

Präsentation

Bianka Grunow, Jan Wenzel, Marina Gebert, Charli Kruse

In vitro generated autonomously contracting cardiomyocytes from rainbow trout as a model system for human heart research

14th International Biotechnology Symposium and Exhibition 2010, Rimini (Italien)

betreute Bachelorarbeiten

Sarah Noglick (2009): Untersuchung der Proliferation und des Expressionsprofils von *in vitro* propagierten Zellen des Atlantischen Störs (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*) bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen

Maren Schmidt (2010): Entwicklung und Regeneration von *in vitro* kultivierten spontan kontrahierenden Kardiomyozytenverbänden aus der Regenbogenforelle

Patent

Kruse, Charli; **Grunow, Bianka**; Rapoport, Daniel; Ciba, Philipp:

“Spontan kontrahierende Fischzellaggregate, deren Anwendung und deren Erzeugung”

Patentanmeldung: 10 2009 041 254.9

Prioritätstag: 11.09.2009, 09F50527

Inhaltsverzeichnis

<i>Wissenschaftliche Veröffentlichungen</i>	I
<i>Inhaltsverzeichnis</i>	I
<i>Abkürzungen</i>	4
I. Einleitung	8
1.1. Klinischer Hintergrund	8
1.2. Modellsysteme	9
1.2.1. <i>In vitro</i> Modellsysteme	10
1.2.2. Ichthyologische Modellsysteme	11
1.2.3. Kardiale Testsysteme	13
1.3. Anatomische und physiologische Grundlagen der Herzfunktion	14
1.3.1. Aufbau der Herzmuskelfaser	14
1.3.2. <i>Disci intercalares</i> (Glanzstreifen)	16
1.3.3. Schrittmacherzellen	18
1.4. Kardiale Aktivität	20
1.4.1. Aktionspotential	20
1.4.2. Feldpotential	22
1.5. Methoden zur Messung kardialer Aktivität	23
1.5.1. Intrazelluläre Signalleitung	24
1.5.2. Extrazelluläre Signalleitung	24
1.6. Pharmakologische Untersuchung	25
1.7. Zielsetzung der Arbeit	28
II. Material	29
2.1. Chemikalien	29
2.2. Puffer und Medien	30
2.3. Kits	30
2.4. Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	31
2.5. Synthetische Oligonukleotide	32
2.6. Verbrauchsmaterialien	32
2.7. Geräte	33
2.8. Software	34
III. Methoden	35
3.1. Tiermodell	35
3.2. Allgemeine Zellkulturmethoden	36
3.2.1. Isolation und Kultivierung von Zellen	36
3.2.2. Kulturbedingungen	36
3.2.3. Subkultivierung	37
3.3. Zellkulturexperimente	38
3.3.1. Stereomikroskopie	38

3.3.2. Berechnung der Wahrscheinlichkeit für die Bildung von SCC	38
3.3.3. Ermittlung des Zeitraumes bis zur Bildung von SCC	39
3.3.4. Messung der Aggregatsgröße	40
3.3.5. Messung der Schlagfrequenz	40
3.3.6. Elektronenmikroskopie	40
3.3.7. Regeneration und Vervielfältigung der Zellaggregate	41
3.3.8. statistische Auswertung der Zellkulturexperimente	41
3.4. Zellbiologische Methoden	42
3.4.1. Immunfluoreszenz	42
3.4.1.1. Vorbereitung für Immunhistochemie	43
3.4.1.2. Vorbereitung für Immuncytochemie	43
3.4.1.3. Färbung mit herzspezifischen Antikörpern	44
3.4.1.4. Aktinfärbung mit Phalloidin	45
3.4.2. Proliferationsnachweis	45
3.5. Molekularbiologische Methoden	45
3.5.1. gDNA-Isolation	45
3.5.2. mRNA-Isolation	46
3.5.3. Design von Primern	46
3.5.4. Reverse Transkription - Ermittlung des Temperaturgradienten bei Primern	47
3.5.5. Gel-Kapillarelektrophorese	49
3.6. Elektrophysiologie	50
3.6.1. Extrazelluläre Ableitungen via Multielektrodenarray (MEA)	50
3.6.2. Intrazelluläre Ableitungen via scharfer Elektrode	51
3.7. Medikamententestung	52
IV. Ergebnisse	54
4.1. Bildung spontan kontrahierender Zellaggregate (SCC)	54
4.2. Beobachtungen zur Entstehungskinetik von SCC	57
4.3. Wahrscheinlichkeit für die Bildung kontrahierender Zellaggregate	59
4.3.1. Aggregatanzahl in Abhängigkeit vom Larvenalter	59
4.3.2. Zeitlicher Verlauf der Aggregatbildung	60
4.3.3. Größe der Aggregate	61
4.4. Kontraktionsfrequenz	63
4.4.1. Kontraktionsfrequenz in Abhängigkeit vom Larvenalter	63
4.4.2. Kontraktionsfrequenz im Zeitverlauf	64
4.5. Charakterisierung kontrahierender Zellaggregate	64
4.5.1. Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion	65
4.5.2. Immunfluoreszenz	66
4.5.3. Elektronenmikroskopie	70
4.6. Schrittmacherzellen in SCC	73
4.7. Regeneration und Vervielfältigung von SCC	75
4.7.1. Regeneration von SCC	75
4.7.2. Vervielfältigung von SCC	77
4.8. Untersuchungen der elektrophysiologischen Aktivität von SCC	78
4.8.1. Extrazelluläre Ableitungen - MEA	79
4.8.2. Intrazelluläre Ableitungen - scharfe Elektrode	83
4.9. Pharmakologische Untersuchungen an Kardiomyozyten mit Hilfe der scharfen Elektrode	84
4.9.1. Modifikation des Aktionspotentials durch Isoproterenol	85
4.9.2. Modifikation der SCC-Aktivität durch Kaliumchlorid	86

4.9.3. Modifikation des Aktionspotentials durch Rilmakalim	87
V. Diskussion	89
5.1. Eigenschaften ichtyologischer Kulturen	89
5.1.1. Bildung spontan kontrahierender Zellaggregate	91
5.1.2. Eigenschaften spontan kontrahierender Zellaggregate	93
5.1.3. Eigenschaften der Kontraktionsfrequenz	94
5.2. Nachweis von Kardiomyozytenverbänden	95
5.2.1. Entwicklung von <i>in vitro</i> generierten Kardiomyozyten	95
5.2.2. Strukturelle und morphologische Eigenschaften kardialer Netzwerke im Vergleich zu SCC	96
5.2.3. Nachweis von Schrittmacherkardiomyozyten	98
5.3. Untersuchung des Regenerationspotentials	100
5.4. Elektrophysiologie	101
5.4.1. Extrazelluläre Ableitung der elektrischen Aktivität kardialer Netzwerke	102
5.4.2. Intrazelluläre Ableitung der elektrischen Aktivität der Kardiomyozyten	103
5.5. Modifikation des kardialen Aktionspotentials durch Pharmaka	106
5.5.1. Isoproterenol	107
5.5.2. Kaliumchlorid	108
5.5.3. Rilmakalim	109
5.6. Tauglichkeit der SCC als zellbasiertes Testmodell	110
5.7. Ausblick	114
VI. Zusammenfassung	117
VII. Literaturverzeichnis	118
VIII. Abbildungsverzeichnis	128
IX. Tabellenverzeichnis	129
X. Danksagung	130
XI. Lebenslauf	<i>Fehler! Textmarke nicht definiert.</i>

Abkürzungen

biologische Strukturen

cmIc	engl. Cardiac myosin light chain
Cx	Connexin
elF ₁	engl. elongation factor α
HCN	engl. hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gate
mH ₁	engl. cardiac muscle myosin heavy chain 6 alpha
Troponin C	Troponin Cardial
Troponin I	Troponin Inhibitor
Troponin T	Troponin Tropomyosin

Chemikalien und Lösungen

BSA	engl. Bovine Serum Albumin
CP	Cacodylatpuffer
Ca ²⁺	Calcium
Cl ⁻	Chlorid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfonat
DPBS	engl. Dulbecco's Phosphate buffered saline
EDTA	engl. Ethylenediaminetetraacetic acid
EdU	5-Ethynyl-2-desoxyuridin
FCS	Fetales Kälberserum
H ₂ O	Wasser
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MS222	Methanol Ethyl-3-Aminobenzoat Methansulfonsäure
Na ⁺	Natrium
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
OsO ₄	Osmiumtetroxid

Elektrophysiologie

AP	Aktionspotential
APA	Aktionspotentialamplitude
APD ₅₀	Aktionspotentialdauer bei 50 % Repolarisation
APD ₉₀	Aktionspotentialdauer bei 90 % Repolarisation
ATP	Adenosintriphosphat
dV/dt _{max}	maximale Depolarisationsgeschwindigkeit
EKG	Elektrokardiogramm
FP	Feldpotential
I _{Ca}	Calciumstrom
I _f	„funny“ Strom
I _{K1}	Kaliumstrom- inward rectifying
I _{KATP}	ATP-sensitiver Kaliumstrom
I _{Kr}	schneller Kaliumstrom
I _{Ks}	langsamer Kaliumstrom
I _{Na}	Natrimstrom
I ₀	Kaliumstrom - transient outward
MEA	Multielektrodenarray
RMP	Ruhemembranpotential

Einheiten

° C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
d	Tag
g	Gramm
h	Stunde(n)
I	Strom
l	Liter
m	Meter
M	Molar
MΩ	Megaohm
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter

mM	Millimolar
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
pH	latein: pondus Hydrogenii; negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
rcf	relative Zentrifugalkraft
s	Sekunde(n)
T	Temperatur
TG	Tagesgrade
U	Unit
V	Volt

Molekularbiologie

A	Adenin
bp	Basenpaar
C	Cytosin
cDNA	complementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Deoxyribonukleosid 5'-Triphosphat
fw	forward
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
mRNA	messenger RNA
PCR	Polymerase Kettenreaktion
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse-Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion
T	Thymin
tRNA	transfer RNA

andere Abkürzungen

bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
EM	Elektronenmikroskopie
engl.	englisch

et al.	latein: et alia; deutsch: und andere
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
ggf.	gegebenenfalls
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NK	Negativkontrolle
PK	Positiv Kontrolle
SCC	spontan kontrahierendes Zellaggregat
u. a.	unter anderem
VK	Versuchskontrolle
W	Woche(n)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
α	alpha
β	beta
3D	dreidimensional

I. Einleitung

1.1. Klinischer Hintergrund

Jeder zweite Todesfall in Deutschland ist auf eine Herz-Kreislauf-Erkrankung zurückzuführen. Somit ist dies die Todesursache Nummer eins in Deutschland (Abbildung 1). Da vor allem ältere Menschen betroffen sind, ist angesichts der steigenden Lebenserwartung eine wachsende Anzahl chronischer Herzerkrankungen und somit eine weitere Zunahme dieser Todesfälle zu erwarten. Aber auch bei jüngeren Menschen treten bereits Störungen des Herz-Kreislauf-Systems auf (Halen 2006, Bundesamt für Statistik). Ursachen liegen hier z. B. in der Fettleibigkeit, Stress, Rauchen, einem erhöhten Cholesterinspiegel und Diabetes. 76 % der Todesfälle, die durch Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems verursacht werden, sind auf ischämische Herzkrankheiten (Erkrankungen aufgrund von Durchblutungsstörungen), wie den Herzinfarkt, zurückzuführen. Rund ein Sechstel der gesamten Ausgaben im deutschen Gesundheitswesen wurden im Jahr 2004 für die Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen aufgewendet (35,3 Mrd. € von insgesamt 225 Mrd. €), ungefähr 20 % davon allein für ischämische Herzerkrankungen (Halen 2006, Bundesamt für Statistik).

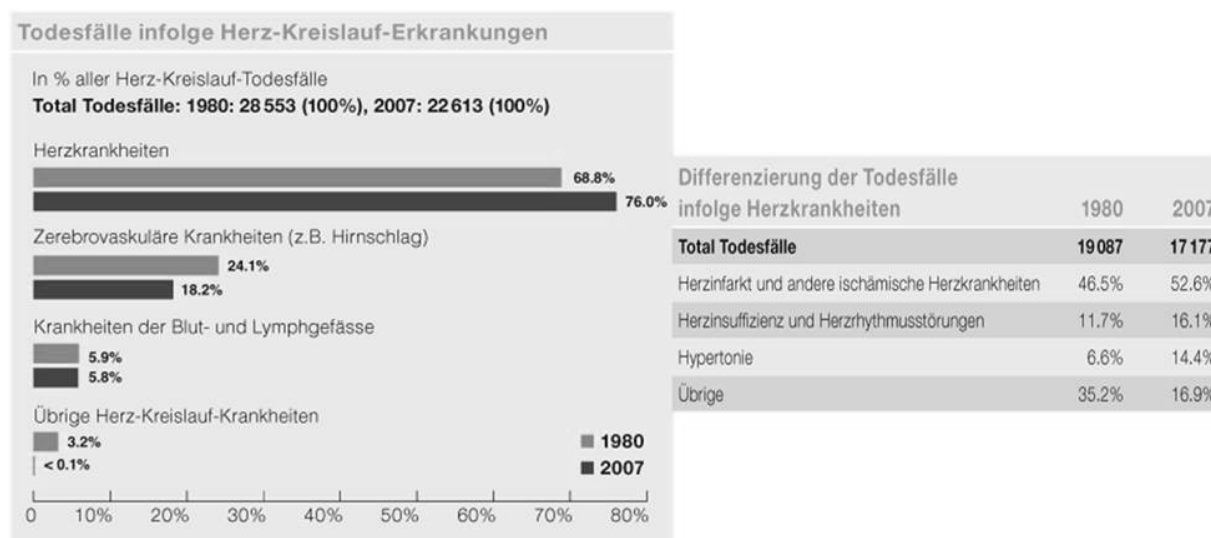


Abbildung 1: Todesursachenstatistik 1980, 2007.

Hauptursache von Todesfällen sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen (WHO (2008); <http://www.who.int/en/>)

Trotz des medizinischen Fortschritts z. B. in Form neuer Therapiemöglichkeiten ist die Sterblichkeit nach einem akutem Herzinfarkt auch in den letzten Jahren gleichbleibend hoch (Mark et al. 2006). Therapiemöglichkeiten, wie die Revaskularisierung von infarktgefährdetem oder gar infarziertem Myokardgewebe sowie auch die medikamentöse Behandlung, sind daher stets von entscheidender Bedeutung in der Kardiologie.

Der Grund für die hohe Sterblichkeit nach einem Infarkt ist u. a. die geringe Regenerationskapazität von Herzzellen in Mammalia. Obwohl in einigen Arbeiten das mitotische Potenzial von Kardiomyozyten in Mammalia gezeigt werden konnte (Anversa et al. 2002, Beltrami et al. 2003, Oh et al. 2003, Leri et al. 2005, Urbanek et al. 2005), ist deren Proliferationsfähigkeit nicht ausreichend, um einen massiven Zelltod aufgrund von Durchblutungsstörungen zu kompensieren. Daher können Säugetiere verletztes Herzgewebe, wie es bei einem Infarkt entsteht, nicht ausreichend regenerieren (Major & Poss 2007). Aus diesem Grund ist die Entwicklung von Herztestsystemen zur Erforschungen von kardialwirksamen Medikamenten bedeutsam, um eine bessere medikamentöse Behandlung bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu gewährleisten.

1.2. Modellsysteme

Ein Ziel der biomedizinischen Forschung ist es stets das beste Modellsystem zu finden, um Krankheiten und Entwicklungsvorgänge erkennen, verstehen und behandeln bzw. beheben zu können.

Es gibt verschiedene gängige Tiermodelle, von denen jedes Stärken und Schwächen für bestimmte Fragestellungen in der Entwicklungsbiologie, Molekulargenetik, Pharmakologie, Biomedizin etc. aufweisen. Das Grundproblem einiger etablierter Modellorganismen wie der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*, Meigen 1830) oder des Fadenwurms (*Caenorhabditis elegans*, Maupas 1900) ist die relativ große entwicklungsbiologische Distanz zum Menschen (Ingham 1997). Das Modelltier Maus (Überfamilie: Mäuseartige, Muridae) als Vertreter der Säugetiere, das u. a. auch in der Herzforschung verwendet wird, weist Nachteile wie die im Vergleich zu Insekten und Würmern geringe Anzahl an Nachkommen (fünf bis zehn) und der ungleich längeren Generationszeit (zehn Wochen) auf. Zudem entwickeln sich ihre Nachkommen im Uterus, so dass die Forschung an Embryonen schwierig ist. Die eben aufgeführten Nachteile des Modellorganismus Maus zu kompensieren und die Vorteile der invertebraten Modelltiere

möglichst zu konservieren, führte zum Vorschlag, leicht zugängliche und stark reproduzierende Fischarten als vertebrierte Modellorganismen zu etablieren. Hierbei wurden vor allem der Zebrafisch (*Danio rerio*, Hamilton), Medaka (*Oryzias latipes*, Temminck & Schlegel 1846) als auch die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) in den Vordergrund der Forschung gestellt. Diese Fischarten haben als Modellorganismen den Vorteil einer hohen Reproduktion. So kann ein Zebrafisch 300 Eier pro Woche und eine Regenbogenforelle bis zu 2000 Eier pro Laich produzieren (Bundesamt für Naturschutz, www.bfn.de). Ein weiterer Vorteil sind die leicht zugänglichen Embryonen. Die Embryonen dieser Fischarten entwickeln sich vollständig außerhalb des Muttertieres in einem durchsichtigen Chorion. Die Embryonen sind ebenfalls durchsichtig, so dass alle Zellen bis ins frühe Larvenstadium sichtbar sind (Metscher et al. 1999, Key & Devine 2003). Darüber hinaus sind Fische dieser Arten unkompliziert in ihrer Haltung, da sie geringe Ansprüche an Futter und Beckengröße stellen. Fische, und hier speziell die Teleostei (Echte Knochenfische), haben als Vertebraten Organsysteme (Auge, Herz, Hirn, Drüsen etc.), die im Aufbau dem des Menschen ähnlich sind. In dieser Arbeit sind bei der Verwendung des Begriffs „Fisch“ nur Tiere der Überordnung Teleostei gemeint.

1.2.1. *In vitro* Modellsysteme

In den letzten Jahren wuchs die Nachfrage für *in vitro* Modellsysteme stetig an. Diese haben den Vorteil, dass die endogenen Einflüsse, die in jedem Tiermodell wirksam sind, entfallen. *In vitro* Modelle sind für physiologische Mechanismen daher vor allem in frühen Studienphasen geeignete Testsysteme (Schmid et al. 2000). In der Herzforschung liegt der derzeitige Fokus auf murinen Modellen. Etablierte murine Modelle in der Herzforschung sind z. B. ein isoliert arbeitendes Herz (Sutherland et al. 2000), Herzschnitte (z. B. Halbach et al. 2006), Zellen aus Herzexplantkulturen (Shenje et al. 2008), induzierte pluripotente Stammzellen (iPS cells – induced pluripotent stem cells) (Pfannkuche et al. 2009, Mauritz 2008), embryonale und adulte Stammzellen (Sauer et al. 1999, Rubart & Field 2008) sowie Embryoidbodies (z. B. Wenzel et al. 2002). Sowohl induzierte als auch embryonale und adulte Stammzellen müssen zunächst durch Zugabe von Differenzierungsmedien, Wachstumsfaktoren oder durch Ko-Kultur mit Herzmuskelgewebe in Kardiomyozyten differenziert werden. Allerdings zeigten Beobachtungen über die Differenzierung von murinen adulten Stammzellen isoliert aus Blut, Fett, Skelettmuskel und Herz, dass die isolierten Stammzellen eine größere Kapazität zur Differenzierung in andere

Zelllinien besitzen, als bisher angenommen wurde (Winitsky et al. 2005, Rubart & Field 2006). Trotz dieser etablierten Methoden zur Herzzelldifferenzierung ist es bisher nicht möglich aus adulten Stammzellen reproduzierbare stabile *in vitro* Herzmodelle aus der Gruppe der Muroidea zu entwickeln. Des Weiteren zeigte sich, dass Mäuse keine geeigneten Modelle in der humanen Herzforschung sind. Limitationen treten nicht nur durch die geringe Anzahl von Nachkommen und die uterine Embryonalentwicklung, sondern auch durch die myokardiale Ionenkanalzusammensetzung und damit in der Elektrophysiologie der murinen Herzen auf (geringe Aktionspotentialdauer).

Weiterhin versuchten Arbeitsgruppen mit so genannten „human Embryonic-Stem-Cell-derived Cardiomyocytes“ (hESC-CM) Herzmodelle zu etablieren, um eine Stammzellquelle für Herzregeneration zu erschaffen (Cao et al. 2008). Aber auch hier sind Mausmodelle für z. B. die ersten Implantationsversuche unentbehrlich. Zudem wurde berichtet, dass die kardialen elektrophysiologischen Eigenschaften von hESC-CM innerhalb einer Zellpopulation sehr heterogen sind. So weisen nicht alle Zellen dieselben Aktionspotentialparameter auf. Außerdem ähnelt die elektrophysiologische Aktivität dieser hESC-CM, in Bezug auf die Depolarisation und das Ruhemembranpotential, in den meisten Fällen eher der elektrophysiologischen Aktivität fötaler als adulter Herzzellen (Mummery et al. 2003, van Amerongen et al. 2008, Cao et al. 2008).

In der kardialen Grundlagenforschung werden neben murinen auch aviäre Modelle verwendet. Hier werden vor allem Zellen oder Gewebe embryonaler Hühnerherzen für entwicklungsbiologische (z. B. Bimler et al. 2007, Krause et al. 2004) und elektrophysiologische Studien (Aubert et al. 2004) verwendet. Es konnte in der Literatur jedoch kein Hinweis auf verwendete Kardiomyozyten vom Huhn für den Gebrauch in der humanen Herzforschung gefunden werden. Des Weiteren werden in der Herzforschung auch *Xenopus*-Oocyten für elektrophysiologische Untersuchungen benutzt. Im Vergleich zu anderen Zelllinien zeigen diese allerdings eine deutlich geringere Empfindlichkeit gegenüber Substanzen, die eine blockierende Wirkung an Kaliumkanälen entfalten, an (Rolf et al. 2000).

1.2.2. Ichthyologische Modellsysteme

Aufgrund der Vorzüge von Fischen für die Verwendung als Modellorganismus finden diese u. a. Anwendung in der Toxikologie, Physiologie, Regenerationsbiologie, Biotechnologie und

Pharmazie (Evans & Clairborne 2006, Berghmans et al. 2008). In der Regenerationsbiologie wurde an Fischen vor allem an Schwanzflosse, Maxillarbarteln und dem Herz die Regeneration nach Amputation ausführlich untersucht (Zodrow & Tanguay 2003, Keating 2004, Major & Poss 2007, Lien et al. 2006, LeClair et al. 2010). Diese Untersuchungen zeigten ein hohes Regenerationspotential der Gewebe. So konnte z. B. bei Zebrafisch eine vollständige Regeneration des Herzens nach einer 20 %igen Ventrikelamputation beobachtet werden (Major und Poss 2007).

Auch auf Zellebene finden bereits seit den 60er Jahren ichthyologische Forschungen statt (Wolf & Quimby 1962). So wurden die ersten poikilothermen *in vitro* Zellkulturen aus Regenbogenforelle, Karpfen und Goldfisch generiert (Wolf & Quimby 1962, Frerichs et al. 1991, Lorenzen et al. 1993). Der hauptsächliche Nutzen lag in der Entwicklung von isolierten und zuverlässigen Systemen zur Untersuchung von Fischviren (Ott 2004). Auch in der Gewässertoxikologie werden Fischzellen vermehrt in den Vordergrund der Forschung gerückt, da die primäre Interaktion zwischen Chemikalie und Organismus auf Zellebene stattfindet (Fent 2001, Ruiz-Leal & George 2004, Kamer et al. 2003). Heutzutage werden Fischzelllinien des Weiteren für Analysen zur Umweltverschmutzung und in der Krebsforschung verwendet (Bunton 1993).

Ab dem Jahr 2006 wurde von der Einsatzmöglichkeit von Fischzellen in der kardialen Physiologie sowie auch in der humanen Herzforschung berichtet (Shiels et al. 2006, Brette et al. 2008, Nemtsas et al. 2009). Shiels et al. (2006) und Brette et al. (2008) beschrieben, dass die murine Herzelektrophysiologie von der des Menschen sehr verschieden ist. Die kardiale Elektrophysiologie des Fisches ist hingegen in ihren Aktionspotentialeigenschaften der der humanen Herzen sehr ähnlich. Das Aktionspotential des Fischherzens hat wie das des Menschen eine schnelle Depolarisation, eine lange Plateauphase und eine schnelle Repolarisation (Abbildung 2). Bei Muroidea ist das Aktionspotential auf einen Peak (Depolarisation) und eine langsame Repolarisation beschränkt. In dieser Tiergruppe existiert daher keine ausgeprägte Plateauphase (Abbildung 2). Zusätzlich erörterten Milan et al. (2006), dass in Fischen die Aktionspotentialdauer (APD) von der Schlagfrequenz abhängig ist. Dieser Effekt wurde ebenfalls beim Menschen nachgewiesen. In all diesen Studien wurde hauptsächlich Zebrafisch verwendet. Aber auch die Regenbogenforelle, als ein robuster und weit verbreiteter Teleostei in limnologischen und marinen Systemen der nördlichen Hemisphäre wurde vielfach als Modelltier verwendet.

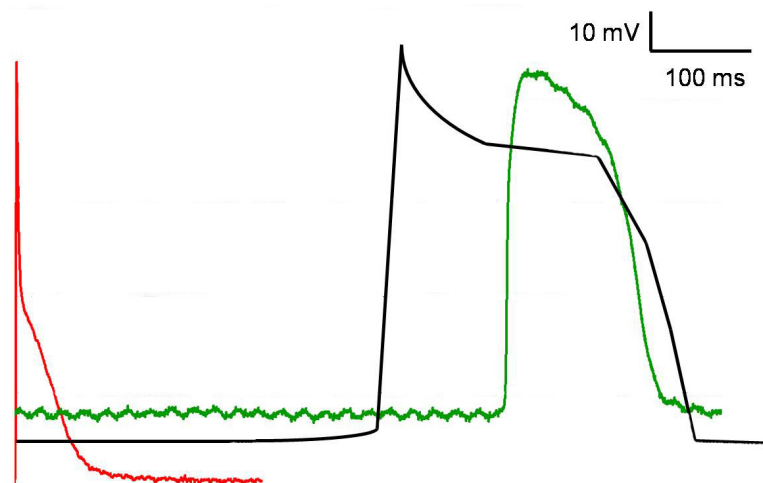


Abbildung 2: Intrazelluläre Ableitungen mit einer scharfen Elektrode einer Herzzelle des Menschen (schwarz)¹, der Maus (rot)² und eines *in vitro* generierten Herzaggregates der Regenbogenforelle (grün).

1.2.3. Kardiale Testsysteme

Ein Problem bei allen bisherigen *in vitro* Herztestsystemen, generiert aus murinen, aviären, amphibischen und auch ichthyologischen Organismen, stellt die Aktivität dar. Entweder weisen kardiale Testsysteme nur nach einer elektrischen Stimulation Kontraktionen auf oder sie kontrahieren nur über einen kurzen Zeitraum von wenigen Minuten, Stunden bis hin zu wenigen Tagen (Kehat 2002). Ein weiteres Problem von klassischen Zellkulturen stellt die Entfernung zu einem organotypischen Modell dar. Meist liegen *in vitro* Modelle als Einzelzelle oder als Zellmonolayer vor. Ein Zellaggregat bietet hingegen einen organähnlicheren Aufbau und damit auch organähnlichere Eigenschaften.

Für die Herzforschung und die Pharmakologie ist daher vor allem die Etablierung von kardialen 3D-Testsystemen von Bedeutung, die zudem eine spontane und rhythmische Langzeitkontraktion aufweisen sollten. Für einen großen Anwendungsbereich müssen Testsysteme zudem einfach, schnell und in großer Anzahl produziert werden können und reproduzierbar sein. Ferner müssen homologe Eigenschaften, wie z. B. in der elektrophysiologischen Aktivität, vorliegen. Nur wenn ein pharmakologisches Testsystem diese Merkmale aufweist, ist es möglich nach Zugabe von

¹ http://www.onmeda.de/lexika/anatomie/herz_anatomie-physiologie

² Daten erhalten von Jan Wenzel, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität zu Lübeck

Pharmaka Veränderungen zu erkennen und Vergleiche zwischen verschiedenen Proben zu ziehen.

1.3. Anatomische und physiologische Grundlagen der Herzfunktion

Für die Entwicklung eines human analogen Herzmodells aus Organen oder Zellen anderer Spezies ist das Verständnis über den Aufbau und die Unterschiede des Herzens der verwendeten Wirbeltiergruppen von Bedeutung. Das Herz ist in allen Wirbeltiergruppen ein Hohlorgan, dessen Funktion in der Aufrechterhaltung der Blutzirkulation besteht. Allerdings bestehen bei den verschiedenen Wirbeltieren Unterschiede im Aufbau des Herzens.

Das Herz der Säugetiere und Vögel ist am höchsten entwickelt und setzt sich aus zwei Teilen zusammen. Die rechte Herzhälfte pumpt das Blut in den Lungenkreislauf, die linke Herzhälfte befördert das Blut durch den Körperkreislauf. Bei diesen beiden Wirbeltiergruppen besteht das Herz aus zwei Kammern (Ventrikel) und zwei Vorhöfen (Atrium, Pl: Atria).

Im Gegensatz zu dem Herz der Säugetiere und Vögel ist die Trennung des Reptilienherzens noch unvollständig. Das sauerstoffreiche Blut ist mit dem sauerstoffarmen Blut vermischt, da das Herz nicht vollständig durch eine Scheidewand geteilt ist. Eine Ausnahme bilden die Krokodile, bei denen die Ventrikel vollständig getrennt sind.

Das Herz der Amphibien ist im Vergleich zu den bisher genannten Tiergruppen geringer entwickelt. Amphibien verfügen über ein Herz mit zwei separaten Atria und einem einheitlichen Ventrikel ohne Scheidewand.

Das Herz der Fische ist unter den Wirbeltieren am einfachsten gebaut. Es besteht nur aus einem dünnwandigen Atrium und einem dickwandigen muskulösen Ventrikel. Die Klappe zwischen diesen beiden Bereichen verhindert den Rückstrom des Blutes.

1.3.1. Aufbau der Herzmuskelfaser

Im Detail zeigt sich, dass trotz der unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften das Herz aller Vertebraten ein quergestreifter Muskel ist. Die Muskelfasern des Vertebratenherzens sind in Sarkomere unterteilt (Abbildung 3). Ein Sarkomer wird durch zwei Z-Scheiben begrenzt, an welche jeweils dünne Aktinfilamente gebunden sind. Zwischen den Aktinfilamenten befinden sich die dickeren Myosinfilamente. In der H-Zone befinden sich nur Myosinfilamente, welche in

der M-Linie (Mitte eines Sarkomers) zentriert sind. Im Gegensatz dazu sind in der I-Bande (I: isotrop) nur Aktinfilamente vorhanden. Weiterhin befindet sich in jedem Sarkomer ein Areal, in dem Aktin und Myosin zusammentreffen - die A-Bande (A: anisotrop).

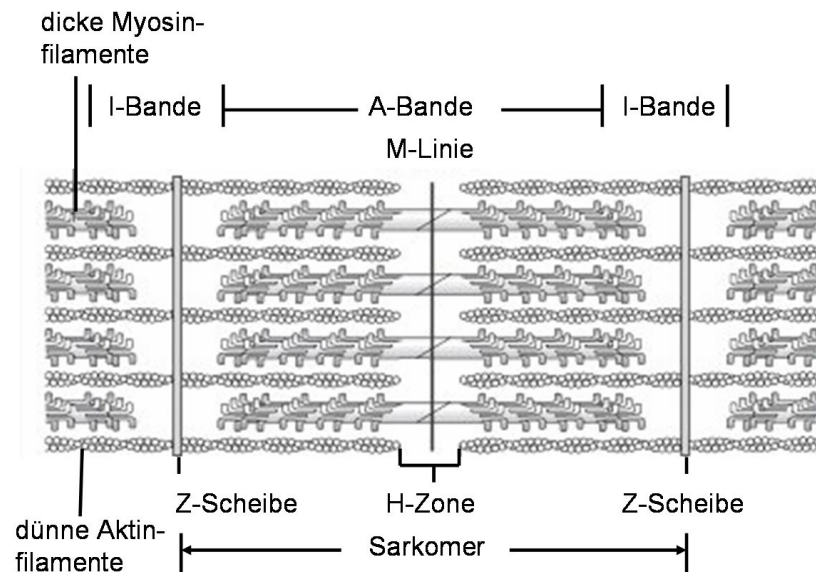


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Sarkomers

Quelle: <http://www.wissenschaft-online.de/>; modifiziert

Das Myosinfilament besteht aus ca. 200 länglichen Myosinmolekülen, die spiralförmig umeinander gedreht sind. Die Schwanzteile der Moleküle bilden zusammen den Körper des Myosinfilaments. Die nach außen ragenden Myosinköpfe stellen die für die Kontraktion wichtigen Querbrücken dar. Während der Kontraktion verbinden sich die Querbrücken mit den Aktinfilamenten und ziehen diese in Richtung der Sarkomermitte.

Aktin ist eines der am höchsten konservierten Proteine, da es in fast allen eukaryotischen Organismen vorkommt. In allen Vertebraten kommen drei Gruppen von Aktin-Isoformen vor, α , β und γ . Im Herzen ist das kardiale α -Aktin von Bedeutung, welches ein Hauptbestandteil des kontraktiven Apparates ist. α -Aktin ist an α -Aktinin gekoppelt, welches in der Z-Scheibe des Sarkomers lokalisiert ist. Das Aktinfilament besteht aus kugelförmigen Aktinmolekülen (globuläres oder G-Aktin), die sich zu zwei Spiralen (filamentären oder F-Aktinmolekülen)

zusammenlagern. Auf den Aktinmolekülen sind die Regulatorproteine Troponin und Tropomyosin aufgelagert (Abbildung 4).

Troponin, welches wie beschrieben dem G-Aktin angelagert ist, ist ein Proteinkomplex aus drei Untereinheiten. Troponin T stellt die Verbindung zum Troponin-Tropomyosin-Komplex her. Troponin I bindet an Aktin und hemmt die Bindung von Myosin an Aktin während der Ruhephase. Troponin C bindet die während eines Aktionspotentials eintretenden Calciumionen (Abbildung 4), (Hick & Hick 2009). Dadurch wird eine Konformationsänderung hervorgerufen und die oben erwähnten Myosin-Querbrücken binden während der Kontraktion an G-Aktin.

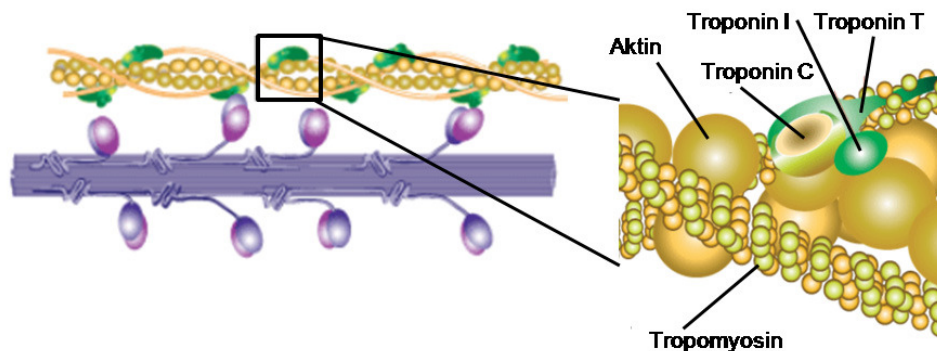


Abbildung 4: Darstellung des Aktin-Troponin-Komplexes

Quelle: <http://www.sigmaaldrich.com>; modifiziert

1.3.2. *Disci intercalares* (Glanzstreifen)

Eine Besonderheit der Herzmuskelzellen in Vertebraten sind die Verzweigungen und Verbindungen der einzelnen Herzmuskelzellen über Glanzstreifen (lat.: *Disci intercalares*).

Es konnte nachgewiesen werden, dass mono- und binukleäre spontan, autonom und rhythmisch kontrahierende Kardiomyozyten während der embryonalen Herzentwicklung aus Vorläuferzellen der Epithelzellschicht stammen (Pieperhoff et al. 2008). Die Kardiomyozyten weisen daher einige typische Strukturen und Moleküle des Epithels, wie spezielle Zellverbindungsproteine, auf. Diese Zellverbindungsproteine zwischen den einzelnen Herzzellen sind in ihrer molekularen Anordnung sehr komplex und speziell. Bei den Zell-Zell-Verbindungen werden drei große Gruppen unterschieden: Versiegelnde Verbindungen im Interzellularraum (*Tight Junctions*),

Ankerverbindungen, (Anheftstellen für Aktinfilamente (u. a. Adhäsionsverbindungen), die Anheftstellen für Intermediärfilamente (u. a. Desmosomen)) und die kommunizierenden Verbindungen (u. a. gap junctions). Nahezu alle Strukturen der Zellverbindungsproteine sind als Glanzstreifen, zusammengefasst. Glanzstreifen sind somit Membranareale und umfassen u. a. die desmosomalen Proteine sowie auch die Adhäsionsverbindungen bzw. Streifendesmosomen (lat.: *fascia adhaerens*) (Borrmann et al. 2006, Franke et al. 2006, Pieperhoff et al. 2008). Desmosomale Proteine sind für die Stabilisierung des Zellverbandes zuständig. Zu den desmosomalen Proteinen gehört u. a. Desmoplakin, welches die Keratinfilamente verankert. Die Streifendesmosomen sind großflächige, unregelmäßig begrenzte, äußerst stabile Haftkomplexe zwischen den Kardiomyozyten. Zu den Komponenten der Streifendesmosomen gehören u. a. N-Cadherin und β -Catenin.

Weiterhin enthalten Glanzstreifen zur Impulsübertragung gap junctions, über die Kardiomyozyten miteinander elektrisch gekoppelt sind. Das Aktionspotential (Kapitel „1.4.1. Aktionspotential“) kann sich so über das Herz ausbreiten. Gap Junction ermöglichen den Austausch von geladenen Molekülen, wie organischen und anorganischen Ionen, und ungeladenen Substanzen. Gap Junctions sind feine, aus Connexinen aufgebaute Kanälchen, welche die Zellmembranen zweier Nachbarzellen durchziehen und somit eine direkte Kommunikation der Zellen untereinander ermöglichen. Die Zellen werden so zu einem funktionellen Synzytium verbunden (Abbildung 5).

Herzzellen von Mammalia und nicht-Mammalia unterscheiden sich wie folgt: Im Herz der Mammalia sind desmosomalen Proteine und Streifendesmosomen kolokalisiert (Abbildung 5a). Im Herzen der nicht-Mammalia liegen diese beiden Strukturen der Glanzstreifen in wechselseitiger Lokalisation vor (Abbildung 5b).

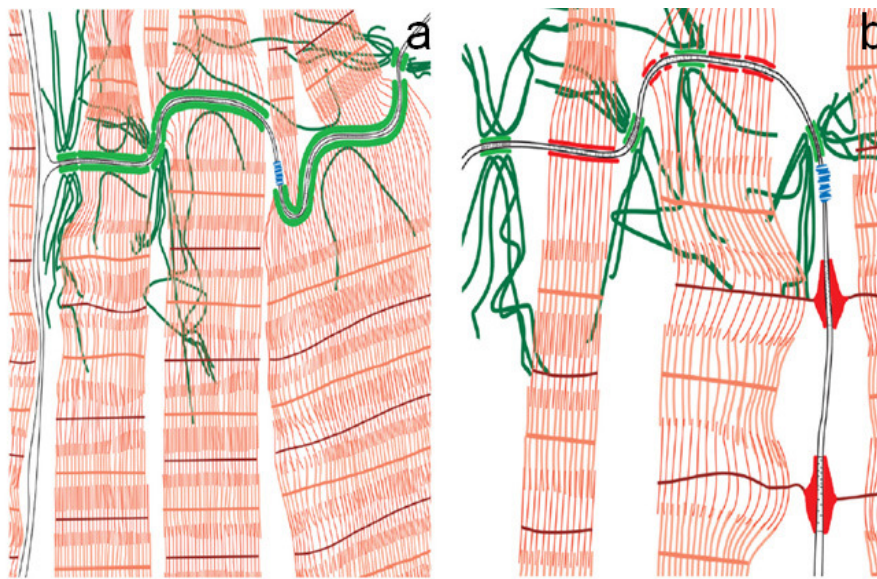


Abbildung 5: Glanzstreifen und laterale Verbindungen in (a) Mammalia und (b) nicht-Mammalia.

(a) Dominanz von Kolo-kalisation von desmosomalen Proteinen und Streifendesmosomen (hellgrün). (b) Dominanz von wechselseitigen Lokalisationen von desmosomalen Proteinen (hellgrün) und Streifendesmosomen (rot), desmosomale Filamente (desmin-reiche; dunkelgrüne); Aktin-reiche Filamente (rosa); Myosin-reiche Filamente (orange); orange Bande: M-Linie; blau: gap junctions. Die Streifendesmosomen haben meist Kontakt zu den Sarkomeren. Z-Linien (dunkelrot) und Intermedärfilamente scheinen mit den desmosomalen Proteinen verankert. (Quelle: Pieperhoff et al. 2008)

1.3.3. Schrittmacherzellen

Herzmuskelzellen bedürfen wie alle Muskelzellen eines Impulses von außen, um ein Aktionspotential (AP) auszubilden. Anders verhalten sich Schrittmacherzellen, die sich aufgrund besonderer Eigenschaften von Herzmuskelzellen unterscheiden. Schrittmacherzellen verändern eigenständig ihre Membranpermeabilität und lösen somit autonom ein AP aus. Dieses AP überträgt sich auf die gesamten umgebenen Kardiomyozyten. Das Hauptzentrum der Schrittmacherzellen befindet sich bei Säugetieren und Fischen im Sinusknoten des Herzens. In beiden Tiergruppen gibt es noch zwei weitere Schrittmacherzellareale, den Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) und das Purkinje-System (Burggren & Keller 1997).

Spontanes Aktionspotential wird durch eine komplexe Koordinierung zwischen verschiedenen Typen von Ionenkanälen und Iontentransportern auf Calcium, Kalium und Natriumbasis ausgelöst, die z. T. sehr spezifisch für Schrittmacherzellen sind (Mangoni & Nargeot 2008). Einer

der wichtigsten Ionenkanaltypen in Schrittmacherzellen sind die Membranhyperpolarisations-aktivierten und durch zyklische Nukleotide gesteuerten Kanäle (HCN=hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gates). Diese Kanäle gehören zu einem schrittmacherspezifischen Strom, dem I_f (f.: „funny“). Dieser Strom ist für die Einleitung einer spontanen Depolarisation verantwortlich (Aktories 2009). Welche direkte Rolle die HCN-Kanäle in der kardialen Physiologie und der Autonomie des Herzens spielen, ist allerdings bisher eine offene Frage (Xu et al. 2010).

Die HCN-Ionenkanalfamilie hat vier bekannte Subtypen, die in einer Vielzahl von Geweben an der Regulation des Membranpotentials beteiligt sind (Stieber et al. 2003, Robinson & Siegelbaum 2003, Stieber et al. 2004). Speziell im Sinusknoten, dem eigentlichen Schrittmacherzentrum des Säugetierherzens, wurde eine starke Expression des Subtyps Nummer vier, dem HCN4, gefunden (Ishii et al. 1999, Stieber et al. 2003, Xu et al. 2010). Daraus lässt sich schließen, dass HCN4 ein schrittmacherspezifischer Kanal im Herzen ist (Xu et al. 2010). Da die Schrittmacherzellen des Sinusknotens den gesamten Herzmuskel zum Aktionspotential anregen, müssen spezielle gap junction Proteine vorhanden sein, die die Weiterleitung des APs von den Schrittmacherzellen des Sinusknotens in das umgebende Myokard garantieren. Yamamoto et al. (1998) beschrieben, dass die gap junctions, die für die Weiterleitung des APs verantwortlich sind, im Sinusknoten nur in geringer Anzahl auftreten. Unabhängig von der Anzahl und Größe der gap junctions, ist es vor allem die Art des gap junction Proteins, das die Einzigartigkeit der Schrittmacherzellen ausmacht. Coppen et al. (1999) untersuchten die Connexine (Cx) 43 und 45. Beides sind gap junction Proteine des Herzens, welche die Kardiomyozyten miteinander verbinden. Es zeigte sich, dass das gap junction Protein Cx 43 nur im Myokard vorkommt, Cx 45 hingegen nur im Sinusknoten, dem Zentrum der Schrittmacherzellen. Somit konnte für Cx 45 eine Spezifität für Schrittmacherzellen nachgewiesen werden. Studien offenbarten, dass die Ionenselektivität und auch die molekulare Permeabilität von Cx 45 im Vergleich zu dem im Myokard vorkommenden Cx 43 verschieden ist (White et al. 1995, White & Bruzzone 1996, Gros and Jongsma 1996). So weist Cx 45 eine niedrige Leitfähigkeit, eine starke Spannungsabhängigkeit sowie eine sehr stark selektive Permeabilität auf, wodurch eine langsame Erregungsleitung verursacht wird (Veenstra et al. 1996) und APs nur mit einer Verzögerung in das umgebende Myokardium weitergeleitet werden können.

1.4. Kardiale Aktivität

Das Aktionspotential definiert sich als die vorübergehende Änderung des Ruhemembranpotentials (RMP - gemessene Potential der Zelle im Ruhezustand), das ein spezielles Schwellenpotential überschreitet.

Das AP unterscheidet sich bei den verschiedenen erregbaren Strukturen (Schrittmacherzellen, unterschiedliche Ventrikel- und Atriumschichten und Purkinje-Fasern) des Säugetierherzens in Verlauf und Form (Balatí et al. 1998, Antzelevitch et al. 2001). Auch für Fische wurden Unterschiede in den Aktionspotentialen bei den verschiedenen erregbaren Strukturen beschrieben, wobei hier hauptsächlich auf das Atrium und das Ventrikel eingegangen wurde (z. B. Haverinen & Vornanen 2006).

In den folgenden zwei Kapiteln wird zum Einen die Entstehung des APs (Kapitel „1.4.1. Aktionspotential“) und zum Anderen des Feldpotentials (FP) (Kapitel „1.4.2. Feldpotential“) bei einem Säugetierherzen erklärt.

1.4.1. Aktionspotential

Das AP kann durch eine Einzelzellmessung mit Hilfe einer intrazellulären Ableitung bestimmt werden. Bei dieser Messung kann an dem Ausschlag des AP Form und Dauer der einzelnen AP-Phasen bei einer Zelle ermittelt werden.

Für die Entstehung eines AP sind diverse Ionenströme (I) verantwortlich. Aufgrund der Komplexität der Ionenströme werden in diesem Kapitel nur die wichtigsten Ionenströme des Atriums beschrieben.

Die Grundlage für die Entstehung eines APs liegt in den Ionenpumpen der Herzzellmembran. Diese schaffen im Zellinneren eine hohe Kaliumkonzentration und im extrazellulären Raum eine hohe Natriumkonzentration. Da die Membran für Ionen selektiv permeabel ist, kann Kalium über offene Kaliumkanäle die Zellmembran passieren. Für andere Ionen, wie z. B. Natrium ist die Zellmembran impermeabel, so dass keine positiven Natriumionen in das Zellinnere gelangen können. Daher entsteht im Zellinneren ein negatives Ruhemembranpotential, das im Wesentlichen dem Gleichgewichtspotential für Kalium entspricht. Durch die Öffnung spannungsgesteuerter (z. B. durch APs) sowie auch ligandengesteuerter (z. B. chemische Synapse) Ionenkanäle ändert sich das Membranpotential.

Der Zeitverlauf des AP wird in fünf Phasen unterteilt (Abbildung 6a). Die Depolarisation der Herzmuskelzelle (Phase 0) erfolgt durch eine schnelle und kurze Öffnung spannungsabhängiger Natriumkanäle. Voraussetzung für diesen Vorgang ist ein elektrischer Reiz, der das Schwellenpotential (human bei: -60 mV) erreicht, und somit dem Kaliumstrom (I_{K1} - „inward rectifying“) übertrifft. Dieser Natriumioneneinstrom wird nach maximal 5 ms inaktiviert. In Phase eins, in der sich die Natriumionenkanäle in einem inaktiven Zustand befinden, wird das Potential durch Kaliumauswärtsströme (I_{to} - „transient outward“) teilweise repolarisiert. Durch diesen Vorgang werden einwärtsgerichtete L-Typ-Calciumkanäle geöffnet. Aufgrund der langen Aktivierung dieses Kanals entsteht die charakteristische Plateauphase, da Calciumionen aus intrazellulären Speichern (Sarkoplasmatisches Retikulum) in das Zytosol einströmen. Während dieser Plateauphase sind die depolarisierenden Calciumströme (I_{Ca}) und die repolarisierenden gleichrichtenden Kaliumströme ($I_{Kr/s}$; r=rapid, s=slow) gleich groß. In Phase drei werden die Calciumkanäle inaktiviert, so dass aufgrund der alleinigen Aktivität von I_{Kr} und I_{Ks} die Repolarisation beginnt. Ein vermehrter Ausstrom von Kaliumionen in den Extrazellularraum liegt vor. In Phase vier, dem Ruhemembranpotential, sind nur die einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle (I_{K1} - „inward rectifying“) aktiv. Bei diesem Kanaltyp verhindert eine Blockade der intrazellulären Kanalöffnung durch positiv geladene Moleküle einen depolarisierenden Ausstrom von Kaliummolekülen in den Extrazellularraum. Extrazelluläre Kaliumionen können hingegen den Kanal passieren. Diese I_{K1} -Kanäle transportieren Kalium daher überwiegend ins Zellinnere, bis wieder ein Potential von -90 mV aufgebaut ist (Aktories et al. 2009).

Die hier aufgeführten Ionenströme sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Aktionspotential (AP) generierende Membranströme

Strom	Beschreibung	AP-Phase
AP einwärtsgerichtete Stromkanäle		
I_{Na}	Natriumstrom	Phase 0
$I_{Ca, L}$	Calciumstrom, L-Typ	Phase 2
$I_{Ca, T}$	Calciumstrom, T-Typ	Phase 2
AP auswärtsgerichtete (K^+) Kanäle		
$I_{to, f}$	Transienter Auswärtsstrom, schnell (fast)	Phase 1
$I_{to, s}$	Transienter Auswärtsstrom, langsam (slow)	Phase 1
I_{Kr}	Verzögerter Gleichrichter, schnell (rapid)	Phase 3
I_{Ks}	Verzögerter Gleichrichter, langsam (slow)	Phase 3
I_{K1}	Einwärtsgerichteter Gleichrichter	Phase 3, 4
I_f	Funny Strom bzw. Schrittmacherstrom	Phase 4

1.4.2. Feldpotential

Eine Form der extrazellulären Ableitung des Herzens stellt z. B. das Elektrokardiogramm (EKG) dar. Bei dieser Methode handelt es sich um die Summe aller elektrischer Aktivitäten (Feldpotential) im Herzzellverband. Es sind die Ströme, die bei der Erregungsbildung (Depolarisation) und der Erregungsrückbildung (Repolarisation) entstehen. In Abbildung 6b ist ein EKG eines humanen Herzens abgebildet. Bei dieser Darstellung handelt es sich um die „Normalform“ des EKG.

In der typischen EKG-Ableitung befinden sich Ausschläge nach oben und unten, die je nach Form Zacken bzw. Wellen genannt werden. Die Erregung beginnt am Erregungszentrum des Herzens, dem Sinusknoten. Dieser liegt an der Herzbasis des rechten Atriums. Von dort lösen spezialisierte Schrittmacherzellen kontinuierlich Aktionspotentiale aus, die über das ganze Herz geleitet werden und die Herzkontraktion auslösen. Die Erregung im humanen Herz verläuft somit vom Sinusknoten über die Atria und den AV-Knoten in die Ventrikel. Die Erregungsausbreitung über beide Atria spiegelt sich in der P-Welle wieder. Etwa 100 Millisekunden später folgen die QRS-Zacken als Zeichen der Erregungsausbreitung in beiden Ventrikeln. Die Rückbildung der Erregung in den Ventrikeln ist als T-Welle erkennbar.

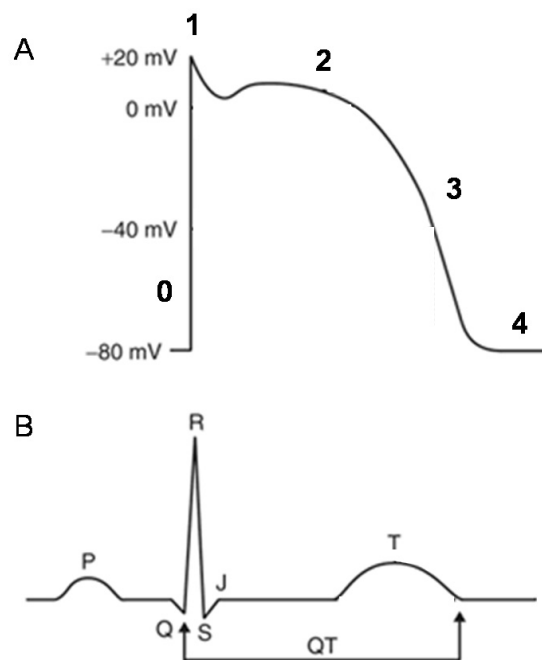


Abbildung 6: intrazelluläre Ableitung via scharfer Elektrode und Feldpotential via EKG beim menschlichen Herz

(a) Aktionspotential einer Kardiomyozyte des Atriums mit der Gliederung in Phase 0 bis 4; (b) „Normalform“ des EKGs

Quelle: <http://media.wiley.com/>; modifiziert

1.5. Methoden zur Messung kardialer Aktivität

Die Messung der Ionenströme und somit die Messung der elektrophysiologischen Eigenschaften bzw. der Bioelektrizität ermöglicht Veränderungen in den Strömen und somit Krankheitsbilder zu erfassen. Die Grundlage der Bioelektrizität beruht auf der Wanderung elektrischer Ladungen durch die Zellmembran. Die Bioelektrizität geht aus der ungleichen Verteilung verschiedener Ionen zwischen dem Zellinneren und dem Zelläußeren hervor. Diese Verteilung wird durch diverse Ionenkanäle, Iontentransporter bzw. Ionenpumpen verändert. Die Veränderungen stellen APs bzw. FPs dar.

Zur Registrierung dieser elektrischen Aktivität von Zellen (Muskelzellen sowie auch Nervenzellen) wird in der Forschung eine Vielzahl von Methoden verwendet. Bei diesen Methoden geht es hauptsächlich um Messungen der Spannungsänderung bzw. Messung von elektrischen Strömen. Zur direkten Messung elektrischer Vorgänge werden hinsichtlich ihres Ableitortes zwei Methoden unterschieden: die intrazelluläre und die extrazelluläre Ableitung. In beiden Fällen gibt es mehrere Methoden für die Analyse elektrophysiologischer Eigenschaften.

Für intrazelluläre Ableitungen wird z. B. eine scharfe Elektrode (Hubel & Wiesel 1959) verwendet (Kapitel „1.5.1. Intrazelluläre Signalableitung“). Die Messung der extrazellulären Ableitungen erfolgen u. a. mittels Multielektrodenarray (MEA) (Kapitel „1.5.2. Extrazelluläre Signalableitung“).

1.5.1. Intrazelluläre Signalableitung

Im Gegensatz zu extrazellulären Ableitungen können mit intrazellulären Ableitungen Transmembranpotentiale gemessen werden. Intrazelluläre Ableitungen besitzen den Vorteil, dass die Elektrode direkt in die zu untersuchende zelluläre Struktur eindringt. Dadurch können das Membranpotential sowie die beteiligten Ionenströme direkt gemessen werden. Ein klassischer Ansatz der intrazellulären Ableitung wird mit einer scharfen Mikroelektrode (Glaspipette) durchgeführt. Dafür wird die Spitze der Elektrode mit einer Elektrolytlösung gefüllt. Diese Lösung weist dabei eine ähnliche Ionenzusammensetzung wie die intrazelluläre Flüssigkeit der Zelle auf, z. B. Kaliumchlorid. Die Pore der Mikroelektrode ist zudem so klein, dass ein Ionenaustausch zwischen der intrazellulären Flüssigkeit und der Elektrolytlösung sehr gering ist. Nach Eindringen der gefüllten Mikroelektrode in eine Zelle kann das Membranpotential der Zelle durch Messung der Spannung zwischen der Ableitelektrode (Messung des Zellinneren) und einer Referenzelektrode im Medium (Messung des Zelläußeren) bestimmt werden. Für die Methode der scharfen Elektrode gilt, je kleiner die Elektrodenspitze, desto höher ihr elektrischer Widerstand. Daher basiert diese Methode auf Kompromissen. Die Elektrode muss klein genug sein, um in die Zelle mit einem minimalen Schaden einzudringen. Aber der Widerstand muss klein genug sein, um zwischen dem Transmembranpotential und dem Hintergrundrauschen unterscheiden zu können.

1.5.2. Extrazelluläre Signalableitung

Bei extrazellulären Ableitungen positioniert man die Elektroden oder Glaspipetten nahe an der Zelle und misst das elektrische Feldpotential in der Nähe der Zellmembran. Die extrazelluläre Signalableitung von kardialen Zellen mit Hilfe eines MEAs erlaubt die simultane Detektion der Aktivität an mehreren Stellen eines Zellnetzwerkes. Die Metallelektroden sind über die Extrazellulärflüssigkeit an die Änderungen des Membranpotentials gekoppelt. Diese Systeme aus

Metallelektroden und Dünnschichtleiterstrukturen auf einem Glassubstrat wurden erstmals von Gross et al. (1977) entwickelt.

Durch das MEA kann zum Einen mit geringem manuellem Aufwand ein schneller Zugriff auf die Messparameter erfolgen. Zum Anderen kann eine hohe Informationsdichte erhalten werden. Die Aktivität bzw. die Reaktion einzelner Kardiomyozyten kann im Verhältnis zum gesamten Zellaggregat ermittelt werden. Ein weiterer Vorteil dieser Messmethode gegenüber intrazellulären Ableitungen liegt in dem nicht-invasiven Eingriff, da die Zellmembran nur nahe an eine planare externe Elektrode gebracht wird. Die Möglichkeit zur Langzeitmessung ist ein Vorteil dieser Methode. Bei den elektrischen Signalen handelt es sich um elektrische Feldpotentiale. Der Gesamtstrom muss durch die Elektrolytschicht zwischen Zelle und Elektrode gelangen und erzeugt an der Elektrode eine Spannung (Fromherz 2002). Das extrazelluläre Aktionspotential wird als Spike bezeichnet. Im Gegensatz zur intrazellulären Ableitung, die eine direkte Messung der Ionenströme durch die Zellmembran ermöglicht, gestaltet sich die Interpretation der Form der Spikes schwieriger. Determinanten der elektrischen Ladungsverteilung und des Leitvermögens der Herzzellen sind Zelldimension bzw. Zellgeometrie, Zellverbindung zur Elektrode und Zell-Zell-Verbindung durch gap junctions (Kehat et al. 2002).

1.6. Pharmakologische Untersuchung

Es wurde bereits über die Häufigkeit von Herzkrankheiten und die Notwendigkeit neuer Behandlungsmethoden zur Reduzierung von Todesfällen berichtet (Kapitel „1.1. Klinischer Hintergrund“). Des Weiteren wurde auf die Bedeutung diverser *in vitro* Modelle für die Untersuchung von Herzkrankheiten eingegangen (Kapitel „1.2.1. *In vitro* Modellsysteme“ & „1.2.2. Ichthyologische Modellsysteme“). Vorteil dieser *in vitro* Modelle ist neben den bereits erwähnten (z. B. die Absenz von endogenen Einflüssen) auch die Reduzierung von Tierversuchen. Die vom Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) vorgelegten Tierversuchszahlen für Deutschland zeigen trotz der Verfügbarkeit von *in vitro* Modellen einen kontinuierlichen Anstieg. So stieg die Anzahl der Versuchstiere im Jahr 2008 von 2,69 Millionen auf 2,79 Millionen im Jahr 2009. Das entspricht einer Steigerung um 100.000 Tiere bzw. 3,5 Prozent. Im Jahr 2009 wurden 1,88 Millionen Mäuse (67%), mehr als 514.000 Ratten (18%), rund 146.000 Fische (5%), etwa 106.000 Vögel, 2.313 Affen, 793 Katzen,

3.832 Hunde und ca. 100.000 Tiere vieler weiterer Tierarten verwendet (www.aerzte-gegen-tierversuche.de).

Bei der Medikamententestung im pharmazeutischen Bereich dienten im Jahr 2009 rund 86 % aller durchgeführten Tierversuche zur Überprüfung von Pharmaka (www.vfa.de). Zu den vorgeschriebenen Versuchen gehören zum Einen die Prüfung auf Qualität, zum Zweiten die auf Wirksamkeit und zum Dritten die Unbedenklichkeitsprüfung des Arzneimittels. Weitere Versuche sind notwendig, um neue Therapieansätze oder grundlegende medizinische Zusammenhänge erforschen zu können (www.vfa.de). Einige dieser Versuche könnten statt im Tierexperiment auf Zellebene durchgeführt werden, da Zellen im Gegensatz zu einem vollständigen Organismus schneller und sensitiver auf Veränderungen reagieren.

Die Umsetzung der "3-R-Regel" (Reduce, Refine, Replace) ist ein Ziel in der naturwissenschaftlichen und medizinischen Forschung. Sie wurde 1959 von den britischen Wissenschaftlern W. M. S. Russel und R. L. Burch in "The Principles of Humane Experimental Techniques" erstmals formuliert. Zielsetzung dieser Arbeit ist eine verminderte Anzahl benötigter Tiere („Reduce“), die Optimierung angewandter Methoden („Refine“) bis hin zur Schaffung alternativer Methoden zum Ersatz von Tierversuchen („Replace“). Bereits Ende der 90er Jahre wurde über die Abschaffung von Tierversuchen und die Einführung von Testsystemen auf Zellbasis berichtet (U.S. Environmental Protection Agency, 1998). Die oben aufgeführten Zahlen zeigen jedoch, dass dieses Ziel nicht ausreichend umgesetzt wurde.

Ein Überblick über derzeitige weltweit benutzte Testmodelle ist auf www.Go3R.org einsehbar. Es konnte in der kardialen Physiologie bisher kein geeignetes zelluläres System und somit auch kein Hochdurchsatzsystem, wie es in dieser Arbeit entwickelt wurde, als Alternative zum Tierversuch etabliert werden. Dennoch hätten *in vitro* Systeme laut Davisson (2008) eine Reihe von Vorteilen gegenüber Tierversuchen. Diese sind:

Zuverlässigkeit: Studien mit Zell- und Gewebekulturen bringen gut reproduzierbare und eindeutige Ergebnisse. Es kann ausschnitthaft ein ganz spezieller Einfluss oder eine spezielle Veränderung untersucht werden, während im Tierversuch üblicherweise der Gesamtvorgang beurteilt wird.

Empfindlichkeit: *In vitro* Testsysteme reagieren empfindlicher auf medikamentöse Einflüsse als lebende Tiere.

Kosten: Studien mit Zellkulturen sind, wenn sie etabliert sind, deutlich billiger als Tierversuche.

Dauer: Studien mit *in vitro* Systemen können Ergebnisse im Verlauf von Stunden generieren, während tierexperimentelle Studien Wochen, Monate oder gar Jahre dauern können.

Anzahl: Mit *in vitro* Systemen lässt sich eine große Anzahl von Pharmaka parallel untersuchen, während mit tierexperimentellen Systemen die Möglichkeiten zahlenmäßig begrenzt sind.

Um das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Modell in der Herzforschung einzusetzen, muss die kardiale Physiologie und die Reaktion auf etablierte Medikamente untersucht werden. Derzeitige auf dem Markt vorkommende Testmodelle bestehen zu großen Teilen aus murinen Modellen. Da ihre kardiale Physiologie sich von der des Menschen unterscheidet, sind diese Modelle für bestimmte Fragestellungen nicht geeignet. Dies zeigt sich vor allem darin, dass beim Testen von Medikamenten in Maus oftmals andere Reaktionen als Menschen auftreten (www.vfa.de).

Mit Hilfe von Medikamententests kann die Existenz spezifischer Ionenkanäle untersucht und zugleich die Reaktion auf das Medikament aufgezeigt werden. So wurden in dem in dieser Arbeit etablierten kardialen Modell Herzmedikamente getestet, welche für Menschen etabliert sind. Mit diesen Medikamenten kann die Sensitivität des Modells sowie die Veränderung der elektrophysiologischen Aktivität der SCC nachvollzogen werden.

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Als Ergebnis bereits existierender Studien wurde festgestellt, dass bisherige auf dem Markt vorhandene *in vitro* Testsysteme weder stabil noch reproduzierbar und nicht praktikabel genug sind, um diese in der Pharmakologie als Hochdurchsatzsystem für die Medikamentenforschung anzuwenden. Ebenfalls kommt es zur Beeinträchtigung dadurch, dass deren physiologischen Eigenschaften nicht dem des Menschen ähneln. Ziel dieser Arbeit ist es daher, ein neues *in vitro* Testsystem für die Herzforschung zu entwickeln.

→ Das Modellsystem soll aus Fischzellen bestehen, da Fisch bereits mehrfach als geeignetes Modelltier für die humane Herzforschung beschrieben wurde. Es werden Zellen der Regenbogenforelle, die als Fisch von hohem wirtschaftlichem Interesse bekannt ist und mit dem sich bereits viele Arbeitsgruppen beschäftigen (z. B. Nurmi & Vornanen 2002, Nickerson et al. 2002; Fritsche 1990, Shiels et al. 2006), verwendet.

→ Das zentrale Ziel dieser Arbeit ist es spontan kontrahierende Kardiomyozytenverbände ohne Differenzierungsfaktoren, Ko-Kultursysteme bzw. elektrische Stimulatoren zu etablieren. Das Testsystem soll jederzeit und von jeder Person hergestellt werden können. Außerdem soll das Modell ein hohes Bildungspotential aufweisen, reproduzierbar sein und auf 3D-Zellverbänden basieren, um die Reaktion auf Medikamente in der Zellverbandebene analysieren zu können.

→ Die Kardiomyozyten sollen eine stabile und rhythmische Langzeitkontraktion aufweisen. Ferner sollen die Zellen in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften den der humanen Kardiomyozyten ähneln, um diese als Modell in der humanen Herzforschung einzusetzen.

→ Schließlich soll präsentiert werden, dass das kardiale Modell neben der Pharmakologie auch in anderen Forschungsbereichen, wie z. B. der Regenerationsbiologie Anwendung finden kann.

II. Material

2.1. Chemikalien

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Roth, Karlsruhe, Dt.
Araldite	Fluka, Buchs, Schweiz
BSA (Bovine Serum Albumin)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Roche, Basel, Schweiz
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat)	Merck, Darmstadt, Dt.
DMSO (Dimethylsulfonat, 50%)	Roth, Karlsruhe, Dt.
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Merck, Darmstadt, Dt.
Ethanol, reinst	Roth, Karlsruhe, Dt.
Ethanol, vergällt	Roth, Karlsruhe, Dt.
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Dt.
Gelatine	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glutamin (100x)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Dt.
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Dt.
Isoproterenol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Dt.
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Dt.
KH ₂ PO ₄ (Kaliumhydrogenphosphat)	Roth, Karlsruhe, Dt.
Lysispuffer ReagentA100	Chemometec, Allerød, Dänemark
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Merck, Darmstadt, Dt.
MgSO ₄ (Magnesiumsulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dt.
MS222 (Methanol Ethyl-3-Aminobenzoat Methansulfonsäure, 98%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dt.
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt, Dt.
Na ₂ HPO ₄ (Natriumhydrogenphosphat)	Roth, Karlsruhe, Dt.
Ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt, Dt.
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Dt.

Penicillin/Streptomycin (100-fach)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Rilmakalim	Sanofi-Aventis, Frankfurt, Dt.
QIAxecl Alignment Marker (15 bp/1000 bp)	Qiagen, Hilden, Dt.
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dt.
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Biomol, Hamburg, Dt.
Triton X 100	Bio-Rad, Richmond, CA, USA
Trypsin-EDTA (10-fach)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Vectashield	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Wasser, Molecular Biology Water	Cambrex, East Rutherford, NJ, USA
Ziegennormalserum	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

2.2. Puffer und Medien

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Puffer und Medien

Puffer/ Medium	Hersteller
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 4,5 g/L Glukose	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Dt.
FKS (Fetales Kälberserum)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Größenmarker 100bp DNA Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot, Dt.
1x TE Puffer, pH 8,0	AppliChem, Darmstadt, Dt.
DPBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Dt.

2.3. Kits

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
Click-iT™ EdU Cell Proliferation Assay	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Dt.
PeqGOLD Tissue DNA Mini Kit	peqLab, Erlangen, Dt.
QuantiTect Reverse Transkription Kit	Qiagen, Hilden, Dt.
PCR-Kit Fermentas	Fermentas, St. Leon-Rot, Dt.
Dynalbeads mRNA Direct Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Dt.

2.4. Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 5: Fluoreszenzfarbstoff

Farbstoff	Hersteller	Prod.nr
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Roche, Basel, Schweiz	10236276001
Phalloidin Fluoprobes 547	Interchim, Frankreich	FP-AZ 0330

Tabelle 6: Primärantikörper

Antigen	Hersteller	Prod.nr
α -Actinin	Sigma-Aldrich, Dt.	A7732
Desmoplakin 1&2	ProGen, Dt.	651155
Troponin I	Acris, Dt.	SM1371P
β -Catenin	BD Transduction Laboratories, Dt.	610153
N-Cadherin	BD Transduction Laboratories, Dt.	6B3
HCN4	Abcam, UK	ab85023
Connexin 45	Abcam, UK	ab16588

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Antigen	Hersteller	Prod.nr
Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Maus IgG (High+Low)	Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., USA	115-165-062
Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-mouse IgG (High+Low)	Dianova, Dt.	115-095-062
Cy3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-sheep IgG (High+Low)	Dianova, Dt.	713-165-147

2.5. Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden zur spezifischen Amplifikation verschiedener DNA-Sequenzen durch PCR benutzt.

Tabelle 8: Sequenzen designer Primer

	Primer	Sequenz
Housekeeping gene		
elfa (elongation factor α)	for	agg ctg att gcg ctg tgc
	rev	ccc cat gcc aac ca gaga t
Herzmarker		
α -actin	for	ttc tct ctg ttg gcc ttg
	rev	tag gtg ggt atg ggt cag
Cx 43 (Connexin 43)	for	atg ctg gtg gtc tct ctg
	rev	ttc ata cag tgg tgg aca
myh6 (Cardiales myosin heavy chain 6 alpha)	for	gca cta cgg caa cat gag
	rev	caa tgc acc gag gga ata

Die Oligonukleotide wurden von der Biomers GmbH (Ulm, Dt.) bezogen.

2.6. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmittel

Material	Hersteller
Chamber-Slides	BD Bioscience, Bredford, MA, USA
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, Dt.
Einmalpipetten 1 ml/ 5 ml/ 10 ml	BD Bioscience, Bredford, MA, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Dt.
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe, Dt.
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Dt.
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Dt.
Skalpell	Aesculap AG & Co. KG / Braun, Tuttlingen, Dt.
Wellplatten (6 Well, 9 cm ²)	Techno Plastic Products AG Trasadingen, Schweiz

Zellkulturfalschen (25 cm ²)	Techno Plastic Products AG Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	Techno Plastic Products AG Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhren 15ml und 50 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

2.7. Geräte

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, Dt.
Bunnsenbrenner Flammy S	Schütt Labortechnik, Göttingen, Dt.
Eppendorfpipette	Eppendorf AG, Hamburg, Dt.
Heizblock	Eppendorf, Hamburg, Dt.
Laser Scanning Mikroskop	Carl Zeiss Vision GmbH, Hamburg, Dt.
Lichtmikroskop Axiovert 40CFL	Carl Zeiss Vision GmbH, Hamburg, Dt.
Mastercycler egradient	Eppendorf, Hamburg, Dt.
Multielektroden Array	Multi Channel Systems, Reutlingen, Dt.
Phillips EM 400	Phillips, Niederlande
pH Meter ph211	Hanna Instruments, Kehl, Dt.
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Dt.
Potentialverstärker SEC-05L	NPI Electronics, Hamm, Dt.
QIAxcel	Qiagen, Hilden, Dt.
Sterilbank Biowizard	Kojair Tech Oy, Vilppula, Finnland
Tischzentrifuge Micro 7	Fischer Scientific, Hampton, USA
Ultracut E	Reichert-Jung, Nussloch, Dt.
Ultrastainer	LKB, Bromma, Schweden
Verstärker EPC9	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Dt.
Vortex Charley 2	Süd-Laborbedarf, Gauting, Dt.
Vortexer: MS2 Minishaker	IKA-Werke, Staufen, Dt.
Waage Kern EW & Kern 770	Kern, Balingen, Dt.
Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Dt.
Zentrifuge 5804R	Eppendorf AG, Hamburg, Dt.

2.8. Software

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Softwares

Software	Hersteller
Axiovision Rel 4.7	Carl Zeiss Vision, Hamburg, Dt.
Chart 5	ADInstruments, Spechbach, Dt.
IGOR Pro Version 6.0	WaveMetrics Inc; Lake Oswego, USA
LSM Image Browser	Carl Zeiss Vision, Hamburg, Dt.
MCRack 3.8.0	Multichannelsystem, Reutlingen, Dt.
Microsoft Excel	Windows
Prism 4.03	GraphPad Software Inc., USA
Pulse 8.8	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Dt.
QIAxcel Biocalculator 3.0	Qiagen, Hilden, Dt.

III. Methoden

3.1. Tiermodell

Für die meisten Versuche wurden Larven der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) verwendet. Die Tiere befanden sich in den Entwicklungsstadien von Anfang „Augenpunktstadium“ bis Ende „Dottersackstadium“. Die Fische wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes gehalten (TierSchuG §1) und getötet (TierSchuG §4 und §7). Sie stammten zum Einen aus der Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei in Born/ Darß bzw. zum Anderen aus der Fischzucht Reese und wurden anschließend bis zur Tötung in den Aquarienanlagen des Fraunhofer EMBs gehalten. Dabei wurde beachtet, dass die Tiere langsam an die neue Umgebung adaptiert wurden. Sie wurden bei 7 bis 10° C gehalten. Larven anderer Arten (Tabelle 12) wurden ebenfalls langsam an die neue Umgebung adaptiert, wobei die Temperatur um maximal $\pm 2^\circ$ C von ihrer ursprünglichen Hälterungstemperatur abwich. Die Tiere stammten aus Aquakulturanlagen unterschiedlicher Standorte (Tabelle 12). Die Studie wurde vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt & ländliche Räume (Tierversuchsantragsnummer: 41/A01/09) genehmigt.

Tabelle 12: Darstellung der verwendeten Tierarten und ihren Herkunftsorten

Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei in Born/ Darß; Fischzucht Reese in Lütjenburg
Atlantischer Stör (<i>Acipenser oxyrinchus oxyrinchus</i>) Maräne (<i>Coregonus maraena</i>)	Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei in Born/ Darß
Meerforelle (<i>Salmo trutta trutta</i>)	Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei in Born/ Darß; Hvilested Lystfiskersøer, Dänemark
Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>)	v. Thünen Institut, Hamburg
Atlantischer Lachs (<i>Salmo salar</i>)	Lachs-Aufzuchtstation in Sittensen

3.2. Allgemeine Zellkulturmethoden

3.2.1. Isolation und Kultivierung von Zellen

Die Eihülle der Regenbogenforellenlarven wurde vorsichtig perforiert. Die Larve wurde fünf Minuten in einem Betäubungsbad mit 0,05 mg Methanesulfonic Acid Salt (MS222; Sigma Aldrich, Dt.) pro ml Aquarienwasser gehältert. Anschließend wurden die Larven mit Schere und Pinzette aus ihrer Eihülle isoliert. Larven im Dottersackstadium wurden direkt mit MS222 (0,05 mg/ ml Aquarienwasser) betäubt.

Die Regenbogenforellenlarven wurden in 500 µl 0,1 % Trypsin/ EDTA gelöst in DPBS (PAA Laboratories, Österreich) für 30 Sekunden bis zwei Minuten inkubiert, wobei das zuvor betäubte Tier zusätzlich mit einer Schere mechanisch zerkleinert wurde. Der enzymatische Verdau wurde gestoppt, indem das Gewebe mit einer 1000 µl Pipette (Sarstedt, Dt.) in 5 ml Zellkulturmediums überführt wurde. Das Zellkulturmedium bestand aus DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium, 4,5 g/l Glukose (Gibco, Karlsruhe), 20 % FKS - Fetales Kälberserum (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) sowie 100 U/ ml Penicillin und 0,1 mg/ ml Streptomycin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) (Tabelle 13).

Anschließend wurde die Gewebesuspension bei 130 rcf (Zentrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg) für fünf Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 2,5 ml Medium resuspendiert und die Zellsuspension jeder Larve in ein sechs-well (9 cm², Techno Plastic Products AG (TPP), Trasadingen, Schweiz) gegeben.

Larven anderer Fischarten (Atlantischer Stör, Maräne, Meerforelle, Atlantischer Lachs und Zebrafisch) wurden nach demselben Muster betäubt, getötet und die Zellen wie bei der Regenbogenforelle beschrieben in Kultur gebracht.

3.2.2. Kulturbedingungen

Die Inkubation der Zellen der Regenbogenforelle, des Atlantischen Störs, der Maräne, der Meerforelle und des Atlantischen Lachs erfolgte bei 20° C und 1,9 % CO₂. Die Zellen des Zebrafisches wurden hingegen bei 28° C und 2,5 % CO₂ Atmosphäre kultiviert.

Das Kulturmedium ist wie in Tabelle 13 beschrieben zusammengesetzt:

Tabelle 13: Zusammensetzung des Standard-Zellkulturmediums

Dulbecco's Modiefied Eagle Medium (DMEM)	395 ml
Fetales Kälberserum (FKS)	100ml
100 U/ ml Penicillin und 0,1 mg / ml Streptomycin	5ml

Der erste Mediumwechsel erfolgte zwei Tage nach Präparation. Im Folgenden wurde das Medium alle drei bis vier Tage gewechselt. Hierbei wurde das vorhandene Medium und alle nicht angewachsenen Gewebestücke und Zellen, ohne Beschädigung des Zellrasens, mit einer Pasteurpipette abgesaugt und durch die entsprechende Menge neuen Mediums ersetzt. Im Falle von Verunreinigungen durch Bakterien oder Pilzen wurden als Antibiotika Gentamycin (0,1 mg/ml; Biochrom AG, Dt.) bzw. Kanamycin (0,5 mg/ml; Biochrom AG, Dt.) sowie als Antimykotikum Amphotericin (250 µg/ml, Biochrom AG, Dt.) hinzugefügt.

3.2.3. Subkultivierung

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und vollständig durch Spülen des Zellrasens mit DPBS (Tabelle 14) beseitigt. Entsprechend der Flaschengröße wurde so viel 0,1 % Trypsin/EDTA hinzugefügt, dass der Zellkulturboden gerade mit Flüssigkeit bedeckt war. Da Trypsin bei 37° C sein Wirkungsoptimum hat, diente eine einminütige Inkubation bei dieser Temperatur dazu, die Zellen vom Zellkulturboden zu lösen. Durch vorsichtiges Klopfen gegen das Zellkulturgefäß konnten die Zellen restlos vom Boden abgelöst werden. Die enzymatische Wirkung von Trypsin wurde durch Zugabe des dreifachen Volumens an Kulturmedium gestoppt. Die Zellen wurden pelletiert (5 min bei 130 rcf) und das Pellet wurde in 5ml Kulturmedium resuspendiert und in einer kleinen Zellkulturflasche (25 cm² Techno Plastic Products AG (TPP) Trasadingen, Schweiz) ausgesät. Die in den Versuchen verwendeten Zellen der Regenbogenforelle waren Primärzellkulturen oder befanden sich in der ersten Passage. Sie wurden stets mit dem in Tabelle 13 zusammengestezten Medium kultiviert.

Tabelle 14: Zusammensetzung von DPBS in einfacher Konzentration

NaCl	32 μ M	123 g/l
KCl	76 μ m	345 g/l
Na ₂ HPO ₄	3 μ M	0,003 g/l
MgSO ₄	654 μ m	0,21 g/l
pH	7,3	

3.3. Zellkulturexperimente

3.3.1. Stereomikroskopie

Der Versuch über den Nachweis einer Neubildung von Kardiomyozyten oder der Regeneration aus *in vivo* bereits bestehenden Verbänden von Herzmuskelzellen begann nach dem ersten Medienwechsel, zwei Tagen nach der Präparation. Es wurde an drei verschiedenen Präparationszeitpunkten (290 bis 340 Tagesgrade (TG)), jeweils drei bis vier präparierte Larven überprüft. Die Einheit TG berechnet sich aus der mittleren Tagestemperatur multipliziert mit der Anzahl der Tage. Ein TG entspricht einem Tag bei 1° C und bedeutet, dass z. B. eine Larve die bei 10° C gehalten wurde nach gleicher Zeit doppelt soweit entwickelt ist wie eine bei 5° C.

Von dem Well, in dem die Zellen/ Gewebe der präparierten Larve kultiviert wurden, wurde eine Übersicht mit dem Stereomikroskop Discovery. V8 (Zeiss, Dt.) und dem Programm Axiovision Rel 4.7 aufgenommen. Die Zellkulturen wurden jeweils alle zwei bis drei Tage auf spontan kontrahierende Zellaggregate (SCC; spontaneously contracting cell aggregates) untersucht. Eine erneute Dokumentation erfolgte beim Auftreten einer spontanen Kontraktion eines Herzzellaggregates. Nach vier Wochen wurde der Versuch gestoppt. Für die Ermittlung der Ratio wurden jeweils die Mittelwerte der erhaltenen SCC genommen. Die Ratio errechnete sich aus dem Quotienten der auftretenden Aggregate und der Anzahl der präparierten Larven.

3.3.2. Berechnung der Wahrscheinlichkeit für die Bildung von SCC

Um die Ausbeute der Bildung von SCC auswerten zu können, wurden die *in vitro* kultivierten Zellen der Fischlarven alle drei bis vier Tage per Mikroskop (Axiovert 40C; Zeiss, Dt.) systematisch abgesehen. Die Aggregate wurden mit AxioVision fotografiert und mit einer Canon

Powershot A640 mit passendem Mikroskop-Adapter gefilmt. Ein Film besaß dabei eine Länge von 30 Sekunden um später die Schlagfrequenz pro Minute ermitteln zu können (3.3.5. Messung der Schlagfrequenz“). Der Beobachtungszeitraum endete, nachdem mindestens drei Wochen keine neuen SCC entstanden sind.

Für die Berechnung der Ausbeute wurde die Ratio verwendet. Für jeden untersuchten Zeitpunkt (252 TG bis 462 TG) wurden 18 Larven der Regenbogenforellen genommen (Tabelle 15). Zur Berechnung der Tagesgrade (TG), wurde von einem Alter von 210 TG bei Erhalt der Eier ausgegangen, dass dem Eintritt ins Augenpunktstadium entspricht (www.sf.adfg.state.ak.us, 2010). Die Eier wurden anschließend bei 6° C gehältert. Der Schlupf der Larven erfolgte nach ca. 350 TG. Die vollständige Dottersackabsorption war bei ca. 500 TG.

Tabelle 15: Versuchstiere für die Generierung von SCC.

Tagesgrade der präparierten Larven [TG]	Entwicklungszustand
252	Augenpunktstadium
294	Augenpunktstadium
335	Augenpunktstadium
378	Dottersackstadium
420	Dottersackstadium
462	Dottersackstadium

3.3.3. Ermittlung des Zeitraumes bis zur Bildung von SCC

Der Zeitraum von der Präparation bis zum Auftreten der Aggregate wurde ebenfalls ermittelt. Für diesen Versuch wurden 36 Larven, die sich kurz vor dem Schlupf befanden, verwendet. In der graphischen Darstellung wurde die Bildung der Aggregate in Wochen zusammengefasst. So entsprach Woche eins dem Zeitraum von Tag eins bis Tag sieben Postpräparation, Woche zwei von Tag acht bis Tag 14 Postpräparation etc.. In diesem Ergebnis spiegelt sich der Mittelwert und die daraus prozentuale Verteilung aller Aggregate wieder.

3.3.4. Messung der Aggregatsgröße

Mit Hilfe der Skalierung des Mikroskops wurde in AxioVision die Fläche, repräsentativ für die Größe, der Aggregate bestimmt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Wilcoxon-Rangsummentest und Kruskal-Wallis-Rangsummentest. Diagramme wurden mit *Microsoft Excel* erstellt.

Bei den Zellkulturen der Regenbogenforellen wurde bei sieben Aggregaten die Dicke der Aggregate bestimmt. Es wurden die Aggregate genommen, die bei der Immunfluoreszenz (siehe 3.4.1. Immunfluoreszenz) verwendet wurden. Es wurden bei jedem Aggregat an fünf verschiedenen Stellen, die nicht direkt am Rand lagen, die beiden äußersten Zellkernebenen (DAPI-Färbung) als Dicke per Laser Scanning Mikroskop (Zeiss) über die „Z-Stapel“-Funktion ermittelt. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden mit *Microsoft Excel* erstellt.

3.3.5. Messung der Schlagfrequenz

Die Ermittlung der Schlagfrequenz der Aggregate erfolgte durch Auszählung der Kontraktionen über 30 Sekunden, so dass diese auf eine Minute hochgerechnet werden konnten. Die Beobachtung erfolgte bei den SCC über den gesamten Zeitraum. In der Regel wurden alle zwei Tage bis zweimal die Woche die Aggregate für 30 Sekunden aufgenommen. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Wilcoxon-Rangsummentest und Kruskal-Wallis-Rangsummentest. Diagramme wurden mit *Microsoft Excel* erstellt.

3.3.6. Elektronenmikroskopie

Ein genauerer Nachweis für vorkommende Kardiomyozyten konnte mit der Elektronenmikroskopie (EM) geliefert werden. Die Vorbereitungen für die EM sowie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von PD. Dr. M. Klinger und seinen Mitarbeitern (Universität zu Lübeck, Institut für Anatomie) durchgeführt.

Für die Untersuchung wurden schlagende Zellaggregate von präparierten Larven im Augenpunktstadium bzw. im Dottersackstadium verwendet. Die schlagenden Aggregate, welche drei Wochen alt waren, wurden mit einem Skalpell großflächig ausgeschnitten und abgelöst. Als Kontrolle wurden Larven des Augenpunkt- und Dottersackstadiums verwendet. Die Betäubung der Larven erfolgte in einer MS222 Lösung (0,05 mg/ml Aquarienwasser) und sie wurden

anschließend mit einer Überdosis (1 mg/ml Aquarienwasser) getötet. Eine Blutzirkulation war nicht mehr sichtbar. Von den nachfolgenden Chemikalien wurde jeweils genügend zugefügt, dass die Proben vollständig bedeckt waren. Das Zellgewebe und die Tiere wurden in MONTI (2.5 % Glutaraldehyde in 0,1 M Cacodylatpuffer (CP)) für 24 h bei 4° C fixiert und für eine Stunde in PBS bei RT gespült. Alle anschließenden Inkubationsschritte fanden bei RT statt. Die Postfixierung erfolgte mit 1 % Osmiumtetroxid (OsO₄) in 0.1 M CP für zwei Stunden. Die Proben wurden im Folgenden mit Ethanol dehydriert und in Araldite (Fluka, Schweiz) eingebettet. Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 60 nm wurden mit Hilfe eines Ultracut (Reichert-Jung, Dt.) hergestellt. Die Schnittkontrastierung erfolgte mit 1 %igem Uranylazetat sowie gesättigter Bleizitratlösung in einem Ultrastainer (LKB Carlsberg System, Schweden). Am Ende erfolgte die Auswertung am Philips Elektronenmikroskop EM 400 bei 60 kV (Philips, Niederlande).

3.3.7. Regeneration und Vervielfältigung der Zellaggregate

Die Untersuchung auf Regeneration und Vervielfältigung erfolgte durch mechanische Teilung mit Hilfe eines Skalpell. Das schlagende Areal wurde dabei mittig durchtrennt. Für die Vervielfältigung wurde weiterhin ein Bereich vom Zellrasen abgelöst und in ein neues Zellkulturgefäß mittels einer Pipette überführt. Die Areale wurde im Anschluss mit der entsprechenden Menge frischen Kulturmediums versetzt und bei 20° C und 1,9 % CO₂ inkubiert.

3.3.8. statistische Auswertung der Zellkulturexperimente

Mit dem Kolmogorov-Smirnov Test wurden die Ergebnisse auf ihre Normalverteilung hin überprüft. Beim Ausschliessen einer Normalverteilung ($p > 0,05$), wurden die ermittelten Werte auf Signifikanz mit Hilfe des Kruskal-Wallis Rangsummentest überprüft. Im Falle einer Signifikanz ($p < 0,05$), wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen kontrolliert. Dafür wurde der Wilcoxon-Rangsummentest angewendet, der eine Spezialform des Kruskal-Wallis Rangsummentests ist und den signifikanten Unterschied zweier Gruppen darstellt.

3.4. Zellbiologische Methoden

3.4.1. Immunfluoreszenz

Für den Nachweis von herzspezifischen Proteinen mittels Immunocytochemie und Immunhistochemie wurden zunächst Antikörper auf ihre Spezifität bei einem Herz einer adulten Regenbogenforelle getestet. So wurde gezeigt, dass die folgenden Antikörper (Tabelle 16) bei der Regenbogenforelle spezifisch jene Herzproteine detektieren gegen die sie auch beim Menschen gerichtet sind (Pieperhoff & Franke 2008).

Tabelle 16: Antikörper

Antigen	Antiserum	Firma	Verdünnung
α -Actinin	Mouse anti- α -Actinin (Sacromeric) Clone EA-53	Sigma-Aldrich, Dt.	1:50
β -Catenin	Mouse anti - β -Catenin; Clone 14/ β -Catenin	BD Transduction Laboratories, Dt.	1:10
Connexin 45	sheep anti-connexin 45	Abcam, UK	1:10000
Desmoplakin 1&2	Mouse anti - Desmoplakin 1&2, Clone DP477	ProGen, Dt.	1:50
HCN4	Mouse anti-HCN4	Abcam, UK	1:100
Kardiales Myosin	Mouse anti - Myosin	Dianova/ABR BioReagent, Dt.	1:100
N-Cadherin	Mouse anti - N-Cadherin; Clone 32/N-Cadherin	BD Transduction Laboratories, Dt.	1:50
Troponin I	Mouse anti - Troponin I	Acris, Dt.	1:50
Mouse IgG	Cy3-conjugated AffiniPure Goat	Jackson Immunoresearch Lab. Inc., USA	1:400
Mouse IgG	Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat	Dianova, Dt	1:200
Sheep IgG	Cy3-conjugated AffiniPure Donkey	Dianova, Dt	1:400

3.4.1.1. Vorbereitung für Immunhistochemie

Das Herz als Positivkontrolle, sowie ebenfalls die Leber, Milz, Auge, Gonaden, Haut und Darm/Pankreas als negative Kontrollen einer adulten Regenbogenforelle wurde für 30 Sekunden in Isopentan inkubiert und anschließend eine Minute in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Organe wurden mit einem Kryostat (Euroimmun, Lübeck, Dt.) in 12 µm dicke Gewebestücke geschnitten. Die Gewebeschnitte wurden auf physikalisch oder chemisch aktivierte Deckgläser aufgebracht und kovalent auf der Glasoberfläche verankert. Die Deckgläser mit den aufgebrachten Organschnitten wurden in 1x1 mm große Fragmente unterteilt (BioChips™, Euroimmun, Lübeck, Dt.) und auf Testfelder von Objektträgern aufgebracht (BioChip Mosaics™, Euroimmun, Lübeck, Dt.).

In vitro generierte Herzzellaggregate wurden mit dem Skalpell aus der Zellkulturschale isoliert und in Tissue-Tec® O.C.T. (Sakura Finetek, Staufen, Dt.) eingebettet. Die Aggregate wurden bei -80° C gelagert, bis sie im Kryostat (Hm 560 MV, Microm) in 5µm dicke Fragmente geschnitten wurden. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger gebracht und in DPBS gewaschen, um das Gewebe vom umgebenden TissueTec zu befreien. Die Fixierung erfolgte mit 1 ml Methanol-Aceton (7:3, -20° C; Roth, Karlsruhe) und 1 µl DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Roche, Basel, Schweiz) zur Zellkernmarkierung pro Well (Tabelle 17). Nach einer fünfminütigen Inkubation und Kernfärbung bei Raumtemperatur erfolgte eine dreimalige Spülung mit PBS.

Tabelle 17: Zusammensetzung der Methanol/Aceton-Fixierungslösung

Methanol	70 %	70 ml/ 100 ml
Aceton	30 %	30 ml/ 100 ml
1000x DAPI Stammlösung	1µg/ ml	1/1000

3.4.1.2. Vorbereitung für Immuncytochemie

Ein Tag vor der Immunfärbung wurden die Zellaggregate mit einem Skalpell aus der Zellkultur isoliert und auf Chamber Slides™ (BD Bioscience, Bredford, MA, USA) überführt. Das Aggregat wurde über Nacht bei 20° C und 1,9 % CO₂ im Medium kultiviert.

Die Vorbereitung für die Immunfärbung der Aggregate beinhaltete das Abnehmen des Mediums und zweimaliges Spülen mit DPBS. Die Fixierung erfolgte nach demselben Protokoll wie bei der Immunhistochemie mit Methanol-Aceton (Tabelle 17).

3.4.1.3. Färbung mit herzspezifischen Antikörpern

Bei den Präparaten für die Immunhisto- und Immunocytochemie wurden die unspezifischen Bindungen durch 16,5 µl Ziegennormalserum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) gelöst in 1ml DPBS 20 Minuten bei Raumtemperatur abgeblockt.

Nach dem Absaugen der Blocklösung wurde der spezifische Erstantikörper (Tabelle 6, Tabelle 16) hinzugegeben. Die Verdünnung der primären Antikörper wurde mit TBST + 0,1 % BSA hergestellt (Tabelle 18). Die Zellen wurden nach einstündiger Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37° C dreimal mit DPBS gewaschen und danach eine Stunde bei 37° C mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Tabelle 7, Tabelle 16) gegen die Herkunftsspezies der jeweiligen Primärantikörper inkubiert.

Am Ende der Färbung erfolgte eine erneute dreimalige Spülung mit DPBS. Das Präparat wurde mit Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) konserviert und mit einem Deckglas (Menzel-Gläser, Braunschweig) abgedeckt. Die Auswertung erfolgte am Laser Scanning Mikroskop (Zeiss, Dt.), welches mit einem elektronischen Auswertesystem bestehend aus Kamera und entsprechendem Computerprogramm (LSM Image Browser) verbunden war.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Puffers TBST + 0,1 % BSA zur Verdünnung des Erstantikörpers

NaCl	150 mM	8,7 g/l
Tris	10mM	1,21 g/l
Triton-X 100	0,05 % (v/v)	0,5 ml/ l
BSA	0,1 % (v/v)	1g/ l
in Aqua dest.		
pH	8,0	

3.4.1.4. Aktinfärbung mit Phalloidin

Der Farbstoff Phalloidin (6,6 µmol/ml Methanol; Interchim, Frankreich) wurde in gebrauchsfertige Aliquotes aufgeteilt und diese, da Phalloidin lichtempfindlich ist, im Dunkeln bei -20° C aufbewahrt. Phalloidin wurde gleichzeitig mit dem sekundären Antikörper auf die Probe gegeben. Die Inkubation erfolgte somit ebenfalls eine Stunde bei 37° C. Die Probe wurde im Anschluss zweimal mit DPBS gespült.

3.4.2. Proliferationsnachweis

Als Proliferationsmarker wurde 5-Ethynyl-2-desoxyuridin (EdU) verwendet. Nach Teilung der Herzzellaggregate per Skalpell wurden 10 µM EdU in die entsprechenden Chamber Slide™ Kammern zum Medium pipettiert.

Die Analoga für die Nukleoside Thymidin werden während der Zellteilung anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit Methanol/Aceton (7:3) und 1 µl DAPI fixiert. Anschließend wurden diese zweimal mit 3 % BSA in PBS gewaschen. Die Färbung der Zellkerne beruht auf einer kovalenten Bindung zwischen dem Ethynyl-Rest des eingebauten EDU und einem fluoreszierenden Azid (Alexa Fluor 488). Die geringe Größe des Farbstoffes ermöglicht dabei eine Reaktion ohne vorherige Denaturierung der DNA. Die Färbung der Präparate mit Alexa Fluor 488 erfolgte gemäß dem Handbuch des Click it™ Proliferationstest (<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp10338.pdf>).

3.5. Molekularbiologische Methoden

3.5.1. gDNA-Isolation

Die genomische DNA (gDNA) wurde aus der Leber einer adulten Regenbogenforelle gewonnen, um mittels Temperaturgradienten-PCR, die beste Annealing-Temperatur designter Primer zu ermitteln. Die Isolation der gDNA erfolgte mit Hilfe des Tissue DNA Mini Kits (peqLab). Die Isolation erfolgte schließlich nach dem Kurzprotokoll des verwendeten DNA-Kits (http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/12-3396-00_m.pdf). Das verwendete Lebergewebe entsprach 30 mg. Die Konzentration der isolierten DNA wurde mit Hilfe des NanoDrop Spektrometers bestimmt und bei 4° C gelagert.

3.5.2. mRNA-Isolation

Die messenger RNA (mRNA) Isolation erfolgte nach dem Protokoll Dynabeads[®] mRNA Direct Kit (Invitrogen Dynal, Norway). Die im Kit enthaltenen magnetischen Kugeln sind mit Oligo(dT)-Nukleotiden bestückt, welche die alleinige Isolation der mRNA aus der Gesamt-RNA ermöglichen. Der Poly-A-Schwanz der mRNA hybridisiert mit den Oligo(dT)Sequenzen. Mit Hilfe eines Magneten werden die Beads befestigt, so dass Überstände leicht entfernt werden können. Andere RNAs wie rRNA oder tRNA werden, wie bei anderen Methoden, nicht mit isoliert.

Die Isolation erfolgte entsprechend dem Handbuch des Kits (<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/mrna-protocols/dynabeads-oligo-dT-25.html#prot2>). Je nach Zellmenge wurde dabei nach dem Standard- (Herz adulte Regenbogenforelle) oder dem Mini-Protokoll (Kontrollzellen, SCC) gearbeitet. Statt des Eluationsschrittes wurden die Beads in 100 µl Tris-HCl zwischengelagert. Währenddessen wurden die Vorbereitungen für eine reverse Transkription mit Hilfe des *QuantiTect Reverse Transkription Kit* (Qiagen) getroffen. Nach Entfernen des Tris-Puffers, wurde der nach QuantiTect Protokoll vorbereitete Primer-Mix direkt zu den Beads pipettiert. Die Eluation der mRNA erfolgte im Cycler durch Erhitzen auf 65° C. Auf Eis wurde die Reverse Transkriptase mit Puffer hinzugefügt und das Cycler-Programm für Reverse Transkription gestartet. Nach Beendigung des Programms wurden die Beads abzentrifugiert und die cDNA im Überstand bei 4° C gelagert.

3.5.3. Design von Primern

Da nur wenige Gene der Regenbogenforelle bisher sequenziert wurde und noch weniger spezifische Primer bekannt sind, wurden selbst Primer designt. Dies geschah mit Hilfe von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), dem Programm Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net>) und dem OligoExplorer 1.2 (oligo-explorer.software.informer.com/1.2/). Als Template wurde dabei mRNA der Regenbogenforelle verwendet. Die designeten Primern wurden mit PCR-H₂O auf 100 pmol/µl angesetzt. Anschließend wurden der forwards (fw) und der reverse (rev) Primer zu einem Primermix angestezt (10 µl der beiden Primer und 180µl PCR-H₂O).

Die Primersequenz, die erwartete Fragmentgröße und die Optimale PCR Annealing- Temperatur (T_m) waren bei den benutzen Primern folgende:

Tabelle 19: Primer für Expressionsanalyse

Name	Orientierung	Sequenz	Schmelz- temperatur	Produktgröße (bp)
elfa fw	5' -> 3'	AGGCTGATTGCGCTGTGC		
elfa rev	3' -> 5'	CCCCATGCCAACCAGAGAT	58° C	272
α -actin fw	5' -> 3'	CATCAGGTAGTCAGTCAGG		
α -actin rev	3' -> 5'	GATGGTGTGACCCACAAC	53° C	102
myh6 fw	5' -> 3'	GCACTACGGCAACATGAG		
myh6 rev	3' -> 5'	CAATGCACCGAGGGAATA	60° C	211
Cx 43 fw	5' -> 3'	TCATGCTGGTGGTCTCTCTG		
Cx 43 rev	3' -> 5'	AGTGGTGGACAGATCCTTGG	58° C	161

Rev – reverse; fw – forward; cardiac muscle myosin heavy chain 6 alpha (myh6), connexin 43 (Cx 43); bp - Basenpaar

Die optimale Annealing- Temperatur wurde durch eine Temperaturgradienten-PCR ermittelt (3.5.4. Reverse Transkription - Ermittlung des Temperaturgradienten bei Primern).

3.5.4. Reverse Transkription - Ermittlung des Temperaturgradienten bei Primern

Die Polymerasekettenreaktion, abgekürzt PCR (polymerase chain reaction), ist eine Methode, die der Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte dient. In der PCR werden durch die drei Schritte Denaturierung (Melting, Schmelzen), Primerhybridisierung (primer annealing) und Elongation (Polymerisation, Amplifikation), welche zyklisch wiederholt werden, die entsprechenden DNA-Abschnitte exponentiell vermehrt.

Die Reaktionsansätze umfassen ein Volumen von 50 μ l, welches vorher folgendermaßen zusammengestellt wird. Die Ermittlung des Temperaturgradienten wurde mit je 10 μ l gDNA (Kapitel „3.5.1. gDNA-Isolation“) durchgeführt (Tabelle 20). Im Gegensatz dazu wurden bei der

cDNA (Kapitel „3.5.2. mRNA-Isolation“) aller Proben jeweils nur 1 µl je Ansatz verwendet (Tabelle 21).

Tabelle 20: PCR-Mix zur Erprobung der Primer mit gDNA

Stocklösungen:	Pipettiervolumen [µl]:
10x Dream Taq-Puffer	5
5 µm Primermix	5
2 mM dNTP	5
5U/ µl Dream Taq Polymerase	0,25
genomische DNA	10
DMSO	2
PCR-Wasser	22,75
SUMME	50µl

Tabelle 21: PCR-Mix für die Amplifikation spezifischer cDNA

Stocklösungen:	Pipettiervolumen [µl]:
10x Dream Taq-Puffer	5
5 µm Primermix	5
2 mM dNTP	5
5U/ µl Dream Taq Polymerase	0,25
cDNA	1
DMSO	2
PCR-Wasser	31,75
SUMME	50µl

Die Ansätze wurden vermischt und kurz abzentrifugiert, damit sich die Probe vollständig im Gefäß und nicht im Deckel sammelte. Die Proben wurden nun bei unterschiedlichen Temperaturen, die bei $-5^{\circ}\text{C} < T_m < +5^{\circ}\text{C}$ lagen, im Mastercycler gefahren. Mit der „Wallace-Regel“ errechnet man die Schmelztemperatur ($T_M = (\text{Cytosin} + \text{Guanin}) \cdot 4 + (\text{Adenin} + \text{Thymin}) \cdot 2$). Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermoblock nach folgendem

Basisprogramm durchgeführt (Tabelle 22). Die enthaltenen PCR-Produkte wurden mittels der Kapillar-Gelelektrophorese aufgetrennt (3.5.5. Gel-Kapillarelektrophorese).

Tabelle 22: Ablauf der PCR-Reaktion

Denaturierung	95° C	2:00 min	Amplifikation ← 40 x →
Denaturierung	95° C	0:40 min	
Hybridisierung	-5° C < T _M > +5° C	0:40 min	
Polymerisierung	72° C	0:40 min	
Polymerisierung	72° C	8:00 min	
Abbruch/ Lagerung	4° C		

3.5.5. Gel-Kapillarelektrophorese

Die Auftrennung der durch die PCR erhaltenen DNA-Fragmente erfolgte maschinell mit Hilfe des Qiaxel (Quiagen). Dieses besitzt dünne Kapillaren, gefüllt mit einem Ethidiumbromid-Agarose-Gel, in denen die Fragmente gemäß ihrer Größe aufgetrennt werden. Ein Detektor misst die Fluoreszenzsignale während die Fragmente die Kapillare durchwandern.

Obwohl nur 10 µl Probe pro Analyse vom Gerät benötigt werden, wurden 20 µl eingesetzt um ein Aufsaugen von Luft zu vermeiden. Dies würde die Kapillaren unbrauchbar machen. Aus demselben Grund wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen in die 96-Well-Platte pipettiert wurden und die komplette Zeile der Platte mit Flüssigkeit gefüllt war. Falls weniger als zwölf Proben untersucht wurden, wurden die verbleibenden Wells der Zeile mit 20 µl Dilution Puffer gefüllt. Die Auswertung der Elektrophorese erfolgte mit dem Analyse Programm Bio Calculator 3.0 (Quiagen).

3.6. Elektrophysiologie

3.6.1. Extrazelluläre Ableitungen via Multielektrodenarray (MEA)

Das verwendete MEA (<http://www.multichannelsystems.com>) bestand aus 60 Titanitrid-Elektroden, angeordnet in einer 8 x 8 Matrix mit freibleibenden Eckpositionen (Abbildung 7). Der Durchmesser der Elektroden betrug 30 μm , der Abstand von Mittelpunkt zu Mittelpunkt benachbarter Elektroden 200 μm . Der auf das MEA aufgesetzte Glasring diente als Reservoir für das Medium und als Begrenzung der Versuchskammer. Es wurde somit eine on-chip Kultivierung der Zellen ermöglicht. Die Versuchskammer des MEA wurde mit 0,1 % Gelatine beschichtet. Das in der Zellkultur entstandene SCC wurde mit dem Skalpell isoliert und mit einer Pipette in die Versuchskammer gegeben. Damit das SCC sich in der Mitte der Kammer, im Bereich der Elektroden, adhärierte, wurde das MEA mehrmals kräftig geschwenkt, so dass das SCC oberhalb der Elektroden schwamm. Es wurde anschließend drei Tage bei 20° C und 1,9 % CO₂ mit DMEM 20 % FKS inkubiert.

Die Systemsoftware MCRack 3.8.0 (Multi Channel Systems) garantierte die Datenerfassung bei der Messung extrazellulärer Aktivität in Echtzeit, online- und offline-Analysen der Daten und den Datenexport. Die Messungen liefen stets fünf Minuten ohne externe Stimulation und spezielles Messmedium.

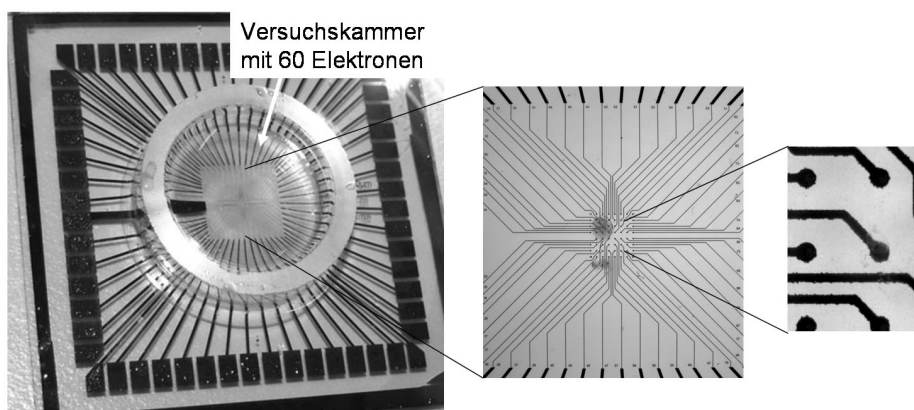


Abbildung 7: Multielektrodenarray

Links: Multielektrodenarray mit 60 Elektroden und Medium in der Versuchskammer; Mitte: Anordnung der Elektroden in einer 8x 8 Geometrie, auf denen zwei SCC adhärrierten; Rechts: Aufnahmen von Elektroden

3.6.2. Intrazelluläre Ableitungen via scharfer Elektrode

Bei der intrazellulären Ableitung wird das Transmembranpotential abgeleitet, d.h. die Potentialdifferenz (eine elektrische Spannung) zwischen dem Zellinneren und dem umgebenden Medium, dessen Potential als Referenzpotential willkürlich als Null definiert wird (Erdpotential). Um eine Zelle intrazellulär ableiten zu können, muss ein elektrischer Zugang erreicht werden. Dafür wird eine Glasmikroelektrode, welche die Arbeitselektrode ist (Spitzendurchmesser $< 1 \mu\text{m}$, Widerstand von 5-40 M Ω ; Messung des Zellinneren), mit einer 2 M Kaliumchlorid-Lösung (KCl) gefüllt. In diese Elektrode ragt ein mit Silberchlorid beschichteter Silberdraht.

Die Referenzelektrode, die sich im Medium befindet (Messung des Zelläußeren), ist ebenfalls mit einem Silberchlorid beschichteten Silberdraht bestückt. Bei beiden Elektroden wird die Spannung über die Chloridionen, die sich an der Elektrode anlagern bzw. ablösen gemessen. Nach Eindringen der gefüllten Mikroelektrode in eine Zelle kann das Membranpotential der Zelle durch Messung der Spannung zwischen der Ableitelektrode und einer Referenzelektrode im Medium bestimmt werden (Abbildung 8). Dafür war die Mikroelektrode mit dem Potentialverstärker SEC-05L (NPI Electronics, Hamm, Dt.) verbunden. Die Signale wurden mit dem Computer-verbundenen Verstärker digitalisiert (EPC9; HEKA, Dt.) und mit dem Softwareprogramm Pulse 8.8 (HEKA, Dt.) erhoben. Die Eigenschaften der spontanen APs wurden anschließend mit dem Softwareprogramm Chart 5 (ADInstruments) ermittelt.

Die verwendeten SCC wurden bei 20° C und 1,9 % CO₂ kultiviert, die sich aus zehn verschiedenen Regenbogenforellenlarven bildeten. Die Larven befanden sich zum Zeitpunkt der Präparation kurz vor bzw. kurz nach dem Schlupf. Die Aufzeichnung der intrazellulären Ableitungen erfolgte über ein bis fünf Minuten bei Raumtemperatur und ohne CO₂-Begasung.

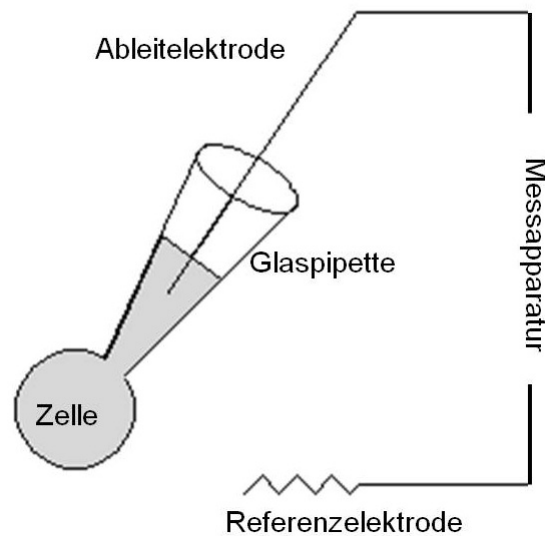


Abbildung 8: Aufbau einer Messstation zur intrazellulären Ableitung mit einer scharfen Elektrode

Messung von transmembranen Spannungen einer Zelle. Eine mit Kaliumchlorid gefüllte Glaspipette wird mit einem silberchloriden Draht bestückt und in eine Zelle gestochen. Ein silberchlorid-beschichteter Draht dient als Referenzelektrode, der sich im Medium befindet. Die Elektroden sind an einen Verstärker und ein Signalaufbereitungsgerät gebunden. <http://www.andreas.bulling-online.de/>; modifiziert

3.7. Medikamententestung

Für die pharmakologischen Experimente wurden ausschließlich Substanzen gewählt, welche bereits bei anderen Organismen verwendet wurden. So konnten Vergleiche zu Säugetieren gezogen werden.

Isoproterenol und Rilmakalim wurden vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck zur Verfügung gestellt und ursprünglich von Sigma-Aldrich bzw. Sanofi/Aventis bezogen.

Die Zellkulturen mit den enthaltenen SCC wurden bei 20° C und 1,9 % CO₂ kultiviert. Mittels intrazellulärer Ableitung erfolgte zunächst eine Aufzeichnung der spontanen Aktivität als Kontrolle. Die getesteten Substanzen wurden zunächst in DMEM-20 % FKS auf eine Konzentration von 10 µM gelöst. Das Medium in der Probe wurde vollständig abpipettiert und durch 2 ml der Testlösung ersetzt. Die Veränderung der Aktivität der SCC wurde über einen Zeitraum von ca. fünf Minuten mittels intrazellulärer Ableitung verfolgt.

Sämtliche Datenpunkte wurden als Mittelwert aller Messwerte mit der dazugehörigen Standardabweichung angegeben. Zur statistischen Analyse wurden die Datensätze zunächst mit Hilfe von Prism 4.03 (GraphPad, USA) und Igor Pro 5.01 (Wavemetrics, USA) analysiert. Für die Auswertung wurde der zweiseitige t-Test für unabhängige Stichproben herangezogen. Als Signifikanzniveau wurde bei den Berechnungen $p < 0,05$ zu Grunde gelegt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wird entsprechend angegeben.

Die Wirkung der SCC auf Zugabe von 1,75 mM Kaliumchlorid (KCl) wurde mittels Videoaufnahme und Auszählung der Schlagfrequenz ermittelt. Auch in diesem Fall wurde das SCC bei 20° C und 1,9 % CO₂ in DMEM-20 % FKS kultiviert. Die Schlagfrequenz wurde zunächst 10 min beobachtet und für stabil erklärt. Im Anschluss wurde das Medium mit einer 1,75 mM KCl-Lsg versetzt. Zwei Minuten nach Zugabe wurde ein Mediumwechsel vorgenommen.

IV. Ergebnisse

4.1. Bildung spontan kontrahierender Zellaggregate (SCC)

Für die Entwicklung eines neuen Testsystems für die Pharmakologie wurden Zelllinien aus Larven der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) etabliert. Nachdem die Zellen mit Trypsin isoliert wurden, konnte innerhalb von ein bis zwei Tagen eine Adhäsion der Zellen im Zellkulturbehälter beobachtet werden. Die Zellen bildeten in der Primärzellkultur (Abbildung 9a, b), wie auch in der ersten Passage (Abbildung 9c, d) Monolayer sowie Aggregate unterschiedlicher Formen aus. Die Zellformen waren spindelförmig bis planar und konnten in beiden Passagen wieder gefunden werden. Die Zellen proliferierten bei 20° C und 1,9 % CO₂.

In den Zellkulturen der präparierten Regenbogenforellenlarven konnten ab zwei Tagen nach der Präparation spontan kontrahierende Zellaggregate (SCC – spontaneously contracting cell aggregates) nachgewiesen werden.

In der Primärzellkultur wiesen diese SCC in den meisten Fällen Kugelform bzw. ein Zwei-Zentersystem auf (Abbildung 10a) und kontrahierten regelmäßig. Die Aggregate hatten eine Länge von 100 µm bis 3000 µm. In der ersten Passage hingegen wiesen die auftretenden SCC eine röhrenförmige Struktur auf und zuckten unregelmäßig an verschiedenen Stellen ein und desselben Aggregates (Abbildung 10b). Diese Aggregate traten in den Kulturen ab dem zehnten Tag nach Passagierung auf, wobei nicht in jedem Fall ein schlagendes Aggregat bereits in der Primärzellkultur vorhanden war.

Neben der Regenbogenforelle wurden auch in den Primärzellkulturen anderer Fischarten kontrahierende Aggregate nachgewiesen. So wurde in der Zellkultur von Larven der Meerforelle (*Salmo trutta trutta*), des Atlantischen Störs (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*), der Maräne (*Coregonus maraena*), des Zebrafischs (*Danio rerio*) und des Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) bereits eine Woche nach Präparation kontrahierende Aggregate festgestellt (Abbildung 11).

Aufgrund der Tatsache, dass Regenbogenforellen in der Aquakultur ökonomisch bedeutende Tiere und deren Eier daher leicht zu erhalten sind, wurden die folgenden Versuche und Untersuchungen nur an Tieren dieser Art vorgenommen. Des Weiteren wurde für diese Arbeit eine Beschränkung auf die SCC in der Primärzellkultur vorgenommen, da diese regelmäßig kontrahierten und mit einer hohen Wahrscheinlichkeit gebildet werden konnten.

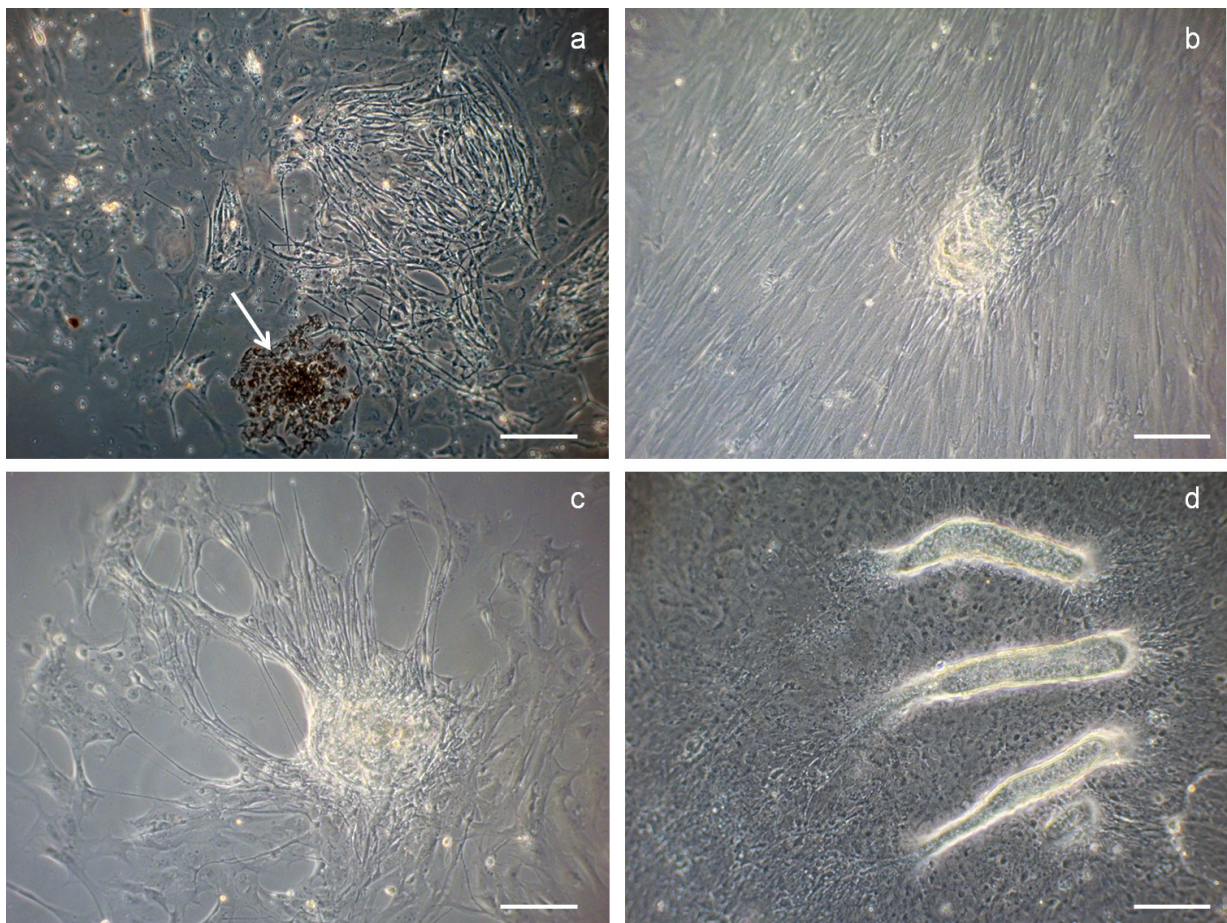


Abbildung 9: Zellkultur der Regenbogenforellenlarve.

Inkubation bei 20° C in 1,9 % CO₂. a, b zeigt Passage Null und c, d Passage Eins. In beiden Passagen sind Zellen verschiedener Formen und z. T. auch Farben ersichtlich (a: Pfeil verweist auf Pigmentzellen). Weiterhin ist die Aggregation von Zellen (helle Bereiche) in beiden Passagen erkennbar. Skala beträgt 100 µm.

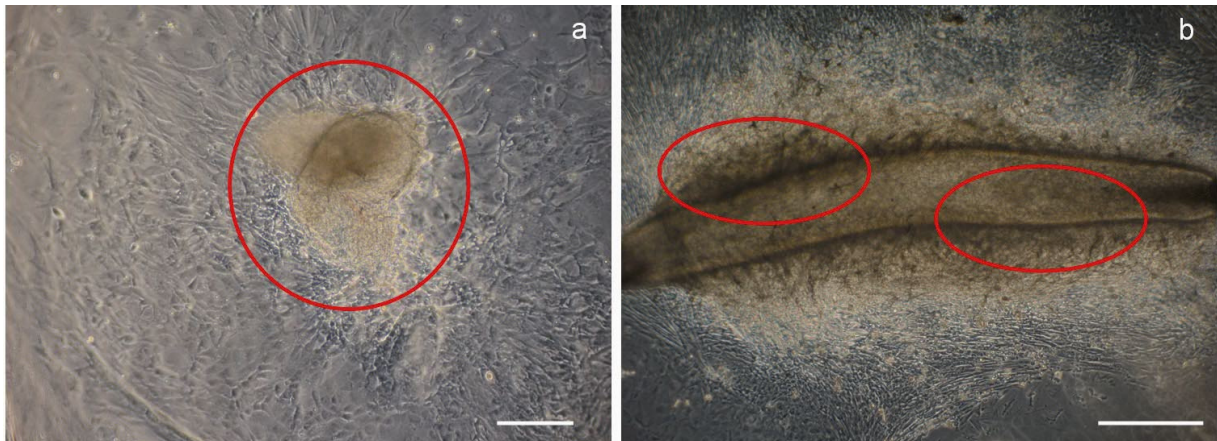


Abbildung 10: Spontan kontrahierende Zellaggregate in der Zellkultur einer Regenbogenforellenlarve.

(a) Kontrahierendes Zellaggregat eine Woche nach Präparation (Passage Null), Skala beträgt 100 µm. (b) Kontrahierendes Zellaggregat ein Monat nach Subkultivierung (Passage Eins), Skala beträgt 500 µm. Kreise zeigen die Regionen der Kontraktionen an.

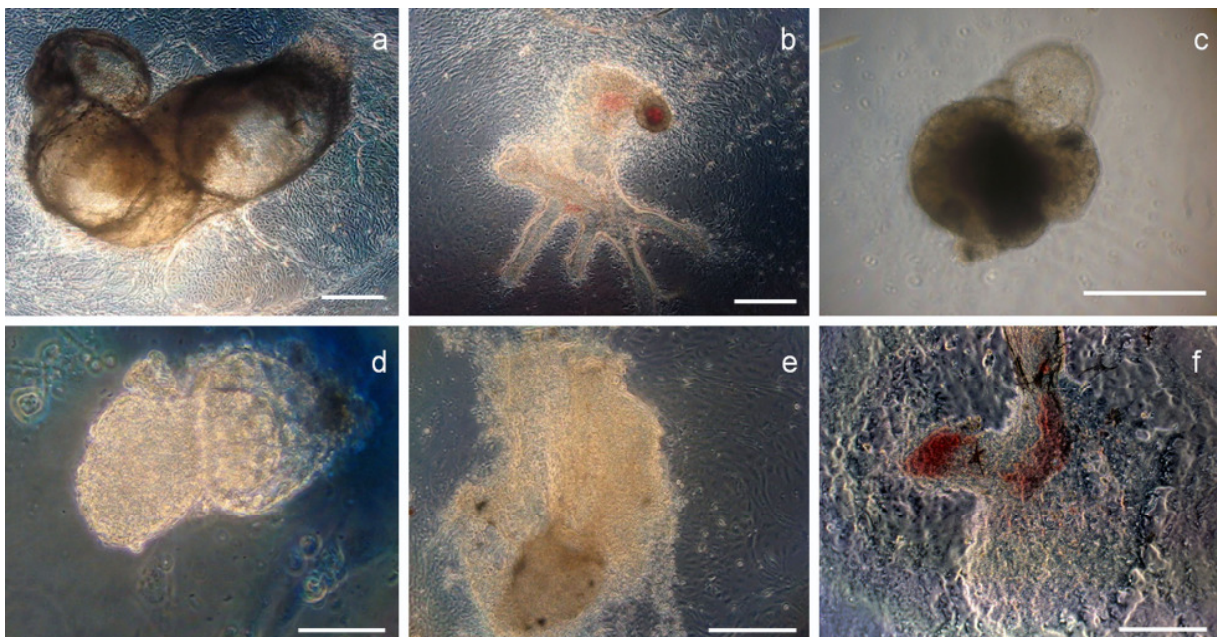


Abbildung 11: Spontan kontrahierende Zellaggregate aus Larven verschiedener Fischarten.

Kontrahierendes Zellaggregat von Larven der (a) Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), (b) Meerforelle (*Salmo trutta trutta*), (c) des Atlantischen Störs (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*), (d) der Maräne (*Coregonus maraena*) und (e) des Zebrafischs (*Danio rerio*) sowie (f) des Atlantischer Lachs (*Salmo salar*). Skala beträgt 100 µm.

4.2. Beobachtungen zur Entstehungskinetik von SCC

Mit Hilfe von stereomikroskopischen Aufnahmen sollte die Bildung der SCC ersichtlich werden. Ziel war es in Erfahrung zu bringen, ob sich die Aggregate bereits nach dem ersten Mediumwechsel in der Kultur befanden und es sich somit um Gewebefragmente aus der Larve handelt oder ob sich die SCC erst in den kommenden Tagen aus einzelnen Zellen bildeten. Hierzu wurden Aufnahmen von Zellkulturschalen mit präparierten Regenbogenforellenlarven direkt nach dem ersten Mediumwechsel (Abbildung 12) und nach Auftreten von SCC (Bildeinlagen in Abbildung 12) gemacht. In dieser Kultur wurden innerhalb von drei Wochen drei SCC gebildet. Das erste auftretende kontrahierende Aggregat (Kontraktionsbeginn eine Woche nach Präparation) und das dritte Aggregat (beginnende Kontraktion drei Wochen nach Präparation) entstanden im Verlaufe der Zeit. Diese zwei Aggregate waren in der ersten stereomikroskopischen Aufnahme, die unmittelbar nach dem ersten Mediumwechsel am zweiten Tag nach Präparation vorgenommen wurde, nicht vorhanden (grüne Kreise). Das zweite Aggregat war im Gegensatz dazu bereits bei der ersten Dokumentation vorhanden (roter Kreis). Die Kontraktion setzte bei diesem Aggregat allerdings erst in der zweiten Woche ein.

Die gesamte stereomikroskopische Beobachtung erfolgte an drei verschiedenen Präparationstagen über einen Zeitraum von vier Wochen mit je drei bis vier Larven (Abbildung 13). Die Larven befanden sich zum Zeitpunkt der Präparation in unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Augenpunktstadiums (290 TG bis 340 TG), die in dieser Arbeit in Tagesgraden (TG) angegeben wird. Die Einheit TG berechnet sich aus der mittleren Tagestemperatur multipliziert mit der Anzahl der Tage.

Die Untersuchung belegte, dass einige SCC bereits nach dem ersten Mediumwechsel vorhanden waren (Abbildung 13, präsent). Allerdings wiesen diese zu jenem Zeitpunkt noch keine Kontraktion auf. Andere SCC generierten sich wiederum erst in den ersten Wochen in der Zellkultur (Abbildung 13, nicht-präsent). Diese Aggregate waren somit bei der ersten Aufnahme am Tag zwei nicht vorhanden. Als Fazit dieser Beobachtung konnte auf keine Regelmäßigkeit bzw. Beeinflussung durch bereits präsente Aggregate auf die Bildung zusätzlicher kontrahierender Aggregate geschlossen werden.

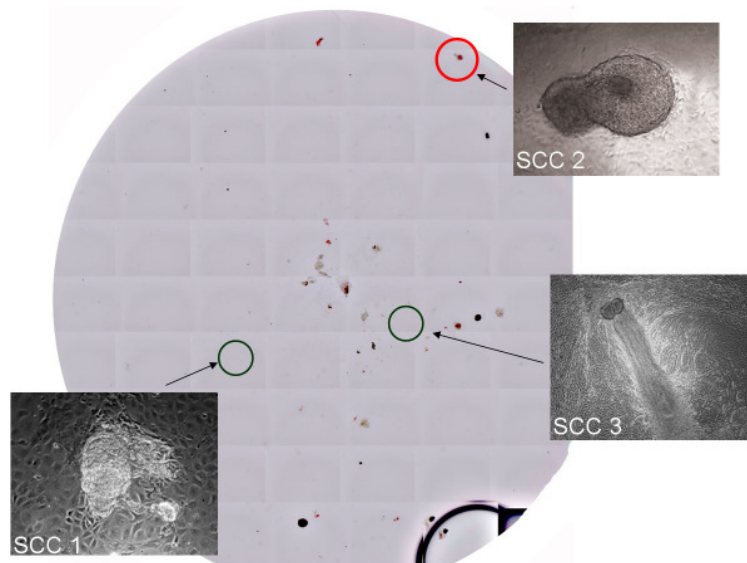


Abbildung 12: Stereomikroskopische Aufnahme einer Regenbogenforellen-Zellkultur nach dem ersten Mediumwechsel.

SCC2 konnte bereits zwei Tage nach der Präparation in der Kultur nachgewiesen werden (roter Kreis), wobei es erst 14 Tage später zu kontrahieren begann. SCC1 und SCC3 konnten nach dem ersten Mediumwechsel nicht nachgewiesen werden (grüne Kreise). Die beigefügten Aufnahmen zeigen die Aggregate nach sieben Tagen (SCC1) und nach 21 Tagen (SCC3). Präparation erfolgte an einer Regenbogenforellenlarve, die sich im Augenpunktstadium befand (290 TG-Tagesgrade).

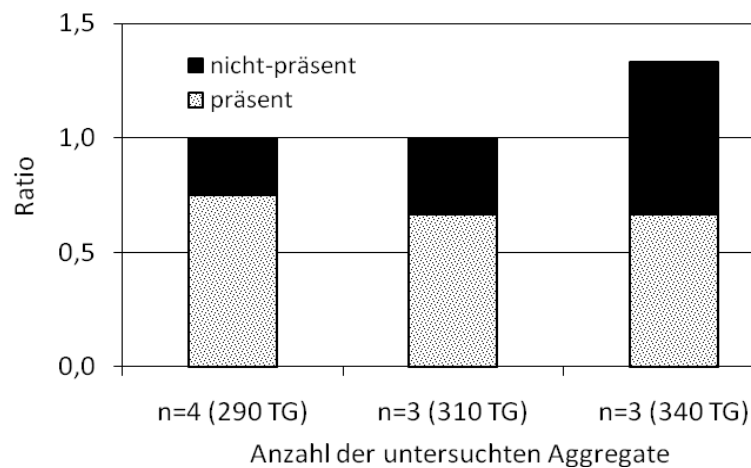


Abbildung 13: Ratio der Mittelwerte der auftretenden Zellaggregate in der Zellkultur von präparierten Larven, die sich im Augenpunktstadium befanden.

Präparation erfolgte an drei verschiedenen Präparationstagen über einen Zeitraum von 4 Wochen [präsent – SCC war in der ersten Aufnahme nach dem Mediumwechsel, Tag 2, vorhanden; nicht präsent– SCC war in der ersten Aufnahme nach dem Mediumwechsel, Tag 2, nicht vorhanden]; [TG- Tagesgrad].

4.3. Wahrscheinlichkeit für die Bildung kontrahierender Zellaggregate

4.3.1. Aggregatanzahl in Abhängigkeit vom Larvenalter

Für die Anwendung der SCC als Testmodell in der Pharmakologie sind die Häufigkeit der Bildung dieser Aggregate sowie deren zeitliches Entstehen von wirtschaftlicher Bedeutung.

Die Wahrscheinlichkeit der Bildung von SCC wurde über die Ratio berechnet. Hierfür wurde die Anzahl der auftretenden Zellaggregate ins Verhältnis zu den präparierten Larven (n= 18 pro Präparationszeitpunkt) gesetzt. Die Larven befanden sich zum Zeitpunkt der Präparation im frühen Augenpunktstadium (252 TG) bis Ende Dottersackstadium (462 TG). Die Präparationen der Larven in unterschiedlichen Entwicklungsstadien zeigten, dass die Gesamtzahl der erhaltenen Aggregate einer Gaußschen Normalverteilung folgt ($p < 0,05$; Kolmogorov-Smirnov Test (252 TG: 8 SCC; 294 TG: 11 SCC; 335 TG: 27 SCC; 378 TG: 10 SCC; 420 TG: 15 SCC; 462 TG: 9 SCC)). Das Maximum dieser Normalverteilung mit einer Ratio von ca. 1,5 trat kurz vor dem Schlupf (335 TG) der Larve auf (Abbildung 14). Zu diesem Präparationszeitpunkt war es möglich bis zu fünf SCC aus einer Larve zu bilden. Die Ratio der SCC-Bildung sank nach dem Schlupf der Larven ab.

Insgesamt zeigten die Präparationen, dass nur kurz vor dem Schlupf der Larven ein Ratio größer eins vorhanden war. Zu diesem Zeitpunkt wurden mehr SCC gebildet, als Tiere eingesetzt wurden.

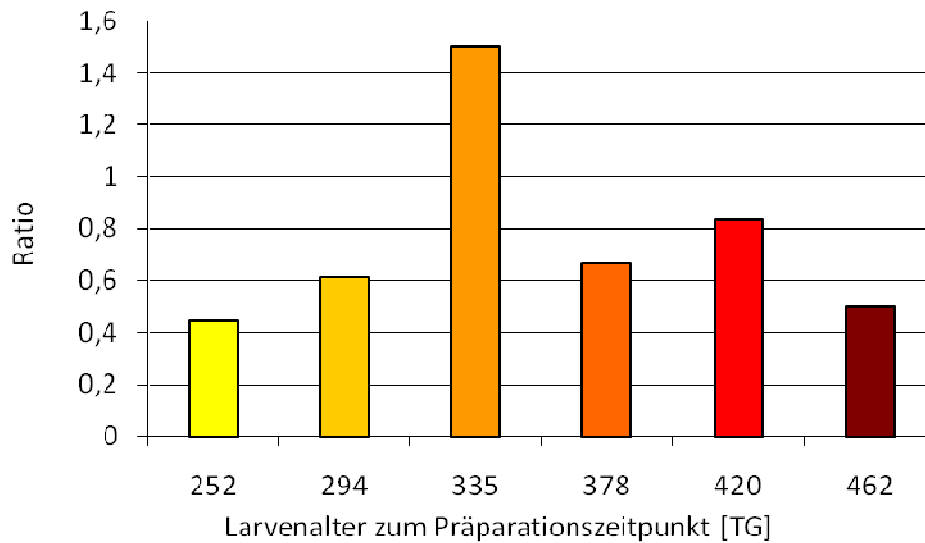


Abbildung 14: Ratio der auftretenden SCC in der Zellkultur in Abhängigkeit vom Larvenalter

Die Ratio berechnet sich aus dem Verhältnis der Anzahl der SCC zur Anzahl eingesetzter Larven (18 Larven/ Präparationszeitpunkt). Die Verteilung folgt einer Normalverteilung ($p < 0,05$; Kolmogorov-Smirnov Test); [TG- Tagesgrad].

4.3.2. Zeitlicher Verlauf der Aggregatbildung

Im zeitlichen Verlauf der SCC-Bildung wurde nur der Präparationszeitpunkt dargestellt, der eine Ratio größer eins aufwies. 36 Larven wurden daher kurz vor dem Schlupf präpariert. Die Bildung der SCC wurde über einen Monat ermittelt. In dieser Zeit entstanden 51 SCC in der Zellkultur. Die Ergebnisse der Bildung zeigten (Abbildung 15), dass bereits am Ende von Woche zwei (14 Tage Postpräparation) 73 % und in der dritten Woche (Tag 15 bis 22 Postpräparation) 97 % aller in der Zellkultur auftretenden SCC vorhanden waren. In seltenen Fällen generierten sich bereits einige SCC in der ersten Woche nach der Präparation aus.

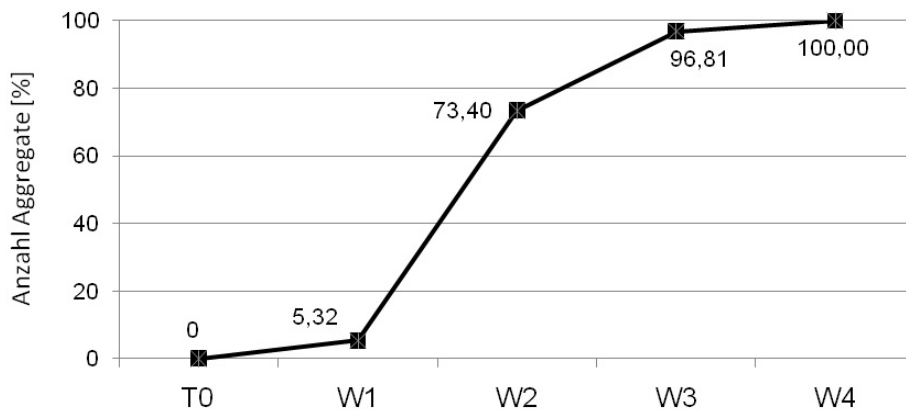


Abbildung 15: Kinetik der Entstehung von SCC in der Zellkultur über vier Wochen.

T0: Tag null - Tag der Präparation; Woche 1- Tag eins bis Tag sieben; Woche 2- Tag acht bis 14; Woche 3- Tag 15 bis 21; Woche 4- Tag 22 bis 30. 100 % entspricht der Anzahl der insgesamt entstandenen SCC aus 36 Larven (kurz vor dem Schlupf, ~ 335 TG-Tagesgrad) nach einem 4-wöchigen Untersuchungszeitraum.

4.3.3. Größe der Aggregate

Im Weiteren wurden die Aggregate auf ihre 3-dimensionale Struktur hin untersucht. Die erste Untersuchung diente dabei der Bestimmung der durchschnittlichen Aggregatdicken. Ziel der zweiten Untersuchung war es die durchschnittliche Aggregatfläche der entwickelten SCC von den fünf Präparationszeitpunkten zu ermitteln.

In der Auswertung der Tiefenbestimmung wurden sieben Aggregate in chamber slides überführt und die Zellkerne nach erneuter Adhäsion mittels DAPI-Färbung markiert. Anhand der Zellkernfärbung wurde an fünf verschiedenen Stellen des Aggregates, wobei der unmittelbare Randbereich nicht beachtet wurde, die Tiefe mittels Laser Scanning Mikroskop ermittelt. Die gemessenen Herzzellverbände wiesen eine Tiefe von 25 μm bis 56 μm auf (Abbildung 16). Die Tiefe in den Aggregaten war gleichmäßig, da die Standardabweichung der fünf Messpunkte in den ermittelten Aggregaten entweder vernachlässigbar gering war bzw. nicht existierte. In dem letzteren Fall waren alle fünf ermittelten Tiefen in den Aggregaten gleich groß.

In der zweiten Untersuchung der 3-dimensionalen Struktur der Aggregate wurde die Fläche ermittelt. In die Berechnung wurden alle entstandenen SCC der einzelnen Präparationszeitpunkte einbezogen (Kapitel „4.3.1. Aggregatanzahl in Abhängigkeit vom Larvenalter“). Die Analysen zeigten, dass ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 252 TG und 294 TG besteht ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis-Test). Die Flächen der Aggregate steigen bei diesen beiden

Präparationszeitpunkten mit dem Alter der präparierten Larven signifikant an ($p < 0,05$; Wilcoxon Rangsummentest). Während die Aggregatfläche bei den SCC zu dem Präparationszeitpunkt 252 TG noch $16750 \mu\text{m}^2$ betrug, wies sie bei 462 TG fast das Vierfache auf. (Abbildung 17). Für die anderen Präparationszeitpunkte konnte keine Signifikanz festgestellt werden.

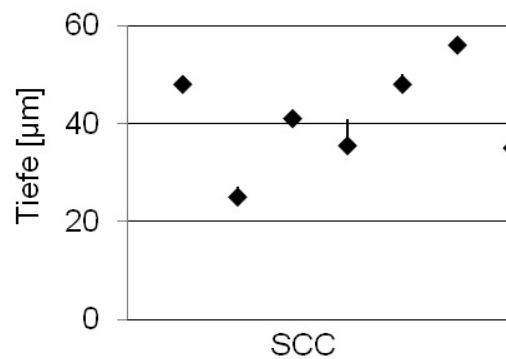


Abbildung 16: Darstellung der Aggregatdicke von sieben SCC.

Aus fünf verschiedenen Messpunkten wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der Aggregatdicke errechnet.

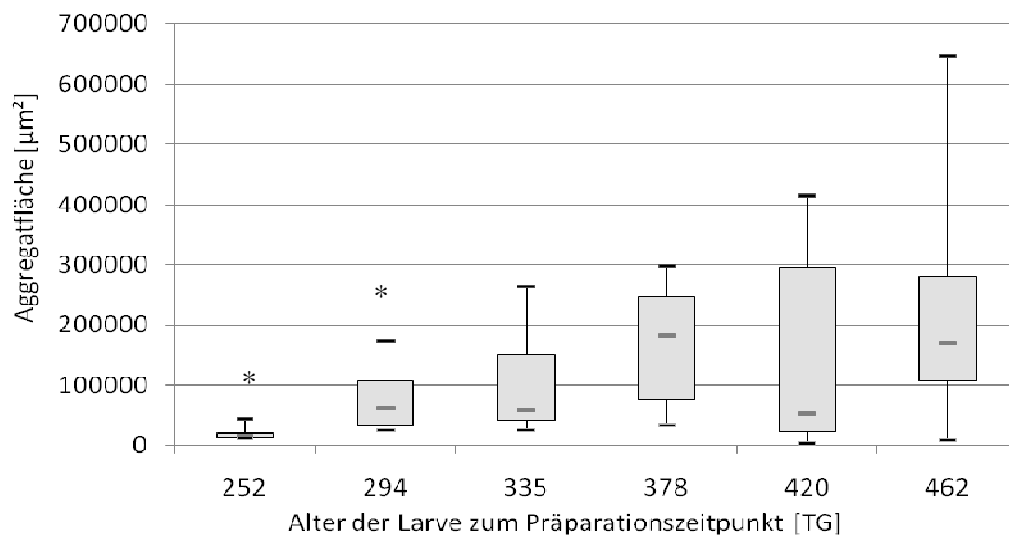


Abbildung 17: Box-Whisker-Plot der kontrahierenden Aggregatflächen in Abhängigkeit vom Larvenalter zum Präparationszeitpunkt.

Dargestellt sind jeweils Minimum und Maximum (Querbalken an den Enden), Median (grauer Balken) und oberes/unteres Quartil (Ränder des Kastens). Nachweis eines signifikanten Unterschiedes zwischen den Gruppen 252 TG und 294 TG ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis Rangsummentest). Die Größe der Aggregate stieg signifikant mit dem Alter der präparierten Larven an. (18 Larven/Präparation; $p < 0,05$ beim zweiseitigen Testen zweier Gruppen, Wilcoxon Rangsummentest), [TG-Tagesgrad].

4.4. Kontraktionsfrequenz

4.4.1. Kontraktionsfrequenz in Abhängigkeit vom Larvenalter

Für die Beurteilung als Testmodell sind auch die Schlagfrequenzen von entscheidender Bedeutung. In diese Untersuchung wurden ebenfalls alle gebildeten SCC aus je 18 Larven pro Präparationszeitpunkt einbezogen (Kapitel „4.3.1. Aggregatanzahl in Abhängigkeit vom Larvenalter“). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Kontraktionsfrequenzen zwischen den SCC der verschiedenen Zeitpunkte ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis Rangsummentest). Die Vergleiche der Gruppen untereinander ergaben, dass die Schlagfrequenz der SCC bei der Präparation nach 252 TG signifikant niedriger und nach 378 TG signifikant höher war, als die jeweiligen anderen Werte ($p < 0,05$; Wilcoxon-Rangsummentest; Abbildung 18). Die restlichen Kontraktionsfrequenzen unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht voneinander ($p > 0,05$).

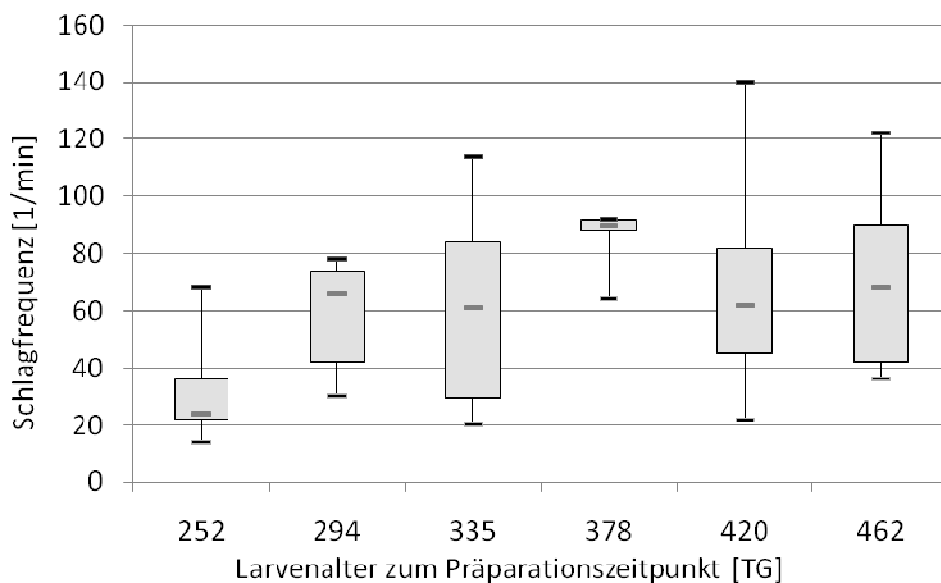


Abbildung 18: Box-Whisker-Plot der Schlagfrequenzen der SCC pro Minute in Abhängigkeit vom Präparationszeitpunkt .

Dargestellt sind jeweils Minimum und Maximum (Querbalken an den Enden), Median (grauer Balken) und oberes/unteres Quartil (Ränder des Kastens). Ein signifikanter Unterschied bestand zwischen den Gruppen ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis Rangsummentest). Die Schlagfrequenz der SCC bei der Präparation bei 252 TG waren signifikant niedriger und bei 378 TG signifikant höher als zu den anderen Präparationszeitpunkten (18 Larven/Präparation; $p < 0,05$ beim zweiseitigen Testen jeweils zweier Gruppen, Wilcoxon Rangsummentest), [TG-Tagesgrad].

4.4.2. Kontraktionsfrequenz im Zeitverlauf

Ein weiterer Maßstab für die Beurteilung der SCC als Testmodell ist neben der Höhe auch die Stabilität der Kontraktionsfrequenz. Daher wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen die Schlagfrequenzen eines SCC in regelmäßigen Abständen dokumentiert. Das Aggregat wurde aus einer Larve, die sich kurz vor dem Schlupf befand, gebildet. Das Aggregat begann zwölf Tage nach der Präparation zu kontrahieren. Während jeder Einzelmessung konnte eine rhythmische und konstante Kontraktion aufgezeichnet werden. Allerdings gab es im Verlauf der 30 Tage-Beobachtung zu verschiedenen Messzeitpunkten Abweichungen in den Frequenzen. Kontraktionsfrequenzen zwischen 50 bis 88 Schlägen pro Minute wurden ermittelt (Abbildung 19).

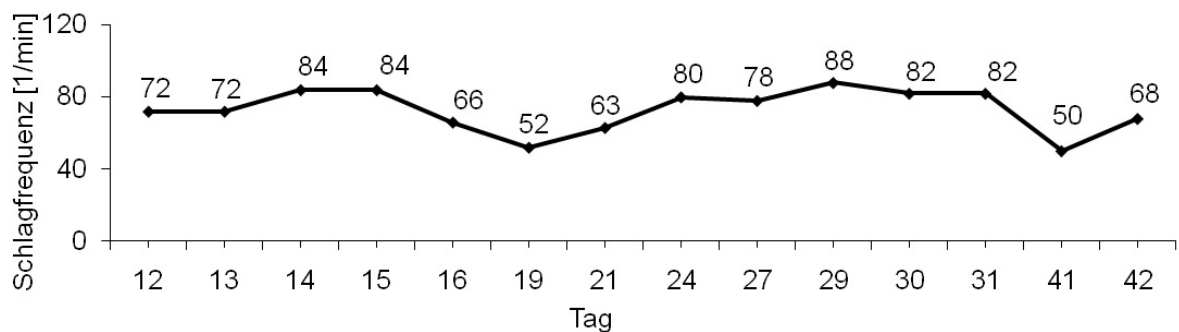


Abbildung 19: Schlagfrequenz (Kontraktion/Minute) eines SCC einer Regenbogenforellenlarve in Primärkultur.

Larve befand sich kurz vor dem Schlupf (350 TG-Tagesgrad). Die Beobachtung erfolgte über 30 Tage.

4.5. Charakterisierung kontrahierender Zellaggregate

Im folgenden Abschnitt wurden die spontan kontrahierenden Zellaggregate auf die Existenz von Kardiomyozyten überprüft. Weiterhin sollte ermittelt werden, ob die Zellen ein Synzytium bilden und über gap junctions in Verbindung stehen. Die Untersuchungen wurden anhand von drei unterschiedlichen Methoden vorgenommen.

4.5.1. Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion

Als erste Methode zur Charakterisierung wurde die Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR: reverse-transcription polymerase chain reaction) verwendet. Die Analyse mittels RT-PCR diente dem Nachweis der Expression herzspezifischer Gene in den entwickelten SCC, womit die Existenz von Kardiomyozyten in diesen Aggregaten nachgewiesen werden sollte. Hierfür wurden drei SCC, die je eine Probe darstellten, verwendet. Für die RT-PCR wurden Primer verwendet, die speziell für Regenbogenforelle designt wurden. Als Kontrolle diente zum Einen die cDNA aus dem Atrium einer adulten Regenbogenforelle (Positivkontrolle - PK) und zum Anderen cDNA aus Zellen der Regenbogenforellenlarve in der dritten Passage (Versuchskontrolle - VK). Zusätzlich zu der Expression herztypischer Gene wurde die Expression des housekeeping gene elfa (elongation factor alpha) untersucht. Die in der Abbildung 20 dargestellte Kapillargelelektrophorese ergab, dass in allen Proben elfa exprimiert wurde und somit die cDNA erfolgreich amplifiziert wurde und die PCR funktionierte. Ausnahme war die Negativkontrolle (NK), die aus RNase freiem Wasser bestand. Es wurde bestätigt, dass diese Probe keine RNA oder DNA und somit keine Verunreinigung enthielt.

Die Analyse der Expression von herzspezifischen Genen ergab, dass in den drei Proben (P1-P3) sowie in der PK, das kardiale Myosin (cardiac muscle myosin heavy chain 6 alpha -myh6), α -Aktin und Cx 43 amplifiziert wurden. Myh6 und α -Aktin sind Proteine, die für die Kontraktilität von entscheidender Bedeutung sind. Cx 43 ist hingegen eines der wichtigsten Proteine in den interzellulären Kanälen des myokardialen gap junction Systems. Der Nachweis von Cx 43 lieferte den Beweis für die Verknüpfung der Herzzellen zu einem Synzytium in jedem der drei SCC sowie im Atrium.

In der Versuchskontrolle konnten keine kardialen Gene nachgewiesen werden (Abbildung 20).

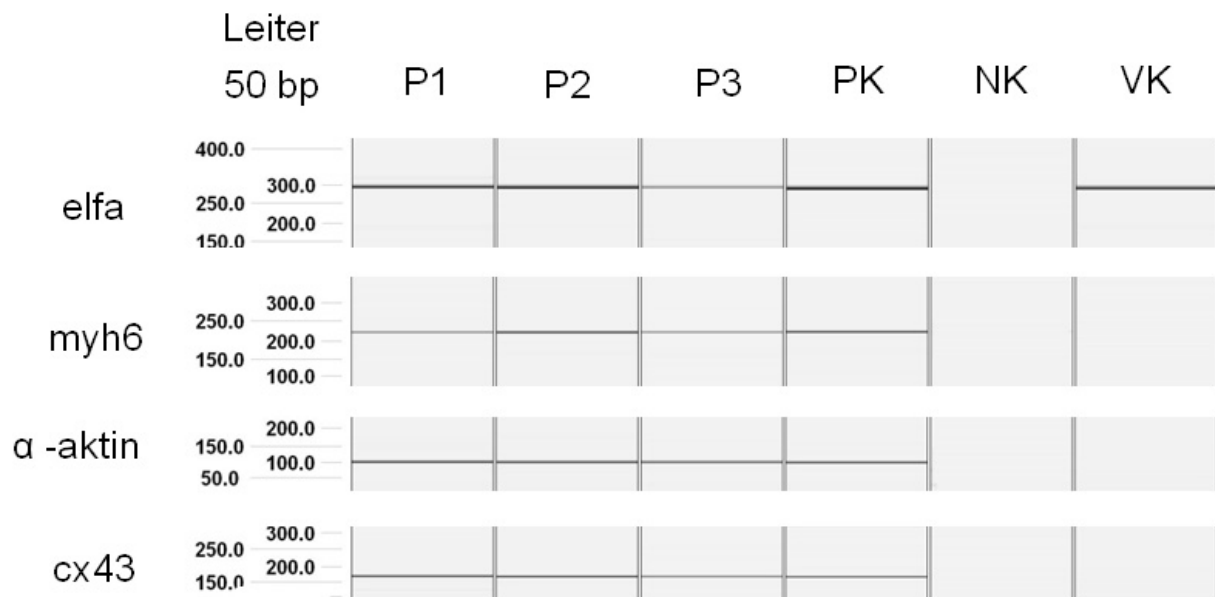


Abbildung 20: RT-PCR Analyse.

Nachweis der Expression von herzspezifischen Markern in isolierten kontrahierenden Zellaggregaten (P-Probe 1-3), isoliertem Herzgewebe einer adulten Regenbogenforelle als Positivkontrolle (PK), PCR-Wasser als Negativkontrolle (NK) und nicht kontrahierenden Zellen einer Regenbogenforellenlarvenzellkultur in Passage drei als Versuchskontrolle (VK). Links abgebildet sind die verwendeten Marker und ihre entsprechenden Basenpaargröße (bp): elfa- elongation factor alpha (272 bp) wurde als interne Kontrolle („housekeeping gene“) verwendet; Mhy6 – cardiac muscle myosin heavy chain 6 (211 bp); α -aktin - alpha aktin (102 bp) und Cx 43 – connexin43 (161 bp). Leiter: GeneRuler 50 bp. PCR-Produkt wurde mittels Kapillargelelektrophorese aufgetrennt (QIAxcel; Qiagen).

4.5.2. Immunfluoreszenz

Als zweite Methode zur Untersuchung der SCC auf Kardiomyozyten wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Da die verwendeten Antikörper gegen homologe Proteine aus Maus oder Schaf gerichtet waren, wurden die Antikörper zur Etablierung der Immunfluoreszenz auf Geweben bzw. Zellen von Fisch zunächst auf ihre spezifische Kreuzreaktivität hin überprüft. Dafür wurden die Immunfärbungen zunächst an Kryoschnitten verschiedener Organe (Herz, Auge, Leber, Haut/ Skelettmuskel, Milz, Gonaden) einer adulten Regenbogenforelle getestet. Die Färbungen zeigten, dass die hier benutzten Antikörper mit einem für das jeweilige Protein typischen Verteilungsmuster im Herz nachgewiesen werden konnten, wodurch das adulte Herz als Positivkontrolle für alle weiteren Experimente verwendet werden konnte.

Die Detektion von Troponin I, welches eines der drei Proteine aus dem Troponinkomplex ist (Kapitel „1.3.1. Aufbau der Herzmuskelfaser“), wies bei den Zellaggregaten die typische Streifung auf. Zusammen mit der Phalloidin-färbung, welche Aktinfilamente markiert, konnte der Troponin I-Aktin-Filament-Komplex detektiert werden (Abbildung 21a). Im Folgenden konnte auch die Existenz von kardialem Myosin belegt werden (Abbildung 21b). Anti- α -Aktinin, welches gegen die Proteine im Z-Band der Kardiomyozyten bindet, konnte ebenfalls identifiziert werden (Abbildung 21c).

Ein Nachweis der Existenz und Lage der Glanzstreifen erfolgte durch die Markierung mit Antikörpern, die gegen ein desmosomales Protein (anti-1&2-Desmoplakin) und gegen zwei Proteine der Streifendesmosomen (anti-N-Cadherin und anti- β -Catenin) gerichtet waren (Abbildung 22). Diese drei Proteine sind in der Zellmembran lokalisiert, da sie Zellverbindungsproteine darstellen. Für die Bildung eines funktionierenden Synzytiums sind die Anzahl, Größe und Verteilung dieser Proteine wichtige Determinanten, da sie die Stabilität des Synzytiums im Herzzellaggregat gewährleisten (Kehat et al.2002). Die Färbungen zeigten, dass 1&2-Desmoplakin (Abbildung 22a) und die Proteine der Streifendesmosomen N-Cadherin (Abbildung 22b) und β -Catenin (Abbildung 22c) auf den Zellaggregaten in hohem Maße vertreten und gut verteilt waren. Die Existenz eines Synzytiums konnte bestätigt werden.

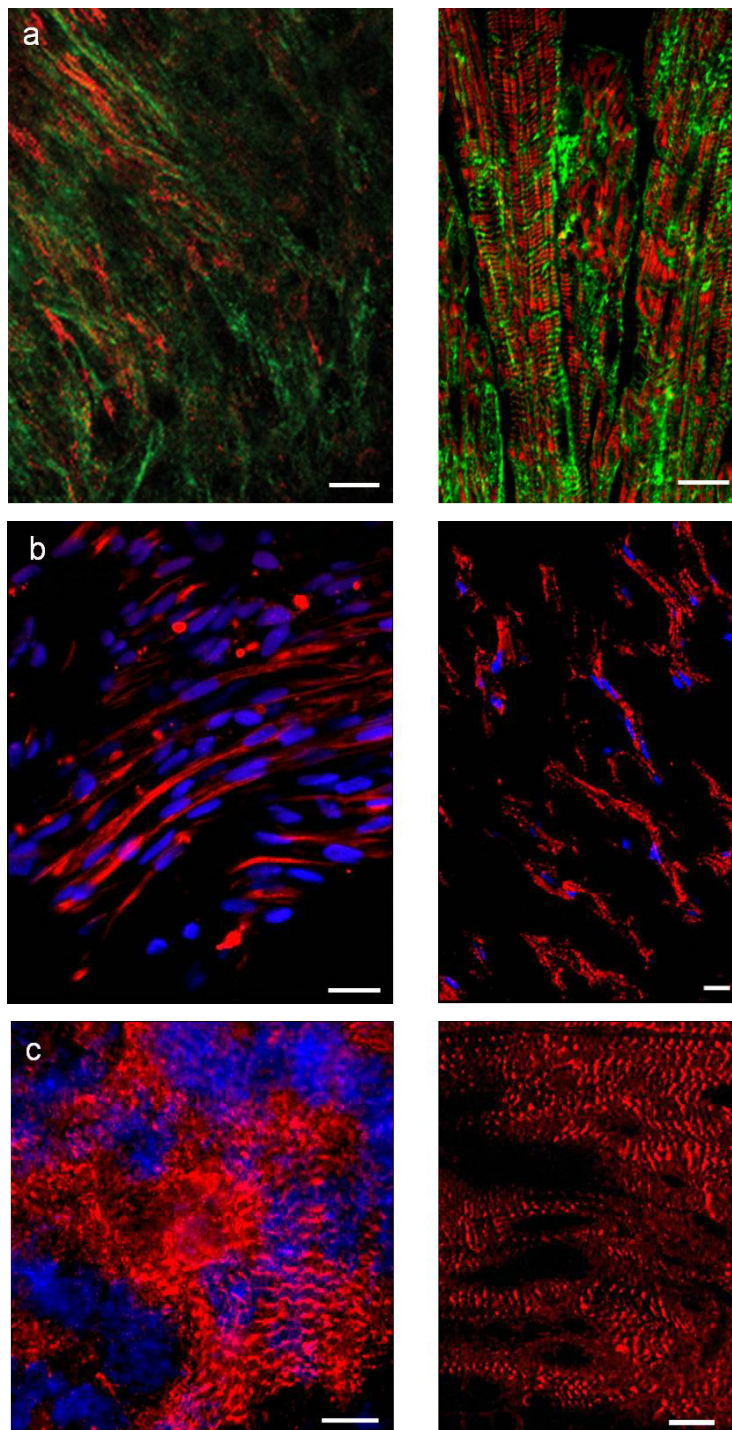


Abbildung 21: Immunfärbung mit herzspezifischen Antikörpern der Sarkomerstruktur.

linke Spalte: *in vitro* differenzierte kontrahierende Zellaggregate, rechte Spalte: Kryoschnitte des Herzens einer adulten Regenbogenforelle; Detektion von (a) Troponin I (grün) und durch Phalloidin angefärbten Aktin Filamenten (rot), (b) kardialem Myosin, (c) α -Aktinin. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Skala beträgt 10 μ m.

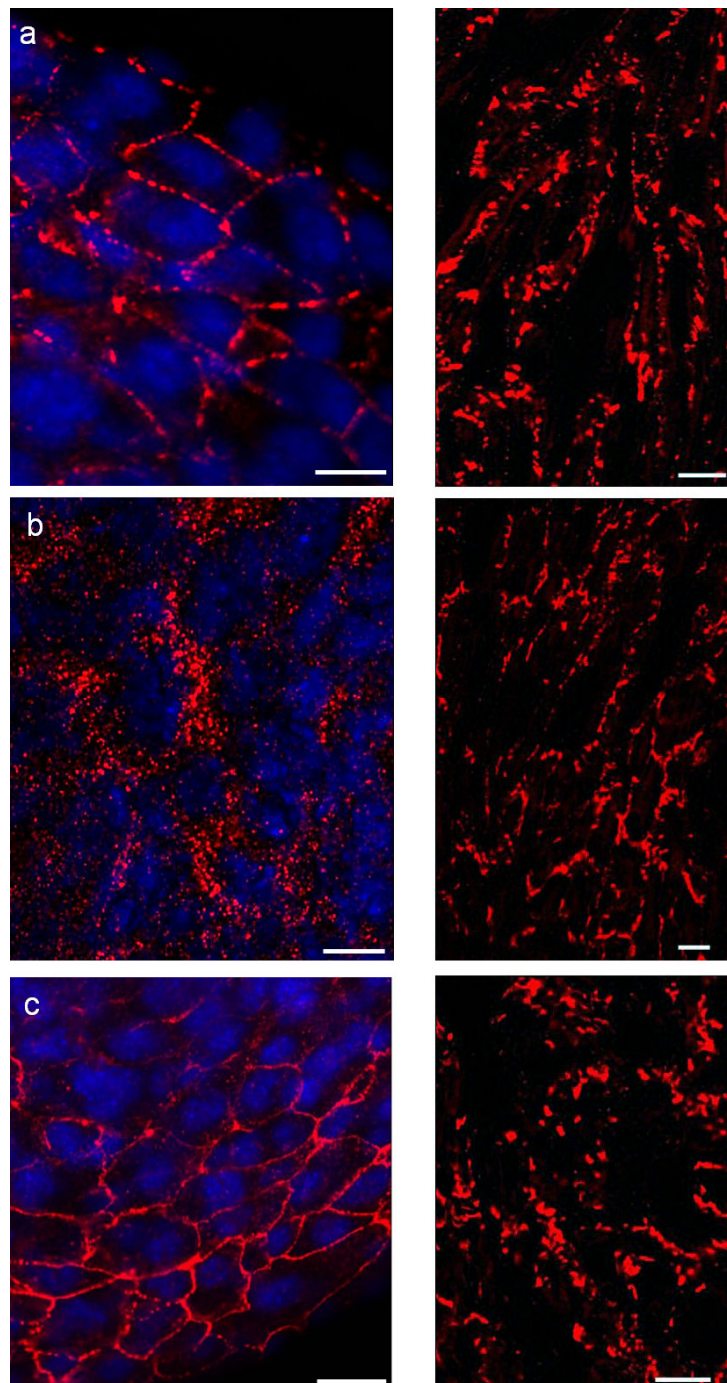


Abbildung 22: Immunfärbung mit herzspezifischen Antikörpern der Glanzstreifen.

linke Spalte: *in vitro* differenzierte kontrahierende Zellaggregate, rechte Spalte: Kryoschnitte des Herzens einer adulten Regenbogenforelle; Detektion von (a) 1&2-Desmoplakin, (b) β -Catenin, (c) N-Cadherin. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Skala beträgt 10 μ m.

4.5.3. Elektronenmikroskopie

Auch mit Hilfe der Elektronenmikroskopie, der letzten der drei eingangs erwähnten Methoden zum Nachweis von Herzzellen, konnte die Existenz von Kardiomyozyten in der Zellkultur bewiesen werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich die Zellen der Regenbogenforellenlarve sich in der Primärkultur *in vitro* differenzieren und sich zu SCC zusammenlagern oder ob adulte Kardiomyozyten sich zu SCC zusammenlagern.

In den elektronenmikroskopischen Analysen der Ultradünnschnitte von ganzen Regenbogenforellenlarven war zu erkennen, dass diese sowohl im Augenpunkt- als auch im Dottersackstadium keine vollständig ausgebildeten Kardiomyozyten aufwiesen, sondern Vorläuferzellen, die Herzprogenitorzellen. Diese waren von einem Endokardium (Abbildung 23a-Bildeinlage) eingeschlossen, welches wiederum von einer extrazellulären Matrix umgeben war. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Progenitorzellen zeigten, dass erste einzelne Sarkomere mit den kontraktilen Proteinen Aktin und Myosin existierten (Abbildung 23a). Zudem waren bereits die Anfänge der H-Zone, der Z- und der M-Linie ersichtlich. Des Weiteren war eine hohe Konzentration von sarkoplasmatischem Retikulum, welches ein Indiz für eine potente Ca^{2+} -Speicherung ist, vorhanden.

Bei Untersuchungen der *in vitro* generierten SCC aus präparierten Larven des Augenpunkt- sowie Dottersackstadiums konnten vollständig ausgebildete Herzzellen nachgewiesen werden (Abbildung 23b). Bei diesen Zellen der SCC erkannte man die Aneinanderreihung der Sarkomere mit den Aktin- und Myosinfilamenten. Die Sarkomere waren, wie im Kapitel „1.3.1. Aufbau der Herzmuskelfaser“ beschrieben wurde, in die Z-Linie, die H-Zone, die M-Linie sowie die A- und I-Bande unterteilt. Des Weiteren war in den Zellen der SCC ebenfalls sarkoplasmatisches Retikulum vorhanden.

Weitere Aufnahmen der SCC offenbarten ebenfalls nicht vollständig ausgebildete Kardiomyozyten (Abbildung 24). Direkt unterhalb der Zellmembran bildeten sich in benachbarten Zellen erste, gegenüberliegende Aktin-Myosin-Filamentstrukturen. An diesen Arealen der Zellmembran schien eine Verknüpfung zu sein, so dass der Eindruck einer Zell-Zell-Kommunikation im Rahmen der Entstehung zur Herzzelle bestand (Abbildung 24).

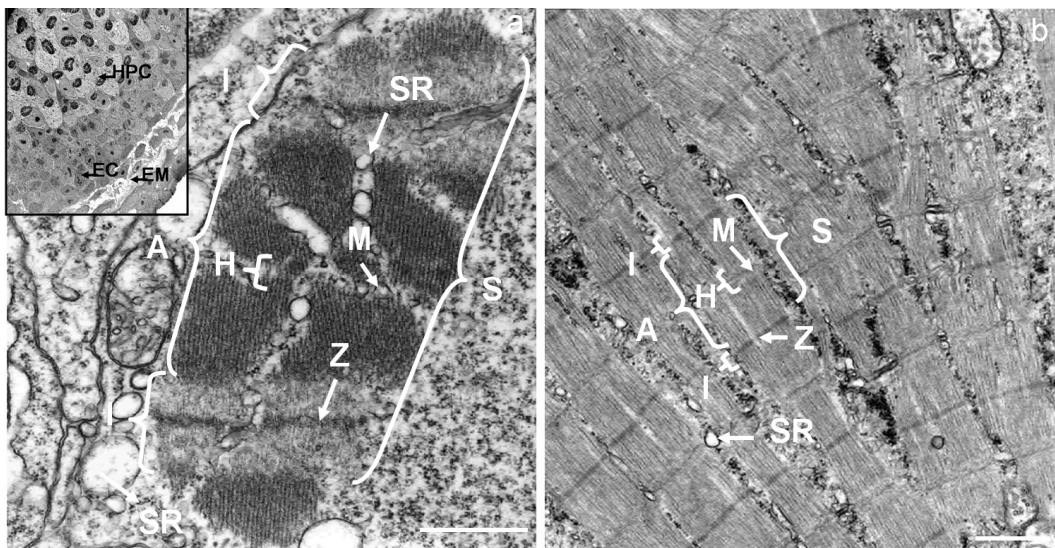


Abbildung 23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kardiomyozyten.

(a) Herzprogenitorzellen einer 270 TG alten Regenbogenforelle. Die Bildeinlage zeigt Herzprogenitorzellen (HPC – Heart progenitor cell) die von einem Endokardium (EC-Endocardium) und einer extrazellulären Matrix (EM) umgeben sind. Die Progenitorzellen zeigen eine beginnende Muskelstreifung mit Sarkomeren (S) sowie Aktin- & Myosinfilamenten (Z, Z-Scheibe; I, I-Band; A, A-Band; H, H-Zone; M, M-Linie). Außerdem ist das sarkoplasmatischen Retikulum (SR) zu sehen. (b) Vollständig entwickelte Herzmuskelzellen eines *in vitro* generierten SCC von einer Regenbogenforellenlarve präpariert bei 270 TG. Die Kardiomyozyte weist aneinander angrenzende Sarkomere mit Z- und M-Linien sowie A- und I-Banden und H-Zonen auf. Skala: 1 µm; [TG-Tagesgrad], (a-Bildeinlage aus Grunow et al. 2010).

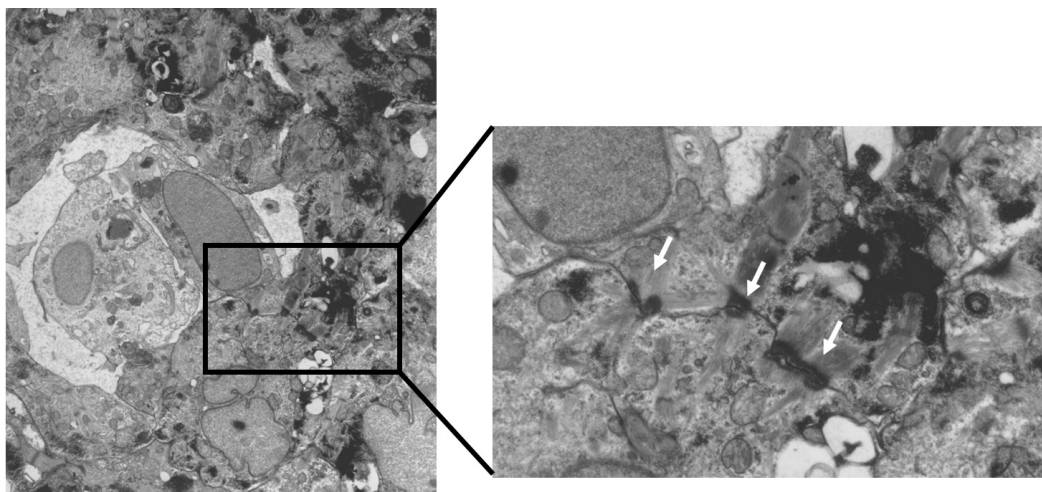


Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen: unvollständig entwickelte Herzzellen. Erste Aktin-Myosin-Filamente sind offenbar an der Membran innerhalb benachbarter Zellen verankert.

Da für den Nachweis und die Funktionalität von Kardiomyozyten nicht nur die Sarkomerstruktur entscheidend ist, wurden weitere Faktoren mittels Elektronenmikroskopie untersucht. So wurden neben der gestreiften Muskulatur auch T-Tubuli in den SCC erfasst, die, wie auch in humanen Kardiomyozyten, auf Höhe der Z-Banden lagen und zudem meist mit einer sarkoplasmatischen Retikulum-Zisterne assoziiert waren (Abbildung 25a, b) (Junqueira & Carneiro 2005). Die Herzmuskelzellen der SCC besaßen zudem eine hohe Anzahl von Mitochondrien im Zytoplasma (Abbildung 25a), um den aeroben Metabolismus, der für die Funktion des Herzens entscheidend ist, zu gewährleisten. Ferner konnten Nuklei (Abbildung 25c), die laut Eschenhagen et al. (2002) in einem gewissen prozentualen Verhältnis vorhanden sein müssen, in den generierten SCC nachgewiesen werden.

Ein weiteres Indiz für die Bildung von funktionierenden Herzzellaggregaten war der Nachweis von Glanzstreifen und gap junctions. Die Existenz von gap junctions wurden bereits in Kapitel „4.5.1. Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion“ und die von Glanzstreifen in Kapitel „4.5.2. Immunfluoreszenz“ nachgewiesen. Auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten klare Strukturen der Glanzstreifen und bestätigten die Bildung eines Synzytiums (Abbildung 25d).

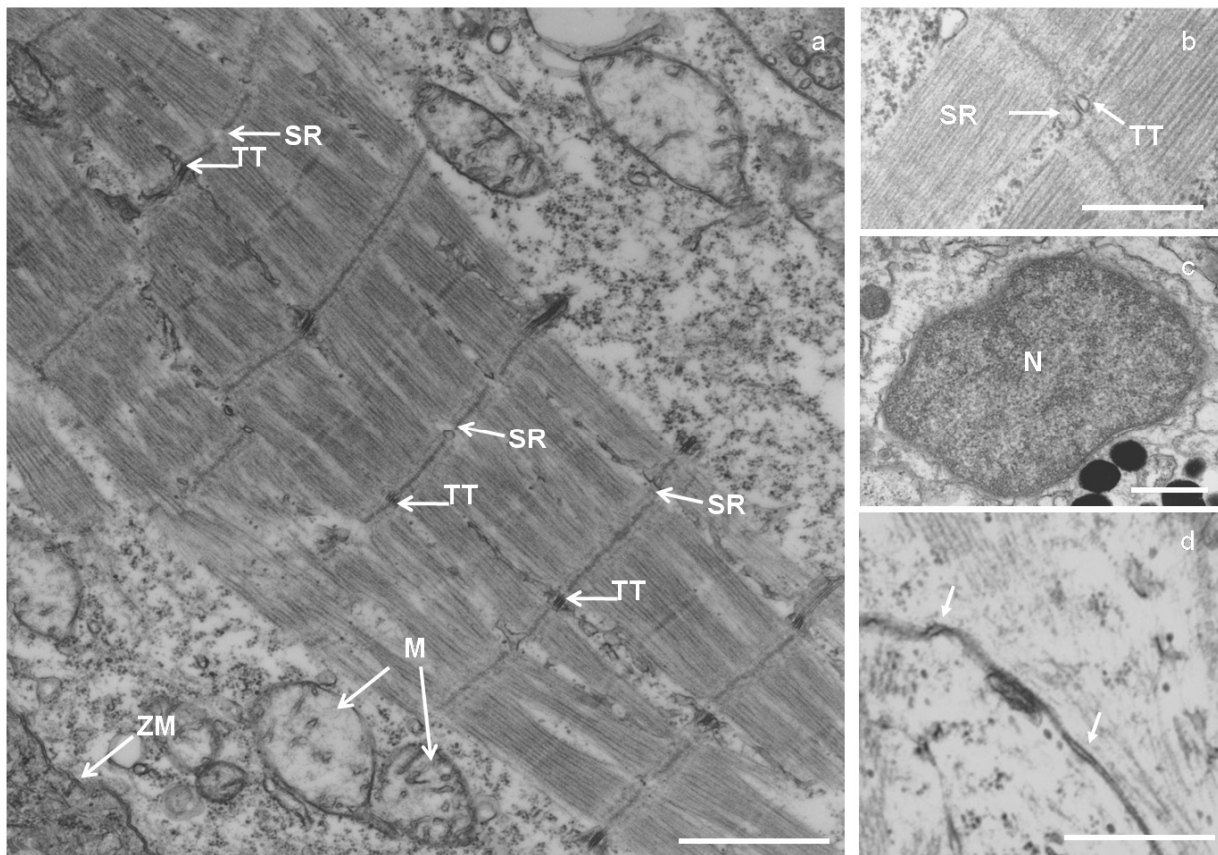


Abbildung 25: Longitudinaler Schnitt durch ein Herzzellaggregat (Elektronenmikroskopische Aufnahme).

(a) Sarkomere mit sarkoplasmatischen Retikuli (SR) und T-Tubuli (TT), die in den Z-Scheiben lokalisiert sind sowie Mitochondrien (M) und Zellmembran (ZM) sind ersichtlich. (b) SR ist mit TT vereint. (c) Nachweis eines Nukleus (N). (d) Die transversal orientierten Abschnitte der Glanzstreifen bestehen aus Streifendesmosomen (Pfeile) und diversen Desmosomen. Skala: 1 μm .

4.6. Schrittmacherzellen in SCC

Neben der Untersuchung auf Kardiomyozyten wurden die Aggregate mittels Immunfluoreszenz auch auf Schrittmacherzellen überprüft, um die spontane Kontraktion der SCC begründen zu können. Ein Nachweis der Schrittmacherzellen erfolgte durch eine Markierung mit einem Antikörper, der gegen ein Protein im HCN4 Kanal gerichtet war. Beim HCN4 Kanal handelt es sich um einen Kanal, der u. a. an der Erzeugung des I_f beteiligt ist (Kapitel „1.3.3. Schrittmacherzellen“). Die zweite Markierung erfolgte gegen das schrittmacherspezifische gap junction Protein Cx 45 (Kapitel „1.3.3. Schrittmacherzellen“).

Die Färbungen zeigten, dass der HCN4-Kanal (Abbildung 26) wie auch das gap junction Protein Cx 45 (Abbildung 27) in den SCC vorhanden waren. Eine detaillierte Betrachtung der SCC

offenbarte die Detektion beider Proteine nur in einem kleinen Areal der SCC. Diese Tatsache wurde auch spezifisch für Mammaliaherzen beschrieben (Coppen et al. 1999, Gros & Jongsma 1996), so dass angenommen werden kann, dass sich in diesem Bereich die Schrittmacherzellen befanden. Die Spezifität der Färbung auf Fischzellen wurde durch das Fehlen des Signals in den übrigen Bereichen des SCC sowie auch durch die Blast Suche bei NCBI, bei der für Cx 45 und HCN4 Homologien zu anderen Vertebraten nachgewiesen wurden, bestätigt. Die Sequenzen von HCN4 und Cx 45 in Fisch (Zebrafisch) und Säugetieren (Mensch, Maus, Ratte) stimmten bis zu 75 % miteinander überein.

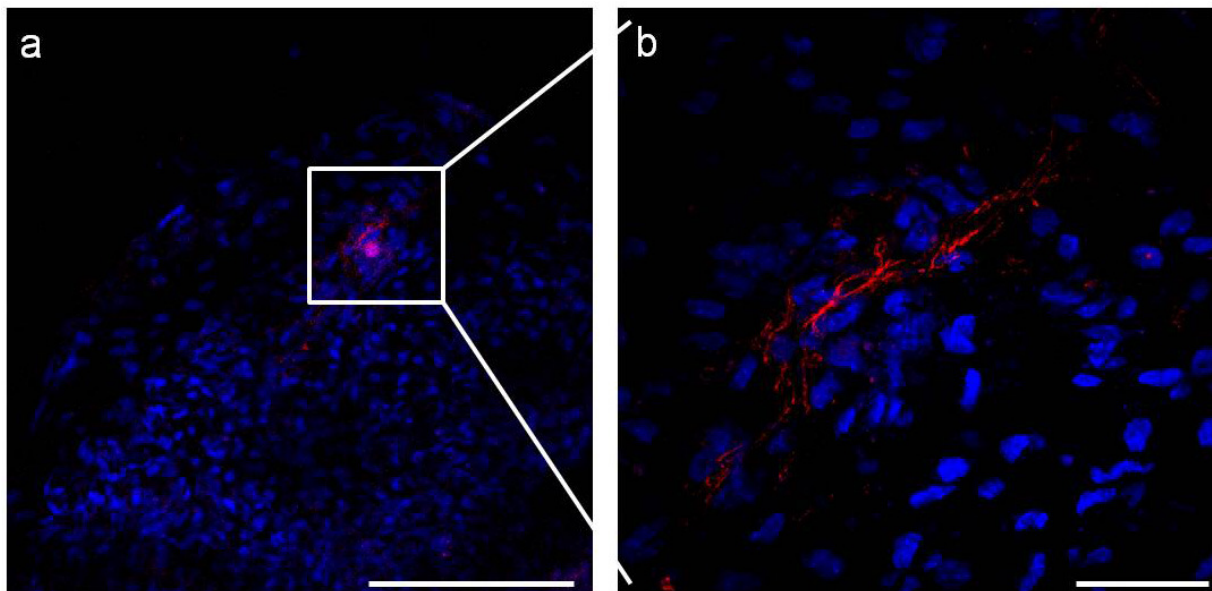


Abbildung 26: Immunfärbung mit HCN4 in Schrittmacherzellen des SCC

Konfokale Aufnahme; (a) Detektion von HCN4. Skala beträgt 200 µm. (b) Ausschnitt des in (a) markierten Bereiches. HCN4-Kanäle werden in einem abgegrenzten Bereich deutlich. Skala beträgt 50 µm.

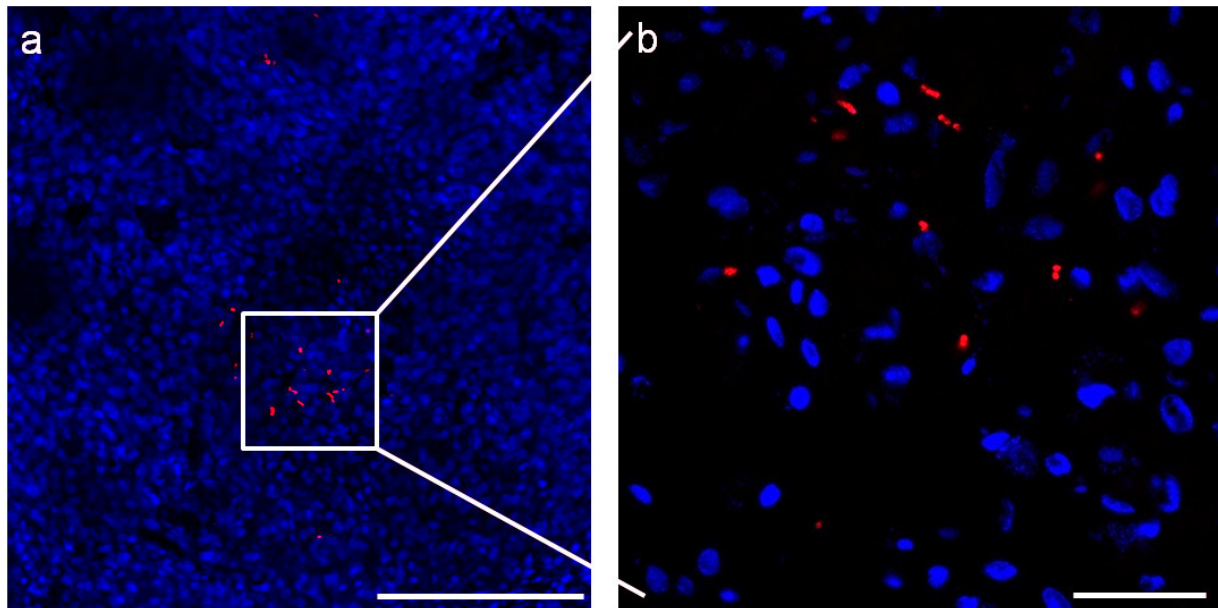


Abbildung 27: Immunfärbung mit Connexin45 in Schrittmacherzellen des SCC.

Konfokale Aufnahme; (a) Detektion von Cx 45. Skala beträgt 200 µm. (b) Ausschnitt des in (a) markierten Bereiches. Gap junction mit Cx 45 werden in einem abgegrenzten Bereich deutlich. Skala beträgt 50 µm.

4.7. Regeneration und Vervielfältigung von SCC

Als weitere Untersuchung wurde die Regenerationsfähigkeit der SCC überprüft. Neben der Regeneration wurde auch die Vervielfältigung der SCC betrachtet. Für beide Versuche wurden die Herzzellaggregate mit Hilfe eines Skalpell zerteilt, wobei für die Propagation ein Teilabschnitt in ein anderes Kulturgefäß überführt wurde.

Ziel war es zu erfahren, ob die *in vitro* generierten SCC auch in der Regenerationsbiologie als Modellsystem geeignet sein könnten. Die Untersuchungen sollten an dieser Stelle nur einen kurzen Einblick in die Thematik der Regeneration der SCC geben. Daher wurden die SCC nur optisch und mit Hilfe von 5-Ethynyl-2-desoxyuridin (EdU) auf ihre Regenerations- und Proliferationsfähigkeit überprüft.

4.7.1. Regeneration von SCC

Im Versuch der Regeneration wurden die kontrahierenden Aggregate (n=8) mit dem Skalpell geteilt. Direkt nach der Teilung war keine Kontraktion erkennbar. Allerdings konnte in 90 % der Fälle nach einigen Minuten eine erneute Kontraktion in mindestens einer der Aggregathälften beobachtet werden. In 37 % war eine Kontraktion beider Hälften vorhanden, wobei diese jeweils

unabhängige Kontraktionsfrequenzen aufwiesen. Bei dem in Abbildung 28 dargestellten Aggregat kontrahierten vor der Teilung zwei Regionen (rot umrandete Region). Kurze Zeit nach der Teilung schlug nur noch die rechte Hälfte. Nach einigen Tagen begann die linke Hälfte ebenfalls wieder in einem kleinen Areal langsam zu kontrahieren, welches sich im Verlauf von zwei Wochen verstärkte, so dass die Kontraktionsfrequenz der Frequenz vor der Teilung ähnelte. Ferner konnten Zellen im Teilungsbereich beobachtet werden, die entweder von den Aggregaten auswanderten oder neu gebildet wurden.

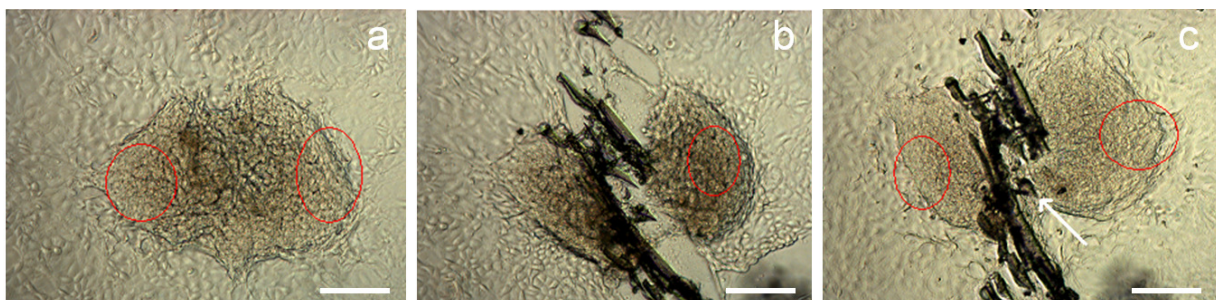


Abbildung 28: Lichtmikroskopische Aufnahmen eines sich regenerierenden SCC.

Die Aufnahmen erfolgten (a) vor der mechanischen Teilung, (b) direkt danach und (c) zwei Wochen nach der Teilung. Rote Kreise stellen die kontrahierenden Areale dar. Pfeil markiert die wieder zusammen gewachsenen Regionen. Nach zwei Wochen konnte eine Kontraktion beobachtet werden, die der vor der Teilung annähernd entsprach. Skala beträgt 200 μm .

Um eine Zellteilung von Kardiomyozyten bei der Regeneration der Aggregate aufzuzeigen, erfolgte der Proliferationsnachweis durch den Einbau von EdU. Ein SCC wurde nach der Teilung mit EdU gefärbt. Als Kontrolle wurde ein nicht geteiltes SCC mit derselben Methode gefärbt. Resultat des Vorgangs war, dass das ungeteilte Aggregat weniger EdU positive Zellen aufwies und diese zudem beliebig über das gesamte Aggregat verteilt waren (Abbildung 29a). Im Gegensatz dazu zeigte das geteilte SCC ein hohes Aufkommen an EdU positiven Zellen im Bereich der Läsion, so dass hier von einer hohen Zellproliferation ausgegangen werden kann (Abbildung 29b).

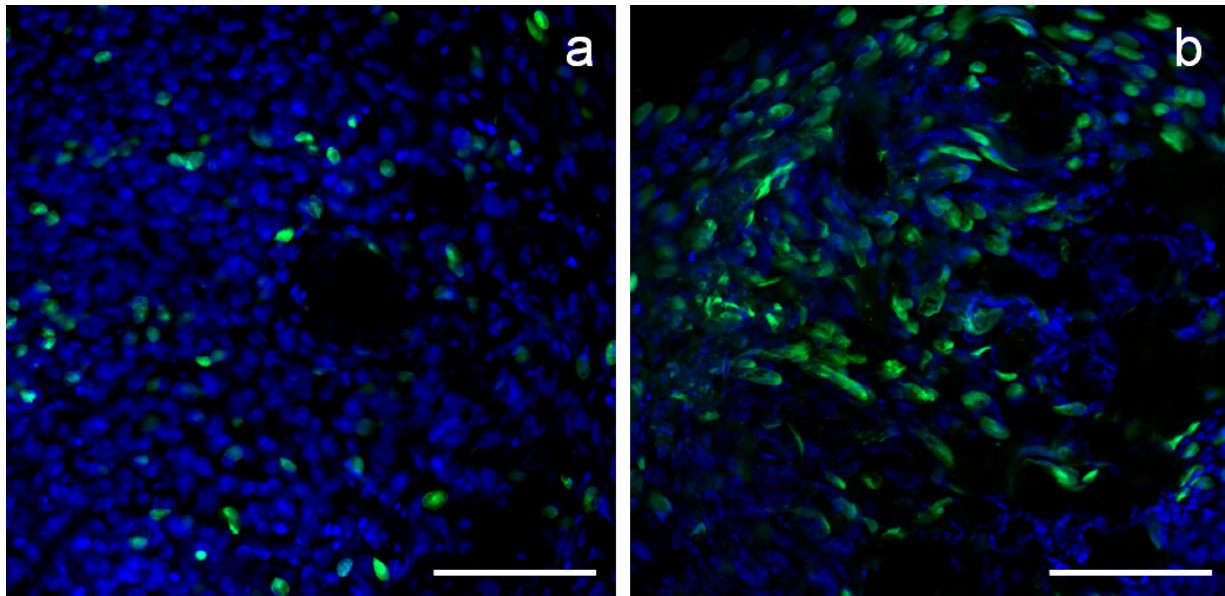


Abbildung 29: Färbung der Zellkernteilung eines (a) unverletzten und (b) verletzten Aggregats mit EdU (grün).

Zellkernfärbung (ungeteilte Zellkerne) mit DAPI (blau). Skala beträgt 100 μm .

4.7.2. Vervielfältigung von SCC

In einem weiteren Versuch wurde die Regeneration gleichzeitig mit der Propagation der SCC untersucht. Das SCC wurde hierfür ebenfalls mechanisch getrennt (Abbildung 30a, b). Ein Teilbereich des Aggregats wurde in ein neues Zellkulturgefäß überführt (Abbildung 30c). Die Kontraktion der SCC stoppte direkt nach der Zertrennung. Nach zwei Tagen konnte bei beiden Teilabschnitten eine spontane und rhythmische Kontraktion beobachtet werden. Die Anzahl der kontrahierenden Aggregate wurde somit verdoppelt.

Die weitere Beobachtung ergab, dass bei dem nicht überführten Aggregat nach zwei Tagen eine Regeneration des amputierten Abschnittes begann. Innerhalb eines Monats wurde der amputierte Bereich vollständig regeneriert (Abbildung 30d). Das Aggregat glich in Form sowie in Größe dem ursprünglichen Aggregat. Während der gesamten Zeit traten in den regenerierten Bereichen ebenfalls Kontraktionen auf, die von dem ursprünglichen Aggregat unabhängig waren. Zudem weiteten sich diese Kontraktionen räumlich aus. Es ist somit anzunehmen, dass sich hier ebenfalls Herzzellen regenerierten.

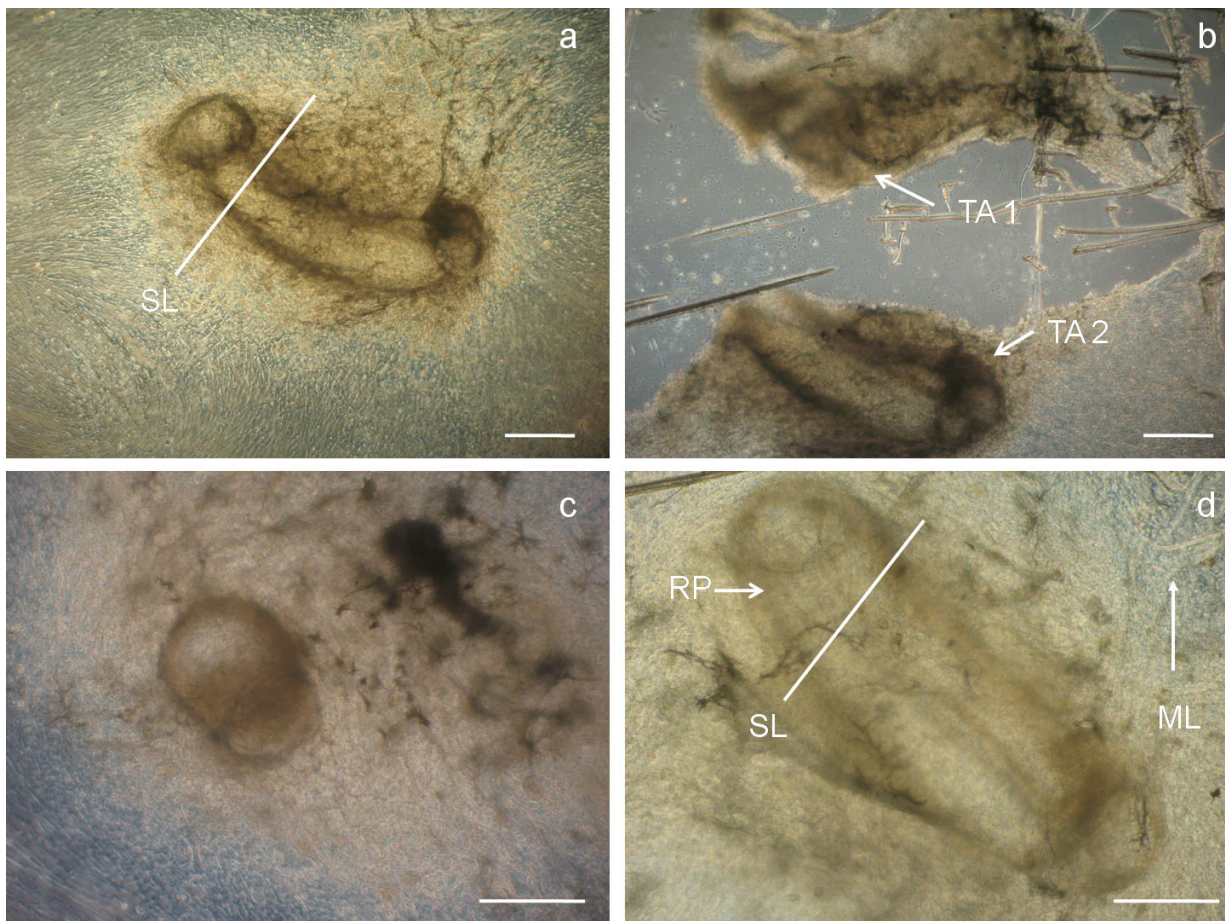


Abbildung 30: Propagation von SCC durch mechanische Separation

(a) Ein SCC in Passage Eins der Zellkultur vor der Teilung. Die Separationslinie (SL) zeigt die Stelle, an dem das Aggregat mit dem Skalpell geteilt wurde. (b) Direkt nach der Teilung in Teilaggregat (TA) 1 und 2, aber vor der Isolation von TA1. (c) TA1 ein Monat nach der Isolation. (d) Das in der ursprünglichen Zellkultur verbliebene zweite TA ein Monat nach Sektion. SL markiert die frühere Separationslinie und RP den regenerierten Part des isolierten Areals. Um das Zellaggregat wuchsen, ähnlich wie zuvor, Zellen in einem Monolayer (ML). Skala: 500µm; (a & d aus Grunow et al. 2010).

4.8. Untersuchungen der elektrophysiologischen Aktivität von SCC

Ziel der folgenden Untersuchung war die Überprüfung der elektrophysiologischen Eigenschaften der *in vitro* generierten SCC. Für die Verwendung als humanes pharmakologisches Testsystem müssen die elektrophysiologischen Eigenschaften und somit die Ionenkanäle der SCC denen der humanen Herzzellen ähneln. Die elektrophysiologischen Eigenschaften wurden in dieser Arbeit mit zwei Methoden untersucht, der extrazellulären Messung via MEA und der intrazellulären Messung via scharfe Elektrode.

Bei den extrazellulären Messungen wurden die Weiterleitungseigenschaften im bestehenden Synzytium ermittelt (Kapitel „1.5.2. Extrazelluläre Signalableitung“). Ziel war es festzustellen, ob die Zellen des SCC elektrisch gekoppelt sind, wie es auch im Herz aller Vertebraten der Fall ist (Kapitel „1.4.2. Feldpotential“).

Die intrazelluläre Messung ermöglichte die einzelnen Parameter der Aktionspotentiale zu bestimmen (Kapitel „1.5.1. Intrazelluläre Signalableitung“), die wiederum durch die Aktivität der Ionenkanäle hervorgerufen werden (Kapitel „1.4.1. Aktionspotential“).

4.8.1. Extrazelluläre Ableitungen - MEA

Die erste der zwei genannten elektrophysiologischen Untersuchungsmethoden wurde mittels des Multielektroden Arrays (MEA) vorgenommen. Mit dem MEA erfolgte eine Online- und Echtzeit-Detektion der SCC. Für den Versuch wurden zwei SCC aus zwei verschiedenen Larven und von unterschiedlichen Präparationstagen auf dem MEA untersucht. Aggregat eins, welches das kleinere von den beiden SCC war, stammte von einer Larve im Augenpunktstadium. Dieses Aggregat begann bereits in Woche Null mit der Kontraktion. Es wurde 29 Tage nach Beginn der Kontraktion isoliert und auf das MEA überführt. Das zweite Aggregat wurde sieben Tage nach Beginn der Kontraktion auf das MEA umgesetzt. Es stammte von einer präparierten Larve, die bereits sechs Tage im Dottersackstadium war. Dieses SCC hatte zudem eine größere Fläche. Der Zusammenhang zwischen Larvenalter und unterschiedlicher Größe der Aggregate deckte sich mit den in Kapitel „4.3.3. Größe der Aggregate“ erhaltenen Ergebnissen.

Es wurde beobachtet, dass beide SCC am Tag zwei auf dem MEA adhärirten. Nach drei Tagen auf dem MEA konnten bei beiden SCC zum ersten Mal elektrische Aktivitäten abgeleitet werden. Diese bestanden aus spontan auftretenden Einzelsignalen, so genannten Spikes.

Abbildung 31 zeigt die von den 60 Elektroden eines MEAs verzeichneten spontanen Aktivitäten für eine Zeitdauer von fünf Sekunden nach drei, 28 und 49 Tagen. Die linke Abbildung zeigt dabei die Aggregate. Jedes einzelne Fenster der rechten Abbildung stellt die von einer Elektrode gemessene Aktivität dar. Die Aktivität war gekennzeichnet durch das für das Herz typische extrazelluläre Feldpotential (FP). Während der ersten Tage konnte das FP auf 18 Elektroden gemessen werden (Abbildung 31a). Feldpotentiale des oberen und größeren SCC aus der Larve zwei waren auf 15 Elektroden vorhanden. Das untere und kleinere SCC der Larve eins wies FPs auf drei Elektroden auf (Abbildung 31a). In den folgenden Tagen migrierte das untere der beiden

SCC nach oben, in Richtung des größeren Aggregates. Zudem wurde eine Vergrößerung durch Auswachsen von Zellen bei beiden SCC festgestellt (Abbildung 31b). Stabile Aufnahmen der Aggregate konnten bis Tag 49 nach Überführung gemacht werden (Abbildung 31c). Während des gesamten Beobachtungszeitraumes war die Netzwerkaktivität (Feldpotential im gesamten Aggregat) stabil und die Spikes traten in regelmäßigen Abständen auf.

Weiterhin war zu verzeichnen, dass mit zunehmender Kulturdauer und zunehmender Größe der SCC auch die Anzahl der Elektroden, von denen Signale abgeleitet werden konnten, anstieg. Am Ende des Experiments wiesen 49 von 60 Elektroden Signale auf. Aufgrund des Zusammenwachsens beider Aggregate konnte nicht ermittelt werden, wie viele Elektroden das jeweilige SCC besetzte (Abbildung 31c).

Weiter im Detail zeigte sich, dass während der ersten Wochen das Feldpotential des kleineren und auch zeitlich jüngeren SCC geringer war als das der älteren Larve. Das Feldpotential des kleinen SCC wies Spikes von etwa $880 \mu\text{V}$ auf. Die Spikeintervalle betrugen hierbei $0,8 \text{ s}$. Das große SCC wies bei seinem FP Spikes von etwa $1250 \mu\text{V}$ in Intervallen von 1 s auf (Abbildung 32a).

Im Laufe der Zeit verringerte sich jedoch die Frequenz beider Aggregate (Abbildung 32b, c). Es konnte eine Behinderung der Kontraktion aufgrund des ausgewachsenen Zell-Monolayers beider SCC beobachtet werden.

Des Weiteren schienen am Tag 28 beide Aggregate räumlich zusammengewachsen zu sein. Die Spikes beider SCC traten allerdings trotz des Zusammenwachsens bzw. Zellkontaktes noch unabhängig voneinander auf (Abbildung 32d). Am Tag 49 hingegen hatten beide Aggregate nur noch ein gemeinsames Feldpotential (Abbildung 32e). Bei beiden SCC bzw. auf allen Elektroden waren Spikes in Intervallen von etwa $2,5 \text{ s}$ zu verzeichnen. Die Intensität der Spikes war jedoch auf den Elektroden verschieden (Abbildung 31c, Abbildung 32c). Es konnte dabei festgehalten werden, dass die Intensitäten in der Mitte des zusammengewachsenen SCC am stärksten waren und sich zum Rand des SCC verringerten (Abbildung 31c).

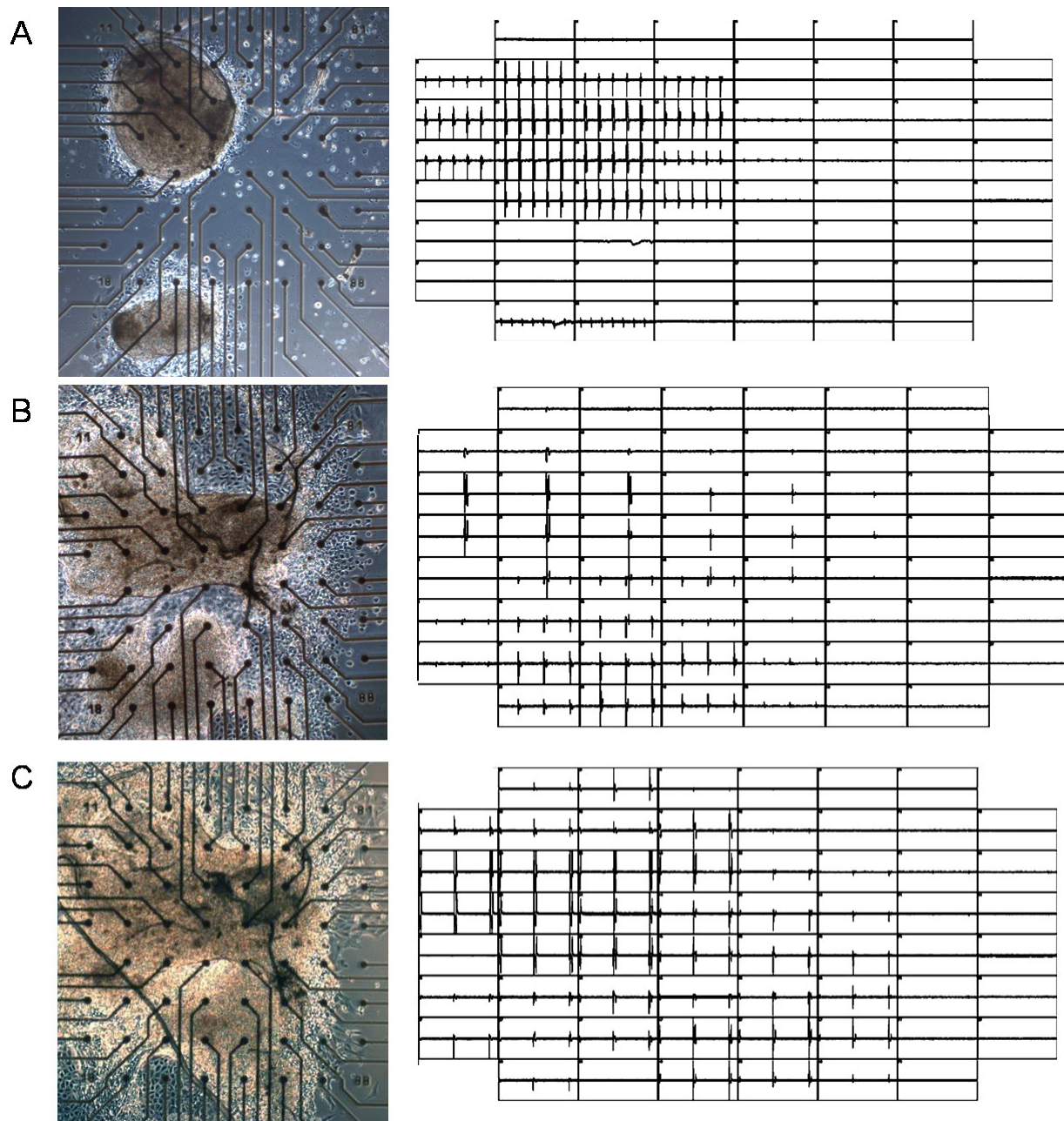


Abbildung 31: Spontane Aktivität von SCC auf einem Multielektroden Array (MEA).

Darstellung der von 60 Elektroden des MEAs gemessenen Aktivität am (a) Tag drei, (b) Tag 28 und (c) Tag 49 nach Überführung der SCC. Links: Morphologische Veränderung der spontan kontrahierenden Aggregate. Rechts: Jedes Fenster zeigt die von den Elektroden verzeichneten Signale für einen Zeitausschnitt von fünf Sekunden; (aus Grunow et al. 2011).

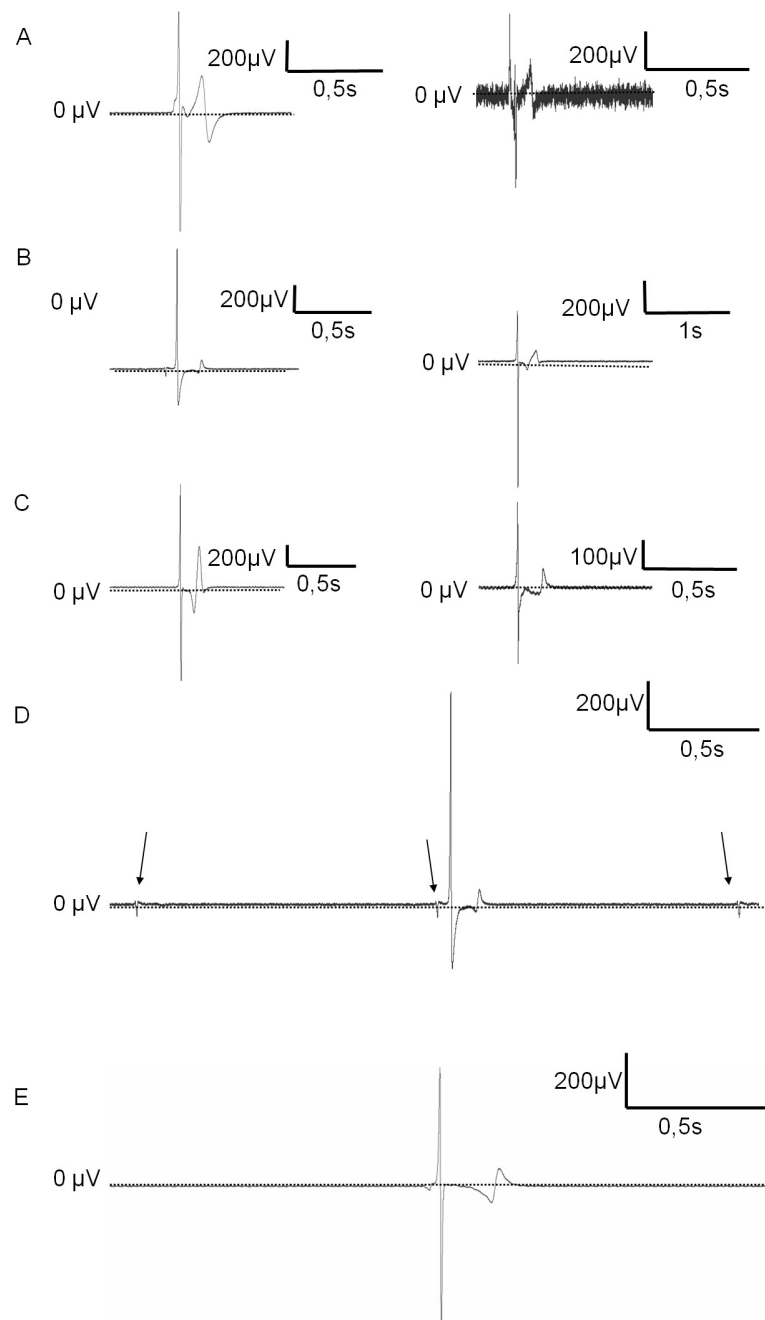


Abbildung 32: Aktivität einzelner Elektroden auf dem MEA.

Die linke Spalte zeigt das gemessene Feldpotential des oberen und größeren Aggregates (Elektrode 23). Die rechte Spalte zeigt das Feldpotential des unteren und kleineren SCC (Elektrode 38). Dargestellt sind die Spikes an (a) Tag drei, (b) Tag 28 und (c) Tag 49 nach Überführung der SCC. Abbildung 32d - die Überlappung der SCC auf Elektrode Nr. 25 am Tag 28. Die Zellen beider Aggregate kontrahieren trotz Zusammenlagerung unabhängig voneinander. Das untere und kleinere Aggregat zeigt ein geringeres Potential (Pfeile). Zudem ist die Frequenz der Kontraktionen höher, als bei dem oberen und größeren SCC, welches ein höheres Feldpotential aufweist. Abbildung 29e zeigt das gemeinsame Feldpotential nachdem beide Aggregate zu einem Synzytium geworden sind (Elektrode Nr. 25 am Tag 49); (a bis c aus Grunow et al. 2011)

4.8.2. Intrazelluläre Ableitungen - scharfe Elektrode

Wie eingangs beschrieben ist die intrazelluläre Messung für die Ermittlung der einzelnen Aktionspotentialparameter erforderlich. Zu den Aktionspotentialparametern gehören u. a.: Ruhemembranpotential (RMP), Aktionspotential-Amplitude (APA), maximale Depolarisationsgeschwindigkeit (dV/dt_{\max}); Aktionspotentialdauer bei 50 % und 90 % der Repolarisation (APD_{50} und APD_{90}) und die Periode (Zeitraum zwischen zwei APs). Für die Untersuchung der intrazellulären Ableitung erfolgten Messungen in 25 Kardiomyozyten aus zehn verschiedenen SCC. Jedes dieser SCC entstand aus einer anderen Regenbogenforellenlarve.

Ähnlich zu den APs von humanen ventrikulären Zellen, zeigten alle AP-Aufnahmen der SCC einen schnellen Anstieg in der Depolarisationsphase, gefolgt von einer langen Plateauphase, welche wiederum in einer schnellen Repolarisation endete. In der Abbildung 33 ist das AP einer Zelle eines SCC mit einem Ruhemembranpotential von -65 mV beispielhaft dargestellt.

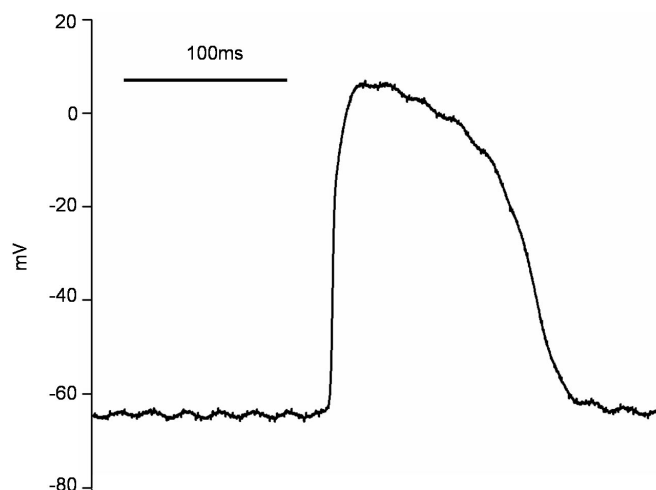


Abbildung 33: Aktionspotential einer Kardiomyozyte aus einem *in vitro* kultivierten SCC.

Das Ruhemembranpotential beträgt -65 mV. Der schnelle Anstieg des Aktionspotentials (AP) erreicht 7 mV. Die Dauer des APs bei 90% der Repolarisation beträgt 130 ms; (aus Grunow et al. 2011).

Die durchschnittlichen AP Parameter der *in vitro* kultivierten SCC der Regenbogenforellenlarven sind in „Tabelle 23: AP Parameter unbehandelter SCC“ zusammengefasst. Aus der Aktivität der 25 Zellen ergab sich ein durchschnittliches RMP von -53 mV und ein dV/dt_{\max} von 19 V/s. Die APA erstreckte sich über 62 mV. Weiterhin wurden in den Zellen die APD analysiert. Die Dauer

des APs bei 50 % Repolarisation (APD₅₀) betrug durchschnittlich 83 ms. Die durchschnittliche APD₉₀ wies 105 ms auf. Die Periode zwischen zwei APs dauerte im Durchschnitt 1,3 s. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Periode des APs in etwa den gemessenen Spikeintervallen in der extrazellulären Ableitung entsprach (Kapitel „4.8.1. Extrazelluläre Ableitungen - MEA“).

Tabelle 23: AP Parameter unbehandelter SCC

Parameter	SCC (n= 25)
RMP [mV]	-52,8 ± 0,2
APA [mV]	61,9 ± 0,2
dV/dt _{max} [V/s]	18,7 ± 2,6
APD50 [ms]	82,8 ± 7,6
APD90 [ms]	104,8 ± 7,7
Periode [s]	1,3 ± 0,3

Aktionspotential wurde mit einer scharfen Elektrode in Einzelzellen der aus der Regenbogenforellenlarve entstandenen SCC gemessen. Die SCC kontrahierten spontan bei Raumtemperatur. RMP, Ruhemembranpotential; APA, Aktionspotentialamplitude, dV/dt_{max}, maximale Depolarisationsgeschwindigkeit; APD₅₀ und APD₉₀, Aktionspotentialdauer bei 50% und 90% Repolarisation; Periode, Periode zwischen zwei Aktionspotentialen – Reziproke zur Schlagfrequenz. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler; (aus Grunow et al. 2011).

4.9. Pharmakologische Untersuchungen an Kardiomyozyten mit Hilfe der scharfen Elektrode

Für die Funktion als pharmakologisches Testmodell ist des Weiteren die Reaktion der Aggregate auf Medikamente bedeutsam. Da Pharmaka spezifische Herzkanäle beeinflussen, kann neben dem Überprüfen der Reaktion auf das Medikament zugleich ein Hinweis auf die Existenz des Kanals in den SCC gesammelt werden. Für diese Untersuchung wurden Medikamente gewählt, bei denen die Reaktion in Säugetierherzen bekannt ist, so dass spätere Vergleiche vorgenommen werden konnten. Eines der hier verwendeten Pharmaka wirkt in Säugern auf den L-Typ Calciumkanal und die anderen Beiden auf einen Kaliumkanal.

4.9.1. Modifikation des Aktionspotentials durch Isoproterenol

Einer der wichtigsten Determinanten in der Herzphysiologie ist die intakte Antwort auf Hormone und Transmitter des zentralen Nervensystems. Daher wurde für die Untersuchung des Calciumkanals Isoproterenol, ein β -Phenylethylamin-Derivat, verwendet (Aktories et al. 2009). Isoproterenol ist ein Standardagonist der β_1 - und β_2 -adrenergen Signalkaskade und wirkt auf den Sympathikus. Dieses Medikament agiert durch Phosphorylierung der L-Typ Calciumkanäle durch die cAMP-abhängige Kinase (Kim et al. 2000). So wird vor allem die Phase zwei – die Plateauphase des APs beeinflusst (Kapitel „1.4.1. Aktionspotential“). Nach Zugabe von Isoproterenol kommt es in Herzzellen zu einem cAMP Anstieg, so dass die Proteinkinasen verstärkt aktiviert werden. Ergebnis dieser Aktivierung ist die zunehmende Steilheit der Depolarisation sowie ein vermehrter Calciumeinstrom in die Zelle. Eine Zunahme der Kontraktionsintensität (positiv inotropisch) durch den vermehrten Einstrom von Calcium ist zu verzeichnen (Aktories et al. 2009).

In Abbildung 34a ist der Effekt nach Zugabe von 10 μ M Isoproterenol auf die SCC zu sehen. Der Anstieg in der Depolarisationsphase erfolgte im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelte SCC) schneller. Außerdem war bei diesen Experimenten in den behandelten SCC der kurze Einstrom von Kalium am Peak der Kurve stärker ausgeprägt. Des Weiteren konnte eine verlängerte Plateauphase beobachtet werden. Bei den SCC war nach Zugabe von Isoproterenol ein positiver inotropischen Effekt zu verzeichnen (optische Kontrolle).

In Abbildung 34b ist die durchschnittliche APD_{90} von Zellen unbehandelter und mit Isoproterenol behandelter SCC dargestellt. Sie zeigt in aller Deutlichkeit, dass die APD_{90} bei den behandelten SCC durchschnittlich 200 ms länger als bei den Kontrollen waren.

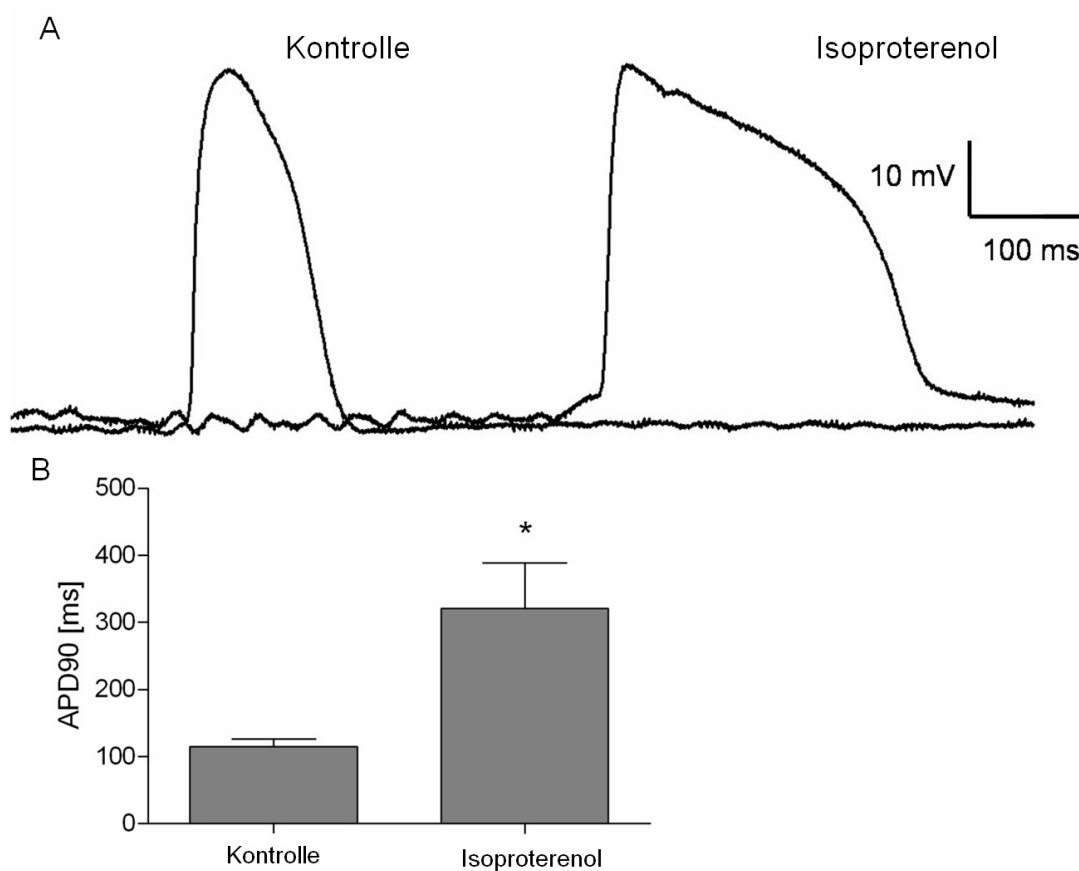


Abbildung 34: Darstellung der Wirkung des Agonisten Isoproterenol.

(a) Das Aktionspotential wird verlängert durch Zugabe von 10 μ M Isoproterenol. (b) Ausdehnung der Aktionspotentialdauer 90 (APD90) in behandelten ($n=5$) und unbehandelten ($n=5$) SCC mit 10 μ M Isoproterenol. Daten \pm Standardabweichung * $p < 0.05$ signifikant verschieden zur Kontrolle; (aus Grunow et al. 2011).

4.9.2. Modifikation der SCC-Aktivität durch Kaliumchlorid

Die Reaktion auf KCl wurde auf einem SCC getestet, welches bereits 16 Tage in Kultur kontrahierte. Per Lichtmikroskop (Axiovert 40C; Zeiss, Dt.) und Videoaufnahme wurde zunächst die Schlagfrequenz dieses Aggregates für 15 Sekunden aufgezeichnet und auf eine Minute hochgerechnet. Über einen Zeitraum von zehn Minuten lag die Frequenz zwischen 66 und 72 Schlägen pro Minute, so dass man von einer Stabilität ausgehen konnte. Nach zehn Minuten wurde eine 1,75 mM KCl-Lösung hinzugegeben. Die Kontraktionsfrequenz des Aggregates erhöhte sich nach Zugabe der KCl-Lösung um das Dreifache und verlangsamte sich anschließend, bis es vollständig stoppte und keine Kontraktion mehr erkennbar war. Nachdem das Medium mit der 1,75mM KCl-Lösung entfernt und durch frisches DMEM-20 % FKS ersetzt

wurde, konnte nach zwei Minuten eine erneute Kontraktion dokumentiert werden (Abbildung 35). Allerdings betrug die Schlagfrequenz anfangs nur 16 Schläge pro Minute, stieg aber in den folgenden drei Tagen fast wieder auf ihre ursprüngliche Höhe.

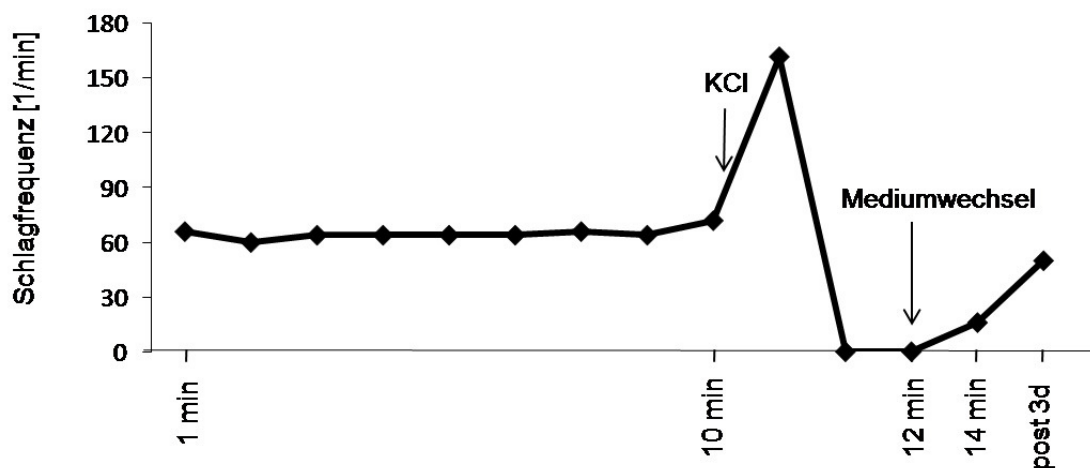


Abbildung 35: Veränderung der Kontraktion durch Kaliumchlorideinwirkung.

Nach Zugaben von 1,75mM KCl-Lösung konnte optisch keine Kontraktion bei dem SCC wahrgenommen werden. Nach Ausspülung durch Mediumwechsel begann das SCC erneut zu kontrahieren.

4.9.3. Modifikation des Aktionspotentials durch Rilmakalim

Im folgenden Versuch sollte die Reaktion der SCC auf Rilmakalim untersucht werden. Rilmakalim ist ein Kaliumkanalöffner. Bereits 1992 wurde die Wirkung dieses Medikaments von Linz et al. (1992) in höheren Wirbeltieren studiert. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Rilmakalim den Blutdruck senkt. Der größte signifikante Effekt von Rilmakalim auf das Myokard ist eine konzentrationsabhängige Reduktion der APD (Riccioppo Neto et al. 1997, Bouchard et al. 1995).

Die Überprüfung auf homologe Kaliumkanäle bzw. auf den K_{ATP} -Kanal in den generierten SCC erfolgte mittels der Zugabe von 10 μ M Rilmakalim. Die Reaktion der SCC auf Rilmakalim wurde durch die Ermittlung der Aktionspotentiale und vor allem der APD untersucht (n=3). Die Ergebnisse zeigten, dass im Vergleich zu Kardiomyozyten unbehandelter SCC (n=3) die Herzzellen der SCC nach Zugabe von Rilmakalim mit einer Erhöhung der Schlagfrequenz reagierten und dadurch der Abstand zwischen zwei APs abnahm (Abbildung 36a). Zusätzlich

reduzierte Rilmakalim die APD_{90} (Abbildung 36b). Weiterhin zeigte das Experiment eine Senkung der Kontraktionsperiode in den behandelten SCC (Abbildung 36b), welches das indirekte Ergebnis der APD-Reduktion ist.

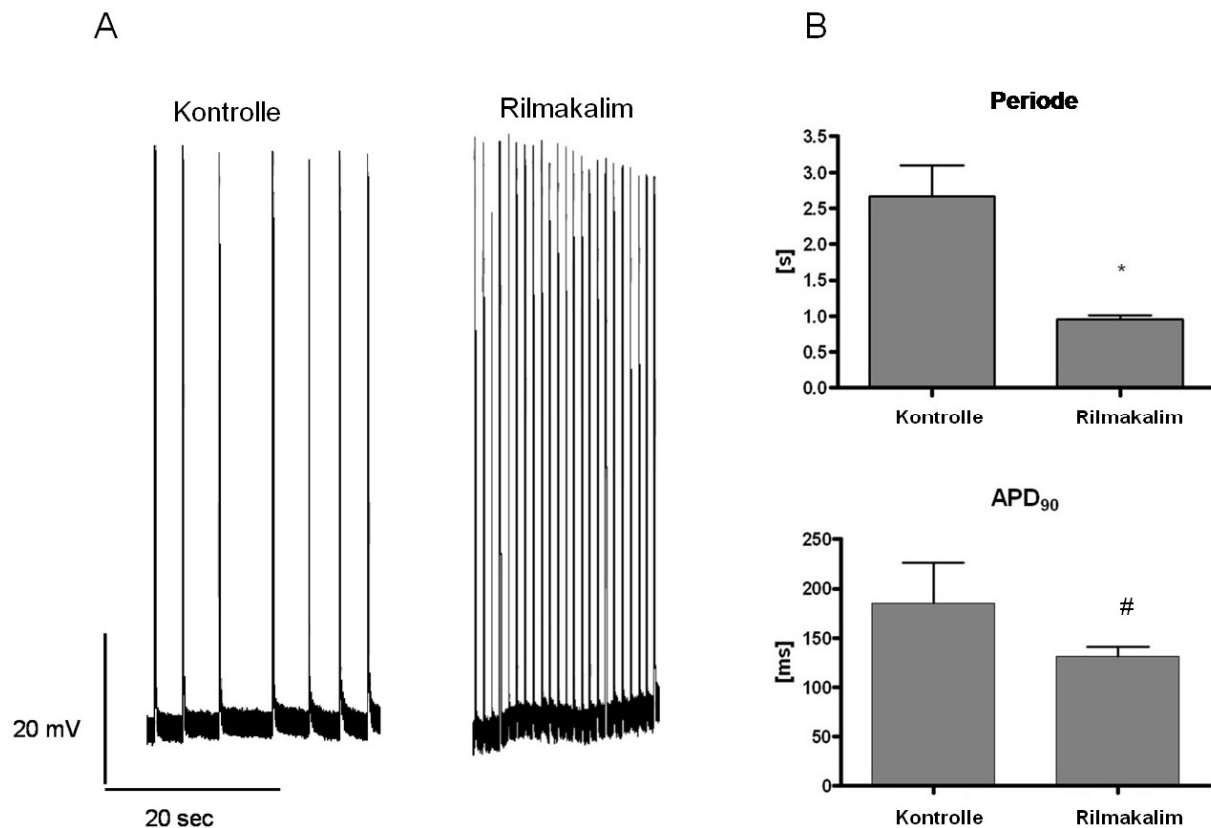


Abbildung 36: Darstellung der Wirkung des Kaliumkanalöffners Rilmakalim

(a) Auswirkung auf die Frequenz und das Aktionspotential der SCC (n=3) durch Zugabe von 10 μ M Rilmakalim. (b) Auswirkung auf die Periode und die APD₉₀ in behandelten (n=3) und unbehandelten (n=3) SCC durch 10 μ M Rilmakalim. Daten \pm Standardabweichung *p < 0,05, #p < 0,27 signifikant verschieden zur Kontrolle; (aus Grunow et al. 2011).

V. Diskussion

5.1. Eigenschaften ichthyologischer Kulturen

Der Hintergrund der vorliegenden Arbeit ist das Interesse an *in vitro* Modellen in der humanen Herzforschung. In der Vergangenheit wurden vor allem an murinen, aviären, ichthyologischen und humanen Kardiomyozyten elektrophysiologische Untersuchungen vorgenommen, um geeignete *in vitro* Modellsysteme für verschiedene Gebiete der Kardiologie (z. B. Pharmakologie, Regeneration, Entwicklung) zu finden und zu entwickeln. Die derzeit genutzten kardiologischen Modelle weisen häufig einen Mangel an spontaner Kontraktilität auf. In diesen Fällen müssen die Kardiomyozyten durch elektrische Impulse angeregt werden (Goldstein et al. 2004, Vornanen 1998, Mortensen und Gesser 1999, Brette et al. 2008, Shiels et al. 2006). Es existieren zwar auch Modelle, die spontan kontrahieren, allerdings ist diese Kontraktion nur von kurzer Dauer.

Auch meine Studie befasst sich mit der Etablierung eines *in vitro* Testsystems für die medizinische und pharmakologische Herzforschung. Das Modell besteht aus 3dimensionalen, über längere Zeit spontan und autonom kontrahierenden kardiomyogenen Zellaggregaten (SCC), die sich nach einem Trypsinverdau in Primärzellkulturen von Fischlarven bildeten.

Es konnte bewiesen werden, dass diese Methode der Herzaggregatbildung nicht nur bei einer Fischart anwendbar ist, sondern auf diverse Spezies übertragen werden kann. Während dieser Arbeit wurde die Präparation und die Bildung von SCC für sechs verschiedene Fischarten (Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), Meerforelle (*Salmo trutta trutta*), Atlantischer Stör (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*), Maräne (*Coregonus maraena*), Zebrafisch (*Danio rerio*) und Atlantischer Lachs (*Salmo salar*) aus drei unterschiedlichen Familien (Karpfenartige – *Cyprinidae*, Lachsartige – *Salmonidae* und Störartige – *Acipenseriformes*) vorgenommen und nachgewiesen. Aufgrund der hohen Bandbreite an Fischarten, bei denen SCC generiert werden konnten, ist anzunehmen, dass die Möglichkeit zur Bildung von SCC aus Larven von Teleostei generell besteht.

In dieser Arbeit beziehen sich die weiteren Untersuchungen jedoch ausschließlich auf die Regenbogenforelle, da diese Fischart, wie bereits im Kapitel „1.2. Modellsysteme“ aufgeführt, ökonomisch bedeutend ist und ihre Eier daher leicht zu erhalten sind. Des Weiteren ist die

Regenbogenforelle, aufgrund ihrer nicht anspruchsvollen Haltung, ein sehr beliebter Forschungsorganismus, mit dem viele Wissenschaftler arbeiten.

In dieser Studie wurden Zellen von Regenbogenforellenlarven verwendet. Die Zellen dieser Primärkulturen besaßen verschiedene Formen (Kapitel „4.1. Bildung spontan kontrahierender Zellaggregate“). Da das Ausgangsmaterial dieser Primärkulturen alle Organe bzw. Gewebe der Fischlarve beinhaltet, können die unterschiedlichen Zellformen auf verschiedene Zelltypen zurückgeführt werden. Primärzellkulturen weisen viele Eigenschaften bzw. Charakteristika auf, durch die auch der Organismus gekennzeichnet ist. So können beispielsweise alle Zelltypen, die der Organismus hat, *in vitro* vorkommen (Schmitz et al. 2009).

In der ersten Passage (Beginn einer Dauerzellkultur) bildeten die Zellen ebenfalls verschiedene morphologische Strukturen, so dass man auch hier von der Existenz verschiedener Zelltypen ausgehen kann. In der Primärkultur sowie in der ersten Passage bildeten sich SCC. Die Zellkultur der Regenbogenforelle wurde bis Passage 16 beobachtet. Die Zellformen schienen mit zunehmender Anzahl an Passagen homogener zu werden. Zudem traten ab der zweiten Passage keine SCC mehr auf. Ein Vergleich der SCC in der Primärzellkultur und der ersten Passage zeigte unterschiedliche Formen der Aggregate an. So wiesen Aggregate der Primärzellkultur hauptsächlich eine Kugelform oder ein Zwei-Zentersystem auf. Die Kontraktionen dieser SCC waren in den meisten Fällen rhythmisch. In Passage Eins hingegen war die Form der SCC länglich bzw. schlauchförmig. Die Aggregate kontrahierten zudem unrhythmisch an verschiedenen Bereichen des Zellaggregats (Kapitel „4.1. Bildung spontan kontrahierender Zellaggregate“). Es ist möglich, dass sich aufgrund der fortschreitenden Passage die Zellen in der Zellkultur veränderten und eine Zusammenlagerung von Kardiomyozyten evtl. nicht mehr stattfinden konnte, so dass keine in sich einheitlichen SCC mehr gebildet wurden. Um diese Vermutung zu verifizieren, wären Analysen auf Protein bzw. Genbasis nötig gewesen, um den bzw. die Zelltypen in der Kultur zu charakterisieren und eine Veränderung der Zellkultur im zeitlichen Verlauf zu untersuchen. Eine Ursache dieser Zellkulturveränderung könnten Stammzellen sein, die in jedem Organismus auftreten. Stammzellen sind in der Lage sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren und außerdem neue Tochterstammzellen zu bilden. Zudem sind Stammzellen in der Lage über mehrere Passage in Kultur zu überleben. Rapoport et al. (2009) beschrieben, dass *in vitro* Kulturen für ein Überleben den schnellsten Zelltyp selektieren. Anhand von Stammzellmarkern, wie z. B. Oct4 oder Nestin, konnte gezeigt werden, dass die Zellen, die diese Proteine aufwiesen, mit steigender Passage zunahmen. Stammzellen

schiene somit die schnellste Wachstumsrate zu haben und wurden daher selektiert (in dieser Studie Untersuchungen am humanen Pankreas). Weiterhin bewiesen Rapoport et al. (2009), dass eine De- und Transdifferenzierung zu einem signifikanten Anteil durch Zellisolation und Zellkultivierung (Passagierung) verursacht wird. Diese Untersuchung könnte evtl. auch auf die hier etablierte Zellkultur der Regenbogenforelle übertragen werden. In diesem Fall würden Stammzellen für die homogenere Zellform und auch die Absenz der SCC ab Passage Zwei verantwortlich sein. Eine Untersuchung mit Stammzellmarkern, die für Fisch bisher nicht etabliert wurden, wäre nötig, um diese Aussage zu bestätigen.

Da für die Etablierung eines pharmakologischen Testsystems ein stabiles und konstantes Modell vorliegen muss, waren die in Passage Eins gebildeten SCC für die physiologische und elektrophysiologische Untersuchung nicht relevant. Ursache war die unregelmäßige Kontraktion der SCC in dieser Passage. Aus diesem Grund beschränkte sich die Arbeit auf Untersuchungen der SCC aus Primärzellkulturen.

5.1.1. Bildung spontan kontrahierender Zellaggregate

Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung der SCC einer Gauß'schen Normalverteilung folgte (Kapitel „4.3.1. Aggregatanzahl *in* Abhängigkeit vom Larvenalter“). Die SCC generierten sich aus Larven, die sich in den Entwicklungsstadien vom Beginn Augenpunktstadium bis Ende Dottersackstadium befanden. Das Maximum der Entstehung der SCC war bei der Präparation von Fischlarven, die sich kurz vor dem Schlupf befanden (325 TG, Abbildung 14). In diesem Larvenstadium lag die Ratio der Bildung der SCC bei 1,5. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt konnten aus einer Larve bis zu fünf SCC entwickelt werden. Für ein Testsystem, bei dem möglichst viele SCC aus einem Tier generiert werden, sollte daher der Zeitpunkt der Präparation um den Schlupf der Larven gewählt werden. Des Weiteren wurde ein starker Abfall der Ratio der SCC-Bildung bei 378 TG beobachtet. Dieser Abfall ist vermutlich auf das Betäubungsmittel MS222 zurückzuführen, welches beigefügt wurde, um die Larven vor der Präparation zu betäuben und im Anschluss mit einer Überdosis zu töten. Die geschlüpften Larven wurden zu diesem Präparationszeitpunkt einer längeren Inkubation ausgesetzt als die früheren Larvenstadien. Es ist bekannt, dass MS222 die Herzkontraktilität negativ beeinflusst, da es ein Muskelrelaxanz ist (Ryan et al. 1993). Es wirkt blockierend auf Aktionspotentiale in den Nervenbahnen, wodurch wiederum die Atemmuskulatur gelähmt wird und der Sauerstoffmangel

zum Absterben des Myokards führen kann. Trotzdem wurde in dieser Studie MS222 zur Betäubung von Fischen genutzt, da Hill et al. (2002) an *Oncorhynchus tshawytscha* zeigte, dass MS222 im Vergleich zu anderen Anästhetika (Metomidat und AQUI-S) die bessere Alternative ist, um eine Schädigung des Organismus und somit auch der Zellen zu verhindern. An den darauf folgenden Präparationszeitpunkten wurde auf eine schnelle Betäubung der Larven geachtet. Die Glockenkurve wies daher bei 420 TG eine höhere Ratio bei der Bildung auf, als der Wert zuvor (378 TG), so dass die Annahme einer zu langen Inkubation der Larven in MS222 verifiziert werden konnte. Bei der Etablierung von SCC sollte daher stets beachtet werden, dass Fischlarven nur bis zur Betäubung und nicht darüber hinaus in MS222 inkubiert werden. Wird dieser Zeitpunkt genau abgepasst, sind die erzielten Ergebnisse Beweis dafür, dass die angewandte Technik zur Reduzierung von Tierversuchen beitragen kann, da pro getöteten Fisch mehrere Testsysteme hergestellt werden können.

Ein weiterer essentieller Faktor für die Etablierung eines Hochdurchsatztestsystems ist die Zeit der Präparation. Der Zeitaufwand sollte dabei möglichst gering sein. Das in dieser Arbeit etablierte Protokoll der Bildung von SCC ermöglicht die Präparation von sechs Larven in 15 Minuten. Innerhalb dieser Zeit kann ein 6-well mit Primärzellkulturen besetzt werden. Da die Möglichkeit besteht, Herzzellaggregate in der Passage Null mit einer Ratio von 1,5 zu bilden (Abbildung 14), liegt die durchschnittlich zu erhaltende Zahl bei neun SCC aus sechs Fischlarven. Im Idealfall würde folglich ein 96-well, in dem je ein SCC pro well vorliegt, durch die Präparation von 64 Fischlarven mit SCC besetzt sein. Die Präparationsdauer der 64 Larven würde 2,6 Stunden betragen. Zu berücksichtigen ist jedoch auch der Zeitfaktor der Isolation und des Transfers der SCC von dem ursprünglichen 6-well in ein 96-well. Ebenfalls gilt es, die Entstehungszeit der Aggregate zu beachten. Untersuchungen zeigten, dass ca. 75 % der SCC innerhalb der ersten zwei Wochen nach Präparation gebildet werden (Abbildung 15). In der darauffolgenden Woche traten 97 % aller nach einem Monat vorkommenden Aggregate in der Primärzellkultur auf. Es zeigt, dass die SCC innerhalb von zwei Wochen für Tests verwendet werden könnten, da die darauf folgende Zeit wegen der geringen Bildung von weiteren SCC bei einem hohen Zeitverlust sowie Verwendung weiterer Material- und Arbeitskosten wirtschaftlich nicht gerechtfertigt ist.

5.1.2. Eigenschaften spontan kontrahierender Zellaggregate

Ein weiterer Vorteil des *in vitro* Modells ist die 3D-Struktur der Aggregate. Diese ermöglicht Reaktionen auf Herzmedikamente nicht nur an einzelnen Kardiomyozyten, sondern im Zellverband zu untersuchen. Da dieser Vorteil ein weiterer Schritt zu *in vivo* Eigenschaften ist, wurde die 3D-Struktur der SCC näher untersucht.

Durch die Bestimmung der Aggregatdicke an verschiedenen Stellen konnte auf eine homogene Struktur geschlossen werden. Die untersuchten Aggregate waren zwar unterschiedlich dick, aber innerhalb eines Aggregates gab es bei den Dickenmessungen keine bis nur geringfügige Standardabweichungen (Abbildung 16).

Des Weiteren wurde auch die Flächengröße der Aggregate bestimmt. Die Flächengröße der SCC stieg bei 252 TG und 294 TG mit dem Alter der präparierten Larven signifikant an (Abbildung 17). Für die anderen Präparationszeitpunkte wurde ebenfalls eine allgemeine Vergrößerung der SCC festgestellt, die allerdings signifikant nicht bestätigt werden konnte. Ursache sind hier einige sehr kleine Aggregate.

Da bei Fischen das Herz während der gesamten Larvenentwicklung mitwächst (Burggren und Keller 1997), ist zu vermuten, dass die Möglichkeit besteht, dass sich die *in vitro* generierten SCC mit zunehmendem Alter der präparierten Larven vergrößern. Diese Vermutung wurde durch die Aggregatflächengrößenmessungen (Abbildung 17) bestätigt, bei denen die maximalen Aggregatgrößen mit zunehmendem Präparationszeitpunkt ebenfalls stiegen. Ob sich mit der Aggregatgröße die Zellzahl oder nur die Zellgröße veränderte, müsste in zukünftigen Arbeiten untersucht werden. Es ist jedoch deutlich, dass mit Vermehrung der Zellzahl auch das SCC-Gerüst in seiner Struktur komplexer werden würde. Das Modellsystem würde sich damit den *in vivo* Bedingungen eines adulten Herzens noch näher angleichen. Die Vergrößerung der Zellen würde dazu führen, dass die Methode der intrazellulären Ableitungen leichter durchzuführen wäre. Schäden an der Zellmembran und der Stress, der aufgrund der Perforation durch die Nadel entsteht, würden sich minimieren.

Es ist jedoch anzunehmen, dass die Größe der SCC für die Verwendung als Testsystem wahrscheinlich unbedeutend ist. Bedeutend ist die Einheitlichkeit der Größe der Aggregate, um Vergleiche ziehen zu können.

5.1.3. Eigenschaften der Kontraktionsfrequenz

Bei der Kontraktionsfrequenz der SCC wurde ebenfalls ein Zusammenhang zur Entwicklungsstufe der präparierten Larven festgestellt (Abbildung 18). Die Kontraktionsfrequenz bei den SCC der ersten Präparation (252 TG) entspricht der Herzschlagfrequenz früher Larvenstadien (Rönnau, 1977). Das frühe embryonale Herz der Regenbogenforelle kontrahiert mit 20 Schlägen pro Minute. Während der Entwicklung zum Augenpunktstadium steigt die Frequenz auf ca. 35 Schläge pro Minute an. Dieser Wert konnte ebenfalls bei den aus Larven entwickelten SCC des frühen Augenpunktstadiums (252 TG) ermittelt werden. Ebenso entspricht die signifikant erhöhte Schlagfrequenz der SCC, generiert aus frisch geschlüpften Larven (378 TG), der *in vivo* Situation der Larven. Larven weisen in diesem Stadium eine bis zu 2,5-fach erhöhte Schlagfrequenz des Herzens auf, die durch eine gesteigerte spontane elektrische Aktivität hervorgerufen wird (Burggren & Keller, 1997). Im nachstehenden zeitlichen Verlauf der Entwicklung sinkt die Herzfrequenz bei Fischlarven. Die Senkung der Herzfrequenz konnte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls in den generierten SCC nachgewiesen werden. Damit ähneln die Werte, die die SCC ab 294 TG aufwiesen, denjenigen von humanen Kardiomyozyten (~60 bis 80 Schläge/Minute). Die Untersuchungen zeigten auch, dass einige SCC Abweichungen in der Kontraktionsfrequenz aufwiesen. So könnten z. B. geringere Kontraktionsfrequenzen auf die starken Adhäsionskräfte der umgebenden Zellen zurückgeführt werden, die die Kontraktion der SCC hemmten. Eine höhere Kontraktionsfrequenz könnte u. a. auf die ansteigende Temperatur des Mediums zurückgeführt werden. Die Temperatur des Mediums stieg während der zeitlich aufwendigen Messungen an, da diese bei Raumtemperatur erfolgten, die wiederum teilweise 5° C mehr aufwies, als die Kultivierungstemperatur.

Eine weitere Eigenschaft der SCC, die zudem ein bedeutendes Argument für die Verwendung der SCC als Testsystem ist, ist die Langzeitkontraktion. Während dieser Studie konnten Kontraktionen von SCC bis zu sechs Monate beobachtet werden. Es ist nicht auszuschließen, dass sich die Kontraktionsdauer noch verlängern kann. In dieser Arbeit konnte dies nicht weiter untersucht werden, da die SCC entweder für andere Versuche verwendet wurden, aufgrund von Kontamination verworfen werden mussten bzw. in ihrer Kontraktion durch vermutlich zu starke Adhäsionskräfte behindert wurden. In zukünftigen Arbeiten könnten die Adhäsionskräfte evtl. durch vorsichtiges Zertrennen der SCC von umgebenen Zellen gemindert werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass SCC als *in vitro*-Testmodell aus Larven entwickelt werden sollten, welche sich kurz vor dem Schlupf befinden. Zu diesem Zeitpunkt können aus einem Organismus maximal fünf und durchschnittlich 1,5 SCC entwickelt werden, die zudem in ihrer Kontraktionsfrequenz den humanen Kardiomyozyten ähneln.

5.2. Nachweis von Kardiomyozytenverbänden

5.2.1. Entwicklung von *in vitro* generierten Kardiomyozyten

Eine Untersuchung über die Herkunft der SCC offenbarte, dass die verwendeten Fischlarven zu keinem Zeitpunkt ausdifferenzierte Kardiomyozyten aufwiesen. Ferner belegten Studien, dass die Herzentwicklung erst mit der kompletten Absorption des Dottersacks abgeschlossen ist (Burggren und Keller, 1997). Herzprogenitorzellen, wie sie auch in den hier verwendeten Fischlarven mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen wurden (Abbildung 23), beginnen bereits nach 100-120 TG (embryonales Stadium) unrhythmisch aber sichtbar zu kontrahieren. Zu diesem Zeitpunkt etwa beginnt das erste Blut zu zirkulieren. Nach ca. 140 TG entstehen das Atrium und der Ventrikel. Im Augenpunktstadium (Beginn nach ca. 210 TG; www.sf.adfg.state.ak.us, 2010) bewegt sich das Atrium langsam dorsal, so dass es sich bei Schlupf (nach 340 TG) dorsal zum Ventrikel befindet. Die endgültige Orientierung ist bei ca. 2/3 der Dottersack-Absorption erreicht. Die ersten Trabekel sind erst nach vollständiger Absorption des Dottersackes (ca. 500-580 TG) erkennbar (Kitoh, 1985). Da die Larven für die SCC-Bildung allerdings nur bis ca. 470 TG verwendet wurden, differenzierten in den SCC Herzprogenitorzellen von Larven zu vollständig ausgebildeten Kardiomyozyten. Ferner konnte durch die Bildung von SCC von Woche Null bis Woche vier nach der Präparation keine zeitliche Äquivalenz zu der Ausdifferenzierung von Kardiomyozyten *in vivo* festgestellt werden. Die isolierten Zellen entwickelten sich sowohl schneller als auch langsamer zu Kardiomyozyten, als das Herz bei den Larven. Stereomikroskopischen Aufnahmen belegten, dass sich die SCC zum Teil bereits nach dem ersten Mediumwechsel in der Kultur befanden, allerdings ohne Kontraktionen in diesem frühen Stadium aufzuweisen. Andere SCC generierten sich *in vitro* hingegen erst in den ersten Tagen bis Wochen. Bei der Bildung von SCC konnte kein immer gleiches Muster festgestellt werden (Kapitel „4.2. Beobachtungen“).

Poss (2007) beschrieb, dass potentielle Stimuli für die Differenzierung von Zellen in aktive

Kardiomyozyten spezifische Hormone, Zytokine sowie auch Wachstumsfaktoren sein können, die von den Zellen abgegeben werden. Eine weitere Quelle für Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren ist das FKS, welches in dieser Zellkultur verwendet wurde. Allerdings konnten bisher die Inhaltsstoffe dieses Serums nicht identifiziert werden. Die Untersuchungen der SCC-Zellkultur auf diese Stimuli wurden in der vorliegenden Arbeit außer Acht gelassen.

5.2.2. Strukturelle und morphologische Eigenschaften kardialer Netzwerke im Vergleich zu SCC

In den SCC konnte u. a. mit der Elektronenmikroskopie eine Organisation in Sarkomere nachgewiesen werden, so dass die Bestätigung für die Existenz von differenzierten Kardiomyozyten geliefert wurde. Aufnahmen zeigten, dass Sarkomere mit einer typischen Querstreifung vorhanden waren. So wurden Aktin- und Myosinfilamente sowie die Z-Scheiben, I- Bande, A-Bande, H-Zone und die M-Linie ersichtlich (Abbildung 23).

Mit der Immunfluoreszenz wurde ebenfalls die Existenz von Kardiomyozyten nachgewiesen. Die in dieser Arbeit positiv getesteten Antikörper (anti-Troponin I, anti- β -Catenin, anti-N-Cadherin, anti-1&2 Desmoplakin und anti- α -Aktinin; Abbildung 22) wurden von Piepperhoff & Franke (2008) auf verschiedenen Organismen untersucht. Es zeigte sich, dass diese Antikörper ebenso spezifisch an die Herzproteine in Fisch (bei Piepperhoff & Franke (2008) Untersuchungen an Regenbogenforelle und Zebrafisch) banden, wie es auch bei Mensch, Maus sowie *Xenopus spec.* der Fall war. Die Ursache dafür ist die hohe Konservierung herzspezifischer Proteine in Vertebraten. In allen Vertebraten werden diese Proteine in der frühen embryonalen Herzentwicklung in epithelialen Vorläuferzellschichten exprimiert (Burggren und Keller 1997). Kardiomyozyten aller Vertebraten stammen daher direkt von diesen Vorläuferzellschichten ab und weisen typische epitheliale Strukturen und Moleküle, wie Zellverbindungsproteine desmosomalen Typs, wie 1&2-Desmoplakin, auf (Kartenbeck et al. 1983, van der Loop et al. 1995, Piepperhoff & Franke 2008)). Piepperhoff & Franke (2008) untersuchten im Herzgewebe höherer und niederer Vertebraten zudem die *area composita* der Adhäsionsverbindungen auf Streifendesmosomenproteine (N-Cadherin und β -Catenin). Es konnten bei adulten Regenbogenforellen und Zebrafischen verschiedene Strukturen des Adhäsionsverbindingssystems festgestellt werden. Weiterhin wurde die Lokalisation dieser Strukturen im Vergleich zu den desmosomalen Proteinen betrachtet. Hier zeigten

Untersuchungen von Piepperhoff & Franke (2008), dass bei Mammalia desmosomale Proteine und Streifendesmosomen hauptsächlich kolokalisiert sind, während sie bei nicht-Mammalia meist in einer wechselseitigen Lokalisation vorliegen. Ursache liegt in der Evolution der Vertebraten (Piepperhoff & Franke 2008). Auch in den SCC traten Adhäsionsverbindungen im gesamten Aggregat auf (Abbildung 22).

Es existieren weitere Faktoren, die die Existenz adulter Kardiomyozyten definieren. Eschenhagen et al. (2002) beschrieben fünf Kriterien zur Beurteilung einer terminalen Differenzierung von adulten Kardiomyozyten:

1. Dicht gepackte und hoch organisierte Sarkomere

Dieser Nachweis wurde mit der Elektronenmikroskopie für die SCC erbracht und in diesem Kapitel bereits erläutert.

2. Die mengenmäßig am stärksten vorhandenen Organellen in Kardiomyozyten sind Myofilamente, Mitochondrien, Sarkoplasmatischem Retikulum (SR) und Zytosol sowie Nuklei.

In den SCC sind Myofilamente, Mitochondrien, Nuklei sowie auch das SR vorhanden. Es konnten Troponin I, α -Aktinin und Myosin via Immunochemie (Abbildung 22) und Myosin und α -Aktin via RT-PCR (Abbildung 20) nachgewiesen werden. Die Färbung mit Troponin I und Phalloidin als Aktinmarker zeigte die Zusammenlagerung beider Proteine im Troponin I-Aktin-Komplex (Abbildung 22a). Ebenfalls waren Zellkerne in den SCC vorhanden (DAPI-Färbung). Die Mitochondrien und das SR konnten mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen nachgewiesen werden (Abbildung 25). Es ist somit festzuhalten, dass alle morphologischen Strukturen, die zur Bildung von Myofilamenten beitragen (Myosin und Aktin) sowie Mitochondrien und Nuklei in den SCC vorhanden sind.

3. Existenz von Zellverbindungsstrukturen wie Adhäsionsverbindungen, Desmosomen und gap junctions.

Die in dieser Arbeit untersuchten SCC enthielten Proteine des gap junction Systems, wie z. B. β -Catenin (Abbildung 22d), N-Cadherin (Abbildung 22e) und Cx 43 (Abbildung 20). Ebenso konnte auch ein Protein desmosomalen Typs, 1&2-Desmoplakin, nachgewiesen werden (Abbildung 22f).

Die EM-Aufnahmen zeigten zudem Streifendesmosomen (Abbildung 25d). Aufgrund der sehr hohen Anzahl von Zellverbindungsproteinen und speziell der gap junctionin in den generierten SCC kann hier von einem funktionierenden Synzytium gesprochen werden. Auch bei Untersuchungen der SCC mit MEAs konnte auf die Existenz von gap junction geschlossen werden, indem sich die Feldpotentiale zweier unabhängig kontrahierender Aggregate anglich und sich beide Aggregate zu einem Synzytium zusammenlagerten.

4. Existenz von T-Tubuli, SR-Vesikel und T-Tubuli-SR-Verbindungen.

EM-Aufnahmen zeigten diese Strukturen auch in den spontan kontrahierenden Herzzellaggregaten (Abbildung 25). An dieser Stelle muss jedoch betont werden, dass diese Strukturen nur sehr vereinzelt auftraten. Eschenhagen et al. (2002) beschrieben ebenfalls, dass T-Tubuli und SR-Verbindungen in Herzen neugeborener Ratten nicht vorhanden sind. Ursächlich für die geringe Anzahl von T-Tubuli und SR in den SCC könnte daher die Entstehung der Kardiomyozyten aus larvalen Progenitorzellen sein.

5. Eine gut entwickelte Basalmembran, die die Herzzelle umgibt.

Dieses Kriterium konnte mit den verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden, da die Kardiomyozyten evtl. nicht adult waren.

Der Nachweis der meisten von Eschenhagen et al. (2002) aufgestellten Kriterien legt nahe, dass die SCC aus Kardiomyozyten bestehen, die durch Zellverbindungsproteine zu einem funktionierenden Synzytium vereint sind.

Auch wenn die entwickelten SCC nicht in jeder Einzelheit dem humanen adulten Herzen gleichen, kann hier, aufgrund der aufgeführten Faktoren, von einem über gap junction gekoppelten Gewebe, welches dem humanen Herzgewebe im Aufbau ähnelt, gesprochen werden.

5.2.3. Nachweis von Schrittmacherkardiomyozyten

Eschenhagens et al. (2002) eingeführte Kriterien sind maßgebend für die Beurteilung der terminalen Differenzierung adulter Kardiomyozytenverbände, nicht aber für die Existenz von Schrittmacherzellen. Die Existenz von Schrittmacherzellen ist jedoch der Grundstein für eine

spontane Kontraktion eines jeden Herzzellverbandes und ist daher für ein Modellsystem von Bedeutung.

Kardiomyozyten benötigen einen exogenen Stimulus für die Entstehung eines Aktionspotentials. Das Aktionspotential wird in Kardiomyozyten ausgelöst, wenn das Schwellenpotential von -60 mV überschritten wird (Hick & Hick 2009). Schrittmacherzellen sind hingegen einer spontanen Depolarisation ausgesetzt und generieren ein von externen Einflüssen unabhängiges Aktionspotential, so dass sie für die autorhythmische Herzaktivität verantwortlich sind. Die in dieser Arbeit generierten SCC kontrahierten ebenfalls spontan und rhythmisch. Daher liegt die Annahme nah, dass Schrittmacherzellen, welche die Zellen anregen, innerhalb dieser Aggregate vorhanden waren.

In adulten Regenbogenforellen sind Schrittmacherzellen in drei verschiedenen Bereichen des Herzens vorhanden: im AV-Trichter, im sinus-atrialen Bereich und am Übergang vom Atrium zum Ventrikel (Saito, 1969). Diese Tatsache könnte eine Erklärung dafür sein, dass aus einer Larve mehrere kontrahierende Herzzellaggregate generiert werden konnten (Kapitel „4.3.1. Aggregatanzahl in Abhängigkeit vom Larvenalter“). Es ist möglich, dass bei den Präparationen das Herzprogenitorzellgewebe in diese drei Bereiche zerteilt wurde. Eine andere Möglichkeit der Entstehung mehrerer SCC in ein und derselben Zellkultur ist die Differenzierung zu Schrittmacherzellen. Beide Möglichkeiten decken sich mit den stereomikroskopischen Beobachtungen der SCC-Generierung. So befanden sich, wie bereits in Kapitel „5.2.1. Entwicklung von *in vitro* generierten Kardiomyozyten“ diskutiert, einige SCC nach dem ersten Mediumwechsel in der Zellkultur. Dieses frühe Vorhandensein der SCC würde durch die Zerteilung des Fischlarvenherzgewebes in die drei Bereiche mit je einem Schrittmacherherzzentrum erklärt. Das Entstehen von SCC im Verlaufe der ersten Wochen könnte durch die Vermutung der Schrittmacherzellendifferenzierung erklärt werden, wobei hier die von Poss (2007) erwähnten spezifischen Hormone, Zytokine sowie auch Wachstumsfaktoren notwendig wären. Diese Vermutungen konnten im Umfang dieser Arbeit nicht näher untersucht werden, so dass keine endgültigen Aussagen möglich sind.

In vitro Testmodelle, bei denen keine spontane Aktivität vorliegt, müssen durch elektrische Stimulationen angeregt werden. Stimulationen stressen wiederum das Zellgewebe und somit können evtl. elektrophysiologische Veränderungen hervorgerufen werden, die mit einer spontanen Kontraktion nicht aufgetreten wären.

Für Schrittmacherzellen sind, wie im Kapitel „1.3.3. Schrittmacherzellen“ beschrieben, die hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gate 4 (HCN)-Kanäle und Connexin 45 spezifisch (Ishii et al. 1999, Stieber et al. 2003, White & Bruzzone 1996, Gros and Jongsma 1996, Xu et al. 2010). Die Untersuchungen der SCC zeigten, dass diese Proteine ebenfalls in den Aggregaten vorhanden waren (Abbildung 26, Abbildung 27). Eine Besonderheit war, dass die Antikörper nur in einem kleinen Bereich des SCC gebunden haben. Es liegt die Annahme nahe, dass die Aggregate, wie auch das Herz eines jeden Vertebraten, ein Schrittmacherzentrum aufweist, in dem sich diese Zellen befinden. Zudem beschrieben Yamamoto et al. (1998), dass trotz der Weiterleitung des APs vom Schrittmacherzentrum zum umgebenden Myokardgewebe, die gap junction im Sinusknoten sehr gering verteilt sind. Diese wenigen Verknüpfungen zwischen den Zellen sollen die räumliche Abtrennung der Schrittmacherzellen vom Myokardgewebe garantieren. Die Beschreibung Yamamotos et al. (1998) traf ebenfalls auf die SCC zu; auch hier waren Connexin 45 und HCN4 nur in einem kleinen Areal der SCC vertreten. Es kann daher auch bei den SCC von einer Abtrennung der Schrittmacherzellen zum umgebenden Myokardgewebe gesprochen werden (Abbildung 26, Abbildung 27).

Die spontane Kontraktion der Aggregate ist also durch die Existenz von Schrittmacherzellen zu erklären. Weiterhin zeigen die SCC aufgrund ihres strukturellen Aufbaus und dem Auftreten mehrerer kardialer Zelltypen eine Ähnlichkeit zum komplexen Herzorgan. Vor allem im Anwendungsbereich der SCC ist diese Tatsache von Bedeutung, da komplexe Zusammenhänge im Herzgewebe bzw. zwischen Herzzellen und Schrittmacherzellen auf Zellebene untersucht werden können.

5.3. Untersuchung des Regenerationspotentials

Ein weiterer Versuch mit den SCC diente dem Ziel das Modellsystem auf die Anwendungsmöglichkeiten in der Regenerationsbiologie hin zu untersuchen. Da bereits in adulten Fischherzen ein Regenerationspotential nachgewiesen werden konnte (Major & Poss 2007), sollte auch an den aus Fisch generierten SCC die Regenerationsfähigkeit aber zugleich auch die Proliferationsfähigkeit getestet werden. Für die Untersuchungen wurden die Aggregate mit dem Skalpell verletzt (Untersuchung der Regenerationsfähigkeit) bzw. zerteilt und isoliert (Untersuchung der Proliferationsfähigkeit). In allen Fällen konnte im Aggregat die Regeneration des verletzten bzw. geteilten Areals dokumentiert werden.

Die Zellvermehrung des verletzten und des unverletzten Aggregates wurde mittels EdU-Proliferationstest untersucht. Die Färbungen zeigten im Vergleich zu den nicht verletzten Kontrollaggregaten eine starke Zellproliferation in den verletzten SCC (Abbildung 29). In den verletzten Aggregaten war auch die Kontraktion nach kurzer Zeit erneut feststellbar (Abbildung 28). Somit konnte eine Regeneration von verletzten Zellabschnitten belegt werden.

Die Untersuchung der Proliferationsfähigkeit der SCC bewies, dass beide Aggregathälften nach Teilung und Isolierung Kontraktionen aufwiesen, so dass die Möglichkeit der Vermehrung der Aggregate besteht. Zusätzlich zeigte die Untersuchung, dass das eine SCC sogar den amputierten Teilbereich vollständig in Größe und Form regenerierte und in diesem Kontraktionen auftraten (Abbildung 30). Eine Regeneration von Kardiomyozyten lag somit vor.

Das Phänomen der Herzregeneration beobachtete Poss (2007) im adulten Zebrafisch. Nach einer 20 %igen apikalen Ventrikelamputation regenerierte sich dieser Abschnitt vollständig mit nur geringfügiger bis keiner Narbenbildung. Die Gene, welche das Regenerationspotential im Zebrafischherzen anregen, sind das embryonale kardiomyogene Gen *gata4* und das Gen cardiac myosin light chain 2 (*cmhc2*), (Kikuchi et al. 2010). Um das Regenerationspotential der SCC näher zu untersuchen, könnten u. a. Expressionsanalysen dieser Gene erfolgen. Fazit der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist, dass die Erforschung der Regeneration von kardiomyogenem Gewebe wahrscheinlich auch an den SCC stattfinden könnte, da erste Versuche eine Regenerations- und sogar Proliferationsfähigkeit der SCC aufzeigten. Die Regeneration der Fischherzen, welche bisher nicht im Detail geklärt werden konnte (Kikuchi et al. 2010), könnte somit auf Zellebene *in vitro* untersucht werden.

5.4. Elektrophysiologie

Ein weiterer Punkt dieser Arbeit diente dem Ziel das elektrophysiologische Potential der SCC zu ermitteln. Für die Verwendung als humanes äquivalentes pharmakologisches Testsystem müssen die elektrophysiologischen Eigenschaften, und somit die Art und Zusammensetzung der Ionenkanäle der SCC, denen der humanen Herzzellen ähneln.

5.4.1. Extrazelluläre Ableitung der elektrischen Aktivität kardialer Netzwerke

Bisher wurden elektrophysiologische Eigenschaften strukturierter kardialer Netzwerke hauptsächlich unter Verwendung der scharfen Elektrode bzw. der patch-clamp-Technik untersucht.

Ableitungen von Kardiomyozyten auf Multielektrodenarrays konnten hingegen nur in wenigen Fällen verwirklicht werden (Mauritz et al. 2008, Wenzel et al. 2002, Kehat et al. 2002, Halbach et al. 2006, Reppel et al. 2007).

Dies ist zum Einen darauf zurückzuführen, dass bei dem MEA aufgrund der Elektroden eine heterogene Substratoberfläche vorliegt und Zellen daher schwer anzusiedeln sind. Zum Anderen müssen die Zellen präzise zu den Elektroden des MEAs dirigiert werden, um Feldpotentiale möglichst erfolgreich ableiten zu können. Die Qualität der abgeleiteten Signale wird optimal, wenn die Zellen direkt auf der Elektrode platziert sind und diese vollständig bedecken (Jung et al. 2001). Die SCC wurden daher bei Überführung durch leichte Rotation zentriert und somit auf den Elektroden platziert.

In dieser Arbeit wurde mit einem Multielektrodenarray gearbeitet, bei dem der Durchmesser der Elektroden 30 μm betrug. Da die SCC eine 3D-Struktur aus vielen Zellen aufwies, konnten die direkten Zellgrößen nicht ermittelt werden. Allerdings war es mikroskopisch erkennbar, dass stets mehrere Zellen benötigt wurden, um eine Elektrode weitestgehend abzudecken. Durch die Adhäsion mehrerer Zellen auf einer Elektrode kann bei den Messungen das Problem bestehen, dass die von verschiedenen Kardiomyozyten generierten Signale von nur einer Elektrode verzeichnet werden. So trat dieses Problem am Tag 28 der Untersuchung auf (Abbildung 32). An diesem Tag lagen einige Bereiche beider Aggregate auf denselben Elektroden, so dass zwei verschiedene Spiketypen von einer Elektrode detektiert wurden. Würde man dem Problem mehrerer Zellen auf einer Elektrode durch die Verwendung kleinerer Elektroden begegnen, so würde sich die Impedanz erhöhen, woraus ein ungünstiges Signal-Rausch-Verhältnis resultieren würde. Die Signaldetektion wäre erschwert bzw. unmöglich (Jung et al. 2001).

Für eine über diese Arbeit hinausgehende detaillierte Analyse der Netzwerkaktivität könnte zusätzlich das Spike-Sorting angewendet werden (Takahashi & Sakurai 2005, Letelier & Weber 2000). Dabei werden die von der Elektrode detektierten Spikes verschiedenen Zellen zugeordnet. Diese Zuordnung geschieht in Abhängigkeit von der Spikeform, die wiederum von der Zellform abhängig ist, und der relativen Position der Zelle zur Elektrode. Bei den zwei anfangs

unabhängigen SCC (bis Tag 28) und auch bei dem zu einem Synzytium zusammengewachsenen SCC ist zu vermuten, dass aufgrund der gleich bleibenden Intervalle und Form der Spikes die Kardiomyozyten derselben Elektrode sowohl dasselbe zeitliche Kontraktionsmuster als auch FP aufwiesen.

Die Messungen mit dem MEA zeigten, dass jedes einzelne SCC ein autonom funktionierendes Synzytium mit eigenständiger Aktivität darstellt. Grund für diese Autonomie ist die Existenz von Schrittmacherzellen in den SCC (Kapitel „4.6. Schrittmacherzellen in SCC“).

Weiterhin entstanden durch Zellwachstum neue Kardiomyozyten, die nach 49 Tagen die dreifache Menge an Elektroden bedeckten, was durch die Detektion der Spikes gezeigt werden konnte. Die Kontraktion neu gebildeter Zellen bestätigt, dass diese zu Herzzellen differenzierten (siehe auch Kapitel „4.5.3. Elektronenmikroskopie“). Hervorzuheben ist die Tatsache, dass zwei, einst unabhängig voneinander kontrahierende SCC zusammenwuchsen und zudem nach einigen Tagen des Zell-Zell-Kontaktes ihre FP ebenfalls angingen (Abbildung 31 & Abbildung 32).

Mit diesen Untersuchungen wurde, so weit bekannt, erstmals bewiesen, dass Langzeit autonom kontrahierende und organotypische Synzytien aus Herzzellen gebildet werden können. Zudem können kardiale Synzytien, die aus unterschiedlichen Larven generiert wurden und somit für das jeweilige andere SCC Fremdzellen darstellen, zu einem funktionellen Verband zusammenwachsen.

5.4.2. Intrazelluläre Ableitung der elektrischen Aktivität der Kardiomyozyten

In den letzten Jahren wurden Modelle aus verschiedenen Spezies für die Herzforschung via intrazellulärer Ableitungen verglichen (Brette et al. 2008, Nemtsas et al. 2009, Kim et al. 2009). Festgestellt wurde, dass die Form des kardialen Aktionspotentials in den Spezies sehr verschieden ist. Die Ursachen liegen hier in den unterschiedlichen Ionenkanalexpressionen und Ionenkanalkompositionen. Dabei wurde auch erkannt, dass das AP von Kardiomyozyten aus Fisch eine schnelle Depolarisation, eine lang andauernde Plateauphase und eine schnelle Repolarisation aufweist. Die intrazellulären Ableitungen in den SCC offenbarten, dass die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kardiomyozyten in den strukturierten Netzwerken der SCC keine Veränderungen aufwiesen. Sie hatten ebenfalls die für Fisch typische AP-Form.

Ein Vergleich zwischen den Organismen zeigt, dass das ventrikuläre AP des Fisches, bedingt durch die lange Plateauphase, eine ähnlichere Form und auch Dauer im Vergleich zum humanen

ventrikulären AP aufweist, als murine Kardiomyozyten (Abbildung 2). Diese Aussage unterstrichen Nemtsas et al. (2009). In dieser Arbeit wurden verschiedene AP Parameter vom Ventrikel und dem Atrium eines adulten Zebrafisches, einer Maus und eines Menschen (Tabelle 24) untersucht. In ihrer Publikation stellten sie fest, dass die APD_{90} im Atrium der Maus 7.5-mal und im Ventrikel dreimal kürzer ist, als im humanen Ventrikel und Atrium. Die APD_{90} des Atriums eines Zebrafisches war hingegen nur fünfmal und im Ventrikel zweimal kürzer als das adulter humaner Kardiomyozyten des Atriums bzw. Ventrikels. In der vorliegenden Studie zeigten die *in vitro* generierten SCC ebenfalls APD_{90} , welche im Vergleich zum Menschen nur zwei (im Ventrikelvergleich) bis dreimal (im Atriumvergleich) kürzer sind. Im Gegensatz dazu wiesen die Messungen der maximalen Depolarisationsgeschwindigkeit (dV/dt_{max}) und der Aktionspotentialamplitude (APA) bei den SCC einen geringeren Wert auf, als es in adulten Kardiomyozyten von Zebrafisch, Mensch und Maus der Fall ist (Tabelle 24). Eventuell weisen die generierten SCC, trotz der vollständigen Differenzierung von Herzprogenitorzellen zu Kardiomyozyten, Eigenschaften von larvalen Kardiomyozyten auf. In diesem Fall könnten die Calciumkanäle für die Aktionspotentialamplitude, wie sie auch in embryonalen Kardiomyozyten auftritt, verantwortlich sein. Bei Calciumströmen entsteht die Amplitude langsamer als bei Natriumströmen, welche in Kardiomyozyten adulter Organismen die Amplitude hervorrufen (Kim et al. 2009). Eine andere Erklärung für den geringen dV/dt_{max} -Wert bei den SCC ist das Ruhemembranpotential (RMP). Das RMP muss für die Öffnung von Natriumkanälen einen geringeren Wert als -60 mV aufweisen. Dieser Wert konnte nicht in jeder gemessenen Zelle ermittelt werden. Das niedrigste RMP wies einen Wert von -65 mV auf. Da aber einige Kardiomyozyten nur ein RMP von -40 mV hatten, lag der durchschnittliche RMP (-53 mV) über dem für die Öffnung der Natriumkanäle relevanten Wert.

Tabelle 24: Aktionspotentialparameter von SCC im Vergleich zu atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten von adulten Zebrafischen, Maus und Menschen.

	SCC	Atrium*			Ventrikel*		
		Fisch	Human	Maus	Fisch	Human	Maus
Präparation (n)	25	16	28	7	16	5	6
APA (mV)	61,9 ± 0,2	100 ± 2	97 ± 2	104 ± 1	99 ± 2	101 ± 4	95 ± 2
RMP (mV)	-52,8 ± 0,2	-74 ± 2	-74 ± 1	-81 ± 2	-72 ± 2	-77 ± 3	-74 ± 1
dV/dt_{max} (V/s)	18,7 ± 2,6	129 ± 9	246 ± 22	239 ± 10	92 ± 5	180 ± 10	166 ± 11
APD₅₀ (ms)	82,8 ± 7,6	46 ± 2	148 ± 8	9 ± 1	110 ± 4	165 ± 12	9 ± 3
APD₉₀ (m/s)	104,8 ± 7,7	62 ± 2	316 ± 7	42 ± 4	132 ± 4	242 ± 15	82 ± 4

Aktionspotential gemessen mit einer scharfen Mikroelektrode in SCC, intaktem Zebrafischherz, linke atriale Kardiomyozyten in Maus, linker atrialer Trabekula und dem rechten ventrikulären Muskelstreifen in Maus, rechter atrialer Trabekulaanhang und dem rechten ventrikulären Papillarmuskel im Mensch. SCC und Zebrafischherz kontrahierten spontan, während humanes und Mausegewebe elektrisch mit 1 Hz stimuliert wurden. APA, Aktionspotentialamplitude; RMP, Ruhemembranpotential; dV/dt_{max}, maximale Depolarisationsgeschwindigkeit; APD₅₀ and APD₉₀, Aktionspotentialdauer bei 50% und 90% der Repolarisation, (*Daten aus Nemtsas et al. 2009 & Grunow et al. 2011).

In den letzten Jahren wurden neben diesen eben Erwähnten auch Modelle aus humanen und murinen embryonalen Stammzellen entwickelt (Kim et al. 2009, Cao et al. 2008, Sauer et al. 1999). Im Vergleich der SCC mit den Daten der „humanen embryonalen Stammzell-abgeleiteten Kardiomyozyten“ (hESC-CM) existieren Ähnlichkeiten im AP. Die Formen der APs der SCC-Kardiomyozyten und der hESC-CM sind in ihrer Plateauphase ähnlich, so dass u. a. die APD₉₀ der hESC-CM ebenfalls ca. 100 ms entspricht (Kim et al. 2009). Im Detail betrachtet gleichen die gemessenen AP-Parameter der SCC jedoch den menschlichen Kardiomyozyten mehr, als die hESC-CM. So beträgt die APA bei den hESC-CM nur rund 46 mV, während sie bei den SCC bei 62 mV liegt (human: 100 mV). Weiterhin haben die hESC-CM ein RMP von ca. -50 mV, während die SCC und humane Kardiomyozyten negativere Werte (SCC: -53 mV, human: -70 bis -80 mV) aufweisen.

Laut Kim et al. (2009) sind hESC-CM in ihrem Entwicklungsstadium im Vergleich zur Herzzelle unreif, da sie aus embryonalen Zellen etabliert wurden. Im Vergleich dazu sind die *in vitro* generierten SCC aus der Isolation von Fischlarven im Augenpunkt- bzw. Dottersackstadium

hervorgegangen. Es ist anzunehmen, dass die in dieser Studie differenzierten Kardiomyozyten der SCC aufgrund ihres bereits weiter ausgebildeten Entwicklungsstadiums reifer als die hESC-CMs sind. Aus diesem Grund sind die AP-Parameter der SCC dem humanen adulten System wahrscheinlich ähnlicher als die hESC-CM. Diese These müsste allerdings in weiterführenden Arbeiten untersucht werden, indem der Zusammenhang zwischen dem Entwicklungsstadium der Larve und den AP Parametern der *in vitro* generierten SCC untersucht wird. Es ist zu erwarten, dass hier, wie auch schon bei der Bestimmung des optimalen Präparationszeitpunktes (Kapitel „4.3. Wahrscheinlichkeit für die Bildung kontrahierender Zellaggregate“ & Kapitel „4.4. Kontraktionsfrequenz“), ebenfalls Veränderungen mit dem Entwicklungsstand der Larve auftreten werden. Erste Tendenzen in diese Richtung zeigten die Untersuchungen mit dem MEA, bei dem die Spikes des SCC der jüngeren Larve schwächer waren, als bei dem SCC der älteren Larve. Allerdings könnten diese Unterschiede auch auf unterschiedliche Adhäsionsstärken zurückgeführt werden.

Für ein *in vitro* Testsystem für die humane Herzforschung wäre es optimal, wenn die dem Menschen am stärksten ähnelnden AP Parameter zu dem Zeitpunkt der höchsten Generierungsrate und der human ähnlichsten Kontraktionsfrequenzen auftreten würden; kurz vor bzw. nach dem Schlupf. Falls die für die Humanforschung optimalen AP-Parameter allerdings zu einem Zeitpunkt geringer SCC-Entstehungspotentials auftreten sollte, könnten die SCC durch Zerteilung vermehrt werden (Kapitel „4.7.2. Vervielfältigung von SCC“).

5.5. Modifikation des kardialen Aktionspotentials durch Pharmaka

Im Rahmen der pharmakologischen Untersuchungen an den kardialen Synzytien wurden Substanzen eingesetzt, bei denen die Wirkung auf humane Kardiomyozyten bekannt ist. Somit konnte überprüft werden, ob das *in vitro* System für Substanzen eine im Vergleich zu humanen Kardiomyozyten ähnliche Sensitivität aufwies und die elektrophysiologische Aktivität der SCC eine ähnliche Veränderung erfuhr.

Die Beeinflussung des APs im Herzen ist auf drei große Kanaltypen zurückzuführen: Calcium-, Natrium- und Kaliumkanal (Kapitel „1.4.1. Aktionspotential“). Für erste Untersuchungen erfolgte in dieser Arbeit eine Beschränkung auf zwei Kanäle, den Calcium- und den Kaliumkanal. Das Medikament Isoproterenol wurde als Agonist der β_1 -adrenergischen Signalkaskade gewählt, da es auf den L-Typ Calciumkanal wirkt. Das Molekül Kaliumchlorid ist

ein Elektrolyt, welches zu 98 % intrazellulär vorkommt. Die restlichen 2 % sind extrazellulär und haben großen Einfluss auf das Aktionspotential. Das letzte angewendete Medikament war Rilmakalim, ein Kaliumkanalöffner und -blocker. Es wirkt auf den K_{ATP} -Kanal, welcher für die Spontanaktivität wichtig ist und somit eine Schlagfrequenzerhöhung auslöst. Dieser Kanal ist ein Schutzmechanismus der Herzzelle und kommt bei Absenz von ATP zum Einsatz, um ein AP zu inhibieren. Dieser Kanal kann in den ersten beiden Phasen des APs aktiv werden.

5.5.1. Isoproterenol

Der wichtigste depolarisierende Strom in der Plateauphase des APs ist der Calciumstrom. Der spannungsgesteuerte Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum durch L-Typ Calciumkanäle ($I_{Ca,L}$) dient als Stimulus und damit der Freisetzung von Ca^{2+} aus den Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums. Dieser Strom hat je nach Abgabe von Calcium einen wesentlichen Einfluss auf die Form des APs. Der maximale $I_{Ca,L}$ nimmt z. B. mit zunehmender intrazellulärer Calciumkonzentration stark ab.

Der schnelle starke Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR zu Beginn des APs bewirkt zugleich eine Inaktivierung des $I_{Ca,L}$. In Folge dessen gewinnen die repolarisierenden Ströme die Oberhand und es kommt zu einer Phase schneller Repolarisation zu Beginn des AP (leichter Abfall in der Kurve). Mit der durch Aufnahme in das SR rasch abfallenden intrazellulären Calciumkonzentration wird $I_{Ca,L}$ wieder größer. Dadurch wird die Repolarisation verlangsamt und das Plateau des APs entsteht. In dieser Phase wird durch Zugabe von Isoproterenol eine Verlängerung des APs erreicht, da die $I_{Ca,L}$ weiterhin aktiviert sind und Calcium einströmen kann.

In meinen Untersuchungen konnte ich zeigen, dass die Zugabe von Isoproterenol eine Veränderung der Kontraktilität bei den SCC zur Folge hat. Ein positiv inotroper (Steigerung der Kontraktilität) und ein negativer chronotroper Effekt (Abnahme der Frequenz des APs) wurden ersichtlich (Abbildung 34). Der durch Isoproterenol veränderte $I_{Ca,L}$ konnte somit in den SCC nachgewiesen werden. Sicouri und Antzelevitch (1991) beschrieben, dass Isoproterenol durch die Elevation des intrazellulären cAMP-Level einen komplexen Effekt induziert. Eine Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration beeinflusst neben Calciumströmen auch die cAMP-abhängigen Kaliumströme (I_K), welche wiederum das AP verkürzen sollten.

In der vorliegenden Arbeit fanden bei den SCC erste grundlegende pharmakologische Untersuchungen an dem $I_{Ca,L}$ statt. Allerdings muss der Einfluss der Veränderung des $I_{Ca,L}$ auf andere Ströme, wie z. B. den Kaliumströmen untersucht werden, bevor das *in vitro* Modell in der Pharmakologie Anwendung finden kann.

Eine weitere Untersuchung könnte an dieser Stelle hinsichtlich der Depolarisationsphase erfolgen. Wie im Kapitel „5.4.2. Intrazelluläre Ableitung der elektrischen Aktivität der Kardiomyozyten“ beschrieben, könnten in den SCC Calciumkanäle und nicht wie in adulten Organismen die Natriumkanäle für die Aktionspotentialamplitude verantwortlich sein. Weiterhin spielt auch der Natrium-Calcium-Austausch-Strom (I_{NCX}) eine bedeutende Rolle in APs. Dieser Strom trägt vor allem in Phase eins des APs kurzfristig zum Ca^{2+} -Einwärtsstrom bei und ist damit repolarisierend. Im Weiteren ist er der wichtigste Mechanismus, um das durch den $I_{Ca,L}$ einfließende Ca^{2+} wieder aus der Zelle zu transportieren.

Aufgrund der homologen Veränderung der AP-Form in den SCC und adulten humanen Herzzellen durch die Zugabe von Isoproterenol ist es wahrscheinlich, dass Natriumkanäle für die Depolarisation in den Kardiomyozyten der SCC verantwortlich sind. Ansonsten wären bereits in dieser AP-Phase Abweichungen in den jeweiligen Reaktionen dieser beiden Spezies ersichtlich gewesen.

5.5.2. Kaliumchlorid

In einem weiteren Versuch wurde die Wirkung von Kaliumchlorid (KCl) auf die SCC untersucht. Die Injektion von Kaliumchlorid führt im Herzen zu Hyperkaliämie. Eine geringe Hyperkaliämie (beim Menschen bis 8 mmol/L) führt zunächst zu einer positiven Chronotropie und Inotropie, da die Kardiomyozyten leichter erregbar sind. Bei einer starken Hyperkaliämie (bei Menschen ab etwa 10 mmol/L) wird das Membranpotential stark positiv. Die Zelle können nach einem einzigen Aktionspotential nicht mehr unter die erforderlichen -40 mV repolarisieren. Da dies die Schwelle zum Öffnen der spannungsabhängigen Natriumkanäle ist, kann kein neues AP eingeleitet werden – es kommt zum Herzstillstand. Die Untersuchungen an den SCC zeigten ebenfalls Veränderungen bei der Kontraktion in den Kardiomyozyten nach Zugabe von KCl an. Die Beobachtungen wiesen eine kurzzeitige Hyperkaliämie auf, die zu einem Herzstillstand führte. Ursache dafür war die Gabe einer zu hohen Dosis an KCl. Der erneute Kontraktionsbeginn nach Austausch des Mediums und somit Auswaschen des KCl lässt

vermuten, dass die SCC in derselben Weise reagieren, wie es bei Kardiomyozyten höherer Vertebraten beobachtet wurde.

5.5.3. Rilmakalim

Das in diesem Experiment verwendete Medikament Rilmakalim wirkt auf den $I_{K,ATP}$, indem das Medikament den Kanal nach dem Öffnen blockt (Riccioppo Neto et al. 1997). Der Ausstrom von K^+ -Ionen induziert eine Steigerung der negativen Ladung in der Zelle. Dadurch wird über Sekundärmechanismen einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und damit einer Zellaktivierung entgegen gewirkt. Eine Erhöhung der Schlagfrequenz ist die Folge (Kapitel „4.9.3. Modifikation des Aktionspotentials durch Rilmakalim“).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kardiomyozyten der SCC einen I_{KATP} besitzen. Die Untersuchungen an den SCC zeigten nach Zugabe von Rilmakalim eine Erhöhung der Schlagfrequenz und somit zugleich eine Verkürzung des APs.

Auch in dieser pharmakologischen Untersuchung wurde die Annahme, dass man die SCC als humanes analoges Testmodell benutzen kann, bestätigt. Die elektrophysiologische Antwort der SCC auf einen ATP-sensitiven Kaliumkanalöffner und -blocker wurde in derselben Weise beeinflusst, wie es bei den humanen Kardiomyozyten nachgewiesen wurde (Brendel et al. 1998). Nichtsdestotrotz müssen weitere Untersuchungen vorgenommen werden, um die Aussagen über das Potential der SCC als Testmodell zu festigen. Während Rilmakalim mit seiner Acylaminoverbindung als Öffner ATP-sensitiver K^+ -Kanäle wirkt, zeigen Verbindungen mit einer Sulfonylaminostruktur eine starke und spezifisch blockierende Wirkung auf den I_{KATP} . Ein Beispiel ist hier Glibenclamid, welches als Gegenspieler von Rilmakalim betrachtet wird. Zugabe von Glibenclamid stoppt die durch Rilmakalim verursachte Schlagfrequenzerhöhung, so dass die Öffnung spannungsgesteuerter Calciumkanäle erfolgen kann (Aktories et al. 2009). Das AP wird somit wieder verlängert. Die beiden Medikamente könnten im Wechsel an den SCC getestet werden, um die Entstehung der Schlagfrequenzerhöhung (Zugabe von Rilmakalim) und die Beendigung der Schlagfrequenzerhöhung (Zugabe von Glibenclamid), wie sie bei humanen Kardiomyozyten auftritt, zu überprüfen. Weiterhin könnten Untersuchungen an den Kaliumströmen $I_{kr/s}$ und I_{K1} erfolgen, da diese ebenfalls Ströme im AP-Ablauf darstellen. Neben den einzelnen Ionenkanälen sollten auch die Zusammenhänge zwischen diesen betrachtet werden, da jede Beeinflussung eines Kanals auch eine Veränderung anderer Ionenkanäle mit sich zieht.

5.6. Tauglichkeit der SCC als zellbasiertes Testmodell

Das hier vorgestellte *in vitro* Modell weist viele Merkmale auf, die die Tauglichkeit der SCC als humanes analoges Testmodell zeigen:

- Die Bildung der SCC ist schnell und einfach. Die Bildungsrate beträgt bis zu 1,5, so dass das Modell als Hochdurchsatztestsystem verwendet werden kann.
- Die SCC weisen eine homologe Struktur auf.
- Die Kontraktion ist spontan und autonom. Sie wurde bis zu sechs Monate nachgewiesen. Zudem weisen die SCC human ähnliche Herzfrequenzen auf.
- Der strukturelle Aufbau der Kardiomyozyten in den SCC entspricht denen von humanen Kardiomyozyten.
- Die SCC sind funktionierende 3D-Synzytien.
- Die Schrittmacherzellen befinden sich in einem Schrittmacherzentrum, so dass verschiedene kardiale Zelltypen vorhanden und zudem, wie im Herzen, räumlich getrennt sind.
- Es sind Aktionspotentiale und Feldpotentiale vorhanden.
- Die APs ähneln in Form und Verhalten den humanen APs (schnelle Depolarisation, lange Plateauphase, schnelle Repolarisation).
- Die Sensitivität bei Pharmakazugabe ($I_{Ca,L}$ und I_{KATP}) entspricht der von humanen Kardiomyozyten.

Es gibt weitere Punkte die für die Nutzung als kardiales Testsystem bedeutend sind. Zwar konnten diese Punkte im Rahmen der Arbeit nicht untersucht werden, sollen jedoch nicht unerwähnt bleiben.

1. Im Herzgewebe existiert neben dem Atrium und dem Ventrikel auch die Unterteilung in subendokardiale, submidmyokardiale, subepikardiale und Purkinje Zellen. Es wurde festgestellt, dass die Zellen zum Teil erhebliche elektrophysiologische Unterschiede aufweisen (Lukas 1997, Balatí et al. 1999). So bestimmten z. B. Balatí et al. (1999) für subendokardiale, submidmyokardiale, subepikardiale und Purkinje Zellen die elektrophysiologische Aktivität im Kaninchenherzen (Tabelle 25). Es zeigte sich, dass vor allem die APD_{90} und die V_{max} in den einzelnen Zelltypen erhebliche Unterschiede aufwiesen.

Tabelle 25: Aktionspotentialparameter von subendokardialen, submidmyokardialen, subepikardialen und Purkinje Zellen aufgenommen aus dem linken Ventrikel eines Kaninchenherzens

	Subendokardium (n = 28)	Submidmyokardium (n = 37)	Subepikardium (n = 29)	Purkinje Faser (n = 20)
RP (mV)	-84.3 ± 0.9	-86.5 ± 0.8	-84.2 ± 0.7	-89.6 ± 0.9
APA (mV)	108.7 ± 1.5	-108.4 ± 1.5	101.3 ± 1.2	124.6 ± 1.7
APD ₉₀ (ms)	238 ± 5.0	258.7 ± 4.5	222.1 ± 5.3	324.8 ± 15.4
V _{max} (V/s)	176.9 ± 7.0	284.0 ± 17.5	154.5 ± 6.6	505.0 ± 32.7

Werte angegeben mit ± Standardabweichung; RP, Ruhemembranpotential; APA, Aktionspotentialamplitude; APD₉₀, Aktionspotentialdauer bei 90 % Repolarisation; V_{max}, maximale Geschwindigkeitsrate beim Aktionspotentialanstieg, (Daten aus Baláti et al. 1999).

Die elektrophysiologischen Daten der subendokardialer Myozyten wurden in der Vergangenheit oft generalisiert und repräsentativ für das gesamte ventrikuläre Myokardium genommen (Baláti et al. 1999). Untersuchungen an Säugetieren zeigten, dass dieselben Herzzelltypen in den Tiergruppen unterschiedlich und zum Teil sogar entgegengesetzt in ihren elektrophysiologischen Aktivitäten reagieren (Antzelevitch et al. 1991, Baláti et al. 1999, Cordeiro et al. 2004). Es ist daher von Bedeutung den Zelltyp genau zu bestimmen, um Falschaussagen aufgrund von Verallgemeinerungen zu vermeiden.

Aufgrund der Tatsache, dass das hier vorgestellte Modell aus Zellen von Fischlarven generiert wurde, besteht die Möglichkeit der Existenz verschiedener kardialer Zelltypen. Allerdings konnten diese in den SCC nicht ermittelt werden. Bei bisherigen Ableitungen fanden in der Regel Messungen in zwei bis drei Zellen eines SCC statt. Diese intrazellulären Messungen wiesen keine erheblichen elektrophysiologischen Unterschiede innerhalb eines SCC auf, so dass man vermuten kann, dass die elektrophysiologischen Aktivitäten der Kardiomyozyten innerhalb eines SCC annähernd homolog sind.

2. Nach den ersten pharmakologischen Untersuchungen scheinen die Zellen der Regenbogenforellenlarve ein geeignetes experimentelles System für elektrophysiologische Untersuchungen darzustellen. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass dieses ichtthyologische *in vitro* Testsystem murine Testsysteme zum Teil ersetzen könnte. Da sich, wie bereits beschrieben, die elektrophysiologischen Merkmale im Mauserzen stark von dem humanen Herzen unterscheiden, reagieren Mäuse anders auf Medikamente, als humane Systeme (www.aerzte-gegen-tierversuche.de). Das führt dazu, dass Tests von Medikamenten in der Maus

alleine nicht aussagekräftig genug sind, um diese Ergebnisse auch auf den Menschen zu übertragen (www.aerzte-gegen-tierversuche.de). Aber auch die SCC müssten, um Eignung für die Nutzung als *in vitro* Testmodell in der humanen Herzforschung nachzuweisen, detaillierter auf ihre Ionenstromzusammenhänge untersucht werden.

In den letzten Jahren wurden Unterschiede in der Ionenkanalzusammensetzung des Herzens zwischen Fisch und Mammalia beschrieben (z. B. Haverinen et al. 2007, Shiels et al. 2006). Ferner wurden auch elektrophysiologische Unterschiede bezüglich des Entwicklungsstadiums der Vertebraten und hier vor allem der ventrikulären und atrialen Kardiomyozyten im Forellenherzen beschrieben (Vornanen et al. 2002). Im Detail sei hier genannt, dass vor allem der voltaged-gate-sodium channel (Nav) untersucht werden sollte, da an diesem Kanal Unterschiede zwischen den Tiergruppen bestehen (Haverinen et al. 2007, Hassinen et al. 2008). So ist z. B. der Natriumkanal in der Regenbogenforelle hauptsächlich durch das Protein Nav1.4 charakterisiert, während es im humanen Herzen das Protein Nav1.5 ist.

Des Weiteren sollte auch der Kaliumkanal (Erg) untersucht werden. Dieser Kanal ist ein Hauptrepolarisations-Kaliumkanal im Herzen der Regenbogenforelle sowie auch des Menschen. Im Vergleich zu anderen Kaliumkanälen hat der Erg-Kanal mehr aromatische Bindungsstellen und ein größeres Porenvolumen, so dass ein höheres Bindungspotential für größere und kleinere Moleküle und somit wiederum ein höheres Hemmungspotential durch Medikamente besteht. Herzrhythmustörungen sind die Folge. Aus diesem Grund werden alle auf den Markt eingeführten Medikamente hinsichtlich ihrer Reaktionen auf diesen Kanal untersucht (<http://www.pharmazeutische-zeitung.de>). Demzufolge ist die Homologie dieses Kanals in den SCC im Vergleich zum humanen ERG-Kanal entscheidend.

3. Die Versuche an den SCC erfolgten bei niedrigeren Temperaturen (20 bis 25° C), als es bei Testsystemen von Mammalia der Fall ist. Aufgrund dessen sollte stets die Reaktions-Geschwindigkeits-Temperatur-Regel (RGT= Van't Hoff'sche Regel) bedacht werden. Diese Regel besagt, dass chemische Reaktionen bei einer Erhöhung der Temperatur um 10° C doppelt so schnell ablaufen.

Shiels et al. (2002) beschrieben, dass die Herzkontraktion in allen Vertebraten von der Temperatur abhängig ist. So tritt bei homoiothermen Organismen mit einer Temperatursenkung eine Bradykardie und mit Temperatursteigerung eine Tachykardie auf. Auch bei Forellen wurde

dieser Effekt nachgewiesen. Shiels et al. (2002) zeigten, dass in Forellen eine steigende Temperatur eine sinkende intrazelluläre Calciumkonzentration zur Folge hat.

4. Veränderungen elektrophysiologischer Eigenschaften im zeitlichen Verlauf während der *in vitro* Kultivierung wurden für humane Kardiomyozyten von Wenzel et al. (2010) beschrieben.

Eine weitere Studie verdeutlichte, dass auch Kardiomyozyten aus adulten Regenbogenforellen zwei bis drei Tage nach Isolation ihre elektrophysiologischen Eigenschaften verändern (Tabelle 26; Nurmi und Vornanen 2002). Eine geringe Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften bzw. des FPs war in der extrazellulären Ableitung der SCC ersichtlich. Die FPs veränderten sich bei den SCC im Verlaufe der 49 Tage (Abbildung 32). Allerdings kann hier die Ursache auch auf das Auswachsen der Zellen zurückgeführt werden, die die Kontraktion hemmten (Kapitel „5.4.1. Extrazelluläre Ableitung der elektrischen Aktivität kardialer Netzwerke“). Weiterhin muss erwähnt werden, dass die in der Studie von Nurmi und Vornanen (2002) isolierten Herzzellen in serumfreiem Medium gehalten wurden und zudem elektrisch stimuliert werden mussten. Es besteht die Möglichkeit, dass die Zellen daher im Verlaufe der Zeit an Vitalität einbüßten.

Tabelle 26: Aktionspotentialparameter in frisch isolierten und kultivierten ventrikulären Myozyten aus dem Regenbogenforellenherz

	Kontrolle (n=15)	2-3 Tage (n=9)	8-10 Tage (n=9)
RP (mV)	-75,2 ± 0,82	-63,4 ± 1,96	-57,1 ± 1,46
APA (mV)	135,1 ± 3,35	99,8 ± 2,96	84,7 ± 5,96
APD ₅₀ (ms)	262,6 ± 21,2	471,2 ± 55,7	283,3 ± 59,4
APD ₉₀ (ms)	306,6 ± 28,7	577,1 ± 68,1	785,7 ± 159,7

Werte angegeben mit ± Standardabweichung; RP, Ruhemembranpotential; APA, Aktionspotentialamplitude; APD_{50/90}, Aktionspotentialdauer bei 50 bzw. 90 % Repolarisation, (Daten aus Nurmi und Vornanen 2002).

5.7. Ausblick

Zusammenfassend zeigt sich, dass das generierte *in vitro* Modell der spontan kontrahierenden Kardiomyozytenverbände in vielen Forschungsgebieten Anwendung finden könnte.

Fischbiologie: Die SCC stellen vor allem für die Fischbiologie ein sehr gutes *in vitro* Testsystem dar. Sie könnten u. a. in der Toxikologie, der Umwelt- oder ökologischen Forschung sowie auch in der Physiologie Anwendung finden. Weiterhin könnten die SCC auch als zellbasierte Assays für die Untersuchung von Herzfunktion und –physiologie fungieren, um Tests auf Organismenebene abzulösen. So wären sie als Testsystem bei Behandlungen mit Metallen und anderen Zytotoxinen (Sawyer & Health 1988), der Untersuchung von Einflüssen von Anästhetika (Hill et al. 2002), Reaktion auf Klimaänderung und die daraus resultierende Veränderung abiotischer Parameter (reduzierte Sauerstoffkonzentration, wechselnde Wassertemperaturen und veränderter pH-Wert), denkbar (Hill & Womersley 1993, Gehrke & Fielder 1988, Franklin et al. 2001, Hartmund & Gesser 1992, Viant et al. 2003, Mitani et al. 1989).

Pathologie: Die Pathologie ist die Lehre der Herkunft, Entstehungsweise, Verlaufsform und Auswirkung von abnormen und krankhaften Vorgängen und Zuständen im Körper. Auf diesem Forschungsgebiet werden u. a. Viruserkrankungen an Fisch untersucht. Ein Beispiel ist das Cardiomyopathy Syndrome (CMS). Bei dieser Krankheit sterben jährlich Millionen von Forellen und Lachsen aufgrund von Herz- bis hin zum Multi-Organ-Versagen (Bruno & Noguera 2009). Bisher werden für Forschungen an diesen Viren Fische verwendet. Das *in vitro* Herzmodell könnte auch hier für Untersuchungen am Ursache-Wirkungs-Komplex Anwendung finden.

Entwicklungsbiologie: Die Entwicklungsbiologie erforscht die Vorgänge der Ontogenese, aber auch die genetische Kontrolle von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zellspezialisierung in verschiedenen Zelltypen und Organen. Anhand der Elektronenmikroskopie konnte der Nachweis erbracht werden, dass die präparierten Fischlarven Herzprogenitorzellen enthalten. Im Gegensatz dazu weisen die SCC ausdifferenzierte Herzzellen mit Aktin- und Myosinstrukturen auf. In weiteren Untersuchungen konnte der Beweis für die unterschiedliche Generierung der SCC in Abhängigkeit vom Larvenalter erbracht werden. Das Bildungspotential der SCC ist somit vom Alter der Fischlarven abhängig. Auch die auftretende Kontraktionsfrequenz der SCC verändert

sich mit dem Larvenalter. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass anhand dieses *in vitro* Modells auch die Entwicklung des Herzens sowie die Ionenkanalentstehung nachverfolgt werden kann.

Regenerative Medizin: In dieser Arbeit wurde der Beweis der Regenerationsfähigkeit der SCC erbracht. Bisher wurde die Regenerationsfähigkeit des Herzens vor allem bei Zebrafischen untersucht. So konnte Poss (2007) nach einer 20 %igen Ventrikelamputation eine komplette Regeneration des Herzens nachweisen. Da die SCC ebenfalls die Fähigkeit der Regeneration besitzen, könnten *in vitro* Untersuchungen zur Herzregeneration an dem in dieser Arbeit generierten Modell stattfinden.

Transplantationsmedizin: Im Experiment der extrazellulären Ableitung wurde neben dem elektrischen Potential auch die Zusammenlagerung zweier Aggregate aus unterschiedlichen Ursprungsorganismen derselben Art beobachtet. Diese beiden einst voneinander unabhängig autonom kontrahierenden Aggregate lagerten sich nach einigen Wochen zu einem Synzytium zusammen. Des Weiteren glichen sich ihre einst unterschiedlichen Kontraktionsfrequenzen ebenfalls an. Dies verdeutlicht, dass sich *in vitro* generierte Herzzellen aus unterschiedlichen Organismen derselben Spezies vereinen können. Diese Möglichkeit wird auch bei der Transplantationsbiologie angewendet, bei der gesamte Organe von einem Spender in einen Empfänger umgesetzt werden. Jedoch kommt es bei Transplantationen immer wieder zu Immunantworten und somit zu Abstoßungsreaktionen des Transplantatgewebes. Das *in vitro* kardiomyogene Modell könnte ggf. auch auf diesem Forschungsgebiet in der Grundlagenforschung Anwendung finden, um z. B. den Mechanismus der Zusammenlagerung fremder Zellen und die Bildung von gap junction zu untersuchen.

Pharmakologie: Es konnte gezeigt, dass das Testmodell als Hochdurchsatztestsystem fungieren kann und zudem humanähnliche elektrophysiologischen Eigenschaften aufweist. Neben der Herzfrequenz ist es vor allem die AP-Form der Kardiomyozyten, die dieses System gegenüber den murinen Herztestsystemen hervorhebt. Weiterhin wurde die Reaktion auf Medikamente untersucht. Auch hier wurden dieselben Sensitivitäten beobachtet, wie sie im menschlichen Herzen vorhanden sind. Ein weiterer Vorteil gegenüber vielen Modellen ist die 3D-Form der SCC. So können hier im Zellverband und nicht nur auf Einzelzellebene Medikamente getestet werden, denn das Zusammenspiel von Kardiomyozyten im Zellverband ist ebenfalls eine

wichtige Voraussetzung für ein *in vitro* Testsystem. Auch die Langzeittestung wäre mit diesem Modell, aufgrund ihrer monatelangen spontanen Aktivität, möglich.

Aufgrund der Ähnlichkeit in Struktur und Funktion des Myokardiums von Mammalia und anderen Vertebraten ist es möglich, Fisch für humane kardiovaskuläre Forschungen einzusetzen (Chico et al. 2008).

Letztendlich ist das hier vorgestellte und angewandte Modell ein einfach ausführbares System, um Reaktionen von Herzzellen in diversen Forschungsgebieten zu untersuchen. Gleichzeitig könnte so zu einer Reduzierung von Tierversuchen beigetragen werden. In allen hier aufgeführten Anwendungsaspekten zeigte sich, dass ein Umsteigen von Tierversuchen auf *in vitro* Modelle möglich ist. Ein solcher Ansatz ist konform mit dem wichtigen 3-R-Prinzip vom Verbessern, Reduzieren, Ersetzen (Reduce, Refine, Replace); (Russel & Burgh 1959). Diese Art von *in vitro* Testsystemen wird staatlich gefördert, ist ethisch unbedenklicher als Tierversuche und sollte daher in den Markt eingeführt werden.

VI. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein *in vitro* Testsystem aus Regenbogenforellenlarven entwickelt. Dieses Testsystem besteht aus spontan kontrahierenden 3D-Zellaggregaten (SCC-spontaneously contracting cell aggregate) und soll in der humanen Herzforschung Anwendung finden. Analysen zur Entstehung der SCC ergaben, dass sich diese aus Herzprogenitorzellen der Larven entwickelten und sich *in vitro* zu adulten Herzzellen ausdifferenzierten. Untersuchungen zeigten, dass bei einer Präparation kurz vor dem Schlupf der Larven, die höchste Bildungsrate auftritt, bei der bis zu fünf SCC aus einer Larve entstehen können. Ferner entspricht die Kontraktionsfrequenz der SCC zu diesem Zeitpunkt der der Menschen. Zudem konnte bei den SCC eine bis zu sechsmoatige Kontraktion beobachtet werden, so dass dieses System als Langzeittestmodell bezeichnet werden kann.

Eine Charakterisierung der Zelltypen der SCC erfolgte mittels RT-PCR, Immunochemie und Elektronenmikroskopie. Die Untersuchungen zeigten, dass in den SCC voll ausgebildete Kardiomyozyten, die durch Zellverbindungsproteine miteinander verbunden sind, vorliegen. Das *in vitro* Testsystem stellt somit ein funktionierendes Synzytium dar. Des Weiteren konnte die Existenz von Schrittmacherzellen in einem kleinen Bereich der SCC nachgewiesen werden, wodurch die Autonomie erklärt werden kann.

Außerdem wurde das Regenerationspotential der SCC untersucht. Es konnte belegt werden, dass die SCC zu einer Regeneration sowie auch zu einer Vervielfältigung fähig sind.

Die Elektrophysiologie der SCC wurde mittels extrazellulären und intrazellulären Ableitungen vorgenommen. Die extrazellulären Messungen mittels Multielektrodenarray zeigten, dass die SCC ein Feldpotential aufwiesen, welches über einen langen Zeitraum konstant war. Zudem konnte die Fusion von zwei Synzytien beobachtet werden, bei dem sich sogar die Feldpotentiale beider SCC angleichen. Die intrazellulären Messungen erfolgten mittels scharfer Elektrode. Die Kardiomyozyten der SCC wiesen dabei ein AP auf, welches dem humanen kardialen AP sehr ähnlich war. Erste pharmakologische Untersuchungen bewiesen zudem, dass die SCC auf Medikamente in derselben Weise reagierten, wie es für humane Kardiomyozyten bekannt ist.

Die Ergebnisse präsentieren, dass die *in vitro* generierten spontan kontrahierenden kardiomyogenen Zellaggregate, die aus der Regenbogenforellenlarve generiert wurden, für Untersuchungen in der humanen Herzforschung nützlich sind und zudem Tierversuche reduzieren würden.

VII. Literaturverzeichnis

Aktories, K., U. Förstermann, et al. (2009). "Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie." Elsevier GmbH, München; Der Urab & Fischer Verlag

Alcolea, S., M. Theveniau-Ruissy, et al. (1999). "Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development." *Circ Res* 84(12): 1365-79.

Antzelevitch, C. and J. Fish (2001). "Electrical heterogeneity within the ventricular wall." *Basic Res Cardiol* 96(6): 517-27.

Antzelevitch, C., S. Sicouri, et al. (1991). "Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells." *Circ Res* 69(6): 1427-49.

Anversa, P. and B. Nadal-Ginard (2002). "Myocyte renewal and ventricular remodelling." *Nature* 415(6868): 240-3.

Annual report 2008, World Health Organization (WHO); <http://www.who.int/en>; 2008.

Aubert, A. E., F. Beckers, et al. (2004). "Heart rate and heart rate variability in chicken embryos at the end of incubation." *Exp Physiol* 89(2): 199-208.

Baláti, B., A. Varró, et al. (1999). "Pharmacological Modification of the Dispersion of Repolarization in the Heart: Importance of the M cells." *Cardiovasc Drugs and Therapy* 13: 491-505.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D; Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114(6):763-76

Berghmans, S., P. Butler, et al. (2008). "Zebrafish based assays for the assessment of cardiac, visual and gut function--potential safety screens for early drug discovery." *J Pharmacol Toxicol Methods* 58(1): 59-68.

Bimber, B., R. W. Dettman, et al. (2007). "Differential regulation of Tbx5 protein expression and sub-cellular localization during heart development." *Dev Biol* 302(1): 230-42.

Borrmann, C. M., C. Grund, et al. (2006). "The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. II. Colocalizations of desmosomal and fascia adherens molecules in the intercalated disk." *Eur J Cell Biol* 85(6): 469-85.

Bouchard, R. A., R. B. Clark, et al. (1995). "Effects of action potential duration on excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. Action potential voltage-clamp measurements." *Circ Res* 76(5): 790-801.

- Brendel, J., Gerlach, U., Lang, H.J., Weidmann, K. (1998). Sulfonamid-substituierte Chromane, Verfahren zu ihrer Herstellung, ihre Verwendung als Medikament sowie sie enthaltende pharmazeutische Zubereitungen. Patent- Anmeldenummer: 98117809.8, Anmeldetag: 19.09.1998
- Brette, F., G. Luxan, et al. (2008). "Characterization of isolated ventricular myocytes from adult zebrafish (*Danio rerio*)." *Biochem Biophys Res Commun* 374(1): 143-6.
- Bruno D.W. and Noguera P. (2009) Experimental transmission of cardiomyopathy syndrome (CMS) in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms* 87, 253-242.
- Bundesamt für Naturschutz; <http://www.bfn.de>
- Bunton, T. E. (1993). "The immunocytochemistry of cytokeratin in fish tissues." *Vet Pathol* 30(5): 418-25.
- Burggren, W. B. B. K. (1997). "Development of Cardiovascular Systems." Cambridge University Press: 145-465.
- Cao, F., R. A. Wagner, et al. (2008). "Transcriptional and functional profiling of human embryonic stem cell-derived Kardiomyozytes." *PLoS One* 3(10): e3474.
- Chico, T. J., P. W. Ingham, et al. (2008). "Modeling cardiovascular disease in the zebrafish." *Trends Cardiovasc Med* 18(4): 150-5.
- Coppen, S. R., I. Kodama, et al. (1999). "Connexin45, a major connexin of the rabbit sinoatrial node, is co-expressed with connexin43 in a restricted zone at the nodal-crista terminalis border." *J Histochem Cytochem* 47(7): 907-18.
- Cordeiro, J. M., L. Greene, et al. (2004). "Transmural heterogeneity of calcium activity and mechanical function in the canine left ventricle." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(4): H1471-9.
- Davisson A. (2008). Ein Ende aller Tierversuche?, *Technology Review*, 10.03.2008
- Eschenhagen, T., M. Didie, et al. (2002). "Cardiac tissue engineering." *Transpl Immunol* 9(2-4): 315-21.
- Evans D. H. & Claiborne J. B. (2006). *The Physiology of Fishes – Third Edition*. CRC Taylor & Francis Group: 119-153. ISBN 0-8493-2022-4
- Fent, K. (2001). "Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples." *Toxicol In Vitro* 15(4-5): 477-88.
- Franke, W. W., C. M. Borrmann, et al. (2006). "The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of

- Kardiomyozytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins." *Eur J Cell Biol* 85(2): 69-82.
- Franklin, C. E., M. Axelsson, et al. (2001). "Constancy and control of heart rate during an increase in temperature in the Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*." *Exp. Biol. Online* 6.
- Frerichs, G. N., D. Morgan, et al. (1991). "Spontaneously productive C-type retrovirus infection of fish cell lines." *J Gen Virol* 72 (Pt 10): 2537-9.
- Fritsche, R. (1990). "Effects of hypoxia on blood pressure and heart rate in three marine teleosts." *Fish Physiology and Biochemistry* 8: 85-92.
- Fromherz, P. (2002). "Electrical interfacing of nerve cells and semiconductor chips." *Chemphyschem* 3(3): 276-84.
- Gehrke, P. C. and F. D.R. (1988). "Effects of temperature and dissolved oxygen on heart rate, ventilation rate and oxygen consumption of spangled perch, *Leiopotherapon unicolor* (Günther 1859), (Percoidei, Teraponidae)." *J. Comp. Physiol. B.* 157: 771-782
- Goldstein, J. P., A. Scott, et al. (2004). "Are primary cultures of trout (*Oncorhynchus mykiss*) ventricular cardiomyocytes metabolically viable?. *Fish Physiology and Biochemistry* 30: 109-117.
- Gros, D. B. and H. J. Jongsma (1996). "Connexins in mammalian heart function." *Bioessays* 18(9): 719-30.
- Gross, G. W., E. Rieske, et al. (1977). "A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro." *Neurosci Lett* 6(2-3): 101-5.
- Halbach, M., F. Pillekamp, et al. (2006). "Ventricular slices of adult mouse hearts--a new multicellular in vitro model for electrophysiological studies." *Cell Physiol Biochem* 18(1-3): 1-8.
- Halen J.(2006). "Krankheitskosten in Deutschland im Jahr 2004". Statistisches Bundesamt Deutschland
- Hamill, O. P., A. Marty, et al. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflugers Arch* 391(2): 85-100.
- Hartmund, T. and H. Gesser (1992). "Temperature, contractility and high energy phosphates in anoxic fish heart muscles." *J. Comp. Physiol. B.* 162: 714-721
- Hassinen, M., J. Haverinen, et al. (2008). "Electrophysiological properties and expression of the delayed rectifier potassium (ERG) channels in the heart of thermally acclimated rainbow trout." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295(1): R297-308.

Haverinen, J., M. Hassinen, et al. (2007). "Fish cardiac sodium channels are tetrodotoxin sensitive." *Acta Physiol (Oxf)* 191(3): 197-204.

Hick, C. A. H. (2009). "Intensivkurs Physiologie." Urban und Fischer Verlag München 6.Auflage: 45-77.

Haverinen, J. and M. Vornanen (2006). "Significance of Na⁺ current in the excitability of atrial and ventricular myocardium of the fish heart." *J Exp Biol* 209(Pt 3): 549-57.

Hill, K. T., W. Davison, et al. (2002). "The effects of fish anaesthetics (MS222, metomidate and AQUI-S) on heart ventricle, the cardiac vagus and brachial vessels from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)." *Fish Physiology and Biochemistry* 37: 397-405

Hill, K. T. and C. Z. Womersley (1993). "Interactive effects of some environmental and physiological variables on fluorescent age pigment accumulation in brain and heart tissue of an aquatic poikilotherm." *Environmental Biology of Fishes* 37: 397-405.

<http://media.wiley.com/>; modifiziert

<http://www.aerzte-gegen-tierversuche.de>; abgerufen: 28.09.2010

<http://www.andreas.bulling-online.de/>; abgerufen 26.11.2009

<http://www.sigmaldrich.com>; abgerufen: 26.02.2011

<http://www.Go3R.org>; abgerufen: 28.09.2010

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/mrna-protocols/dynabeads-oligo-dT-25.html#prot2>; abgerufen: 13.12.2010

<http://www.multichannelsystems.com>; abgerufen: 11.11.2010

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; abgerufen: 12.04.2010

<http://www.oligo-explorer.software.informer.com/1.2/>; abgerufen: 13.12.2010

http://www.onmeda.de/lexika/anatomie/herz_anatomie-physiologie; abgerufen: 23.07.2010

http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/12-3396-00_m.pdf; abgerufen: 13.12.2010

<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=29235>; abgerufen am 06.01.2011

<http://primer3.sourceforge.net>; abgerufen: April 2009-Januar 2010

<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp10338.pdf>; abgerufen: 13.12.2010

<http://www.sf.adfg.state.ak.us>; abgerufen: 29.04.2010

<http://www.vfa.de>; 28.09.2010

<http://www.wissenschaft-online.de/>; abgerufen 12.08.2010

Hubel, D. H. and T. N. Wiesel (1959). "Receptive fields of single neurones in the cat's striate cortex." *J Physiol* 148: 574-91.

Ingham, P. W. (1997). "Zebrafish genetics and its implications for understanding vertebrate development." *Hum Mol Genet* 6(10): 1755-60.

Ishii, T. M., M. Takano, et al. (1999). "Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node." *J Biol Chem* 274(18): 12835-9.

Jung, D. R., R. Kapur, et al. (2001). "Topographical and physicochemical modification of material surface to enable patterning of living cells." *Crit Rev Biotechnol* 21(2): 111-54.

Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2005). "Basic Histology". McGraw-Hill Companies, Inc by Appleton & Lange. ISSN: 0891-2106

Kamer, I., J. Douek, et al. (2003). "Metallothionein induction in the RTH-149 cell line as an indicator for heavy metal bioavailability in a brackish environment: assessment by RT-competitive PCR." *Arch Environ Contam Toxicol* 45(1): 86-91.

Kartenbeck, J., W. W. Franke, et al. (1983). "Specific attachment of desmin filaments to desmosomal plaques in cardiac myocytes." *EMBO J* 2(5): 735-42.

Keating, M. T. (2004). "Genetic approaches to disease and regeneration." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359(1445): 795-8.

Kehat, I., A. Gepstein, et al. (2002). "High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived Kardiomyozytes: a novel in vitro model for the study of conduction." *Circ Res* 91(8): 659-61.

Key, B., C.A.Devine (2003). "Zebrafish as an experimental model: strategies for developmental and molecular neurobiology studies." *Methods in Cell Science* Volume 25(1-2): 1-6.

Kikuchi, K., J. E. Holdway, et al. (2010). "Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes." *Nature* 464(7288): 601-5.

Kim, C., M. Majdi, et al. (2009). "Non-Kardiomyozytes influence the electrophysiological maturation of human embryonic stem cell-derived Kardiomyozytes during differentiation." *Stem Cells Dev*.

Kim, C. S., M. D. Coyne, et al. (2000). "Voltage-dependent Calcium channels in ventricular cells of rainbow trout: effect of temperature changes in vitro." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278(6): R1524-34.

- Kitoh, K. M. O. (1985). "Differentiation of the Compact Layer in the Heart Ventricel of Rainbow Trout." *Bullentin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 51: 539-542.
- Krause, A., W. Zacharias, et al. (2004). "Tbx5 and Tbx4 transcription factors interact with a new chicken PDZ-LIM protein in limb and heart development." *Dev Biol* 273(1): 106-20.
- LeClair, E. E. and J. Topczewski "Development and regeneration of the zebrafish maxillary barbel: a novel study system for vertebrate tissue growth and repair." *PLoS One* 5(1): e8737.
- Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev* 2005;85(4):1373-416
- Letelier, J. C. and P. P. Weber (2000). "Spike sorting based on discrete wavelet transform coefficients." *J Neurosci Methods* 101(2): 93-106.
- Lien, C. L., M. Schebesta, et al. (2006). "Gene expression analysis of zebrafish heart regeneration." *PLoS Biol* 4(8): e260.
- Linz, W., E. Klaus, et al. (1992). "Cardiovascular effects of the novel potassium channel opener (3S,4R)-3-hydroxy-2,2-dimethyl-4-(2-oxo-1-pyrrolidinyl)-6-phenylsulfonylechromane hemihydrate." *Arzneimittelforschung* 42(10): 1180-5.
- Lorenzen, N., N. J. Olesen, et al. (1993). "Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the glycoprotein gene of VHS virus, and immunization of rainbow trout with the recombinant protein." *J Gen Virol* 74 (Pt 4): 623-30.
- Lukas, A. (1997). "Electrophysiology of Myocardial Cells in the Epicardial, Midmyocardial, and Endocardial Layers of the Ventricle." *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2(1): 61-72.
- Major, R. J. and K. D. Poss (2007). "Zebrafish Heart Regeneration as a Model for Cardiac Tissue Repair." *Drug Discov Today Dis Models* 4(4): 219-225.
- Mangoni, M. E. and J. Nargeot (2008). "Genesis and regulation of the heart automaticity." *Physiol Rev* 88(3): 919-82.
- Mark B., Meinertz T., Fleck E., Gottwik M. G., Becker H.-J., Jünger C., Gitt A. K., Senges J.; Stetige Zunahme der Prähospitalzeit beim akuten Herzinfarkt: Eine Analyse der Entwicklung im bundesweiten Infarktregister (MITRAplus); *Dtsch Arztebl* 2006;103(20): A-1378 / B-1172 / C-1128
- Mauritz, C., K. Schwanke, et al. (2008). "Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells." *Circulation* 118(5): 507-17.
- Metscher, B. D. and P. E. Ahlberg (1999). "Zebrafish in context: uses of a laboratory model in comparative studies." *Dev Biol* 210(1): 1-14.

- Milan, D. J., I. L. Jones, et al. (2006). "In vivo recording of adult zebrafish electrocardiogram and assessment of drug-induced QT prolongation." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(1): H269-73.
- Mitani, H., K. Naruse, et al. (1989). "Eurythermic and stenothermic growth of cultured fish cells and their thermosensitivity." *Journal of Cell Science* 93: 731-737.
- Mortensen, B. and H. Gesser (1999). "O₂ consumption and metabolic activities in resting cardiac myocytes from rainbow trout." *J. Exp. Zool.* 283: 501-509.
- Mummery, C., D. Ward-van Oostwaard, et al. (2003). "Differentiation of human embryonic stem cells to Kardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells." *Circulation* 107(21): 2733-40.
- Neher, E. and B. Sakmann (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." *Nature* 260(5554): 799-802.
- Nemtsas, P., E. Wettwer, et al. (2009). "Adult zebrafish heart as a model for human heart? An electrophysiological study." *J Mol Cell Cardiol.*
- Nickerson, J. G., G. Drouin, et al. (2002). "In vitro regulation of β -adrenoceptor signaling in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*." *Fish Physiology and Biochemistry* 27: 157-171.
- Nurmi, A. and M. Vornanen (2002). "Electrophysiological properties of rainbow trout cardiac myocytes in serum-free primary culture." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282(4): R1200-9.
- Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(21):12313-8
- Ott, T. (2004). "Tissue Culture of Fish Cell Lines." *NWFHS Laboratory Procedures Manual - Second Edition Chapter 10: 1-16.*
- Pfannkuche, K., H. Liang, et al. (2009). "Cardiac myocytes derived from murine reprogrammed fibroblasts: intact hormonal regulation, cardiac ion channel expression and development of contractility." *Cell Physiol Biochem* 24(1-2): 73-86.
- Pieperhoff, S. and W. W. Franke (2008). "The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. VI. Different precursor structures in non-mammalian species." *Eur J Cell Biol* 87(7): 413-30.
- Poss, K. D. (2007). "Getting to the heart of regeneration in zebrafish." *Semin Cell Dev Biol* 18(1): 36-45.
- Rapoport, D. H., S. Schick Tanz, et al. (2009). "Isolation and in vitro cultivation turns cells from exocrine human pancreas into multipotent stem-cells." *Ann Anat* 191(5): 446-58.

- Reppel, M., P. Igelmund, et al. (2007). "Effect of cardioactive drugs on action potential generation and propagation in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes." *Cell Physiol Biochem* 19(5-6): 213-24.
- Riccioppo Neto, F., O. Mesquita Junior, et al. (1997). "Antiarrhythmic and electrophysiological effects of the novel KATP channel opener, rilmakalim, in rabbit cardiac cells." *Gen Pharmacol* 29(2): 201-5.
- Robinson, R. B. and S. A. Siegelbaum (2003). "Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function." *Annu Rev Physiol* 65: 453-80.
- Rolf, S., W. Haverkamp, et al. (2000). "Effects of antiarrhythmic drugs on cloned cardiac voltage-gated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes." *Naunym-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362: 22-31.
- Rönnau, K. (1977). "Myogenesis and Contraction in the Early Embryonic Heart of Rainbow Trout." *Cell and Tissue Research* 180: 123-132.
- Rubart, M. and L. J. Field (2006). "Cell-based approaches for cardiac repair." *Ann N Y Acad Sci* 1080: 34-48.
- Rubart, M. and L. J. Field (2008). "Stem cell differentiation: cardiac repair." *Cells Tissues Organs* 188(1-2): 202-11.
- Ruiz-Leal, M. and S. George (2004). "An in vitro procedure for evaluation of early stage oxidative stress in an established fish cell line applied to investigation of PHAH and pesticide toxicity." *Mar Environ Res* 58(2-5): 631-5.
- Russel, W.M.S. & R.L. Burgh (1959). *The Principles of Humane Experimental Techniques*. London: Methuen & Co. Special edition published by Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992.
- Ryan, S. N. and P. S. Davie (1993). "The effect of MS-222 on paced ventricle strips and the perfused heart of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*." *Comp. Biochem. Physiol.* 106C: 549-553.
- Saito, A. (1969). "Electrophysiological studies on pacemaker of several fish hearts." *zool. Mag.* 78: 291-296.
- Sauer, H., G. Rahimi, et al. (1999). "Effects of electrical fields on Kardiomyozyte differentiation of embryonic stem cells." *J Cell Biochem* 75(4): 710-23.
- Sawyer, P. L. H., A.G. (1988). "Cardiac, ventilatory and metabolic responses of two ecologically dissimilar species of fish to waterborne cyanide." *Fish Physiology and Biochemistry* 4: 203-219

- Schmid, A. C., M. Reinecke, et al. (2000). "Primary cultured hepatocytes of the bony fish, *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: a valid tool for physiological studies on IGF-I expression in liver." *J Endocrinol* 166(2): 265-73.
- Schmitz, S. (2009). "Der Experimentator Zellkultur." Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Shenje, L. T., L. J. Field, et al. (2008). "Lineage tracing of cardiac explant derived cells." *PLoS One* 3(4): e1929.
- Shiels, H. A., M. Vornanen, et al. (2002). "Effects of temperature on intracellular Ca²⁺ in trout atrial myocytes." *J Exp Biol* 205(Pt 23): 3641-50.
- Shiels, H. A., S. C. Calaghan, et al. (2006). "The cellular basis for enhanced volume-modulated cardiac output in fish hearts." *J Gen Physiol* 128(1): 37-44.
- Sicouri, S. and C. Antzelevitch (1991). "A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle. The M cell." *Circ Res* 68(6): 1729-41.
- Stieber, J., S. Herrmann, et al. (2003). "The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25): 15235-40.
- Stieber, J., F. Hofmann, et al. (2004). "Pacemaker channels and sinus node arrhythmia." *Trends Cardiovasc Med* 14(1): 23-8.
- Stieber, J., A. Thomer, et al. (2003). "Molecular basis for the different activation kinetics of the pacemaker channels HCN2 and HCN4." *J Biol Chem* 278(36): 33672-80.
- Sutherland, F. J. and D. J. Hearse (2000). "The isolated blood and perfusion fluid perfused heart." *Pharmacol Res* 41(6): 613-27.
- Takahashi, S. and Y. Sakurai (2005). "Real-time and automatic sorting of multi-neuronal activity for sub-millisecond interactions in vivo." *Neuroscience* 134(1): 301-15.
- Urbanek K, Torella D, Sheikh F, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(24):8692-7
- U.S. Environmental Protection Agency, "Prenatal Developmental Toxicity Study," Health Effects Test Guidelines, Aug. 1998
- van Amerongen, M. J. and F. B. Engel (2008). "Features of Kardiomyozyte proliferation and its potential for cardiac regeneration." *J Cell Mol Med* 12(6A): 2233-44.
- van der Loop, F. T., G. Schaart, et al. (1995). "Rearrangement of intercellular junctions and cytoskeletal proteins during rabbit myocardium development." *Eur J Cell Biol.* 68(1): 62-69.

- Veenstra, R. D. (1996). "Size and selectivity of gap junction channels formed from different connexins." *J Bioenerg Biomembr* 28(4): 327-37.
- Viant, M. R., I. Werner, et al. (2003). "Correlation between heat shock protein induction and reduced metabolic condition in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) chronically exposed to elevated temperature." *Fish Physiology and Biochemistry* 29: 159-171.
- Vornanen, M. (1998). "L-type Ca²⁺ current in fish cardiac myocytes: effects of thermal acclimation and beta-adrenergic stimulation." *J Exp Biol* 201(Pt 4): 533-47.
- Vornanen, M., A. Ryokkynen, et al. (2002). "Temperature-dependent expression of sarcolemmal K(+) currents in rainbow trout atrial and ventricular myocytes." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282(4): R1191-9.
- Wenzel, F., M. Dittrich, et al. (2002). "Hypoxia influences generation and propagation of electrical activity in embryonic Kardiomyozyte clusters." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 132(1): 111-5.
- Wenzel J, Brandenburger M, Richardt D, Bogdan R, Reppel M, Hescheler J, Dendorfer A, Terlau H (2010) An electrophysiological long-term model of human adult myocardium. *Cardiovasc Res* 87, p106
- White, T. W. and R. Bruzzone (1996). "Multiple connexin proteins in single intercellular channels: connexin compatibility and functional consequences." *J Bioenerg Biomembr* 28(4): 339-50.
- White, T. W., D. L. Paul, et al. (1995). "Functional analysis of selective interactions among rodent connexins." *Mol Biol Cell* 6(4): 459-70.
- Winitsky, S. O., T. V. Gopal, et al. (2005). "Adult murine skeletal muscle contains cells that can differentiate into beating Kardiomyozytes in vitro." *PLoS Biol* 3(4): e87.
- Wolf, K. and M. C. Quimby (1962). "Established eurythermic line of fish cells in vitro." *Science* 135: 1065-6.
- Xu, X., Z. V. Vysotskaya, et al. "Structural basis for the camp-dependent gating in human HCN4 channel." *J Biol Chem.*: doi 10.1074/jbc.M110.152033
- Yamamoto, M., H. Honjo, et al. (1998). "Low-frequency extracellular potentials recorded from the sinoatrial node." *Cardiovasc Res* 39(2): 360-72.
- Zodrow, J. M. and R. L. Tanguay (2003). "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibits zebrafish caudal fin regeneration." *Toxicol Sci* 76(1): 151-61.

VIII. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Todesursachenstatistik 1980, 2007.	8
Abbildung 2: Intrazelluläre Ableitungen mit einer scharfen Elektrode einer Herzzelle des Menschen (schwarz), der Maus (rot) und eines <i>in vitro</i> generierten Herzaggregates der Regenbogenforelle (grün).	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Sarkomers.....	15
Abbildung 4: Darstellung des Aktin-Troponin-Komplexes.....	16
Abbildung 5: Glanzstreifen und laterale Verbindungen in (a) Mammalia und (b) nicht-Mammalia.	18
Abbildung 6: intrazelluläre Ableitung via scharfer Elektrode und Feldpotential via EKG beim menschlichen Herz.....	23
Abbildung 7: Multielektrodenarray.....	50
Abbildung 8: Aufbau einer Messstation zur intrazellulären Ableitung mit einer scharfen Elektrode.....	52
Abbildung 9: Zellkultur der Regenbogenforellenlarve.	55
Abbildung 10: Spontan kontrahierende Zellaggregate in der Zellkultur einer Regenbogenforellenlarve.	56
Abbildung 11: Spontan kontrahierende Zellaggregate aus Larven verschiedener Fischarten.	56
Abbildung 12: Stereomikroskopische Aufnahme einer Regenbogenforellen-Zellkultur nach dem ersten Mediumwechsel.	58
Abbildung 13: Ratio der Mittelwerte der auftretenden Zellaggregate in der Zellkultur von präparierten Larven, die sich im Augenpunktstadium befanden.....	58
Abbildung 14: Ratio der auftretenden SCC in der Zellkultur in Abhängigkeit vom Larvenalter..	60
Abbildung 15: Kinetik der Entstehung von SCC in der Zellkultur über vier Wochen.	61
Abbildung 16: Darstellung der Aggregatdicke von sieben SCC.....	62
Abbildung 17: Box-Whisker-Plot der kontrahierenden Aggregatflächen in Abhängigkeit vom Larvenalter zum Präparationszeitpunkt.....	62
Abbildung 18: Box-Whisker-Plot der Schlagfrequenzen der SCC pro Minute in Abhängigkeit vom Präparationszeitpunkt.....	63
Abbildung 19: Schlagfrequenz (Kontraktion/ Minute) eines SCC einer Regenbogenforellenlarve in Primärkultur.	64
Abbildung 20: RT-PCR Analyse.....	66
Abbildung 21: Immunfärbung mit herzspezifischen Antikörpern der Sarkomerstruktur.	68
Abbildung 22: Immunfärbung mit herzspezifischen Antikörpern der Glanzstreifen.	69
Abbildung 23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kardiomyozyten.	71
Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen: unvollständig entwickelte Herzzellen. ..	71
Abbildung 25: Longitudinaler Schnitt durch ein Herzzellaggregat (Elektronenmikroskopische Aufnahme).....	73
Abbildung 26: Immunfärbung mit HCN4 in Schrittmacherzellen des SCC.....	74
Abbildung 27: Immunfärbung mit Connexin45 in Schrittmacherzellen des SCC.....	75
Abbildung 28: Lichtmikroskopische Aufnahmen eines sich regenerierenden SCC.....	76
Abbildung 29: Färbung der Zellkernteilung eines (a) unverletzten und (b) verletzten Aggregats mit EdU (grün).	77
Abbildung 30: Propagation von SCC durch mechanische Separation.....	78
Abbildung 31: Spontane Aktivität von SCC auf einem Multielektroden Array (MEA).	81

Abbildung 32: Aktivität einzelner Elektroden auf dem MEA.	82
Abbildung 33: Aktionspotential einer Kardiomyozyte aus einem <i>in vitro</i> kultivierten SCC.	83
Abbildung 34: Darstellung der Wirkung des Agonisten Isoproterenol.....	86
Abbildung 35: Veränderung der Kontraktion durch Kaliumchlorideinwirkung.....	87
Abbildung 36: Darstellung der Wirkung des Kaliumkanalöffners Rilimakalim	88

IX. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aktionspotential (AP) generierende Membranströme	22
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Chemikalien	29
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Puffer und Medien	30
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Kits	30
Tabelle 5: Fluoreszenzfarbstoff.....	31
Tabelle 6: Primärantikörper	31
Tabelle 7: Sekundärantikörper	31
Tabelle 8: Sequenzen designter Primer	32
Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmittel	32
Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmittel	33
Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Softwares.....	34
Tabelle 12: Darstellung der verwendeten Tierarten und ihren Herkunftsorten	35
Tabelle 13: Zusammensetzung des Standard-Zellkulturmediums	37
Tabelle 14: Zusammensetzung von DPBS in einfacher Konzentration	38
Tabelle 15: Versuchstiere für die Generierung von SCC.....	39
Tabelle 16: Antikörper	42
Tabelle 17: Zusammensetzung der Methanol/Aceton-Fixierungslösung.....	43
Tabelle 18: Zusammensetzung des Puffers TBST + 0,1% BSA.....	44
Tabelle 19: Primer für Expressionsanalyse	47
Tabelle 20: PCR-Mix zur Erprobung der Primer mit gDNA	48
Tabelle 21: PCR-Mix für die Amplifikation spezifischer cDNA	48
Tabelle 22: Ablauf der PCR-Reaktion	49
Tabelle 23: AP Parameter unbehandelter SCC	84
Tabelle 24: Aktionspotentialparameter von SCC im Vergleich zu atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten von adulten Zebrafischen, Maus und Menschen.	105
Tabelle 25: Aktionspotentialparameter von subendokardialen, submidmyokardialen, subepicardialen und Purkinjen Zellen aufgenommen aus dem linken Ventrikel eines Kaninchenherzens	111
Tabelle 26: Aktionspotentialparameter in frisch isolierten und kultivierten ventrikulären Myozyten aus dem Regenbogenforellenherz	113

X. Danksagung

Ich danke Professor Dr. Charli Kruse vielmals für die Möglichkeit der Dissertation in der Fraunhofer EMB, in der ich an einem interessanten und zukunftsorientierten Forschungsfeld, dem Ausprobieren unterschiedlicher Forschungsaspekte und mit einer hervorragenden technischen Ausstattung in den Laboren arbeiten durfte. Zu großem Dank bin ich ihm außerdem für die vielen Reisemöglichkeiten zu nationalen und internationalen Konferenzen verpflichtet, bei denen ich meinen fachlichen Horizont erweitern sowie interessante Themen erörtern und diskutieren konnte.

PD. Dr. M. Klinger danke vielmals ich für die Übernahme und das Interesse am Zweitgutachten, die Anfertigung der EM-Bilder und die zahlreichen anregenden Gespräche.

Meiner Arbeitsgruppenleiterin Dr. Marina Gebert gebührt Dank für die Einführung in die Welt der PCR und die Hilfestellungen in unterschiedlichsten Belangen. Mit Engagement und guten Verbesserungsvorschlägen stand sie mir beim Korrekturlesen der Arbeit hilfreich und geduldig zur Seite.

Mein Dank gilt auch der Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei in Born und der Fischzucht Reese in Sarlhusen für die Lieferung der Regenbogenforelleneier. Der Euroimmun AG danke ich für die Anfertigung der BioChips Mosaics. Ebenfalls bedanke ich mich bei Jan Wenzel für die intrazellulären Messungen, Dr. Jessica Oder für die „kardialen Gespräche“ und vor allem Dr. Phillip Ciba für die Einführung in die Welt der Zellen und der ichthyologischen Zellbiologie. Weiterhin möchte ich Carolin Wienke für die Hilfe bei der konfokalen Mikroskopie danken.

Ferner danke ich meiner jetzigen und ehemaligen Bürogemeinschaft und allen anderen Mitarbeitern des EMB für die vielen fachlichen und auch persönlichen Gespräche.

Mein letzter persönlicher Dank richtet sich an meine Eltern, meine Schwester Silke und meinen Freund Karsten, die mich in der langen Phase der Doktorarbeit unterstützt haben und die keine Mühen scheuten sich in dem fachfremden Terrain durch die Seiten zu wälzen.