Aus der
Fraunhofer Einrichtung für Marine Biotechnologie
Vertreten in der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät durch
Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse, Standortleiter des Fraunhofer EMB

Einfluss der Kryokonservierung auf die strukturelle Integrität und die Elektrophysiologie von Herzdünnschnitten. Ein innovatives Testsystem für Herzmedikamente.

Inauguraldissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Sektion Naturwissenschaften

Vorgelegt von
Stephanie Andrea Kuhn
aus Landau in der Pfalz

Hundsmühlen 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Charli Kruse

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Norbert Guldner

Tag der mündlichen Prüfung: 09.05.2014

Zum Druck genehmigt. Hundsmühlen, den 13.05.2014

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung 1
1. Abstract 3
2. Einleitung 5
2.1 Das Herz 5
2.1.1 Die Herzmuskelzelle 6
2.1.2 Elektrophysiologie des Herzens 6
2.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen 13
2.2.1 Behandlungsmöglichkeiten der betroffenen Gewebepartien im Herzmuskel 14
2.3 Medikamentenentwicklung 15
2.4 Testsysteme 17
2.4.1 Embryonale Stammzellen als Testsysteme 18
2.4.2 Testsysteme aus induzierten pluripotenten Stammzellen 19
2.4.3 Organotypische Testsysteme 20
2.4.4 Testsystemanwendungen 22
2.5 Kryokonservierung 24
2.5.1 Kryoschäden 25
2.5.2 Kryoprotektiva 27
2.5.3 Einfriergeschwindigkeit 29
2.5.4 Momentaner Stand der Kryokonservierung 29
2.6 Ziel der Arbeit 30
3. Material und Methoden 32
3.1 Material 32
3.1.1 Verbrauchsmittel 32
3.1.2 Chemikalien 33
3.1.3 Medien 34
3.1.4 Lösungen & Puffer 34
3.1.5 Primer 36
3.1.6 Kits 36
3.1.7 Geräte 37
3.1.8 Software 38
3.2 Methoden 38
3.2.1 Gewebe 38
3.2.2 Gewebekultur 39

3.2.3 Kryokonservierung ... 43
3.2.4 Histologie ... 45
3.2.5 Immunzytochemie ... 47
3.2.6 Lebend-/ Tod- Analyse ... 49
3.2.7 Mikroskopische Aufnahmen ... 52
3.2.8 Molekularbiologische Analysen ... 53
3.2.9 Quantitative Real-time PCR ... 58
3.2.10 Elektrophysiologische Messungen ... 60
4. Ergebnisse ... 62
4.1 Etablierung und Kultivierung organotypischer Gewebeschnitte vor und nach dem Einfrier- und Auftauvorgang ... 62
4.2 Vitalitätstests ... 63
4.2.1 Far- Red- /SYTO 9- Färbung ... 63
4.2.2 MTT-Assay ... 65
4.2.3 JC-1- Färbung ... 69
4.3 Untersuchungen der Morphologie und Ultrastruktur ... 76
4.3.1 HE-Übersichtsfärbung ... 76
4.3.2 Immunzytochemie ... 82
4.3.3 Transmissionselektronenmikroskopie ... 102
4.4 Untersuchung der herzspezifischen Genexpression ... 106
4.4.1 Quantitative Real Time PCR ... 106
4.4.2 Kapillargelelektrophorese ... 113
4.5 Elektrophysiologische Untersuchungen ... 115
4.5.1 Mikroelektroden-Array (MEA) ... 116
4.5.2 Elektrophysiologische Messungen mittels scharfer Elektrode ... 117
5. Diskussion ... 119
5.1 Untersuchung der Vitalität in Herzgewebeschnitten und -streifen ... 119
5.2 Strukturelle Schädigung durch Kryokonservierung ... 124
5.3 Genexpression spezieller Herzmarker ... 129
5.4 Elektrophysiologische Veränderungen der Gewebeschnitte und -streifen ... 134
5.5 Fazit & Ausblick ... 137
6. Referenzen ... 139
7. Anhang ... 151
7.1 Abbildungsverzeichnis ... 151
7.2 Tabellenverzeichnis ... 153
7.3 Abkürzungsverzeichnis ... 154

7.4 JC-1 Vorversuche mit pankreatischen Rattenzellen 156
7.5 Eidesstattliche Versicherung 157
7.6 Danksagungen 158
8. Sonstiges 159
8.1 Lebenslauf 159
8.2 Wissenschaftliche Publikationen 159

1. Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit. Dementsprechend ist die Entwicklung neuer Herzmedikamente sehr wichtig. In der Forschung wird in den ersten Testphasen fast ausschließlich auf tierische Testsysteme zurückgegriffen, bevorzugt auf rodente Systeme. Dies hat den Nachteil, dass die Wirkung der zu testenden Medikamente nicht ohne weiteres auf den humanen Organismus übertragen werden kann. Die gewonnenen Ergebnisse der tierischen Testsysteme, müssen daher in weiteren langwierigen Versuchsreihen am Menschen evaluiert werden. Um die ersten Testphasen zu verkürzen und daraus resultierende Rückschläge in der Medikamentenforschung zu verringern, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Eignung kryokonservierter Dünnschnitte aus Herzgewebe als Testsystem untersucht.

Nach Etablierung der Methode zur Herstellung der Herzdünnschnitte sowie der Kryoprotokolle erfolgte die Verifizierung der Nutzbarkeit kryokonservierter Dünnschnitte als Testsystem mittels Far-Red-Färbung, MTT-Test und JC-1-Färbung. Die Ergebnisse zeigten, dass das Einfriermedium keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen im Muskelgewebe nimmt. Der MTT-Test sowie die JC-1-Färbung machten jedoch deutlich, dass sich nach der Kryokonservierung der Anteil der vitalen Mitochondrien verringerte. Die gestörte Zellatmung im Muskelsynzytium könnte zu einer Unterversorgung der kryokonservierten Schnitte führen. In weiteren Versuchen wurde die strukturelle Intaktheit der gesamten Schnitte untersucht. Mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), transmissionselektronenmikroskopischer (TEM) Aufnahmen sowie der Fluoreszenzfärbung mit den Antikörpern Myosin & alpha-Aktinin konnten die kontraktilen Strukturen in den Schnitten gut nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass die kryokonservierten Schnitte im Vergleich zu den akuten Schnitten eine substantielle Deformation des kontraktilen Apparates erfuhren. Die Ionenkanalverbindungen wurden über die Visualisierung von Connexin 43 & N-Cadherin untersucht. Der Vergleich zwischen kryokonservierten Schnitten und nicht eingefrorenen Schnitten zeigte nur geringfügige Unterschiede in der Expression. Die Zellen in den Herzdünnschnitten stehen also untereinander auch nach der Kryokonservierung noch über die Ionenkanäle in Verbindung, die kontraktile Einheit wird jedoch durch die Kryokonservierung stark geschädigt. Die Untersuchung auf mRNA-Ebene mittels Real-Time-PCR sollte zeigen, wie sich die Expression herzspezifischer Gene (Connexin 43, Na^+-K^+-ATPase und Na^+-Ca^{2+}-Austauschers) während der Kultur und nach der Kryokonservierung verändert. Es konnten in den Versuchen starke Veränderungen der relativen Expressionslevel aller drei Gene gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen versuchen, ihre ursprüngliche Funktion wieder zu erlangen. Schließlich wurde mit elektrophysiologischen

Untersuchungen der Schnitte mittels Multielektroden Array (MEA) untersucht, wie stark sich die Reizweiterleitung in den Schnitten vor und nach der Kryokonservierung verändert. Während die nicht eingefrorenen Schnitte gute Reizantworten zeigten, konnte in den kryokonservierten Schnitten keine Reizweiterleitung detektiert werden.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass es prinzipiell möglich ist Herzdünnschnitte vital zu kryokonservieren und wieder aufzutauen. Zur Verwendung als Testsystem für neue Medikamente müssen jedoch die kontraktilen Bereiche der Dünnschnitte noch besser vor Zerstörung durch die Kryokonservierung geschützt werden.

"Influence of cryopreservation on structural integrity and electrophysiology in thin heart slices. An innovative test system for new heart medication"

1. Abstract

Cardiovascular diseases are the most common cause of death worldwide. Therefore, the development of new heart medication is very important. Today, animal test systems, in particular rodents, are used almost exclusively in the first test phases. This method has the disadvantage that the results of drug testing cannot be transferred to the human organism. The obtained results from animal test systems need to be re-evaluated in time consuming series of experiments on humans. To shorten the initial test phase at animal tissue and to reduce setbacks in drug discovery this work investigates the suitability of cryopreserved heart slices as test systems.

After establishing production methods and cryoprotocols for thin heart slices of both human and rodent origin, their usability as test systems was determined. The investigation included Far-Red-staining, MTT-test and JC-1-staining. The results showed that the cryomedium itself had no adverse effect on the heart tissue. However, both the MTT-test and the JC-1-staining showed a decrease of viable mitochondria after cryopreservation. This means that the respiration of the cells in the muscle syncytium decreases and the cryopreserved cells might be underserved. In further experiments, the structural integrity of the slices was examined. Using hematoxylin-eosin-staining, transmission electron microscopy and fluorescence staining with the antibodies alpha-actinin and myosin, the contractile structures were detected in slices. However, cryopreserved slices showed substantial deformation of the contractile apparatus. The ion channel structures were investigated trough immunostaining with Connexin 43 and N-cadherin antibodies. The comparison between cryopreserved sections and non-frozen sections showed only minor differences. Therefore, it should be possible for the cells to communicate with each other even after cryopreservation. However, the contractile unit is greatly damaged by the cryopreservation. Further, the investigation at mRNA-level using real-time-PCR revealed that the expression of cardiac specific genes (Connexin 43, Na^+-K^+-ATPase and Na^+-Ca^{2+}-exchanger) changed during culture and after cryopreservation. The relative expression level of all three genes displayed strong changes during the experiment. This suggests that the cells attempt to re-establish the original heart functionality. Finally, electrophysiological tests of the slices were carried out with a multi-electrode array, before and after cryopreservation. The non-frozen sections showed good responses to stimulation, proving that acute thin heart slices can indeed be used as test systems for drug discovery. However, the electrical stimulus could not be transmitted within the cryopreserved slices.

The obtained results show that it is possible to cryopreserve and thaw vital thin heart slices. However, for novel drug test systems, the contractile apparatus of the slices needs to be better protected from cryodamage.

2. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, ob und wie dünne Schnitte aus funktional intaktem Herzgewebe eingefroren und, unter Beibehalt der Funktionalität, wieder aufgetaut werden können. Dadurch würden die Dünnschnitte lager- und verschickbar gemacht werden. Dies wiederum erlaubte ihren umfassenden Einsatz als Testsystem in der Medikamentenentwicklung. In der folgenden Einleitung wird kurz auf die relevanten Themenbereiche Herz/Herzkrankheiten, Pharma-Testsysteme und Kryokonservierung eingegangen.

2.1 Das Herz

Das Herz (Abbildung 1) hat die Aufgabe, das mit Sauerstoff angereicherte Blut durch den gesamten Organismus zu pumpen und so die anderen Organe zu versorgen. Es besteht aus vier Kammern: dem linken und rechten Vorhof sowie dem linken und rechten Ventrikel.

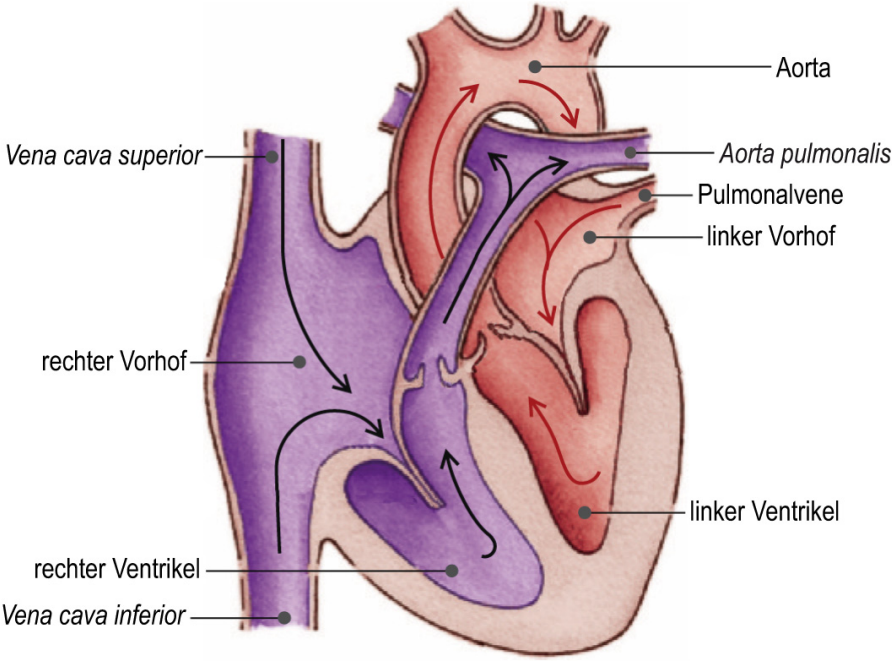

Abbildung 1| Blutfluss im Herzen. Das Herz besteht aus vier Kammern: dem rechten und linken Vorhof sowie dem rechten und linken Ventrikel. Das sauerstoffarme Blut gelangt über die *Vena cava superior* und die *Vena cava inferior* in die rechte Herzhälfte, von wo aus es über die *Aorta pulmonalis* vom venösen Kreislauf in den Lungenkreislauf geleitet wird. Dort wird es mit Sauerstoff angereichert und gelangt über die *Pulmonalvene* in die linke Herzhälfte. Von der linken Herzhälfte aus gelangt es über die *Aorta* wieder in den Körperkreislauf. Abbildung nach Schrader et al. (2010)

Die rechte Herzhälfte befördert das Blut aus der *Vena Cava inferior* und *superior* über die *Aorta pulmonalis* vom venösen Kreislauf in den Lungenkreislauf, wo es mit Sauerstoff versorgt wird. Über

die Pulmonalvene gelangt dieses Blut in die linke Herzhälfte, welche für die Verteilung des Blutes über die Aorta in den Körperkreislauf verantwortlich ist (Schrader und Kelm, 2005).

2.1.1 Die Herzmuskelzelle

Der Herzmuskel ist in seiner Struktur dem Skelettmuskel sehr ähnlich, in seiner Funktionalität kommt er allerdings der glatten Muskulatur sehr nahe. Aufgrund der abwechselnden Anordnung von Sarkomeren und Myofibrillen erscheint die Herzmuskulatur gestreift, weswegen sie als quer gestreifte Muskulatur bezeichnet wird. Die einzelnen Herzmuskelzellen sind einkernig, bilden parallel angeordnete Ketten und stehen mittels *Gap Junctions* und der *Zonula adhaerens* in den Glanzstreifen miteinander in Verbindung. Diese Zelladhäsion spielt in der Architektur des Herzmuskelgewebes eine wichtige Rolle, da so die mechanische und elektrische Kopplung zwischen den einzelnen Herzzellen gewährleistet ist. *Gap Junctions* bilden die elektrische Verbindung zwischen den Zellen, was auch als funktionelles Synzytium bezeichnet wird. Hierüber erfolgt die Synchronisation der elektrischen Signale für die Kontraktion des Herzmuskelgewebes. Die Aktionspotenziale (AP) können sich mit Hilfe dieser Verbindungen schnell von Zelle zu Zelle ausbreiten. In der *Zonula adhaerens* werden die einzelnen Aktinfilamente benachbarter Zellen miteinander verbunden und ermöglichen die Übertragung der kontraktilen Kräfte. Durch das Zusammenspiel dieser beiden Mechanismen ist es möglich, dass die Herzmuskelzellen koordiniert kontrahieren und somit das Herz die benötigte Pumpleistung erbringen kann. Die Länge einer Herzmuskelzelle beträgt etwa 100 µm, der Durchmesser liegt bei etwa 15 µm. (Brenner, 2005)

2.1.2 Elektrophysiologie des Herzens

Die Kontraktionen des Herzens werden durch AP, die von Schrittmacherzellen im Sinusknoten (*Nodus sinuatrialis*) des Herzens ausgehen, hervorgerufen (Abbildung 2). Der Sinusknoten liegt am Übergang der oberen Hohlvene (*Vena cava superior*) in den rechten Vorhof (Atrium). Die AP laufen vom Sinusknoten über den Atrioventrikular-Knoten (AV-Knoten), die His-Bündel und die Purkinjefasern bis ins Ventrikelmyokard und erregen so sämtliche Herzmuskelzellen (Abbildung 2). Aufgrund dieser Tatsache spricht man auch von einer motorischen Einheit. Die Erregungsausbreitung dauert insgesamt 210 ms, wobei das AP vom Sinusknoten zum AV-Knoten ca. 130 ms benötigt. Die Weiterleitung über die His-Bündel und Purkinjefasern zum Ventrikelmyokard ist mit ca. 80 ms etwas schneller als im Vorhofgewebe. Diese Verzögerung führt dazu, dass die Vorhöfe und Ventrikel kurz nacheinander kontrahieren. (Hick und Hick, 2009; Schrader und Kelm, 2005)

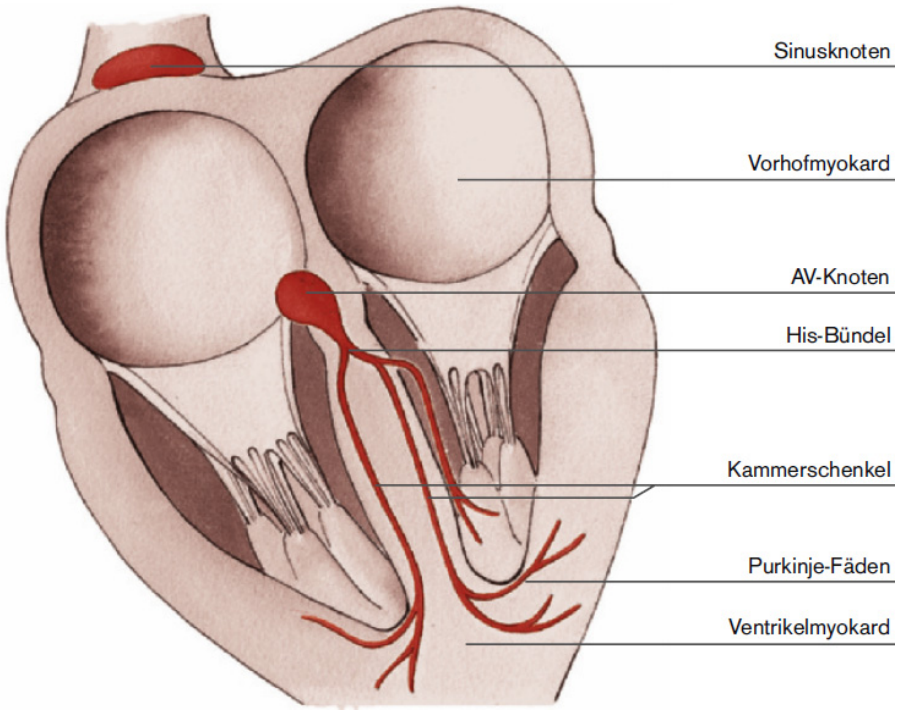

Abbildung 2| Erregungsleitung im Herzen. Die Aktionspotenziale im Herzen werden von den Schrittmacherzellen im Sinusknoten, welcher am Übergang der *Vena cava superior* und dem rechten Vorhof liegt, hervorgerufen. Von hier aus breitet sich der elektrische Reiz über drei Leitungsbahnen über das Vorhofmyokard zum Atrioventrikular-Knoten (AV-Knoten) aus. Die elektrische Stimulierung gelangt dann in die His-Bündel und von hier aus über die Kammerschenkel zu den Purkinje-Fäden in das Ventrikelmyokard. Abbildung nach Schrader et al. (2010)

2.1.2.1 Herzaktionspotenzial

Die Kontraktion des Herzens geht vom Sinusknoten aus, der als Schrittmacher dient. Der Sinusknoten hat ein instabiles Ruhemembranpotenzial (RMP) und löst in regelmäßigen Abständen ein AP aus, das etwa 300 ms lang ist. Dieses AP wird über die unter 2.1.1 genannten Stationen wie den AV-Knoten, die His-Bündel und die Purkinjefasern bis in die Ventrikel weiter geleitet. Die Kontraktion selbst wird über die Ca^{2+}-Konzentration im Sarkoplasma kontrolliert. Je höher die Ca^{2+}-Konzentration, desto stärker ist die Kraft des Herzmuskels (Schrader und Kelm, 2005).

Während der Diastole, der Entspannungs- und Füllungsphase des Herzens mit Blut, liegt bei den Herzmuskelzellen ein RMP vor. Dies beträgt beim Menschen etwa -85 mV (Schrader und Kelm, 2005) und bei der Ratte ca. -80 mV (Padmala und Demir, 2003). Ein AP kommt dann zustande, wenn die Herzmuskelzelle durch einen elektrischen Impuls vom Sinusknoten auf -65 mV depolarisiert wird (Abbildung 3). Wird dieses Schwellenpotenzial erreicht, öffnen sich zuerst die spannungsabhängigen Na^{+}-Kanäle (Abbildung 3 a, b) und es kommt zum vermehrten Einstrom von

Na^+ in das Zytosol der Herzmuskelzelle. Dies bewirkt eine schnelle Phase der Depolarisation auf bis zu +40 mV. Der kurze, 12 ms dauernde, Einstrom an Na^+-Ionen wird durch das Potenzialgefälle der Na^+-Konzentration zwischen Extrazellularraum (EZR, 145 mmol/l) und Zytosol (12 mmol/l) der Zelle hervorgerufen. Danach schließen sich die Na^+-Kanäle und öffnen sich erst wieder, wenn das Membranpotenzial auf mindestens -50 mV repolarisiert ist (Schrader und Kelm, 2005). Der schnelle Einstrom von Na^+-Ionen führt zur Öffnung spannungsabhängiger Rezeptoren in der Membran der T-Tubuli (Abbildung 4). Aufgrund dessen kann Ca^{2+} aus den T-Tubuli in die Zelle einströmen. Im weiteren Verlauf wird der Ryanodin-Rezeptor in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR; Abbildung 4) aktiviert und es kommt hier ebenfalls zu einem Einstrom von Ca^{2+} aus den L-Tubuli. Durch diesen lang anhaltenden und langsamen Ca^{2+}-Einstrom (Abbildung 3 a, b) kommt es zu einer Plateauphase, in der das Membranpotenzial bei ca. 0 mV liegt.

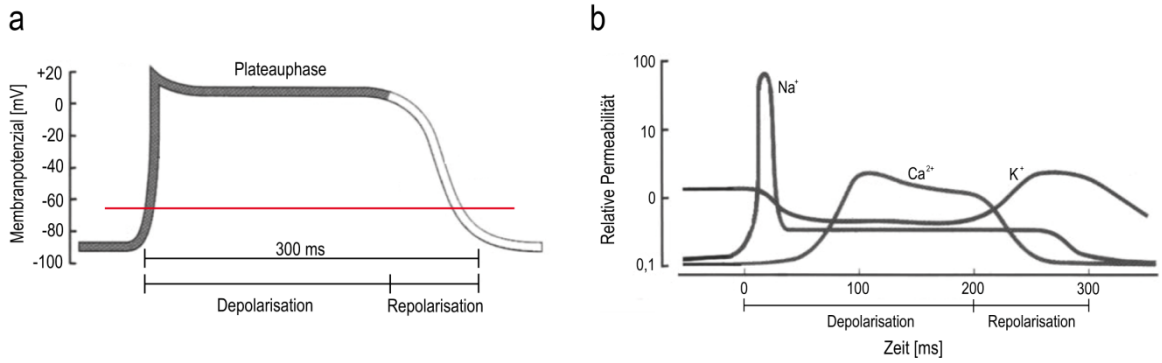

Abbildung 3| Ionenströme während des Aktionspotenzials. (a) Wird eine Herzmuskelzelle elektrisch stimuliert, kommt es bei Überschreitung des Schwellenwertes (rote Linie) zur Ausbildung eines Aktionspotenzials (AP). Das AP hat eine Dauer von etwa 300 ms. (b) Während der Depolarisation kommt es erst kurzzeitig zu einem enormen Einstrom an Na^+-Ionen, worauf die Plateauphase und der langsame Einstrom an Ca^{2+}-Ionen folgen. Dieser Vorgang dauert etwa 200 ms, bevor es zu einem vermehrten K^+-Ionen-Ausstrom kommt. Der Ausstrom an K^+-Ionen bewirkt eine schnelle Repolarisation auf -85 mV und damit die Wiedererregbarkeit der Herzmuskelzelle. Abbildung nach Iaizzo (2005)

Nach etwa 200-300 ms kommt es zur Repolarisation über die Kaliumkanäle, die spannungsabhängig sind und verzögert aktiviert werden. Der repolarisierende Ausstrom an K^+-Ionen erfolgt über einen Konzentrationsgradienten, da im Zytosol 150 mmol/l K^+-Ionen und im EZR lediglich 4 mmol/l vorliegen. Dies geschieht so lange, bis sich ein K^+-Gleichgewicht eingestellt hat und das Ruhemembranpotenzial von -85 mV wieder erreicht ist. Damit entspricht das RMP in Herzmuskelzellen nahezu dem K^+-Gleichgewichtspotenzial. Danach ist die Herzmuskelzelle für eine erneute Stimulation bereit. Die sarkoplasmatische Ca^{2+}-Konzentration, die während der Plateauphase stark verändert wurde, wird über verschiedene Mechanismen wieder in den Ausgangszustand gebracht. Die Ca^{2+}-ATPase im Sarkolemm sowie in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums und der

Na^+-Ca^{2+}-Austauscher sorgen für den Austausch der Ca^{2+}-Ionen (Schrader und Kelm, 2005). Die Muskelzelle ist vor dem Erreichen eines Membranpotenzials von mindestens – 50 mV nicht erregbar. Man spricht hierbei von der sogenannten Refraktärzeit, der Herzmuskel ist in dieser Zeit nicht stimulierbar, sprich nicht tetanisierbar.

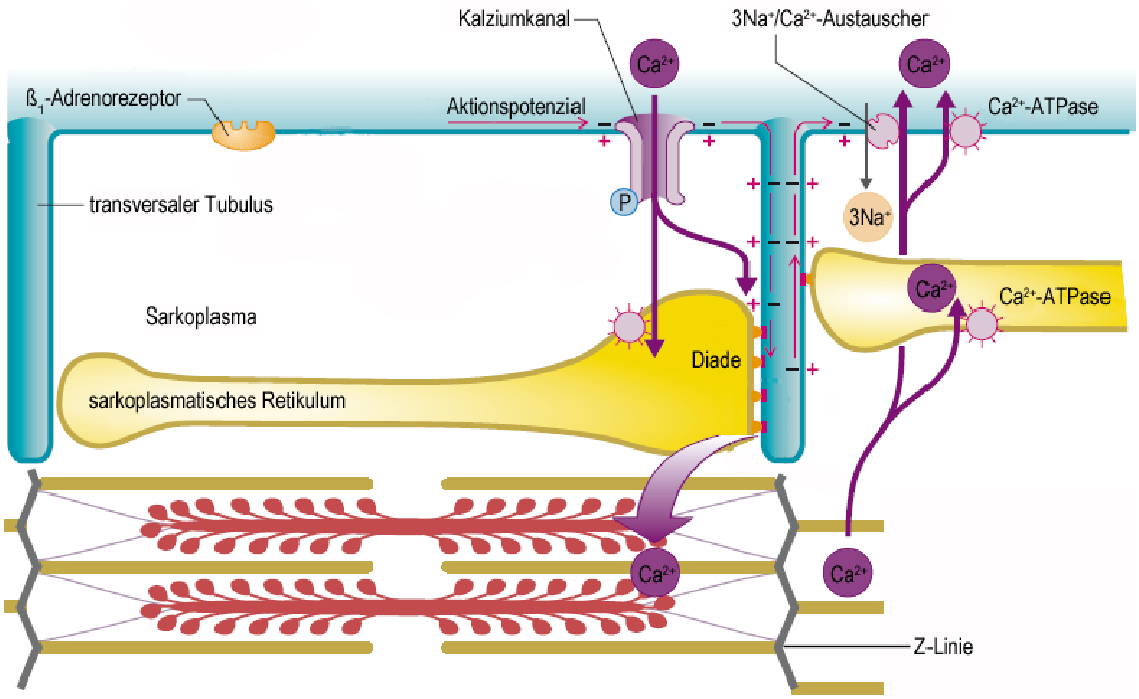

Abbildung 4| Elektromechanische Kopplung in der Muskelzelle. Das sich über den Herzmuskel ausbreitende Aktionspotenzial wird über die transversalen Tubuli (T-Tubuli) in die Muskelzelle geleitet und kann so eine noch bessere Kontraktion in den einzelnen Muskelzellen auslösen. Die T-Tubuli befinden sich in Höhe der Z-Linien im Muskelsynsyzium und stehen über spezielle Rezeptoren mit dem sarkoplasmatischen Retikulum in Verbindung. Diese Verbindungen werden auch Diaden genannt. Die Ca^{2+}-Versorgung für die Kontraktion sowie der Austausch des Natriums erfolgt über Kalziumkanäle, Ca^{2+}-ATPasen sowie den Na^+/Ca^{2+}-Austauscher. Abbildung verändert nach Schrader und Kelm (2005)

Unter einem Tetanus versteht man das Muskelzittern wie es im Skelettmuskel möglich ist, um die Kraft des Muskels zu erhöhen. Kommt es im Herzmuskel doch zu einer Tetanisierung, dann spricht man von Kammerflimmern, was im schlimmsten Fall mit einem Herzstillstand einhergehen kann (Schrader und Kelm, 2005; Hick und Hick, 2009).

2.1.2.2 Elektromechanische Kopplung

Die elektrische Stimulation wird durch eine Veränderung der Ionenkonzentrationen an der Zelle hervorgerufen; die Kontraktion hingegen erfolgt über eine Konformationsänderung des kontraktilen Apparates jeder Zelle. Es muss also die elektrische in eine mechanische Veränderung umgewandelt werden. Dieses Zusammenspiel wird auch elektromechanische Kopplung genannt (Abbildung 4).

Eine wichtige Rolle spielt hier die Ca^{2+}-Konzentration. Je nachdem, wie hoch die Ca^{2+}-Konzentration im Zytosol ist, fällt oder steigt die Aktivierbarkeit des kontraktilen Apparates. Ist kein bzw. kaum Ca^{2+} vorhanden, kommt es zwar zur Ausbildung eines Aktionspotenzials aber die Kontraktion bleibt aus. Das bedeutet, dass eine elektromechanische Entkopplung vorliegt. Der Herzmuskel ist also bei jeder Kontraktion auf das aus dem EZR einströmende Ca^{2+} angewiesen. Zudem wird, durch die Beladung des intrazellulären Ca^{2+}-Speichers, die Kontraktionskraft des Herzmuskels bestimmt. Sobald die zytosolische Ca^{2+}-Konzentration absinkt, beginnt der Herzmuskel zu relaxieren, was in einem Herzstillstand resultieren kann, wenn die Ca^{2+}-Konzentration zu stark absinkt (Schrader und Kelm, 2005).

2.1.2.3 Kontraktiler Apparat

Der kontraktile Apparat einer Herzmuskelzelle besteht aus Myofibrillen, die sich ihrerseits aus vielen ca. 2 µm langen Sarkomeren (Abbildung 5) zusammensetzen. Sarkomere bilden die kleinsten Einheiten des kontraktilen Apparates. Sobald ein Aktionspotenzial die Zellmembran der Muskelzelle erreicht, kommt es als Reaktion darauf zu einer Kontraktion der Muskelzelle. Dabei verkürzen sich die Myofilamente gegeneinander und es kommt zu einer Verringerung der Sarkomerlänge. Dies wiederum führt zu einer Verkürzung der Myofibrillen, der Muskelfasern sowie der Muskelbündel und schließlich zur Kontraktion des gesamten Muskels.

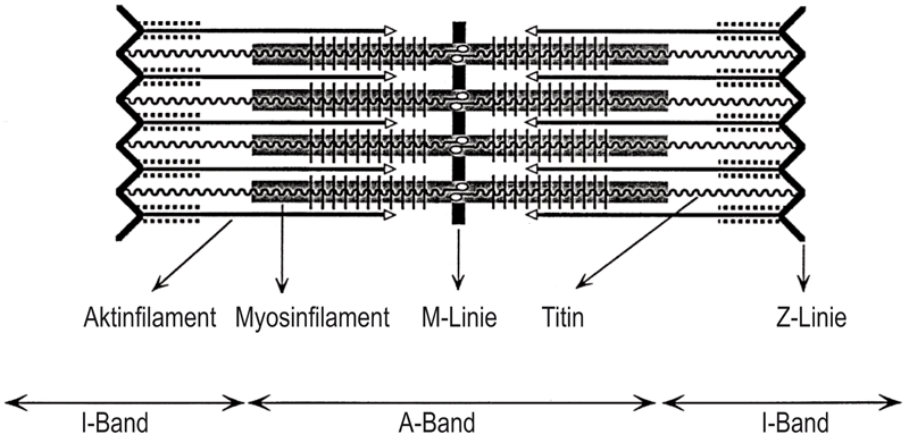

Abbildung 5| Aufbau eines Sarkomers. Das Sarkomer bildet die kleinste Einheit des kontraktilen Apparates. Das Sarkomer besteht aus Aktin- und Myosinfilamenten, die sich während der Kontraktion gegeneinander verschieben und zu einer Verkürzung des Muskels führen. Die Myosinfilamente sind über Titinfilamente an den Z-Linien verankert und bilden zusammen das A- Band. Die M- Linie befindet sich in der Mitte des Sarkomers, an ihr sind die Myosinfilamente über Strukturproteine verankert. Das I- Band ist der Bereich des Sarkomers, an dem das Titin befestigt ist, welches die Myosinfilamente an den Z-Linien verankert. Abbildung nach Schaub et al. (1998)

Zentrale Elemente der Kontraktion sind die Myofilamente Myosin- und Aktinfilamente (Brenner, 2005). Ein Myosinfilament setzt sich aus Myosinmolekülen zusammen, die jeweils aus einer Schwanz-, Hals- und einer Kopfdomäne bestehen. Der Schwanzteil verdreht sich mit denen anderer Myosinmoleküle zu einem Myosinfilament. Die Kopfdomäne unterteilt sich nochmals in die katalytische Domäne (S1), an der es während der Kontraktion zur Bindung mit den Aktinfilamenten kommt sowie den Leichte-Ketten-Domänen, die für die Hebelbewegung während der Kontraktion verantwortlich sind. Diese Verbindung von Myosinköpfen und Aktinfilament wird auch „Querbrücke" genannt. Die Aktinfilamente setzen sich aus dem sogenannten f-Aktin sowie den Regulatorproteinen Tropomyosin und dem Troponinkomplex zusammen. Diese Regulatorproteine sind in regelmäßigen Abständen in den Längsrillen des f-Aktin angelagert (Schrader und Kelm, 2005).

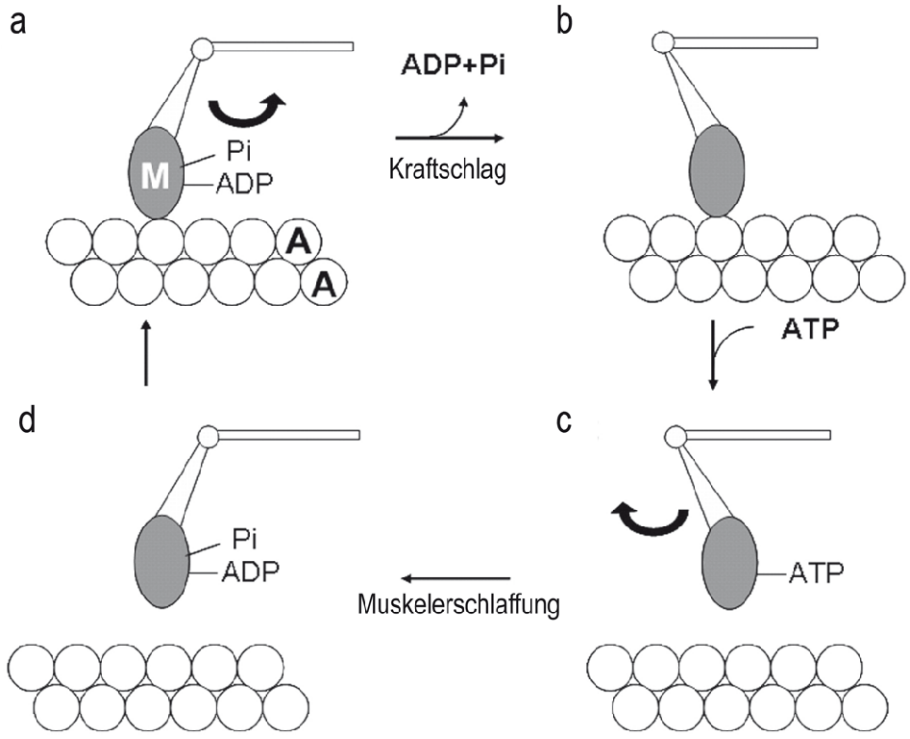

Abbildung 6| Schematische Darstellung des Querbrückenzyklus. Der sogenannte Kraftschlag, der zur Kontraktion der Muskulatur führt, hat seinen Ursprung in der Verbindung zwischen dem Aktinfilament (A) und dem Myosinkopf (M) des Myosinfilaments. Der Myosinkopf ist über ADP und Phosphat (P_i) mit dem Aktinfilament verbunden (a). Durch den Kraftschlag wird das ADP + P_i freigesetzt (a nach b). Nach Ende des Kraftschlages bleibt eine schwache Verbindung zwischen Aktinfilament und Myosinkopf vorhanden (b). Diese Verbindung löst sich wieder, sobald ATP an den Myosinkopf gebunden hat (b nach c). Das darauffolgende Rückklappen des Myosinkopfes erfolgt bei Spaltung von ATP in ADP + P_i (c nach d). In Folge dessen kann der Myosinkopf wieder am Aktinfilament binden und der Muskel kann erneut kontrahieren (d nach a). M: Myosinkopfdomäne, A: Aktinfilament. Abbildung nach Sugi et al. (2008)

Der Troponinkomplex besteht aus drei Untereinheiten, die während der verschiedenen Phasen der Kontraktion ihre Konformation ändern und das Myosinmolekül bewegen. Zu den Untereinheiten

zählen Troponin C, Troponin T sowie Troponin I. Die Wechselwirkung zwischen Aktin und Myosinfilamenten wird Querbrückenzyklus genannt (Abbildung 6), der im Wesentlichen folgende Schritte beinhaltet: Zunächst bindet ATP an den Myosinkopf und löst dadurch die Bindung zwischen Myosinkopf und Aktinfilament. Darauf folgend kommt es zur Spaltung des ATP in ADP, was zu einer Strukturumlagerung und zum Umklappen des Myosinkopfes führt. Dadurch wird die katalytische Domäne in Richtung eines anderen Aktinmoleküls verschoben. Hier kommt es wiederum zu einer Bindung zwischen Aktin und Myosinkopf, die durch eine wiederholte Strukturveränderung des Myosins hochaffin wird. Im 5. Schritt des Querbrückenzyklus kommt es zu einer Umorientierung des Hebelarms des Myosinkopfes, wodurch die Aktin- und Myosinfilamente gegeneinander verschoben werden. Dieser Schritt stellt die eigentliche Kontraktion des Muskels dar (Brenner, 2005).
Die Kontraktion wird durch Ca^{2+}, das durch spannungsabhängige Kanäle während eines AP's aus dem EZR in die Zelle einströmt, hervorgerufen. Dort bindet es an Troponin C und durch verschiedenen Konformationsänderungen wird die Bindung zwischen Myosin und Aktinfilament freigegeben. Durch diesen Schritt kommt es dann zum Ablauf des Querbrückenzyklus.

2.1.2.4 Mitochondrien

Die Mitochondrien sind für Zellen enorm wichtig, da in diesen Organellen die ATP-Synthese stattfindet, die einen großen Teil der Energieversorgung der Zelle ausmacht. Umgangssprachlich werden sie daher auch „Zellkraftwerke" genannt. Sie sind von einer doppelten Membran umhüllt und vermehren sich durch Teilung. Da die Mitochondrien aufgrund ihrer evolutionären Herkunft über eine geringe Menge an eigener DNA verfügen, sind sie auch in der Lage einige Proteine, die sie für die ATP-Synthese benötigen, selbst herzustellen. Je nach Energiebedarf einer Zelle variiert die Zahl der Mitochondrien. So beträgt der Volumenanteil der Mitochondrien in einer Herzmuskelzelle etwa 36 % (Schrader und Kelm, 2005). In Größe und Form zeigen sie ebenfalls große Unterschiede. Sie können von 0,1 bis zu mehreren mm lang sein und sowohl rund, lang gestreckt oder sogar verzweigt vorliegen (Plattner und Hentschel, 2006). Die äußere und die innere Membran sind durch den perimitochondrialen Spalt voneinander getrennt und haben nur an einigen Stellen Kontakt zueinander.
Ionen und Moleküle mit einem Gewicht von bis zu 5000 Dalton können die äußere Mitochondrienmembran noch durchdringen, für Proteine ist diese nicht durchlässig (Alberts, 2002). Die Innenmembran ist hingegen impermeabel. Hier geschieht der Transport über spezielle Transportproteine, die in der Membran sitzen. Der Austausch von ADP und ATP erfolgt über Antiporter aus dem perimitochondrialen Spalt in die Mitochondrienmatrix. Die Synthese von ATP erfolgt an der

ATP-Synthase. Diese Moleküle durch spannen die Membran der Cristae mit ihrem stielartigen Teil und ragen mit einem darauf sitzenden kugeligen Teil in die Matrix vor. Die Mitochondrien in Herzmuskelzellen sind daher nicht nur in einer Vielzahl vorhanden, sondern auch die innere Membran weist sehr viele Cristae auf. Dies hat den Hintergrund, dass die Herzmuskelzellen sehr hohe Energieanforderungen aufgrund ihrer periodischen Kontraktionen haben. Sie benötigen also viel ATP. Wird die Zellatmung durch Einwirkungen von außen gehemmt, so ist keine ATP-Synthese mehr möglich und es kommt zum Zelltod, da innerhalb einer Minute das ATP in der Zelle verbraucht ist. Die Untersuchung der mitochondrialen Aktivität ist also eine gute Möglichkeit, die Vitalität einer Zelle zu untersuchen. (Plattner und Hentschel, 2006)

Neben der Zellatmung sind die Mitochondrien auch ein wesentliches Element der Apoptose, also des kontrollierten Zelltodes. Aus diesem Grund können verschiedene Untersuchungen des Membranpotenzials der Mitochondrienmembran ebenfalls Aufschluss darüber geben, in welchem Zustand sich die Zelle befindet. Während des Stoffwechsels des Mitochondriums kommt es in der Mitochondrienmembran zu einer Reihe von Redoxreaktionen, an deren Ende die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP steht. Damit die ATP-Synthase an der Innenmembran des Mitochondriums vonstattengehen kann, muss ein Protonengradient vorhanden sein. Dieser entsteht durch Protonen, die während des kontinuierlichen Elektronentransfers über die Mitochondrienmembran gepumpt werden. Es entsteht also ein Membranpotenzial, welches in dieser Arbeit zur Untersuchung der mitochondrialen Aktivität herangezogen wurde. Kommt es zu einem Abfall dieses Potenzials, z. B. durch eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran, kann dies einen entscheidenden Schritt bei der Einleitung der Apoptose darstellen. Dennoch muss bei der Untersuchung der Mitochondrienmembran bedacht werden, dass nicht alle Mitochondrien polarisierte Membranen haben, sondern auch in depolarisiertem Zustand vorliegen können.

2.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind laut WHO in der westlichen Gesellschaft die häufigste Todesursache (WHO, 2008). Um zwischen den verschiedenen kardialen Krankheitsbildern unterscheiden zu können, werden die Erkrankungen in vier Gruppen eingeteilt. Zu diesen Krankheitsbildern gehören die myokardialen, die endokardialen, die koronaren sowie die rhythmologischen Erkrankungen. Das koronare Krankheitsbild gehört dabei zu den häufigsten Herzerkrankungen und zieht meist auch myokardiale und rhythmologische Veränderungen des Herzens nach sich (Schrader und Kelm, 2005).

2.2.1 Behandlungsmöglichkeiten der betroffenen Gewebepartien im Herzmuskel

2.2.1.1 Herzinfarkt

Der Herzinfarkt, auch Myokardinfarkt genannt, ist oft die Folge eines Gefäßverschlusses. Die darauffolgende Nekrose des durch das verschlossene Gefäß versorgten Gewebes ist umso schwerwiegender, je näher der Verschluss an der Hauptverzweigung des Gefäßes liegt. Das Gewebe kann absterben und es kommt zur Bildung von Narbengewebe, welches die Pumpkraft und so auch die Leistungsfähigkeit des Herzens vermindert. Zur Behandlung des akuten Infarktes werden häufig Catecholamine eingesetzt (Eschenhagen, 2009), da diese die Kontraktilität des Herzens erhöhen. Die Myokardfilamente in der Diastole erschlaffen schneller und so werden die Kontraktion und die Frequenz sowohl verstärkt, als auch beschleunigt (Förstermann, 2009). Im weiteren Verlauf der Behandlung sollte jedoch auf Herzglycoside zurückgegriffen werden, da diese Art von Medikamenten besser verträglich ist.

2.2.1.2 Herzinsuffizienz

Eine Herzinsuffizienz wird definiert als ein Zustand des Herzens, in welchem dieses weder in Ruhe noch unter Belastung in der Lage ist die peripheren Organe mit Blut, d.h. in erster Linie mit Sauerstoff, zu versorgen (Weil und Schunkert, 2006). Diese Herzerkrankung geht meistens mit Bluthochdruck und verstärkter Wassereinlagerung einher. Laut der „Framingham Heart Study“ liegt die Möglichkeit in Folge einer chronischen Hypertonie an einer Herzinsuffizienz zu erkranken bei 49 % (Levy et al., 1996). Die chemischen Veränderungen bei einer Herzinsuffizienz betreffen hauptsächlich den Kalziumein- und Kalziumausstrom während der Kontraktionen des Herzens. Der Kalziumausstrom ist hierbei abgeschwächt und verlängert sich aufgrund dessen. Dies hat zur Folge, dass die Kontraktionskraft geringer wird und dadurch die Versorgung des Organismus mit Blut nicht mehr vollständig gewährleistet ist. Zur Verbesserung der Symptomatik sowie der Herabsetzung des Blutdrucks werden unter anderem Angiotensin Conversion Enzym Hemmer eingesetzt. Diese können bei schweren Verläufen durch β-Adrenorezeptor-Blocker und auch Aldosteron-Antagonisten ersetzt werden. Die Medikation bewirkt eine Abnahme des Bluthochdrucks sowie eine verringerte Einlagerung an Lymphe im Gewebe.

2.2.1.3 Herzrhythmusstörungen

Bei Herzrhythmusstörungen spricht man von einem rhythmologischen Krankheitsbild. Diese Rhythmusstörungen haben ihren Ursprung meist in der Verminderung des RMP in unterschiedlichen Bereichen des Herzmyokards. Allerdings kann eine Herzrhythmusstörung auch durch andere kardiale Erkrankungen, wie koronare Herzerkrankungen, Herzinfarkt oder Kardiomyopathie, hervorgerufen werden (Lemmer und Brune, 2010).

Liegt eine Rhythmusstörung aufgrund verringerten Membranpotenzials vor, kann dies eine Folge akuter Minderdurchblutung (Ischämie) des betroffenen Bereiches sein (Pieper, 2007). Medikamentöse Behandlungen sind bei diesem Krankheitsbild ebenso möglich, wie die Implantationen von Elektrostimulatoren. Eingesetzte Medikamente sind hier unter anderem Antiarrhythmika, wie z. B. Chinidin oder auch Lidocain, die je nach Erkrankungsbild und Wirkung in vier Klassen unterteilt und eingesetzt werden (Klasse I: Natriumkanalblocker; Klasse II: Betablocker; Klasse III: Kaliumkanalblocker; Klasse IV: Kalziumkanalblocker). Hier muss beachtet werden, dass die Wirkung der Medikamente mit der Gewebeschädigung, der Herzfrequenz, dem Membranpotenzial sowie weiteren Faktoren variieren kann (Lemmer und Brune, 2010).

Neben der medikamentösen Behandlung sind auch noch der Einsatz von Herzschrittmachern und Defibrillatoren sowie der Einsatz von transthorakaler Elektrokonversion möglich. Hier wird ein Gleichstromimpuls hoher elektrischer Energie durch den Brustkorb in das Herz geleitet, was bewirkt, dass fast alle Herzmuskelzellen depolarisiert werden und der Sinusrhythmus wiedererlangt wird.

2.3 Medikamentenentwicklung

Aufgrund der enormen Anzahl an möglichen Herzerkrankungen sowie deren Behandlungsalternativen wird nach wie vor an der Entwicklung neuer Testsysteme gearbeitet, damit neue Medikamente schnell und effektiv auf den Markt gebracht werden können. Der Anspruch ist, eine Verbesserung der gängigen Behandlungen und eine schnellere Zulassung von Herzmedikamenten zu erreichen. Zurzeit müssen neu entwickelte Medikamente vor dem regulären therapeutischen Einsatz verschiedene Testphasen durchlaufen, die einige Jahre in Anspruch nehmen können.
Zur Behandlung der unter 2.2.1 genannten Krankheiten gibt es viele Medikationen, die grob aufgezeigt worden sind. Bevor solch ein Medikament zum Einsatz kommt, sind viele Studien an Tieren sowie Testphasen notwendig, an deren Ende an freiwilligen Testpersonen die Wirkung des Arzneimittels getestet wird (Abbildung 7). Dies geschieht zur Erfassung aller erdenklichen Risiken und Nebenwirkungen und soll helfen diese auszuschließen.

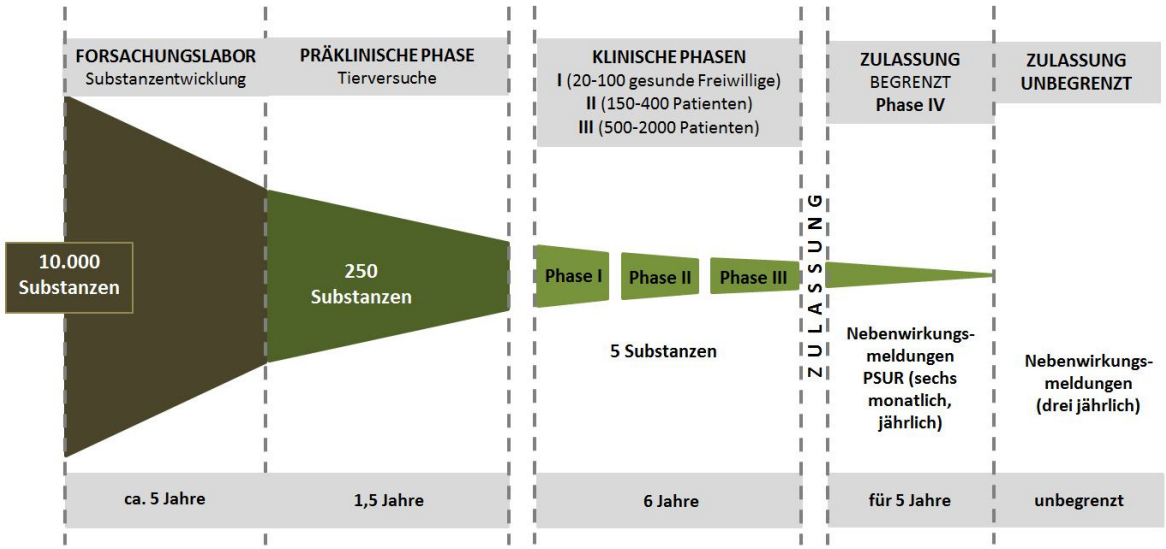

Abbildung 7| Testphasen der Medikamentenentwicklung. Abbildung nach Bundesamt für Sicherheit im Gesundheitswesen (BASG)

In den 60er Jahren kam in Deutschland erstmals die Debatte auf, dass Arzneimittel grundlegend getestet werden müssen. Damals wurde das unter dem Namen Contergan bekannte Schlafmittel Thalidomid Schwangeren gegeben, woraufhin viele Kinder mit Missbildungen zur Welt kamen. Hier hatte man vor der Zulassung des Medikaments nicht die notwendigen Studien durchgeführt. Aufgrund dessen wurde in Deutschland die Zulassung von neuen Medikamenten im Arzneimittelgesetz festgelegt, welches am 1. Januar 1978 in Kraft trat (Dilger, 2009).

Vor Beginn der klinischen Testphase werden die neuen Arzneimittel unter anderem *in vitro* und in Tierversuchen getestet. Die *in vitro* Studien werden an Zellsystemen, die unter Laborbedingungen kultiviert werden, durchgeführt. Die dadurch erhaltenen Ergebnisse werden im Anschluss in Tierversuchsstudien *in vivo* an Labortieren wie Mäusen, Ratten und Hunden getestet. Erfolgen diese Tests zufriedenstellend, müssen weitere 4 Testphasen (EMA, 2006; Dilger, 2009) durchlaufen werden (Abbildung 7).

In Phase 1 wird das Medikament das erste Mal humanpharmakologisch untersucht. Freiwillige Testpersonen bekommen das Medikament verabreicht und die Reaktion auf die Dosierung und die Anzahl der Einnahmen wird betrachtet. Phase 2 beinhaltet erste therapeutische Tests. Hier geht es darum, die Wirksamkeit sowie die Unbedenklichkeit des Medikaments bei wenigen erkrankten Personen für nur kurze Zeit zu erproben. Die Untersuchungen aus Phase 2 werden in Phase 3 in groß angelegten Studien ein weiteres Mal durchgeführt. Außerdem werden die Tests in sogenannten Doppelblindstudien durchgeführt, das heißt, weder behandelnder Arzt noch Patient wissen, ob ein Placebo oder das tatsächliche Medikament verabreicht wird. Nach Beendigung dieser Phase kann

ein Antrag auf Zulassung gestellt werden. Phase 4 folgt, wenn diese erteilt wurde und beinhaltet Langzeitstudien der Medikamente sowie deren Untersuchung auf Interaktionen mit anderen Arzneimitteln. Sind alle 4 Testphasen positiv abgeschlossen, kann das Medikament frei gegeben und in den Handel gebracht werden (Dilger, 2009).

2.4 Testsysteme

Testsysteme sind ein wichtiger Bestandteil der heutigen Forschung, da mit Hilfe dieser Systeme neu entwickelte Medikamente erprobt oder andere wissenschaftliche Fragestellungen bearbeitet werden können. Hierbei kann man zwischen zellbasierten und gewebebasierten / organotypischen Testsystemen unterscheiden. Im Folgenden wird auf beide Testsystemvarianten eingegangen.

So werden zum Beispiel humane alveolare Epithelzellen für Toxizitäts- und Transportstudien von neuen Medikamenten für Lungenerkrankungen eingesetzt (Daum et al., 2012). Auch embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sowie seit 2006 induzierte pluripotente Stammzellen werden als Testsysteme verwendet. Organotypische Testsysteme bieten neben den zellulären Systemen die Möglichkeit neue Medikamente an den jeweiligen Geweben zu testen, an denen sie später eingesetzt werden sollen.

Die oben beschriebenen organotypischen Systeme gibt es z. B. schon für die Haut in Form von Hautexplanten, auf denen Medikamente getestet werden (Lebonvallet et al., 2010). Aber auch für die Erforschung von neuroaktiven Medikamenten (Drexler et al., 2010) sowie die Untersuchung von Pankreaskarzinomen (Froeling et al., 2010) gibt es bereits entsprechende organotypische Testsysteme.

Testsysteme aus Geweben oder Zellen haben den Vorteil, dass sie die Anzahl der Tierversuche reduzieren. Zudem können Tierversuche den Effekt eines Medikamentes auf den humanen Organismus nicht vollends widerspiegeln. Die tatsächliche Wirkung am Menschen muss in weiteren Tests gezeigt werden. Hier wären Testsysteme aus den jeweiligen Organen eine gute Option. So kann die Wirkung der Medikamente schon vor der Testphase an Patienten gezielt untersucht werden. Durch die Anwendung organotypischer Systeme kann außerdem schon vorab die Wirkung des Medikaments auf das Organ getestet werden. Zeigt sich nicht die gewünschte Veränderung kann direkt an einer Verbesserung des Wirkstoffes gearbeitet werden. Die systemischen Effekte des Medikamentes werden durch solche Versuche zwar noch nicht abgedeckt, aber die Entwicklung verbesserter Medikamente kann auf diese Weise beschleunigt und preiswerter gestaltet werden.

2.4.1 Embryonale Stammzellen als Testsysteme

Die ES-Zellen werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen, die aus einer befruchteten Oozyte entstanden ist (Abbildung 8).

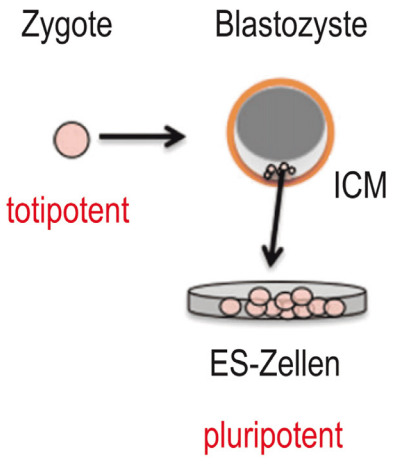

Abbildung 8| Gewinnung von embryonalen Stammzellen. Aus der noch totipotenten Zygote entwickelt sich eine Blastozyste, aus deren innerer Zellmasse (ICM) die ES-Zellen gewonnen werden. Diese ES-Zellen sind pluripotent und können in Zellen der drei Keimblätter sowie in die Zellen der Keimbahn differenzieren. ICM: Innere Zellmasse aus dem englischen *Inner Cell Mass*. Abbildung nach Watt und Driskell (2010)

Das Besondere an den ES-Zellen ist ihre Pluripotenz, das heißt sie haben die Befähigung, *in vitro* Zellen aller drei Keimblätter (des Endoderm, des Mesoderm und des Ektoderm) sowie Zellen der Keimbahn hervorzubringen (Foldes et al., 2008; Sarkar, 2009). 1981 konnten Wissenschaftler um M.J. Evans das erste Mal ES-Zellen aus Mäuseblastozysten isolieren, *in vitro* kultivieren und auf ihre Eigenschaften untersuchen (Evans und Kaufman, 1981).

Die erste erfolgreiche Isolierung und Etablierung humaner embryonaler Stammzellen (hES-Zellen) gelang 1998 dem Wissenschaftler James Thomson (Thomson et al., 1998). Aufgrund ihrer pluripotenten Eigenschaften kann durch Zugabe verschiedener Faktoren gezielt der gewünschte Zelltyp differenziert werden. Diese Eigenschaft macht sie für die Verwendung als Testsystem sehr interessant, da der für das zu testende Medikament benötigte Zelltyp differenziert und in Kultur hergestellt werden kann. Die Gewinnung spontan kontrahierender Kardiomyozyten aus ES-Zellen erfolgt über die Bildung von sogenannten Embryoid Bodies (EB). Hierzu werden die gewonnen ES-Zellen für zwei Tage in hängenden Tropfen kultiviert. In dieser Zeit entstehen Aggregate, die dann in einzelnen Well's weiter kultiviert werden. Nach etwa 7 Tagen können die ersten kontrahierenden Zellen aus den angehafteten EB's separiert und untersucht werden (Wobus et al., 1991; Wobus et al., 1995). Neben dieser spontanen Differenzierung der ES-Zellen in Kardiomyozyten ist auch eine forcierte

Differenzierung von ES-Zellen in Kardiomyozyten durchführbar. So bewirken unter anderem Dimethylsulfoxid (DMSO) und Retinsäure eine gerichtete Differenzierung (Wobus et al., 2006; Wobus und Boheler, 2005).

Wenzel et al. (2002) konnten zum Beispiel an spontan kontrahierenden embryonalen Kardiomyozytenclustern die Wirkung einer Hypoxie auf die Generation und Weiterleitung einer Erregung zeigen. Die Differenzierung ES-Zellen in verschiedenste Zelltypen machen sie so nicht nur für die medizinische Forschung interessant, sondern auch für die pharmazeutische sowie die chemischen Industrie.

Ein Nachteil der ES-Zellen liegt in der unkontrollierten spontanen Differenzierung, welche sie *in vitro* aufweisen. Diese spontane Differenzierung kann zumindest bei murinen ES-Zellen durch den „Leukaemia inhibitory Faktor“ (LIF), der die Selbsterneuerung der Zelle unterstützt, unterdrückt werden (Heath und Smith, 1988; Smith und Hooper, 1987) und fördert so die Vermehrung in einem undifferenzierten Stadium. Eine weitere Schwachstelle der ES-Zellen liegt darin, dass zwar die Wirkung der zu testenden Stoffe auf die Zellen getestet werden, der Effekt auf das gesamte Organ oder den Zellverband jedoch nicht dargestellt werden kann. Ein weiterer Aspekt, der zumindest bei der Arbeit mit humanen ES-Zellen in Deutschland besteht, sind die strengen Auflagen, die in §8 des Embryonenschutzgesetzes verankert sind (2008). Es dürfen nur ES-Zellen für Forschungszwecke verwendet werden, die vor dem 01.05.2007 im Ausland gewonnen werden konnten. Des Weiteren muss eine Genehmigung vorliegen, die es dem Wissenschaftler erlaubt mit ES-Zellen zu arbeiten. Die Generierung neuer ES-Zelllinien ist in Deutschland per Gesetz ((2008); BGBl. I S. 1708) verboten.

2.4.2 Testsysteme aus induzierten pluripotenten Stammzellen

Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) sind in der ethischen Diskussion um die Verwendung von embryonalen Stammzellen eine mögliche Alternative, da sie aus somatischen Zellen eines adulten Organismus gewonnen werden können. Im Jahre 2006 haben Wissenschaftler um Shinya Yamanaka vier Transkriptionsfaktoren identifiziert, mit deren Hilfe somatische Zellen in einen Zustand versetzt werden können, der dem ES-Zustand sehr ähnlich ist (Takahashi und Yamanaka, 2006). Zu diesen vier Faktoren zählen Oct3/4, Sox2, cMyc, und Klf4, die für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz in den ES-Zellen eine wichtige Rolle spielen. Ein Jahr später konnte die gleiche Arbeitsgruppe die Induzierung von humanen Fibroblasten in iPS-Zellen (Takahashi et al., 2007) beschreiben. Die Merkmale der Chimärenbildung, Tumorbildung und Pluripotenz werden herangezogen, um sicherzustellen, dass es sich bei den iPS-Zellen tatsächlich um ES-ähnliche-Zellen

handelt (Takahashi und Yamanaka, 2006). Der Vorteil der iPS-Zellen als Testsysteme gegenüber den ES-Zellen, besteht in ihrer ethisch unbedenklichen Herkunft und ihrer einfachen, patientenspezifischen Herstellbarkeit. Sie können unter anderem aus den somatischen Zellen eines Patienten gewonnen werden. So können angedachte Medikationen schon vorab an den Zellen des Patienten getestet und eventuelle, nicht gewünschte Nebenwirkungen im Vorfeld erkannt werden. Außerdem sind sie als Testsystem für neue biologische Agentien oder Medikamente interessant, da man so die effektivsten Medikationen und therapeutischen Ansätze ermitteln kann (Chapin und Stedman, 2009). Dennoch ergeben sich auch hier, wie bei den ES-Zellen, Probleme. Zum einen sind die Kosten und der Aufwand der Herstellung der iPS-Zellen sehr hoch, da die Ausbeute nur sehr gering ist und zum anderen kommt hinzu, dass diese mittels Retroviren gewonnen werden. Diese virale DNA verbleibt nach der Induzierung in den Zellen und es konnte noch nicht nachgewiesen werden, inwieweit sich diese Tatsache auf die physiologischen Eigenschaften der Zellen bei Zugabe der zu testenden Medikamente auswirkt. Das Risiko einer genetischen Mutation der iPS-Zellen und die Entstehung karzinogener Zellen ist aufgrund der viralen DNA sehr hoch (Hussein et al., 2011; Gore et al., 2011). Jüngste Ergebnisse zeigen außerdem, dass der Vorgang der Reprogrammierung selbst die Wahrscheinlichkeit einer Mutation, die potenziell karzinogen ist, enorm steigert (Lister et al., 2011).
Demnach können iPS-Zellen ebenso wie ES-Zellen nur mit gewissem Vorbehalt als Testsysteme für die Entwicklung neuer Medikamente und Therapien dienen. Es muss immer die oben beschriebene Problematik mit bedacht werden. In Anbetracht dieser Tatsachen sind organotypische Testsysteme eine bessere Alternative, um die Auswirkungen eines Medikaments auf ein Organ zu testen.

2.4.3 Organotypische Testsysteme

Organotypische Testsysteme haben den Vorteil, dass sie die Wirkung der Medikamente oder der toxikologisch zu testenden Substanzen in zusammenhängendem Gewebe zeigen können. Außerdem repräsentieren Gewebeschnitte die *in vivo* Situation von Organen besser als Zellmonolayer und sind allein deswegen interessant (Parrish et al., 1995). Überdies können organotypische Testsysteme wesentlich besser genutzt werden, um einen pathologischen Zustand ex vivo zu präparieren; dieser ist in der Medikamentenentwicklung i.d.R. der eigentlich interessante. Aus diesem Grund sind organotypische Testsysteme gegenüber zellulären Testsystemen in der Arzneimittel- und Toxikologieforschung eine ansprechende Alternative (Parrish et al., 1995; de Boer et al., 2009; Meyer et al., 2010).
Die organotypischen Testsysteme bestehen aus kleinen Biopsien, oft dünnen Gewebeschnitten eines Organs oder Gewebes. Sie werden unter speziellen Kultivierungsbedingungen am Leben

erhalten. Je nach Organ, können dies sogenannte Rollkulturen (Parrish et al., 1995) oder Kulturen an der Luft-Flüssigkeits-Grenze mittels Membraneinsatz im Kulturgefäß (Stoppini et al., 1991) sein. Die ersten in der Literatur beschriebenen organotypischen Testsysteme stammen aus dem Jahr 1923 von Otto Warburg (Krumdieck et al., 1980). Burdette & Wilhelmi beschrieben 1946 das erste Mal Rattenherzgewebeschnitte (Pearson et al., 1949) als Testsysteme. Zu dieser Zeit wurden die Gewebeschnitte noch manuell mit dem Skalpell gewonnen und waren aus diesem Grund nicht immer gleich dick, was ihre Aussagekraft als Testsystem einschränkte. Das erste automatisierte Schneidegerät zur Herstellung von Gewebeschnitten wurde 1980 von der Arbeitsgruppe um Carlos Krumdieck entwickelt (Krumdieck et al., 1980). Auf dieser Grundlage nahm die Bedeutung der Gewebeschnitte für die Forschung an pharmakologischen Substanzen ebenso wie für toxikologische Untersuchungen zu (de Boer et al., 2009). Auch zur Erforschung des Metabolismus (Yasuhara et al., 1996; Takaki et al., 1998) sowie für elektrophysiologische Untersuchungen der Herzzellen im Verbund (Burnashev et al., 1990) wurden die Schnitte herangezogen. Burnashev et al. (1990) zeigten das erste Mal, dass die Messung von Natrium- sowie Kaliumströmen mittels Patch-Clamp-Technik auch an Herzdünnschnitten durchführbar ist und die generierten Daten mit anderen Strömungsmessungen aus Herzgewebe vergleichbar sind. Bursac et al. (2003) zeigten, dass neonatale Herzdünnschnitte aus Rattenherzen repräsentativere Daten bezüglich der herzspezifischen Elektrophysiologie zeigen als Zellmonolayer oder über *Tissue engineering* hergestellte myokardiale Gewebe. Die Kultivierung der Gewebeschnitte war lange auf bis zu 24h begrenzt, doch dies konnte zuletzt auf bis zu eine Woche erhöht werden (Pillekamp et al., 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung horizontaler Schnitte durch den Herzventrikel die Ausbreitung eines AP beobachtbar ist. Die Schnitte werden dabei durch eine scharfe Elektrode an einer Stelle stimuliert und an anderer Stelle des Herzschnittes werden die ankommenden Potenziale gemessen (Halbach et al., 2006). Durch die Weiterleitung der Stimulation konnte gezeigt werden, dass die Schnitte physiologisch und mechanisch noch intakt sind (Pillekamp et al., 2007). Diese Tatsache macht die Gewebeschnitte als Testsystem für die Pharmakologie immer attraktiver, da die Wirkung von Medikamenten an einem intakten Gewebestück getestet werden kann. Sowohl die Wirkung auf die Kontraktionskraft, als auch auf die Länge des AP's kann so untersucht und ausgewertet werden. Eine weitere Verwendung für die Gewebeschnitte findet sich im Bereich der regenerativen Medizin. Die Integration von Stammzellen, die auf den nativen Herzschnitt gegeben werden, kann sehr gut untersucht werden (de Boer et al., 2009). Nach den durchgeführten elektrophysiologischen Untersuchungen, kann der Schnitt noch fixiert werden und im Anschluss daran Immunhisto- bzw. Immunzytochemisch untersucht werden. So kann im Voraus am Modell beurteilt werden, ob die Zellen, die

zur Behandlung eines Patienten verwendet werden sollen, tatsächlich in das Gewebe integrieren und die Kontraktionskraft verbessern (Brehm et al., 2008).
Im Vergleich zu den ES und iPS-Zellen ist das Testsystem aus organotypischem Gewebe also vorzuziehen, da eine umfassendere und genauere Aussage auf die Reaktion der getesteten Medikamente gemacht werden kann. Auch ist es inzwischen gelungen, vor allem humane Herzschnitte über einen Zeitraum von 4 Wochen zu kultivieren (Brandenburger et al., 2011). Gewebeschnitte bieten außerdem einen guten Mittelweg zwischen den Experimenten am Zellmodel und am gesamten Organ (Meyer et al., 2010). Die Versuche an unterschiedlichen Spezies erweisen sich jedoch zuweilen als problematisch, da die myokardialen Ionenkanäle von Ratte und Maus nicht mit den Ionenkanälen im Herzen des Menschen übereinstimmen. In der S7B-Richtlinie wird beschrieben, dass die Ionenkanäle von Meerschweinchen, Schwein, Kaninchen und Hund den Kanälen aus humanem Gewebe ähnlicher sind als die von Ratte und Maus (Pharmaceuticals, 2005). Dennoch müssen die Gewebeschnitte, sollen sie zum festen Bestandteil in die klinische Testphase von Medikamenten werden, aus humanem Gewebe sein. Da die Gewebeschnitte nur für einen begrenzten Zeitraum in Kultur gehalten werden können, müssten immer wieder neue Herzschnitte generiert werden. Um die Schnitte für Testzwecke jederzeit verfügbar zu haben, muss demnach ein System entwickelt werden, mit dem man die Herzschnitte lange lagern kann. Allgemeiner gesagt, muss eine Logistik entwickelt werden, die nicht nur die Lagerung, sondern auch das Verschicken und die verwechslungsfreie Markierung von Gewebeschnitten ermöglicht.

2.4.4 Testsystemanwendungen

Zur Untersuchung der elektrophysiologischen Intaktheit von Herzgewebeschnitten gibt es verschiedenen Methoden. Im Folgenden werden drei dieser Methoden kurz genauer betrachtet.

Zum einen kann eine Kraftmesskammer angewandt werden, um die Reaktion auf ein Medikament, welches die Kontraktionskraft des Herzens verändert, zu untersuchen (Brandenburger, 2011). Die Gewebeschnitte werden auf der einen Seite an einem statischen Muskelhalter und auf der gegenüberliegenden Seite an einem dynamischen Organhaken befestigt. Mit diesem kann eine Vorlast eingestellt werden. Der Organhaken ist mit einem Kraftaufnehmer verbunden, der die Kontraktion der Gewebeschnitte in ein Messsignal umwandelt und dieses zur Darstellung an einen Computer weiterleitet. Zur Untersuchung von Medikamenten können diese zusammen mit der Nährstofflösung in das begaste Organbad eingeleitet werden und auf diesem Wege ebenso wieder ausgewaschen werden. Die sich verändernde Kontraktilität des Gewebeschnittes wird dann vom Kraftaufnehmer an den Computer übertragen.

Zum andern können elektrophysiologische Veränderungen an einem Gewebeschnitt durch Zugabe von Medikamenten mit einem Mikroelektroden-Array (MEA, Abbildung 9) gemessen werden. Die Herzschnitte werden kurz vor der Messung in das MEA überführt, in dem zuvor spezieller 37° C warmer Messpuffer vorgelegt wurde. Über kleine Elektroden, die auf die Glas- bzw. Plastikplatte aufgebracht sind (Abbildung 9 b), werden die Feldpotenziale (FP) des Schnittes aufgenommen. Die Stimulation des Gewebes erfolgt über eine externe Elektrode, die in das Gewebe eingestochen wird, da die internen Elektroden nicht für die Stimulation von solch großen Gewebestücken ausgelegt sind. Die internen Elektroden werden wiederum zur Aufnahme der FP verwendet. Die Weiterleitung der FP nach einer Stimulation kann am Monitor in Echtzeit verfolgt werden, ebenso wie die Veränderung des FP nach Zugabe von Medikamenten.

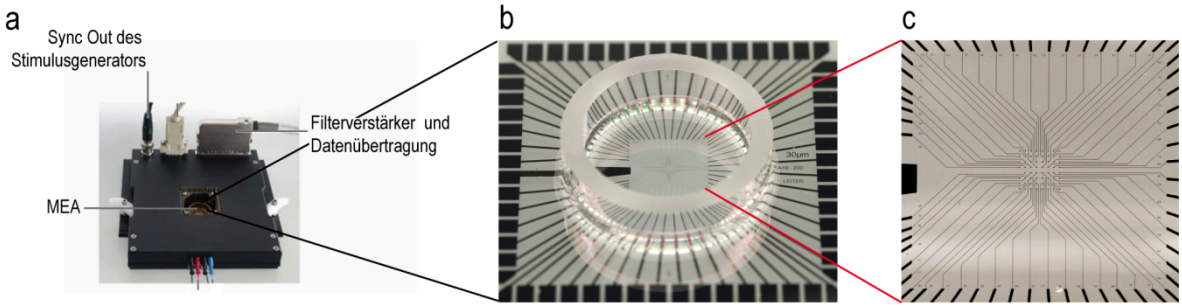

Abbildung 9| Aufbau eines Mikroelektroden Arrays (MEA). Das MEA (b) wird in eine spezielle Halterung (a) eingelegt, die mit dem Stimulusgenerator, dem Rechner sowie einem Heizelement verbunden ist. Die hier verwendeten MEA's bestehen aus Glas mit aufgebrachten Titaninitrid-Elektroden (c). Zur Aufnahme der Feldpotenziale stehen insgesamt 60 Elektroden zur Verfügung, die es ermöglichen die FP's am Bildschirm live zu verfolgen. Abbildung a verändert nach Multi Channel Systems (2011).

Drittens schließlich kann die Intaktheit der Zell-Zell-Kontakte und des kontraktilen Apparates in den Gewebeschnitten mit einer scharfen Elektrode untersucht werden (Wenzel, 2011). Der Vorteil gegenüber dem MEA besteht darin, dass die absoluten Werte der gemessenen Potenziale den wirklichen Membranpotenzialen entsprechen, während im MEA lediglich (kleinere) Feldpotenziale aus der Zone der Elektroden registriert werden; nachteilig hingegen ist, dass die scharfe Elektrode keine Aussagen über die Reizweiterleitung erlaubt (keine örtliche Auflösung). Für die Messung werden die Gewebeschnitte mit der Elektrode angestochen und ein Impulsgeber an anderer Stelle an den Schnitt angelegt. Werden die Impulse in Form von Aktionspotenzialen von Zelle zu Zelle weitergeleitet, können diese mit der Elektrode aufgenommen werden. Durch Zugabe von Medikamenten kann mit dieser Methode ebenfalls die Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften aufgenommen werden.

2.5 Kryokonservierung

Unter Kryokonservierung versteht man die Lagerung von Zellen und Geweben bei Temperaturen unter -130 °C. Bei diesen Temperaturen sind alle physiologischen Prozesse angehalten („eingefroren“). Nach dem Auftauen soll ein substanzieller Teil der Zellen vital und funktionell sein. Dazu ist es sehr wichtig Kryoprotektiva zu verwenden, welche die lebensnotwendigen Strukturen erhalten und somit erlauben die Zellen und das Gewebe wieder vital aufzutauen. Außerdem muss darauf geachtet werden, dass der Ein- und Auftauvorgang einem bestimmten Protokoll folgt, da es sonst zu irreversiblen Schäden der Zellen und des Gewebes kommen kann (Schmitz, 2009). Verwendet man keine Kryoprotektiva können sich Eiskristalle im Intra- und Extrazellularraum bilden, von denen besonders das intrazelluläre Eis für die Zellen und somit auch für das Gewebe tödlich sind (Pegg, 2007).

Der erste Versuch der Kryokonservierung von Zellen wurde 1776 von Lazzaro Spallanzani unternommen. Er kühlte Spermien mittels Schnee und stellte fest, dass die Zellen durch die Kälte unbeweglich wurden und nach dem Erwärmen wieder beweglich waren (Zhmakin, 2009). Ende des 19ten Jahrhunderts konnte Hans Molish, mit einem von ihm entwickelten Mikroskop, zum ersten Mal die Entstehung intrazellulären Eises und den dadurch hervorgerufenen Grad der Dehydrierung in Zellen zeigen (Diller, 1997). Durch die Verbesserung von Aufbewahrungsgefäßen für flüssige Gase und der weiteren Erforschung der Kryokonservierung im 19. Jahrhundert wurde der Grundstein für den Fortschritt im 20. Jahrhundert gelegt. So wurden auch die Techniken verfeinert, mit denen man die Kristallbildung in den Zellen beobachten konnte (Zhmakin, 2009). Die Vitrifikation wurde 1938 von Basile Joseph Luyet und E.L. Hodapp an Froschspermien demonstriert, die zuvor mittels Sucrose dehydriert wurden (Zhmakin, 2009; Schmidt, 2006). Luyet und eine Kollegin folgerten schließlich aus ihren gewonnenen Ergebnissen, dass die zellulären Schäden und der Zelltod auf die Kristallbildung in den Zellen zurückzuführen sei (Zhmakin, 2009). Glyzerin als Gefrierschutzmittel wurde erstmals von Polge et al. (1949) eingesetzt, was einen weiteren Fortschritt in der Kryoforschung bedeutete und die darauffolgende Entwicklung neuer Einfriertechniken und Einfrierlösungen nach sich zog.

Die Einfrierprotokolle, die momentan in der Wissenschaft und der Medizin angewandt werden, sind zum einen die Vitrifikation und zum anderen das langsame Einfrieren mit Geschwindigkeiten um ca. 1 °C/min. Außerdem gibt es - den unterschiedlichen Zellen und Geweben entsprechend - verschiedene Einfriermedien, die verwendet werden. Bei der Vitrifikation werden sehr hohe Konzentrationen an Gefrierschutzmittel benötigt, die schnell in die Proben eindringen können (Mazur und Seki, 2011). Der Einfriervorgang dauert nur wenige Sekunden, in denen die Probe schockgefroren wird. Es entstehen keine Kristalle bzw. nur sehr kleine Kristalle, die der Zelle nicht schaden können. Nachteilig sind mechanische Spannungen, die durch das schnelle Einfrieren nicht relaxieren

können, beim Auftauen aber zu Zellschädigungen führen. Ebenso sind die genannten hohen Konzentrationen an Gefrierschutzmittel, die meist zelltoxisch wirken, schädlich. Bei langsamem Einfrieren kommt es ebenfalls zum Einsatz von Frostschutzmitteln, die jedoch wesentlich geringer konzentriert sind als bei der Vitrifikation. Auch spielen die Eigenschaften der Medien eine Rolle. So gibt es Medien, die in die Zellen eindringen (penetrierende, intrazelluläre Einfriermedien), aber auch solche die die Zellen von außen schützen (nicht penetrierende, extrazelluläre Einfriermedien; (Schmitz, 2009; Diller, 1997)).

Die Kryokonservierung vereinzelter Zellen in Suspension stellt inzwischen kaum noch ein Problem dar. Das Einfrieren und Auftauen von vitalem Herzgewebe ist bisher jedoch noch nicht gelungen. Dies liegt unter anderem an folgenden Gründen: 1. In den Gewebeproben stehen die Zellen untereinander in Kontakt, was zu der Schwierigkeit führt, dass weder intrazellulär noch extrazellulär Eiskristalle entstehen dürfen (Meryman, 1956). Deshalb müssen während des Einfriervorgangs von Gewebe die korrekten Einfriermedien sowie die beste Einfriergeschwindigkeit verwendet werden. 2. Der Ablauf des Auftauvorgangs ist bei der Kryokonservierung ebenfalls von Bedeutung, da es auch in dieser Phase zur Bildung von Kristallen und zu einer sogenannten Rekristallisierung kommen kann. 3. Darüber hinaus können Missverhältnisse der lokalen Ionenkonzentration zu osmotischem Stress, Denaturierung von Eiweißen, Störung des Zellstoffwechsels und Schädigungen der Membran führen.

Die Kryokonservierung heute wird unter anderem in der Fertilisationsmedizin sowie in der Zellkultur angewandt. Spermien und Ovarien von Mensch und Tier können praktisch beliebig lange gelagert werden, ebenso wie die Zellen, welche im weiteren Verlauf der Forschung für Versuche benötigt werden.

2.5.1 Kryoschäden

Während des Einfriervorgangs treten drei unterschiedliche Prozesse auf, die der Vitalität der Zellen schaden können. Die Kristallbildung ist der gravierendste Eingriff in die Zellstruktur und das Gewebe während des Einfriervorgangs. So kann zu schnelles Einfrieren zu Kristallbildung im Inneren der Zelle führen und Schäden an den Membranen hervorrufen (Pegg, 2007). Die Eiskristalle entstehen bei hohen Einfriergeschwindigkeiten früher und sind kleiner als bei langsameren Kühlraten. Ein Nachteil der kleinen Eiskristalle ist deren thermodynamische Instabilität, die durch die große Oberflächenenergie und das Oberflächen-Volumen-Verhältnis hervorgerufen wird. So kann es im weiteren Verlauf des Einfrierprozesses dazu kommen, dass es zu einem Zusammenschluss der kleinen Eiskristalle kommt, bzw. kleinere Kristalle durch Stofftransport von größeren Kristallen

„geschluckt“ werden. Die daraus entstehenden großen Kristalle verursachen innerhalb der Zelle letalen Schaden (Schmitz, 2009). Werden die Zellen langsam, also bei ca. -1 °C/min eingefroren, bilden sich die Eiskristalle zunächst außerhalb der Zelle. Durch die Kristallisation des Wassers im Extrazellularraum der Zelle erhöht sich auch die Elektrolytkonzentration außerhalb der Zelle. Das dadurch entstehende osmotische Missverhältnis zwischen dem inneren und dem äußeren Milieu der Zelle führt zu einem erhöhten Wasserausstrom aus der Zelle. Erklärung für den Wasserausstrom und nicht den Ionenaustausch ist die Tatsache, dass Ionen aktiv in die Zelle geschleust werden müssen und das Wasser passiv über Aquaporine die Membran der Zelle passieren kann. Der so hervorgerufene Wasserverlust führt zu einer Dehydrierung der Zellen und lässt sie schrumpfen (Meryman et al., 1977). Ist die Dehydrierung zu stark, führt dies, wie auch die Eiskristalle, zum Tod der Zelle. Neben den Schäden durch die Kristallbildung und der daraus folgenden Dehydrierung kommt es auch durch osmotische Effekte, die während des Einfriervorgangs auftreten, zur Schädigung von Zellen und Gewebe. Durch die hohen osmotischen Unterschiede zwischen dem Zellinneren und dem äußeren Milieu der Zelle, kann es zu einer Schädigung der Membran kommen (Meryman et al., 1977). Die dadurch hervorgerufenen Lipidveränderungen an der Membran erlauben es, dass positiv geladene Ionen ins Zellinnere gelangen können. Da die Zelle während des Auftauvorgangs bereits Wasser abgibt, um den Elektrolythaushalt an die extrazellulären Verhältnisse anzupassen, führt ein weiteres Eindringen von Kationen unweigerlich zur Zelllyse (Hubel, 1997). Ein weiterer Aspekt, der in der erfolgreichen Kryokonservierung eine Rolle spielt, ist der der mechanischen Schäden. Schon 1956 konnte Meryman eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der mechanischen Schäden, hervorgerufen durch große Eiskristalle, und der Eismenge pro Zelle nachweisen (Meryman, 1956). Je nachdem wie groß die Eiskristalle in den Zellen sind, kann es zu mechanischen Schäden durch diese kommen. Dies bedeutet also, je größer die Kristalle sind, desto gefährlicher sind sie. Auch können durch die Kryokonservierung Spannungen in der Zelle auftreten, die ebenfalls durch die Bildung von Kristallen hervorgerufen werden. Durch zu große Spannungen können unter anderem die Membranen der Zellen Schaden nehmen, was zur Apoptose der Zelle führen kann.

Bei Geweben sind die sich entwickelnden Kryoschäden noch schwieriger in den Griff zu bekommen. Es muss nicht nur auf einen Zelltyp geachtet werden, sondern es müssen verschiedene Zellen vor Kryoschäden geschützt werden. Außerdem ist es sehr wichtig, dass die Zell-Zell-Kontakte bestehen bleiben, damit das Gewebe nach dem Auftauen noch vital ist (Pegg, 2007; Pegg et al., 1987). Bilden sich extrazelluläre Eiskristalle im Gewebe, so verbleiben diese im Gegensatz zu Einzelzellen innerhalb des Systems, was die Zellmembranen und auch die Zell-Zell-Kontakte direkt schädigt (Pegg, 2007). Die Arbeitsgruppen um Hunt und Pegg (Hunt et al., 1982; Taylor und Pegg, 1983) konnten als Erste die Effekte, die während der Kryokonservierung auf Gewebe wirken, zeigen. Die Bildung von

Eis zwischen den Muskelbündeln und die dadurch entstehende Schädigung des kontraktilen Apparates konnte ebenfalls gezeigt werden (Hunt et al., 1982).
Ein weiterer Aspekt, der zu Kryoschäden führen kann, ist die Auftaugeschwindigkeit. Während eines zu langsamen Auftauprozesses kann es zu einer sogenannten Rekristallisierung kommen. Diese resultiert aus der unterschiedlichen Oberflächenenergie zwischen den ungleichgroßen Kristallen sowie aus der Behebung lokaler Nicht-Gleichgewichtszustände (nicht-kristallines, glasartiges Wasser) durch Umlagerung zu Kristallen (Meryman, 1956).
Die angestrebten Lagertemperaturen der Zellen und Gewebeproben von < -130 °C haben den Hintergrund, dass bei diesen Temperaturen die oben beschriebenen Prozesse und der Zellmetabolismus praktisch vollständig zum Erliegen kommen. Dies ermöglicht die Lagerung über einen sehr langen Zeitraum. Da in der Gasphase direkt über einem Bad aus flüssigem Stickstoff stationäre Temperaturen von unter -150 °C erreicht werden, sind dies ideale Lagerbedingungen für Zellen und Gewebe (Schmitz, 2009).

2.5.2 Kryoprotektiva

Die Zellen und Gewebe ohne Kryoprotektiva einzufrieren, würde unweigerlich ihren Tod herbeiführen. Dem vorzubeugen, werden Gefrierschutzmittel für die Kryokonservierung von lebenden Zellen und Geweben eingesetzt. Die Wirkungsmechanismen der Kryoprotektiva bestehen hauptsächlich darin, dass sie unbegrenzt mit Wasser mischbar sind und so die Kristallstruktur des Eises massiv stören, was die Kristallbildung des Wassers verhindert. Des Weiteren kann insbesondere DMSO die Hydratisierungsfunktion des Wassers übernehmen, auch wenn dieses schon gefroren ist. Dies bewirkt, dass sich insbesondere die Denaturierung von Eiweißen vermindert. Außerdem können diese durch die Erniedrigung des Gefrierpunktes ebenso vor der Bildung von intrazellulärem Eis schützen, wie auch vor zu hoher Konzentrierung von Elektrolyten. Membranschäden kann so vorgebeugt und die osmotische Zelllyse zum größten Teil verhindert werden (Schmitz, 2009).
Kryoprotektiva unterteilt man nach ihrem Vermögen die Zellmembran zu durchdringen in penetrierende und nicht penetrierende (Meryman et al., 1977). Zu den penetrierenden zählen unter anderem DMSO, Glycerin, Propandiol und Ethylenglykol, wobei DMSO und Glycerin wesentlich häufiger verwendet werden. Alle vier Stoffe können aufgrund ihres kleinen Molekulargewichtes, die Zellmembranen durchdringen und so ihre schützende Wirkung entfalten (Schmitz, 2009). Durch das Schutzmittel stellt sich ein Mischungsgleichgewicht mit dem noch nicht kristallisierten Wasser ein. Dies bedeutet, es kommt zu einer Erhöhung der Osmolarität außerhalb der Zelle, was den Ausstrom von Wasser aus der Zelle hervorruft. Im Gegenzug dringt dann das Kryoprotektivum in die Zelle ein.

Je nach Permeabilität der Membran für das Schutzmittel, schrumpft die Zelle stärker oder behält ihre ursprüngliche Form nahezu bei. Der Austausch von Wasser mit dem Gefrierschutzmittel dauert so lange, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Wasserausstrom und Einstrom des Frostschutzmittels einstellt. Dieser Vorgang ist darüber hinaus temperaturabhängig; je höher die Temperatur ist, desto schneller geht der Austausch vonstatten (Schmitz, 2009).

DMSO ist ein Gefrierschutzmittel, das stark membranpermeabel ist und seine Wirkung erst in den Zellen entfalten kann. Aufgrund der guten Durchgängigkeit durch die Membranen hat es eine hohe Eindringgeschwindigkeit (Lovelock und Bishop, 1959). Da man es allerdings in Konzentrationen höher als 1,5 Mol/l einsetzen muss, damit es seine kryoprotektive Wirkung entfalten kann, ist es stärker zelltoxisch als z. B. Glycerin (Schmitz, 2009). Infolge der guten Membranpermeabilität von DMSO ist das Ausspülen mit Medium recht einfach, da die Zellen bzw. das Gewebe nur in frisches Kultivierungsmedium überführt werden müssen. Dennoch muss der Auftauvorgang sehr schnell ablaufen, um die toxischen Einflüsse des Frostschutzmittels möglichst gering zu halten.

Glycerin ist ebenfalls ein häufig verwendetes Kryoprotektivum, unterscheidet sich aber in seiner Wirkweise vom DMSO. Durch seine hohe Viskosität benötigt es länger, um in die Zellen einzudringen, ist jedoch auch in höheren Konzentrationen nicht so stark toxisch wie DMSO. Glycerin entfaltet ebenso wie DMSO seine Schutzwirkung, in dem es in hohen Konzentrationen dazu führt, dass die entstehenden Kristalle kleiner sind und aufgrund der vorliegenden Form den Zellmembranen weniger Schaden zufügen. Während des Auftauvorgangs muss bei der Verwendung von Glycerin darauf geachtet werden, dass es stufenweise aus den Zellen entfernt wird. Hierfür sind nicht penetrierende Gefrierschutzmittel wie Sucrose geeignet. Ansonsten würden die Zellen durch den Einstrom von Wasser anschwellen und die Gefahr, dass sie platzen, würde sich stark erhöhen (Meryman, 1956).

Neben den membranpermeablen Gefrierschutzmitteln gibt es noch solche, die nicht in die Zelle eindringen können und ihren Frostschutz außerhalb der Zelle entfalten. Zu diesen Mitteln zählen unter anderem Zucker wie Sucrose und Polymere wie Polypyrrolidone (PVP). Ihre Wirkung beruht unter anderem darauf, dass gelöste Stoffe auch während des osmotischen Stresses, der bei der Kryokonservierung auftritt, die Membranen reversibel passieren können. Außerdem wirken sie wie ein Wasserspeicher, der je nach osmotischer Lage Wasser aufnehmen oder abgeben kann. So ist die Gefahr der osmotischen Lyse nicht so hoch, wie bei penetrierenden Gefrierschutzmitteln. Der häufigste Einsatz von Zuckern und Polymeren als Gefrierschutzmittel erfolgt bei Einfrierprozessen mit hohen Kühlraten, die eine schnelle Dehydrierung benötigen (Schmitz, 2009). Außerdem werden sie eingesetzt, wenn in Glycerin eingefrorene Zellen aufgetaut werden sollen. Durch ihre dehydrie-

rende Wirkung verhindern sie das Anschwellen der Zellen und gewährleisten eine höhere Ausbeute an vitalen Zellen nach der Kryokonservierung (Schmitz, 2009).

2.5.3 Einfriergeschwindigkeit

Neben den oben beschriebenen unterschiedlichen Kryoprotektiva gibt es auch noch Unterschiede in der Einfriergeschwindigkeit. So können Zellen und Gewebe sowohl langsam mit -1 °C/min eingefroren werden als auch sehr schnell mittels Vitrifikation. Bei der Vitrifikation spricht man auch von einer Verglasung der Zellen, weil das Wasser keine Zeit hat, Kristalle zu bilden und stattdessen in amorpher, glasartiger Struktur erstarrt. Die Einfriergeschwindigkeit liegt hier bei etwa 300 000 °C/min (Mazur und Seki, 2011). Aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus von Gewebe und Zellen wird die jeweils entsprechende Methode angewandt, um die gewünschten Ergebnisse zu erhalten.
Bei einer Einfriergeschwindigkeit von -1 °C/min kann man geringer konzentrierte Kryoprotektiva verwenden, um das Gewebe und die Zellen vor Schäden durch Kristallbildung und osmotischen Konzentrationsunterschieden zu bewahren.
Bei der Vitrifikation werden die Objekte vor der Kryokonservierung in eine hoch konzentrierte Gefrierschutzmittellösung gegeben und danach direkt in flüssigen Stickstoff überführt (Mazur und Seki, 2011). Aufgrund der hohen Einfriergeschwindigkeit können sich keine Eiskristalle bilden, das Wasser gefriert direkt.
In der Wissenschaft werden Zellen hauptsächlich mit -1 °C/min eingefroren (Hubel, 1997), da gering konzentrierte Frostschutzmittel verwendet werden können und die Vitalität nach dem Auftauen besser ist. Die Vitrifikation wird eher bei der Kryokonservierung von Oocyten (Mazur und Seki, 2011) und Spermien verwendet. Diese Methode kann gewährleisten, dass auch das Cytoplasma, das den größten Teil der Eizelle ausmacht, ohne Schaden kryokonserviert werden kann.
Die beste Einfriergeschwindigkeit ist demnach die Geschwindigkeit, die sowohl die Eiskristallbildung im Inneren der Zelle so gering und die Einwirkdauer in der konzentrierten Elektrolytlösung so kurz wie möglich hält. Allerdings muss auch beachtet werden, dass das Volumen der Zellen eine Rolle spielt. Je größer das Volumen einer Zelle ist, desto eher neigt sie dazu, intrazelluläre Kristalle zu bilden. Großvolumigere Zellen geben während des Einfriervorgangs weniger Wasser ab als kleinvolumigere, was die intrazelluläre Kristallbildung begünstigt (Schmitz, 2009).

2.5.4 Momentaner Stand der Kryokonservierung

Den Hauptnutzen der Kryokonservierung sieht die Wissenschaft in der Tatsache, dass es auf diese Weise möglich ist, z. B. Testsysteme oder auch „Ersatzteile“ wie Blutgefäße zu lagern und jederzeit

zugänglich zu machen. Die Arbeitsgruppe um Else Müller-Schweinitzer konnte zeigen, dass humane Blutgefäße vital kryokonservierbar sind (Müller-Schweinitzer, 1988; Müller-Schweinitzer, 1992). Auch konnte sie zeigen, dass Blutgefäße, die in Kultur hergestellt wurden, für den Ersatz von Blutgefäßen mit größerem Durchmesser gut geeignet sind, jedoch nicht für den Ersatz von schmalen Gefäßen (Müller-Schweinitzer, 2009). Zurzeit können vor allem Zellen und Zellsuspensionen, Spermien sowie Ovarien (Hwang und Lamb, 2010; Paynter, 2008; Gosden, 2011) ohne größere Probleme kryokonserviert und nach Bedarf wieder vital aufgetaut werden. Bei den Spermien und Ovarien spielt hauptsächlich die *In-Vitro-Fertilisation* eine Rolle. Durch die Erfolge der Kryokonservierung von Ovarien und Spermien ist es möglich, nach Krebserkrankungen noch Kinderwünsche zu erfüllen. Auch die Kryokonservierung von humanen Blastozysten war bereits erfolgreich (Youssry et al., 2008). Die Erfolge in der Gefrierkonservierung von Geweben sind jedoch noch begrenzt. Neben den unterschiedlichen Methoden, wie Geschwindigkeit und Kryoprotektivum, spielt auch die Größe der zu kryokonservierenden Gewebe eine Rolle. So ist es noch nicht gelungen, größere Gewebestücke (je nach Gewebetyp >200 µm) einzufrieren, die nach dem Auftauvorgang vital und funktionsfähig gewesen wären. Hinzu kommt, dass es praktisch gesehen einfacher ist, eine Zelle funktionell intakt einzufrieren und wieder aufzutauen. So kann es sein, dass in einer Zelle zwar noch alle funktional notwendigen Strukturen intakt sind, jedoch keine Vitalität mehr gemessen werden kann. Deswegen ist es überaus wichtig, nicht nur die funktionelle Intaktheit zu bewahren, sondern auch verstärkt auf die Vitalität der Zelle einzugehen und diese während der Kryokonservierung zu erhalten.

Es bedarf also noch weiterer Forschung, um größere Gewebestücke vital kryokonservieren zu können und diese neben der Verwendung als Testsysteme für Medikamente auch als Ersatz für krankhafte Gewebepartien zu verwenden.

2.6 Ziel der Arbeit

Das Kryokonservieren einzelner Zellen und Zellsuspensionen und das darauffolgende vitale Auftauen stellen in der Wissenschaft kein großes Problem mehr dar. Das Einfrieren und Auftauen von vitalen und möglichst sogar funktional intakten Herzgewebeproben ist jedoch noch wenig erforscht und soll im Hinblick auf die Bereitstellung für Testsystemanwendungen in dieser Arbeit untersucht werden.

Neben der Optimierung des Kryoprotokolls wurden auch unterschiedliche Auswerteparameter getestet, um eine bestmögliche Aussage über die Vitalität der Herzgewebeproben vor und nach der Kryokonservierung treffen zu können.

Zu diesem Zweck sind 300 µm dicke Herzdünnschnitte aus dem Herzgewebe der Ratte und des Menschen mittels der Vibrationsschneidetechnik gewonnen worden. Diese Herzdünnschnitte wurden zum Teil nochmals in 500 µm breite Streifen geschnitten. Im weiteren Verlauf sind die Schnitte und Streifen unterschiedlich weiter behandelt worden. Ein Teil des Gewebes kam ohne vorherige Kryokonservierung in Air-Lift-Kultur, der andere Teil wurde zuvor in verschiedenen Einfriermedien erst bei -80 °C und später bei -196 °C gelagert.

Zur Auswertung der Vitalität der Schnitte und Streifen fanden verschiedene Auswerteparameter Verwendung, um möglichst aussagekräftige Ergebnisse erzielen zu können. Zu diesen Parametern zählten unter anderem der MTT-Test sowie die JC-1-Färbung. Mittels dieser Methoden wurde die mitochondriale Aktivität der Schnitte und Streifen direkt nach dem Schneiden und nach einer festgelegten Kultivierungszeit sowie nach der Kryokonservierung untersucht. Neben der Vitalität der Gewebeproben ist auch die Intaktheit des kontraktilen Apparates sowie die der Zell-Zell-Kontakte untersucht worden. Hier kamen Immunzytochemie, Immunhistochemie, Transmissionselektronenmikroskopie und – zur Bestimmung der funktionellen Intaktheit – elektrophysiologische Messungen zum Einsatz. Auch die Analyse der mRNA-Expression wichtiger herzspezifischer- und Transmembrangene wurde mittels molekularbiologischer Techniken durchgeführt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der oben genannten Verfahren die Schnitte und Streifen möglichst funktional einfrieren und wieder auftauen zu können. Dies würde eine Möglichkeit bieten, in der Medikamentenentwicklung auf Tierversuche zu verzichten und die Medikamente direkt an Dünnschnitten des Wirkorgans zu testen. Der unschätzbare Vorteil läge in der steten Bereitstellung der benötigten Gewebeproben durch deren Kryokonservierung.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmittel

Verbrauchsmaterial	Hersteller
250 µl & 500 µl Steril Filter mit 0,22 µm Porengröße	Millipore, Deutschland
6-Well- Zellkulturplatten	Techno Plastic Products, Schweiz
96- Well Platte- Clearbottom	Berthold, Deutschland
96- Well Zellkulturplatten	Techno Plastic Products, Schweiz
Cryo- Babies	Diversified Biotech, USA
Deckgläschen (quadratisch)	Marienfeld, Deutschland
Drei-Wege-Hähne	Braun, Deutschland
Einmalpasteurpipetten (3,0 ml) *Transferpipetten*	Sarstedt, Deutschland
Filterpapier	Macherey- Nagel, Deutschland
Gewebekultureinsätze *Millicell* 0,4 µm Porengröße	Millipore, Deutschland
Glaspasteurpipetten	Roth, Deutschland
Kryoröhrchen	Techno Plastic Products, Schweiz
Objektträger *Menzel- Gläser Superfrost Plus*	Thermo Scientific, Deutschland
Paraffinkäfige	Medite, Deutschland
Pipetten (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Deutschland
Probenröhrchen (15 ml/ 50 ml)	Sarstedt/ Greiner Bio- One, Deutschland
Rasierklingen *Gilette Super Silver*	Gillette, USA
Reaktionsgefäße (200 µl/ 1,5 ml/ 2,0 ml)	Eppendorf, Deutschland
Schaumstoffeinsätze für Paraffinkäfige *Biopsy Pads*	Bio optica, Italien
Sekundenkleber *Classic flüssig*	Pattex, Deutschland
Skalpell *Surgical Disposable*	Braun, Deutschland
Sterican 100 Kanülen	Braun, Deutschland
Tissue Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Deutschland
Tungsten Elektrode (Standardspitze)	Science Products, Deutschland
Zellkultureinsätze 0,4 µm Porengröße	Greiner Bio- One, Deutschland
Zellkulturschale (4,08 cm², 78,5 cm²)	Greiner Bio- One, Deutschland
Zellkulturschalen (9,2 cm², 28,3 cm², 78,5 cm²)	Techno Plastic Products, Schweiz

3.1.2 Chemikalien

Chemikalien/ Medien/ Reagenzien	Hersteller
2- Propanol	Roth, Deutschland
2,3-Butanedione monoxime (BDM)	Sigma-Aldrich, Deutschland
a-D(+)-Glucose Monohydrat	Roth, Deutschland
Agarose Low Melt	Roth, Deutschland
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat ($CaCl_2$ x $2H_2O$)	Merck, Deutschland
Carbogen	AirLiquide, Deutschland
CryoStore CS 10, CS 5, CS 2	Sigma-Aldrich, Deutschland
4‘,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Roche, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) Hybri- Max	Sigma, Deutschland
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco® Invitrogen, Deutschland
DNase 1	Qiagen, Deutschland
Eosin G (C.I. 45380)	Roth, Deutschland
Ethanol (99,8 % p.a./ 96 % vergällt)	Roth, Deutschland
Euparal	Roth, Deutschland
Far Red	Invitrogen, Deutschland
Formalin	Roth, Deutschland
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Deutschland
Hämalaunlösung sauer nach Meyer	Roth, Deutschland
HEPES	Roth, Deutschland
Hypothermosol	BiolifeSolutions, USA
Insulin-Transferrin-Selen- Lösung	Invitrogen, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2$ x $6H_2O$)	Merck, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH_2PO_4 x H_2O)	Roth, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Roth, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 1x und 10x	Invitrogen, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-Mix	PAA Laboratories, Österreich
Propidium Iodid	Sigma-Aldrich, Deutschland

RNAlater	Qiagen, Deutschland
RNase freies Wasser	Qiagen, Deutschland
Roti Liquid Barrier Marker	Roth, Deutschland
Sauerstoff	AirLiquide, Deutschland
Shandon Histoplast Paraffin	Thermo Scientific, Deutschland
Shandon Histoplast Pelletised Paraffin Wax	Thermo Scientific, Deutschland
Syto 9	Invitrogen, Deutschland
Triton X 100	Fluka Chemie/Sigma- Aldrich, Deutschland
Vectashield	Vector Laboratories, USA
Xylol	Roth, Deutschland
Ziegenormalserum	Vector Laboratories, USA
β- Mercaptoethanol	Roth, Deutschland
Immersionsöl *Immersol™ 518 F*	Carl Zeiss, Deutschland

3.1.3 Medien

1 % ITS- DMEM- Medium	DMEM 0,01 mg x ml^{-1} Insulin $5,5^{-3}$ mg x ml^{-1} Transferrin $5,0^{-3}$ µg x ml^{-1} Natriumselenit 100 U x ml^{-1} Penicillin 0,1 mg x ml^{-1} Streptomycin
Einfriermedium (EM)	10 % DMSO 90 % FKS

3.1.4 Lösungen & Puffer

Transportpuffer	136 mM NaCl 5,4 mM KCl 1 mM $MgCl_2$ x $6H_2O$ 0,33 mM NaH_2PO_4 x H_2O 10 mM Glucose x H_2O

Transportpuffer (weitere Bestandteile)	0,9 mM CaCl x H_2O 30 mM BDM 27 mM $NaHCO_3$
Schneidepuffer	136 mM NaCl 5,4 mM KCl 1 mM $MgCl_2$ x $6H_2O$ 0,33 mM NaH_2PO_4 x H_2O 10 mM Glucose x H_2O 0,9 mM CaCl x H_2O 30 mM BDM 5 mM HEPES
Messpuffer	136 mM NaCl 5,4 mM KCl 1 mM $MgCl_2$ x $6H_2O$ 0,33 mM NaH_2PO_4 x H_2O 10 mM Glucose x H_2O 1,8 mM CaCl x H_2O 23 mM $NaHCO_3$
Natriumcitrat- Puffer	10 mM Natriumcitrat Wurde mittels 1N HCl auf pH 6.1 eingestellt
0,1 % BSA + TBST	150 mM Natriumchlorid 10 mM Tris (pH 8,8) 0,05 % Triton X-100 Bovine Serum Albumin (BSA)
PBS	137 mM g Natriumchlorid 9,6 mM Dinatriumhydrogenphosphat 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat 2,7 mM Kaliumchlorid

3.1.5 Primer

Tabelle 1| Verwendete Primer. Auflistung aller Primer für Gene, deren Expression untersucht wurde. Angegeben werden die Spezies, für welche das Gen bindet, die Amplikonlänge in Basenpaaren (bp), ob der Primer Exons aufweist, also Intron-spannend bindet sowie die Bestellnummer des jeweiligen Primers. Alle Primer wurden von der Firma Qiagen bezogen.

Primer	Spezies	Größe [bp]	Exon	Bestelnummer
Atp1b1	Ratte	125	2/3	QT00177128
GAPDH	Ratte	149	1/3	QT00199633
Gja1	Ratte	141	1/2	QT00177737
Slc8a1	Ratte	162	5/6	QT01592451
Atp1a1	Human	99	21/22	QT00059962
GAPDH	Human	119	1/2/3	QT01192646
Gja1	Human	92	1/2	QT00012684
Slc8a1	Human	96	1/2	QT00075376

3.1.6 Kits

Kit	Hersteller
CellQuanti-MTT™ Cell Viability Assay Kits	BioAssay Sytems, Deutschland
LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit	Invitrogen/ Molecular Probes, Deutschland
MitoProbe™ JC-1 Assay Kit	Molecular Probes, Deutschland
QuantiTect® Reverse Transcription	Qiagen, Deutschland
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen, Deutschland
SYTO® 9 Green-Fluorescent Nucleic Acid Stains	Invitrogen/ Molecular Probes, Deutschland

3.1.7 Geräte

Geräte	Hersteller
AmpliSpeed Slide Cycler ASC200D	Advalytix AG/ Beckman Coulter, Deutschland
Chopper *McIllwain Tissue Chopper*	The Mickle Laboratory Engeneering Co. ltd., USA
Feinwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Deutschland
Fixierroboter für Gewebe Microm STP120	Thermo Scientific, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Deutschland
Grant Asymptote EF 600 102	Cell Cryogenics Ltd, UK
Kapillargelelektrophorese *QIAxcell*	Qiagen, Deutschland
Laserscanningmikroskop *LSM 710*	Carl Zeiss, Deutschland
Mikroelektroden-Array *MEA1060*	MultichannelSystems, Deutschland
Microm Cryotom Cry-Star HM 560 MV	Microm/ Thermo Scientific, Deutschland
Microm HM 355S für Paraffinschnitte	Microm/ Thermo Scientific, Deutschland
Microtom VT1200 S	Leica, Deutschland
Mikrowelle Sharp R-207	Sharp, Deutschland
Nanodrop-Spektrophotometer *NanoDrop 1000*	Peqlab, Deutschland
Nukleinsäureaufreinigungsroboter *QIAcube*	QiagenDeutschland
Paraffineinbett- Automat *Microm EC 350-1& 2*	Thermo Scientific, Deutschland
Pipettierroboter *QIAgility*	Qiagen, Deutschland
Platereader *Mithras LB 940*	Berthold Technologies, Deutschland
qPCR Cycler Mastercycler ep *Realplex*^{2}	Eppendorf, Deutschland
Stereoskop *Stereo Discovery. V8*	Carl Zeiss, Deutschland
Stimulationsgenerator *STG 2004*	Multichannel Systems, Deutschland
Temperatur Controller *TC01*	Multichannel Systems, Deutschland
Thermocycler *Mastercycler*	Eppendorf, Deutschland
Tischzentrifuge	Eppendorf, Deutschland
Trockenschrank *HeraCell*	Heraeus/ Thermo Scientific, Deutschland
Umwälzkühler *Minichiller*	Huber, Deutschland
Verstärker *FA60 SBC*	Multichannel Systems, Deutschland
Waage *Kern EV*	Kern & Sohn GmbH, Deutschland
Zentrifuge *Allegra® X-15R*	Beckman- Coulter

3.1.8 Software

Programm	Vertrieb
Adobe Illustrator 13.0.2	Adobe CS3
Adobe Photoshop 10.0.1	Adobe CS3
BioCalculator 3.0	Qiagen, Deutschland
ChemSketch 12.01	Advanced Chemistry Development, Inc. Kanada
McRack	MultichannelSystems, Deutschland
McStimulus Generator	MultichannelSystems, Deutschland
Microsoft Excel 2007	Microsoft, Deutschland
realplex 2.2	Eppendorf, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Gewebe

3.2.1.1 Ratten- Material:

Die Rattenherzen stammten aus adulten, 8 bis 12 Wochen alten, männlichen Sprague-Dawley Ratten. Die Tiere sind nach §4 des Tierschutzgesetztes euthanasiert worden. Dies erfolgte mittels CO_2-Begasung im Tierstall oder durch Betäubung mit Isofluoran® und darauffolgender Dekapitation (Universitätsklinikum Schleswig- Holstein (UKSH) in Lübeck, Pharmakologie und Toxikologie) bzw. Ausbluten (UKSH Lübeck, Physiologie). Das Herz wurde direkt nach dem Ableben der Tiere entnommen und in dem dafür vorgesehenen, eisgekühlten Transportpuffer bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.2.1.2 Humanes- Material:

Das humane Material stammte aus explantierten Herzen, die bei Organtransplantationen den erkrankten Personen entnommen worden sind. Der operierende Arzt entnahm etwa 2x2x1 cm^3 große Stücke aus dem noch gesunden Teil des rechten Ventrikels und überführte diese in den dafür vorgesehen, eisgekühlten Transportpuffer. Die Proben wurden dann schnellst- möglich nach Lübeck transportiert. Spätestens 24 h nach der Organentnahme konnten die Gewebestücke verarbeitet werden. Vor Ort sind die Gewebestücke für unterschiedliche Versuche verwendet worden. Dem

Austausch des Gewebes liegt eine Kooperation zwischen der Arbeitsgruppe Pharmakologie und Toxikologie des UKSH Lübeck und dem Transplantationszentrum Hamburg- Eppendorf zu Grunde.

Alle Patienten, deren Gewebe für die Versuche verwendet wurde, haben eine Einverständniserklärung unterschrieben, in der sie das explantierte Herz den Kooperationspartnern für die Versuche und Untersuchungen überlassen.

3.2.2 Gewebekultur

3.2.2.1 Herstellung organotypischer Schnitte und Streifen

Zum Schneiden der Gewebestücke in kleine Scheiben (Schnitte) wurde das Vibratom *VT1200 S* (Leica) verwendet. Vor Beginn des Schneidens musste die vertikale Vibration der eingespannten Rasierklinge mittels der Vibrationsüberprüfung (siehe Abbildung 10) getestet und korrekt eingestellt werden. Hierbei wird die Höhenamplitude der Klinge mit Hilfe eines Laserstrahls, durch den diese schwingt, ermittelt und durch Verändern der Längsachse eingestellt (Längsachse des Schwingkopfes parallel zur Schneidekante; Abbildung 10).

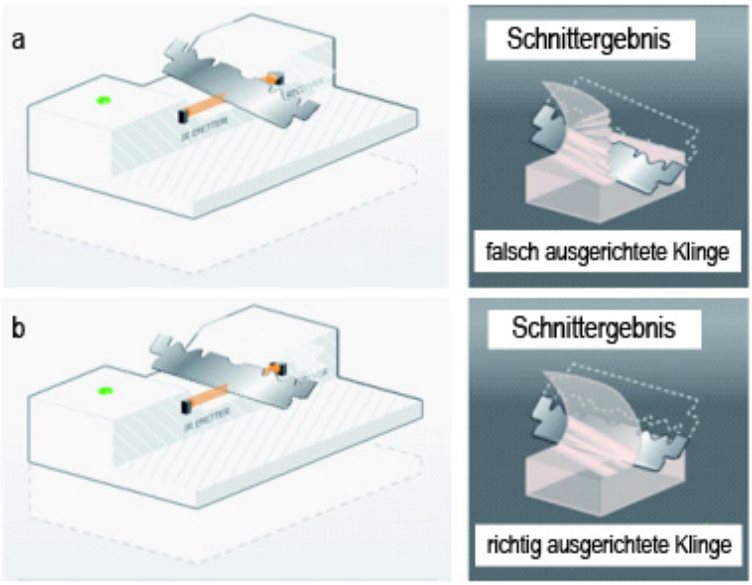

Abbildung 10| Schematische Darstellung der Vibrationsüberprüfung. Zur Ermittlung der korrekten Vibrationsachse wurde die Rasierklinge in einen Laserstrahl gehalten (a). Das Gerät ermittelte die notwendige Achsenveränderung, die mit Hilfe einer Einstellschraube korrigiert wurde. Die Vibrationsüberprüfung wird solange wiederholt, bis die Ausrichtung der Klinge exakt ist (b). Abbildung nach Leica Biosystems (2013)

Nach Beendigung der Vibrationsüberprüfung wurde das Organbad mit Schneidepuffer gefüllt und dieses mit dem Kühlaggregat *Minichiller* (Huber) auf 4 °C gekühlt. Die benötigte Sauerstoff-(O_2)

Versorgung wurde am Organbad befestigt und das O_2-Ventil geöffnet. Zum Einbetten des Gewebes wurde 4 %-ige low melt-Agarose in Schneidepuffer angesetzt und mit O_2 begast. Zur Verflüssigung wurde die Agarose in der Mikrowelle solange aufgekocht (ca. 1 min), bis diese vollständig gelöst war. Die weitere Verarbeitung des Gewebes unterschied sich aufgrund der vorliegenden Form. Zur Herstellung der humanen organotypischen Gewebeschnitte wurden die 1x2 cm^2 großen Herzgewebestücke mit Skalpell und Schere von Fettgewebe und größeren Blutgefäßen befreit. Dem Rattenherz wurden die Vorhöfe entfernt, da nur die Ventrikel zum Herstellen der Schnitte verwendet wurden. In das Herz der Ratte wurde mit Hilfe einer 1 ml Einwegspritze Agarose in die Ventrikel gespritzt, um während des Scheidens die Formstabilität des Organs zu gewährleisten. Ohne diese Stabilitätsunterstützung würde das Gewebe reißen und die Schnitte wären nicht mehr verwertbar. Im weiteren Verlauf wurde das präparierte Gewebe in einer 4,08 cm^2 großen Petrischale platziert, mit der 37 °C warmen Agarose komplett übergossen und zum Abkühlen auf Eis gelagert.

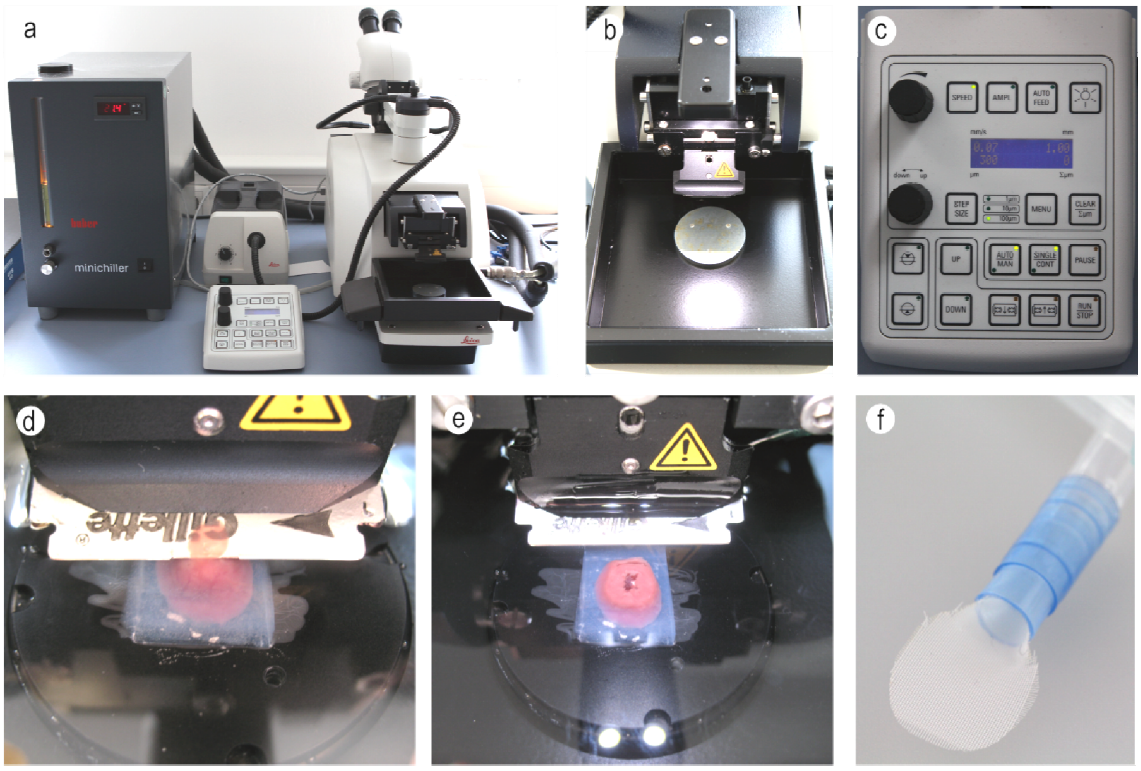

Abbildung 11| Schneiden von organotypischen Schnitten mittels des Vibratom *Microtom VT1200 S*. Zur Herstellung der Schnitte ist u.a. ein Kühlaggregat notwendig, das mit dem Organbad des Vibratoms verbunden ist (a, b). Zur optimalen Einstellung der Schneideparameter (Vortriebsgeschwindigkeit der Klinge, Schnittdicke sowie Anfangs- und Endpunkt des Agaroseblocks) wird das Bedienpanel (c) verwendet. Der im Organbad (b) platzierte Agarose- Gewebe- Block wird mittels Sekundenkleber befestigt. Die Rasierklinge schneidet das Gewebe mit gleichmäßiger Vortriebsgeschwindigkeit und kehrt nach Beendigung des Schneidevorgangs zurück zur Startposition (d, e). Die Schnitte werden mit einem speziell angefertigten Aufnehmer aus dem Organbad entnommen (f).

Sobald die Agarose fest war, wurde das Gewebe mit einem ca. 0,5 cm breiten Agaroserand ausgeschnitten und mit Cyanacrylatkleber (Pattex) auf dem Schneideteller befestigt. Zusammen mit dem Gewebe- Agarose- Block wurde der Schneideteller im Organbad platziert. Der Anfangs- und Endpunkt des Schneidevorgangs sowie die Vortriebsgeschwindigkeit der Rasierklinge (Gilette) und die Schnittdicke wurden mit Hilfe des Bedienpanels (Abbildung 11 c) eingestellt. Die Schnittdicke in den hier durchgeführten Versuchen betrug 300 µm (Pillekamp et al., 2007; Pillekamp et al., 2005). Die optimale Vortriebsgeschwindigkeit lag bei 0,07 µm x s^{-1} (Konvention im Konsortium). Die erzeugten Schnitte wurden mit einem eigens angefertigten Aufnehmer (Abbildung 11 f) aus dem Organbad genommen und in einem, mit Schneidepuffer gefüllten, 50 ml Plastikröhrchen unter ständiger O_2-Begasung gelagert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis das komplette Gewebe geschnitten war. Je nach Größe des Organs dauerte dieser Vorgang ca. 120 bis 150 min. Der gesamte Schneideablauf sowie die Lagerung geschahen bei 4 °C. Ein Teil der Schnitte wurde direkt nach dem Schneiden, nach 3 h sowie 24 h in Air- Lift- Kultur (siehe Abschnitt 3.2.2.2) untersucht. Die restlichen Schnitte wurden in den, in Tabelle 2 angegebenen Einfriermedien eingefroren.

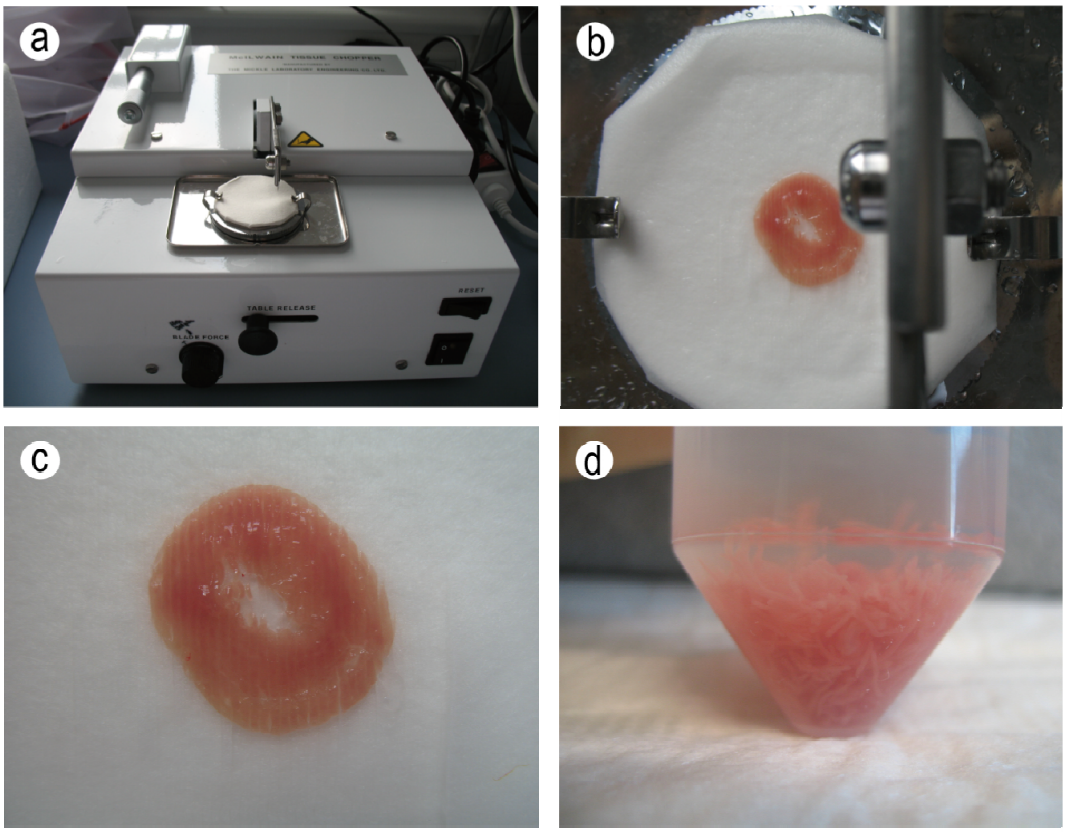

Abbildung 12| Erstellung von organotypischen Streifen. Mit Hilfe des McIllwain Tissue Choppers (a) wurden die 300 µm dicken Gewebeschnitte in 500 µm breite Streifen geschnitten. Hierzu wurden die Schnitte auf den mit einem feuchten Tuch bedeckten Objekttisch überführt (b) und mittels einer Rasierklinge in Streifen (c) geschnitten. Die angefertigten Streifen werden in O_2-begasten Schneidepuffer überführt (d) und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

Die Einfriergeschwindigkeit betrug 1 °C min^{-1} bis die Proben auf -80 °C gekühlt waren. Danach wurden die Proben in die Gasphase des flüssigen Stickstoffs (LN_2) überführt und dort bis zur weiteren Untersuchung gelagert. Der Auftauprozess erfolgte wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben. Auch hier wurden die Proben direkt nach dem Auftauvorgang sowie nach 3 h und 24 h in Kultur mittels unterschiedlichster Methoden auf ihre Vitalität und strukturelle Intaktheit untersucht. Desweiteren wurden die 300 µm dicken und ca. 1 cm breiten Schnitte in 500 µm breite Streifen geschnitten, die den gleichen Untersuchungen unterzogen wurden wie die Schnitte. Mit Hilfe des *McIllwain Tissue Choppers* (The Mickle Laboratory Engeneering; Abbildung 12 a) konnten die Schnitte innerhalb kürzester Zeit in Streifen (Abbildung 12 b, c) geschnitten und wieder in Schneidepuffer überführt werden (Abbildung 12 d). Während der Schneidephase wandert der Probentisch mit dem Gewebe nach jedem Schnitt die gewählte Strecke weiter. Die Rasierklinge fällt dabei immer wieder auf das Präparat hinab und gewährleistet so eine komplette Durchtrennung des Gewebes.

3.2.2.2 Kultivierung organotypischer Schnitte und Streifen

Die Kultivierung der Schnitte und Streifen erfolgte als sogenannte Air- Lift- Kultur. Hierbei wurde das Gewebe an der Luft-Flüssigkeitsgrenze kultiviert, wodurch der für dieses Gewebe wichtige Gasaustausch gewährleistet ist. Um diese Methode durchführen zu können wurden 6- Well- Platten und spezielle Zellkultureinsätze (Millipore) verwendet. Die Einsätze wurden in die Wells gesetzt und je 1 ml Medium, bestehend aus DMEM, 0,01 mg x ml^{-1} Insulin, $5,5^{-3}$ mg x ml^{-1} Transferrin, $5,0^{-3}$ µg x ml^{-1} Natrium Selenit (ITS) sowie 1 U x ml^{-1} Penicillin und 0,1 mg x ml^{-1} Streptomycin (P/S), unter die Einsätze gegeben.

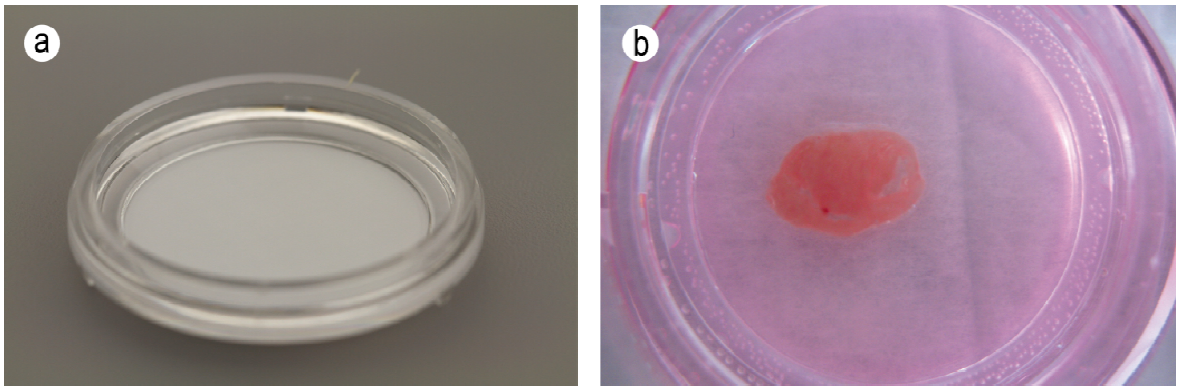

Abbildung 13| Air- Lift- Kultur der organotypischen Gewebeschnitte. Die Gewebeschnitte wurden auf Zellkulturinserts (a) bei 37 °C sowie 5 % CO_2 kultiviert. Die Inserts wurden vor Kultivierungsbeginn in 6-Well-Platten mit 1 ml Medium vorinkubiert. Das Medium konnte in dieser Phase von der Membran des Inserts aufgenommen werden, was die spätere Nährstoffversorgung des Gewebes (b) gewährleistete.

Diese Einsätze (Abbildung 13 a) haben eine semipermeable Membran aus hydrophilem Polytetrafluorethylen (PTFE), die das Medium aufnimmt und so die Versorgung der Schnitte mit Nährstoffen aus dem Medium ermöglicht (Abbildung 13 b). Die Überführung der Schnitte aus dem Schneidepuffer auf die Membran erfolgte mittels des Aufnehmers (Abbildung 11 f), da so nur geringe Scherkräfte auf das Gewebe wirkten. Die Streifen wurden mit Hilfe einer Pinzette überführt. Je nach Dauer der Kultivierung wurde das Medium alle 2 bis 3 Tage gewechselt.

3.2.3 Kryokonservierung

3.2.3.1 Kryokonservierung organotypischer Schnitte und Streifen

Für die Kryokonservierung der Schnitte und der Streifen wurden unterschiedliche Kryomedien, die in Tabelle 2 aufgelistet sind, getestet.

Tabelle 2| getestete Kryomedien

Kryomedium	**Inhaltsstoffe**
Einfriermedium 1 (EM1)	1 % DMSO + 99 % FKS
Einfriermedium 2 (EM2)	3 % DMSO + 97 % FKS
Einfriermedium 3 (EM3)	10 % DMSO + 90 % FKS
Einfriermedium 4 (EM4)	1 % DMSO + 99 % FKS+ BDM
Einfriermedium 5 (EM5)	3 % DMSO + 97 % FKS + BDM
Einfriermedium 6 (EM6)	10 % DMSO + 90 % FKS + BDM
Einfriermedium 7 (EM7)	1 % DMSO + 49,5 % Medium (10 %) + 49,5 % FKS
Einfriermedium 8 (EM8)	3 % DMSO + 48,5 % Medium (10 %) + 48,5 % FKS
Einfriermedium 9 (EM9)	10 % DMSO + 45 % Medium (10 %) + 45 % FKS
Einfriermedium 10 (EM10)	1 % DMSO + 49,5 % Medium (10 %) + 49,5 % FKS
Einfriermedium 11 (EM11)	3 % DMSO + 48,5 % Medium (10 %) + 48,5 % FKS
Einfriermedium 12 (EM12)	10 % DMSO + 45 % Medium (10 %) + 45 % FKS
IBIDI- Einfriermedium	keine Angaben des Herstellers IBIDI; ohne FKS
IBIDI- Einfriermedium 2	keine Angaben des Herstellers IBIDI; ohne FKS + BDM
CryoStore CS2	keine Angaben des Herstellers BiolifeSolutions
CryoStore CS5	keine Angaben des Herstellers BiolifeSolutions
CryoStore CS10	keine Angaben des Herstellers BiolifeSolutions

Sowohl industriell hergestellte Medien als auch selbst gemischte Medien mit prozentual unterschiedlich zugefügten Mengen an DMSO und FKS wurden getestet. Außerdem wurde noch der Kontraktionshemmer BDM zu ausgewählten Medien zugegeben.

3.2.3.2 Langsames Einfrieren

Gewebeschnitte und Gewebestreifen wurden nach dem Schneiden für ca. 30 Minuten im begasten Puffer belassen, bevor sie in die Kryomedien überführt wurden. Je ein Schnitt sowie jeweils 10 bis 20 Streifen, was in etwa einem Schnitt entspricht, kamen in ein Kryoröhrchen mit vorgelegtem, 4 °C kaltem Kryoprotektant. Die auf Eis gelagerten Röhrchen wurden im Anschluss daran in eine Kryobox (Nalgene), die die Temperatur um 1 °C min^{-1} senkt, überführt. Diese Box wurde für 1 Tag im -80 °C Gefrierschrank belassen. Am darauffolgenden Tag wurden die Röhrchen in die Gasphase des LN_2 überführt und dort gelagert. Zum Auftauen wurden die Proben direkt aus der Gasphase des LN_2 entnommen, im 37 °C Wasserbad angetaut und unmittelbar in 37 °C warmes Kulturmedium gegeben. War der Auftauvorgang beendet, wurden die Schnitte bzw. die Streifen nochmals in frisches Medium überführt und dann in Air-Lift-Kultur genommen.

3.2.3.3 Unterschiedliche Einfriergeschwindigkeiten

Um die bestmögliche Einfriergeschwindigkeit zu ermitteln, wurden die Proben im *Grant Asymptote* (Cell Cryogenics Ltd; Abbildung 14 a), einem transportablen und programmierbaren Einfrierapparat, mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten eingefroren. Es wurden sowohl die Standard- Einfriergeschwindigkeit von 1 °C x min^{-1} als auch 0,5 °C x min^{-1} und 3 °C x min^{-1} ausgetestet. Nachdem das Gerät die Starttemperatur von 4 °C erreicht hatte, konnten die Proben eingesetzt werden. Dafür wurden diese in die Standard Einfrierröhrchen von TPP mit den entsprechenden Einfriermedien überführt und in die im Gerät vorhandene Einfrierplatte (Abbildung 14 b) gestellt. Diese ist auf die Größe, speziell den Durchmesser der Röhrchen ausgelegt (Abbildung 14 c). Der Einfriervorgang dauerte dann je nach eingestellter Kühlgeschwindigkeit 27 bis 160 Minuten. Nach Beendigung des Programms wurden die Proben aus dem Gerät genommen und in den LN_2- Tank überführt, wo sie bis zur weiteren Verarbeitung gelagert wurden.

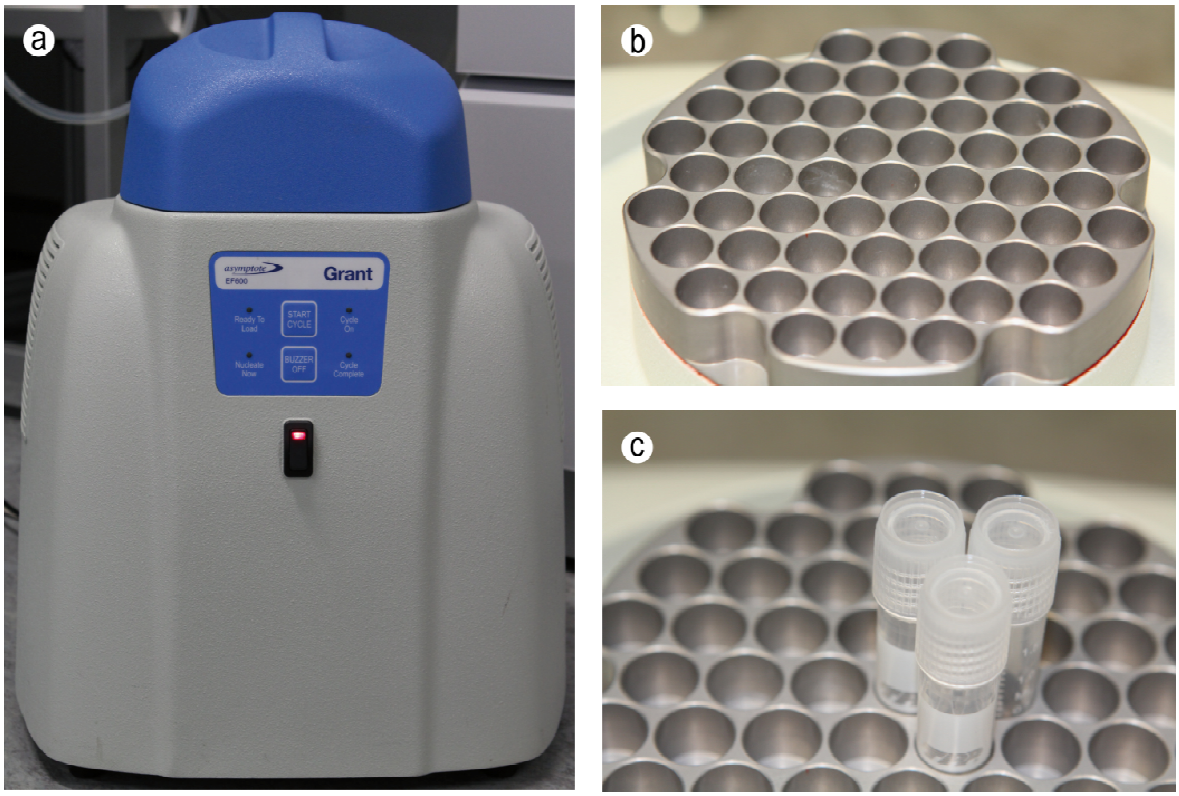

Abbildung 14| Grant Asymptote. Zur Ermittlung der besten Einfriergeschwindigkeit wurde der Asymptote verwendet (a). Die Proben wurden in eine spezielle Platte (b) eingesetzt, die auf die verwendeten Kryobehälter abgestimmt ist (c).

3.2.4 Histologie

3.2.4.1 Paraffinschnitte

Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurde das Gewebe direkt, 3 h und 24 h nach dem Schneiden sowie das aufgetaute Gewebe 0 h, 3 h und 24 h nach dem Auftauen fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Proben wurden in kleine Plastikkäfige, die mit Biopsy Pads ausgelegt waren, platziert. Die Biopsy Pads sollten verhindern, dass die Proben aus den Käfigen in die Fixierungsmedien gelangen. Die Fixierung wurde mit dem Fixierroboter für Gewebe (Microm STP 120, Thermo Scientific) durchgeführt. Das Programm beinhaltet die Schritte wie in Tabelle 3 dargestellt.

Nach der Fixierung wurde das Gewebe aus den Käfigen genommen und in bereits angewärmte Probenschalen platziert. Mit dem unteren Teil des vorher verwendeten Plastikkäfigs wurde die Probe abgedeckt und mit Paraffin überdeckt. Nachdem das Paraffin erkaltet war, wurde der Block aus der Probeschale entfernt und bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 3| Programmablauf während der Fixierung von Gewebe für die spätere Paraffineinbettung. Formalin dringt in das Gewebe ein und fixiert die vorhandenen Strukturen. Die aufsteigende Alkoholreihe führt dazu, dass den Geweben das Wasser entzogen wird und so durch Xylol ersetzt werden kann. In den letzten beiden Schritten der Fixierung wird das Xylol wiederum durch das flüssige Paraffin ausgetauscht. Das so fixierte Gewebe kann jetzt in Paraffin eingebettet und für weitere Untersuchungen geschnitten werden.

Chemikalie	**Dauer [h]**
Formalin I	1
Formalin II	1
Ethanol 70 Vol-%	0:30
Ethanol 80 Vol-%	0.30
Ethanol 96 Vol-%	0:30
Ethanol 100 Vol-% I	1
Ethanol 100 Vol-% II	1
Ethanol 100 Vol-% III	1
Xylol I	1:30
Xylol II	1:30
Flüssig-Paraffin I	2
Flüssig-Paraffin II	2

Mittels des *Microtom HM 355S* 8 (Leica) wurden die Paraffinschnitte angefertigt. Die Schnitte waren 5 µm dick (Muhlfeld et al., 2010) und wurden in einem auf 37 °C vorgeheiztem Wasserbad gestreckt. Sobald sich die Schnitte ausgefaltet hatten, wurden sie mit speziellen *Superfrost Plus* Objektträgern aufgenommen und kurz auf einer 37 °C Heizplatte angetrocknet. Waren alle Schnitte fertig gestellt, wurden diese zum Trocknen in den Trockenschrank (37 °C) gelegt und über Nacht dort belassen. Am nächsten Tag konnten die angetrockneten Schnitte in den Kühlschrank überführt und bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

Die angefertigten Schnitte mussten vor der Weiterverarbeitung von Paraffin befreit und hydratisiert werden. Die Entparaffinierung lief wie folgt ab:

Die Schnitte wurden 3 x je 7 Minuten in Xylol getaucht, um das Paraffin aus den Schnitten zu entfernen. Das Xylol seinerseits wurde danach in 2 x 3 Minuten- Schritten in 100 %-igen Alkohol durch diesen ersetzt. Die Hydratisierung erfolgt daraufhin für je 2 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %- 96 %- 90 %- 80 %- 70 %). Darauffolgend wurden die Schnitte für 5 Minuten in destilliertes Wasser (Aqua dest.) überführt. Für die Hämatoxylin- Eosin- Färbung (HE- Färbung) war

die Entparaffinierung nach diesem Schritt abgeschlossen, sollten die Schnitte allerdings Immunzytochemisch gefärbt werden, kam noch ein 15- minütiger Waschschritt in PBS hinzu.

3.2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die HE- Färbung ist eine Übersichtsfärbung, die sich die unterschiedlichen pH-Werte der Gewebe zu Nutze macht. Hämatoxylin wird zu Hämalaun aufbereitet und dieser Farbstoff kann dann alle sauren und basophilen Strukturen im Gewebe blau anfärben. Hierzu gehören z.B. die Zellkerne (enthalten Desoxyribonukleinsäure) sowie das raue endoplasmatische Retikulum. Nach dem Färben mit Hämalaun muss das Präparat nochmals für einige Zeit in Leitungswasser bläuen, da erst nach Anheben des pH-Wertes die Gewebestrukturen blau erscheinen. Die basischen und acitophilen Gewebe werden von Eosin G angefärbt. Dieser saure Farbstoff bindet hauptsächlich an Proteine und färbt z.B. das Zytoplasma rot-orange sowie z.B. Erythrozyten und Kollagen gelb-orange an. Sind diese Strukturen ebenfalls angefärbt, wird das Wasser über eine ansteigende Alkoholreihe entfernt und dann mit Euparal eingedeckt. Die einzelnen Färbeschritte sind in Tabelle 4 nochmals genau dargestellt.

Tabelle 4| Ablaufprotokoll der HE- Färbung an Paraffinschnitten

Färbeschritt	**Dauer**
Färben in Mayers Hämalaun	10-12 Minuten
Bläuen in Leitungswasser	10-15 Minuten
Gegenfärben in alkalischer Eosinlösung	45 Sekunden
Differenzieren in Ethanol 70 Vol-%	ca. 5 Sekunden eintauchen
Entwässern in Ethanol 80 Vol-%	10x kurz eintauchen
Entwässern in Ethanol 96 Vol-%	10x kurz eintauchen
Entwässern in Ethanol 100 Vol-%	10x kurz eintauchen
Eindecken in Euparal (Roth)	

3.2.5 Immunzytochemie

3.2.5.1 Fluoreszenzfärbung

Für die Fluoreszenzfärbung wurden die entparaffinierten Schnitte für 10 Minuten in NaCitrat- Puffer (pH 6) in der Mikrowelle (800 Watt) gekocht und über Nacht darin abgekühlt. Dies ist notwendig um die Antigene, die durch die Paraffineinbettung maskiert worden sind, zu demaskieren. Nach der

Demaskierung wurden die Proben mit einem Fettstift umrandet, um die Menge der benötigten Reagenzien so gering wie möglich zu halten und das Verlaufen dieser zu verhindern. Außerdem wurden die unspezifischen Bindungen mit 5 %-igem Ziegenormalserum (NGS, aus dem englischen normal goat serum; in PBS verdünnt) für 1 h bei Raumtemperatur ab gesättigt. Danach wurden die Primär- Antikörper (1. AK) in *Tris Buffered Saline Tween* (TBST) + 0,1 % *Bovines Serumalbumin* (BSA), wie in Tabelle 5 aufgeführt, verdünnt und auf die Präparate gegeben. Diese wurden für 1 h bei 37 °C in einer feuchten Färbekammer inkubiert und vor der Inkubation mit dem Sekundär- Antikörper (2. AK) 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen. Die 2. AK wurden entsprechende der Angaben in Tabelle 5 in PBS verdünnt, auf die Proben pipettiert und ebenfalls für 1 h bei 37 °C in einer feuchten Färbekammer inkubiert. In den darauffolgenden Waschschritten (3 x 5 Minuten mit 1x PBS) wurde der zweite Waschschritt zur DAPI-Färbung der Zellkerne genutzt. Das DAPI wurde 1:1000 in PBS verdünnt und für 5 Minuten auf die Präparate gegeben. Direkt vor dem Eindecken der Proben wurden diese nochmals in Aqua dest. gespült, soweit möglich abgetrocknet und mit speziellem Eindeckmedium von *VectaShield* eingedeckt. Da die Färbungen mit der Zeit verblassen, wurden im Anschluss Aufnahmen der Präparate am konfokalen Laser Scanning Mikroskop *LSM 710* (Zeiss) gemacht.

Tabelle 5| Primär und Sekundär Antikörper für die immunzytochemische Untersuchung. Die jeweils spezifischen Antikörper für die humane bzw. rodente Zielstruktur sind hier mit der verwendeten Abkürzung, dem Herkunftsorganismus/ Wirt, der Verdünnung sowie dem jeweiligen Hersteller und der Bestellnummer aufgelistet.

Primär AK	**Abkürzung**	**Wirt**	**Verdünnung**	**Hersteller/ Bestell-nummer**
Connexin 43	Cx43	Kaninchen	1:400	Santa Cruz/ sc- 6560 R
Myosin	Myo	Maus	1:100	Dianova/ MA1- 26180
N-Cadherin	N-Cad	Maus	1:50	BD/ 610920
α- actinin	α- act	Maus	1:100	Sigma-Aldrich/ A7732
Sekundär AK Zielorganismus	**Konjugat**	**Wirt**	**Verdünnung**	**Hersteller**
Maus	Cy3	Ziege	1:800	Jackson Immunoresearch, UK
Kaninchen	FITC	Ziege	1:400	Jackson Immunoresearch, UK

3.2.6 Lebend-/ Tod- Analyse

Zur besseren Detektion von Vitalparametern der Schnitte und Streifen wurden unter anderem die Zellvitalität wie auch die mitochondriale Aktivität mittels unterschiedlicher Methoden untersucht.

3.2.6.1 Far- Red-/ SYTO 9- Färbung (Untersuchung der Membranpermeabilität)

Der Far- Red (FR)- Assay basiert auf der Reaktion eines fluoreszierenden Farbstoffs, der mit den Aminen der Zelle reagiert. Sind die Zellen nicht mehr vital, so reagiert die Färbelösung sowohl mit den freien Aminen in der Zelle als auch mit denen an der Zelloberfläche. Dies hat zur Folge, dass die Färbung sehr intensiv ist und man keine Abgrenzung zwischen den einzelnen Zellen im Gewebe erkennen kann. Ist das Gewebe noch vital und die Zellen intakt, kann der Fluoreszenzfarbstoff nur mit den Aminen an der Zelloberfläche reagieren. Daraus resultiert eine deutlich schwächere Fluoreszenz, die die Zellstruktur im Gewebe noch gut erkennen lässt. Um jede Zelle noch deutlicher ausmachen zu können, wurde das Gewebe mit SYTO 9 gegengefärbt. Hierbei handelt es sich um einen grün fluoreszierenden Kernfarbstoff, der sowohl die Zellkerne in vitalen als auch in letalen Zellen anfärbt.

Für die Färbeprozedur wurden die Schnitte in 6- Well- Platten (je ein Schnitt pro Well) mit Zellkultureinsätzen der Firma Greiner Bio- One (0,4 µm Porengröße) überführt und unter ständiger Begasung auf Eis bei konstanter Geschwindigkeit geschüttelt. Die FR- Färbelösung wurde mit einer Konzentration von 1:1000 zu den Schnitten gegeben und 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Damit der Farbstoff nicht ausbleicht wurde das ganze System mit Alufolie umwickelt. Danach wurden die Schnitte in PBS gewaschen und in Tissue Tek, zur Herstellung von Kryoschnitten, überführt. Sobald das Tissue Tek durchgekühlt und ausgehärtet war, wurde das an den Rändern des Gewebes überflüssige Tissue Tek entfernt und die Probe auf dem Objektteller befestigt. Mit Hilfe des Kryostaten *Cry- Star HM 560 M V* (Thermo- Scientific) wurden 7 µm (Konvention im Konsortium) dicke Kryoschnitte angefertigt und auf Deckgläschen überführt. Die Schnitte wurden mit der SYTO 9- Lösung gegengefärbt und direkt im Anschluss daran unter dem konfokalen Laserscanningmikroskop *LSM 710* angeschaut.

3.2.6.2 JC-1 Färbung (Untersuchung des Membranpotenzials der Mitochondrien)

Bei dieser Färbung wird durch ein positives Membranpotenzial der Mitochondrien eine Aggregation des Farbstoffes hervorgerufen. Diese Aggregate fluoreszieren bei Anregung in rot und

zeigen die Aktivität der Mitochondrien an. Bei diesem Lebendfarbstoff handelt es sich um 5,5‘,6,6‘-etrachloro- 1,1‘,3,3‘-tetraethylbenzimidazolocarbocyanin Iodid (JC-1, Abbildung 15). Dieser Farbstoff akkumuliert je nach Polarität der Mitochondrienmembran. Ist die Membran hyperpolarisiert, kommt es zur Bildung von JC-1- Aggregaten, die rot fluoreszieren. Fluoresziert das Mitochondrium im grünen Bereich, liegt der Farbstoff als Monomer vor und zeigt an, dass die Membran zu diesem Zeitpunkt depolarisiert ist.

Da die Mitochondrien einer Zelle nicht alle zur gleichen Zeit hyper- bzw. depolarisiert sind, muss man die Aussage über die Vitalität des gesamten Gewebes über die unterschiedliche Polarität der Mitochondrienmembranen auswerten. Je mehr depolarisierte, also grün fluoreszierende Mitochondrien vorhanden sind, desto geringer ist die Vitalität des behandelten Gewebes. Sind etwa gleich viele Mitochondrien rot- bzw. grünfluoreszent, so zeigt dies an, dass das Gewebe noch vital ist.

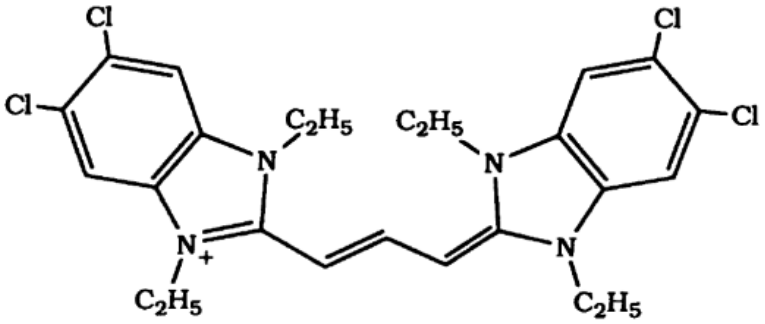

Abbildung 15| Strukturformel von JC-1 in nicht aggregiertem Zustand. Der Lebendfarbstoff 5,5‘,6,6‘-tetrachloro- 1,1‘,3,3‘-tetraethylbenzimidazolocarbocyanin Iodid kurz JC-1, wird angewendet, um die mitochondriale Aktivität in den Zellen der Gewebeschnitte zu ermitteln. JC-1 reagiert auf die unterschiedliche Polarität der Mitochondrien und verändert je nach Polarität seinen Aggregatzustand. Sind die Zellen aktiv, bildet der Farbstoff rot fluoreszierende Aggregate. In nicht aggregiertem Zustand fluoresziert der Farbstoff grün. Nach Smiley et al. (1991)

Da noch keine Protokolle für das Anfärben von Mitochondrien im Gewebe vorhanden waren, wurden verschiedene Protokolle für Zellen ausgetestet und das beste Protokoll als Standard festgelegt. Für die Färbeprozedur musste die JC-1 Lösung mindestens handwarm aber besser 37 °C warm sein, damit bei der Zugabe der Färbelösung in das Medium diese nicht ausfällt. Das zu behandelnde Gewebe wurde vor dem Anfärben in frisches Medium gegeben und dann 1 µl JC-1 Lösung/ 100 µl Medium dazu gegeben. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten bei 37 °C, ein danach folgender Waschschritt wurde ebenfalls für 10 Minuten bei 37 °C mit frischem Medium durchgeführt. Die Untersuchung des Gewebes fand direkt im Anschluss an die Färbung mittels des Laserscanning-mikroskops LSM 710 statt. Die Anregung der JC-1-Monomere liegt bei 488 nm, die der

JC-1- Aggregate bei 633 nm. Die Emission liegt für die Monomere bei 529 nm und für die Aggregate bei 590 nm.

3.2.6.3 MTT-Assay (Untersuchung der Dehydrogenaseaktivität der Mitochondrien)

In diesem Assay wird durch Zugabe des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT; Abbildung 16) zu den Geweben die Vitalität dieser bestimmt. In den durchgeführten Versuchen liegt das Hauptaugenmerk auf der Vitalität der organotypischen Gewebe nach dem Einfrieren und wieder Auftauen. Hierfür wurden die Gewebe, die nach dem Auftauen bei 37 °C als Air- Lift- Kultur kultiviert wurden, mit Messpuffer gespült und in frischen Messpuffer, dem pro 100 µl 18,75 µl MTT-Reagenz zugegeben worden sind, überführt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C bildeten sich blauviolette Kristalle, die die Aktivität der Dehydrogenase in den Mitochondrien anzeigen. Das gelbe Tetrazoliumsalz wurde während dieser Reaktion in blauviolettes, wasserunlösliches Formazan reduziert. Zum Lösen der Kristalle wurde das Gewebe mit Messpuffer gespült und dann 30 Minuten bei 37 °C mit DMSO inkubiert. Die DMSO-Lösung mit dem gelösten Formazan wurde in eine schwarze 96- Well Mikrotieterplatte mit klarem Boden überführt und mit einem *Mithras LB 940* Platereader (Berthold) ausgewertet.

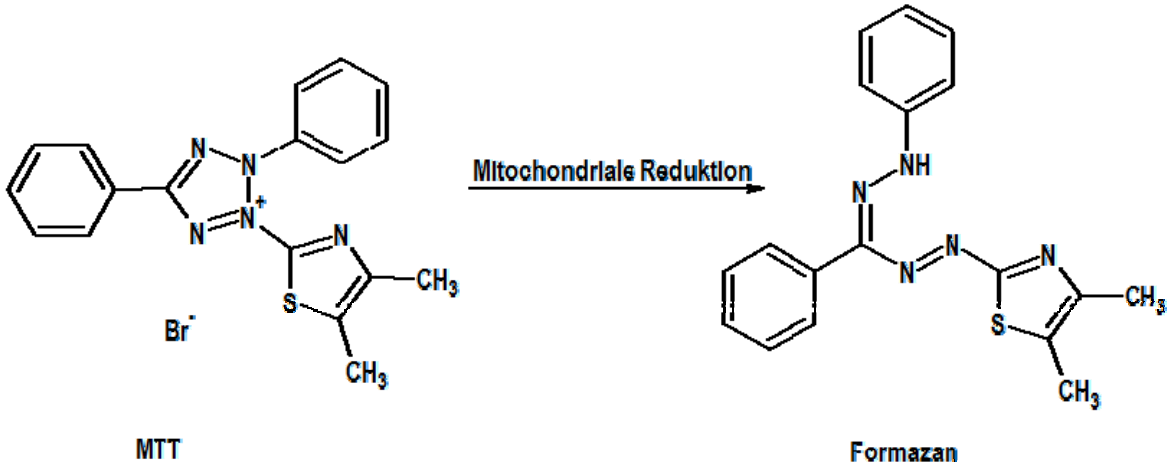

Abbildung 16| Strukturformel der Reduktion von MTT zu Formazan. Abbildung erstellt mit ChemSketch

Dazu wurde die Lösung in den Wells mit Licht der Wellenlänge 540 nm angeregt und die Emission aufgezeichnet. Je mehr Formazan sich während der Verarbeitung des Tetrazoliumsalzes gebildet hatte, desto höher waren die Emissionswerte, also die optische Dichte der Lösung. Die Negativkontrolle diente zum Vergleich mit den gemessenen Werten. Hierzu wurden ein Teil der Schnitte und Streifen in einer Lösung aus DMSO und Messpuffer (80/20) über 24h bei 37° C kultiviert. Im

Anschluss an die Kultivierungsphase wurde die Gewebestücke genauso weiterbehandelt wie oben beschrieben.

3.2.7 Mikroskopische Aufnahmen

Zur Untersuchung der behandelten und unbehandelten Proben wurden verschiedene Mikroskopieverfahren angewandt. Um die Verarbeitung des Tetrazoliumsalzes während des MTT- Tests zu zeigen wurden die Präparate unter dem Stereoskop *Stereo Discovery. V8* (Zeiss) untersucht und abfotografiert. Alle weiteren Analysen der FR-, immunzytochemisch und JC-1 angefärbten Präparate wurden mit Hilfe des konfokalen Laser- Scanning- Mikroskop durchgeführt. Um auch die Ultrastrukturen der Proben untersuchen zu können wurden diese außerdem noch mit dem Transmissionselektronenmikroskop EM 400 (Philips, Eindhoven, Niederlande) angeschaut.

3.2.7.1 Konfokale Laser- Scanning- Mikroskopie

Die Aufnahmen der immunzytochemischen Färbungen der Paraffinschnitte sowie die JC-1- Färbung wurden nicht mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen, sondern mit einem konfokalen Laser- Scanning- Mikroskop (*LSM 710*, Zeiss). Während bei einem konventionellen Lichtmikroskop nicht nur die Bildpunkte in der Fokusebene dargestellt werden sondern auch solche außerhalb dieser Ebene, wird bei einem konfokalen Laserscanningmikroskop nur die Fokusebene dargestellt. Dies hat den Vorteil, dass die Präparate genauer und schärfer dargestellt werden. Das Prinzip, dass hinter der konfokalen Laser- Scanning- Mikroskopie liegt, beruht auf der Verwendung einer Lochblende im Strahlengang des detektierten Lichtes. Die Lochblende verhindert, dass das Licht, welches außerhalb der Fokusebene liegt zum Detektor gelangt. So steigt die Auflösung des Präparates, während die Schärfentiefe sich verringert.

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden in unterschiedlichen Vergrößerungen gemacht. Die 20x- Vergrößerung diente als Übersicht über den gesamten Zustand des Präparates, die 40x- sowie die 63x- Vergrößerungen dienten zur detaillierteren Darstellung der Gewebeschnitte. In den beiden höheren Vergrößerungen wurde Immersionsöl verwendet, um eine Brechung des Lichts an den Übergängen von Deckglas zu Luft zu Objektiv so gering wie möglich zu halten.

3.2.7.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Mit einem Elektronenmikroskop ist es möglich, das Innere einer Zelle sehr detailliert darzustellen. Aus diesem Grund wurden auch die Schnitte und Streifen mittels dieser Methode untersucht. Es gibt verschiedene Methoden der Elektronenmikroskopie, wobei hier die TEM angewandt wurde. Bei dieser Methode werden die Objekte mit Elektronen beschossen und dargestellt. Aufgrund dessen ist es möglich die Schäden an den Schnitten und Streifen im mesoskopischen wie mikroskopischen Bereich genauer beurteilen zu können. Das Hauptaugenmerk wurde auf die Schäden in den Mitochondrien und am kontraktilen Apparat gelegt.

Für die TEM müssen die Präparate sehr dünn sein, da die Elektronen das Objekt durchdringen müssen, um es darstellen zu können. Im Normalfall sind die Schnitte etwa 10 bis 100 nm dick. Zur Herstellung dieser dünnen Schnitte wurden die Herzschnitte und Streifen direkt nach dem Schneiden und Auftauen sowie nach 3 h bzw. 24 h in Kultur in der Fixierungslösung Monti- Graziadei (2 % Glutaraldehyd, 0,6 % Paraformaldehyd in 0,1 M Cacodylate- Puffer bei pH 7,2) über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Dies führt zu einer Vernetzung und somit zu einer Verhärtung der Proteine. Im weiteren Verlauf wurden die Proben einmal für 10 Minuten in PBS gespült und dann in frischem 1 x PBS gelagert. Für die weitere Verarbeitung wurden die Proben in 1 %-igem Osmiumtetroxid nachfixiert. Dies hat zur Folge, dass die Lipide schwarz gefärbt werden. Die anschließende Dehydrierung der Proben erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe. Im Anschluss daran wurden die Proben in Araldite (Fluka, Buchs, Schweiz), einem Acrylharz, eingebettet und in Ultradünnschnitte geschnitten. Waren die Proben nach dem Schneiden trocken, wurden sie mit Kontrastmittel (Uranylacetat und wässrigem Bleizitrat) beschichtet und am Transmissionselektronenmikroskop analysiert. Die Präparate wurden in unterschiedlichen Vergrößerungen durchgeführt um auch geringere Schädigungen des Gewebes nachweisen zu können. Die Präparation sowie die Aufnahmen am Transmissionselektronenmikroskop erfolgten in Kooperation mit der Anatomie des UKSH Lübeck.

3.2.8 Molekularbiologische Analysen

Die molekularbiologischen Analysen wurden sowohl an frischem Gewebe als auch an eingefrorenem und wieder aufgetautem Gewebe durchgeführt. Die Proben sind direkt nach dem Schneiden bzw. dem Auftauen und jeweils nach 3 h und 24 h in Air- Lift- Kultur in *RNAlater* überführt und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert worden. Die Schnitte und Streifen wurden auf die Expression von herzspezifischen Proteinen untersucht, die für die Funktionalität des Gewebes notwendig sind. Zu diesen gehörten Gja1, Slc8a1, Atp1a1, Atp1b1 und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

als Haushaltsgen. Gja1, auch Connexin 43 genannt, ist ein Transmembranprotein, das eine wichtige Rolle bei der Kopplung benachbarter Zellen spielt. Slc8a1 ist für den Natrium- Kalzium- Austausch in der Zelle verantwortlich und somit auch am elektrischen Verhalten der Muskelzelle maßgeblich beteiligt. Atp1b1 und Atp1a1 sind, wie der Name schon sagt, für die ATP- Herstellung in der Zelle notwendig. Die Natrium- Kalium- ATPase sorgt für den ständigen Austausch von Natrium und Kalium in der Zelle, sodass immer genug Energie für die Kontraktion vorhanden ist. Als Haushaltsgen hat sich bei diesen Versuchen die GAPDH bewährt. Dies ist ein Enzym das in der Glykolyse eine sehr wichtige Rolle spielt und daher unabhängig vom Zelltyp immer exprimiert wird. Man verwendet als Haushaltsgene typischerweise Gene, die mit dem Grundstoffwechsel der Zellen zusammenhängen.

3.2.8.1 RNA-Isolation

Die für die Synthese der komplementären DNA (cDNA, aus dem englischen *complementary* DNA) benötigte RNA wird mit Hilfe des Nukleinsäureaufreinigungsroboters *QIAcube* (Qiagen) und dem *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* aus den Proben gewonnen. Dieses Kit ist speziell für die optimale Zelllyse von Muskelgewebe wie z.B. die des Herzens entwickelt worden. So werden die Proben zusätzlich mit Proteinase K sowie DNase1 verdaut, um eine bessere Ausbeute an RNA zu erhalten und möglichst die gesamte DNA, die in der Probe enthalten ist, zu eliminieren.

Bevor die Proben zur RNA-Isolation in den *QIAcube* überführt werden konnten, musste das Gewebe zerkleinert werden. Dazu wurden die in *RNAlater* gelagerten Proben mit PBS gespült, ohne jegliche Flüssigkeit in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in LN_2 schockgefroren. Die gefrorenen Proben wurden mit einer spitzen Schere möglichst fein zerkleinert und in RLT- Lysispuffer, der mit 10 µl/ml β- Mercaptoethanol versetzt wurde, überführt. Um zu gewährleisten, dass möglichst viele Zellen im Gewebe aufgeschlossen werden, wurden die kleinen Gewebestücke nochmals durch Kanülen der Gr. 1 mit einem Durchmesser von 0,9 mm zerkleinert. Die so behandelten Proben wurden dann wie im Protokoll des Herstellers angegeben weiter verarbeitet. Am Ende des Programms wird die RNA in 30 µl RNase- freiem Wasser eluiert.

3.2.8.2 Bestimmung der RNA-Menge

Die genaue RNA-Konzentration sowie eventuelle Verunreinigungen wurden mit Hilfe des *Nanodrop1000* Spektrometer (Peqlab) bestimmt. Hierfür wurden 2 µl der RNA auf den Lichtweg gegeben und die Absorption in zwei unterschiedlichen Laufstrecken (1 mm und 0,2 mm) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Nukleinsäuren haben bei dieser Wellenlänge ihr

Absorptionsmaximum und aus der so erhaltenen optischen Dichte (OD) konnte die in der Probe enthaltene RNA- Konzentration berechnet werden. Um die Reinheit der RNA ermitteln zu können, wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm bestimmt. Aus dem Verhältnis der OD260 zu OD280 kann auf die Reinheit der Probe geschlossen werden. Liegt dieses Verhältnis bei einer Rate um 2,0 kann man laut Herstellerprotokoll von „reiner" RNA ausgehen. Liegt dieser Wert hingegen deutlich unter 2,0 kann das ein Hinweis auf verunreinigte RNA sein.

3.2.8.3 Reverse Transkription

Die für die quantitative real time PCR (qRT- PCR) benötigte DNA wurde durch die cDNA-Synthese der gewonnenen RNA hergestellt. Diese Synthese erfolgte über das *QuantiTect® Reverse- Transcription- Kit*, welches nach Protokollangaben durchgeführt wurde. Hierzu wurden 500 ng x μl^{-1} RNA eingesetzt die mittels des gDNA Wipeout Buffers bei 42 °C für 2 Minuten von genomischer DNA (gDNA) befreit wurde. Zu dieser Probe wurde dann der Mastermix (MM, siehe Tabelle 6) zugefügt und nochmals für 30 Minuten bei 42 °C inkubiert. Während dieser Reaktion wurde die vorhandene RNA durch die Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Der im MM enthaltene Primermix enthält ein in Wasser gelöstes, optimiertes Gemisch an oligo-dT und random Primern. Dies gewährleistet, dass die cDNA-Synthese von allen Regionen der RNA- Abschnitte sowie dem 5'- Ende der RNA möglich ist und größere Mengen an cDNA erhalten werden. Die für die DNA- Replikation notwendigen Desoxyribonukleosidtriphosphate sind im RT- Puffer des MM enthalten. Um die RT zu inaktivieren, wurde am Ende des Inkubationsschritts der Reaktionsmix für drei Minuten auf 95 °C erhitzt. Nach Beendigung der cDNA- Synthese wurde diese mit 180 µl RNase- freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt und bei -20 °C weggefroren.

Tabelle 6| Mastermix (MM) für die Generierung von cDNA aus RNA. Angezeigt werden die Komponenten und die jeweiligen Volumina, die zur Erstellung des MM benötigt werden.

Komponente	Volumen 1x
Reverse Transkriptase (RT)	1 µl
RT- Puffer	4 µl
RT- Primermix	1 µl
Eingesetztes Volumen je Probe	6 µl

3.2.8.4 SingleCell PCR

Aufgrund der Tatsache, dass bei der RNA- Isolation der eingefrorenen und wieder aufgetauten Gewebe zum Teil nur sehr geringe Mengen (≤ 50 ng x μl^{-1}) an RNA gewonnen werden konnten, wurde die cDNA-Synthese mit dem *AmpliSpeed Slide Cycler ASC200D* (Advalytix/ Beckmann Coulter) und einem speziellen Kit für die SingleCell- PCR durchgeführt.

Zu Beginn wurden die benötigten Primer 1:10 verdünnt und je 1 µl auf die speziell dafür vorgesehenen AmpliGrid- Objektträger (Abbildung 17) aufgetragen. Auf die bei 37 °C angetrockneten Primer wurden im darauffolgenden Schritt die Mastermixe (MM) mit der jeweiligen RNA, die zu cDNA synthetisiert werden sollte, aufgetragen. Die MM bestanden jeweils aus den in Tabelle 7 aufgetragenen Komponenten. Es wurde je 1 µl des jeweiligen MM in eine Vertiefung auf dem AmpliGrid-Objektträger gegeben und mit 5 µl *SealingSolution* überschichtet, um ein Verdunsten des Reaktionsmixes zu verhindern. Das verwendete Programm zur cDNA- Synthese sah wie folgt aus: Je ein Inkubationsschritt für 10 Minuten bei 42 °C sowie bei 50 °C, während derer die RNA- Sekundärstruktur aufgeschmolzen wurde um die RT- Ausbeute zu erhöhen. Danach folgte die cDNA- Synthese bei 58 °C für 30 Minuten und zum Deaktivieren der RT wurde nochmals 2 Minuten bei 97 °C inkubiert. Sobald das Programm beendet war, wurde der Objektträger zum Abkühlen kurz auf einen Kühlblock abgelegt und dann weiter verarbeitet.

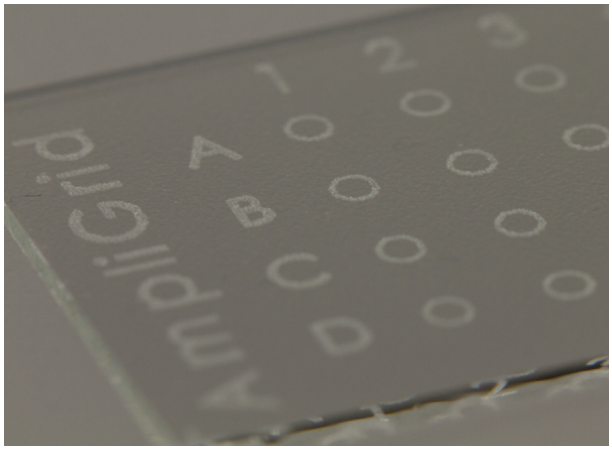

Abbildung 17| AmpliGrid- Objektträger. Der spezielle Objektträger der Firma Advalytix wird für die Single-Cell- PCR eingesetzt. Dieser besteht aus 48 speziell beschichteten Reaktionsspots, die es ermöglichen, dass der jeweilige 1 µl Reaktionsmix und die darüber geschichtete SealingSolution während der Reaktion nicht ineinander laufen.

Tabelle 7| Volumenangaben für den Reaktionsmix der cDNA- Synthese in der SingleCell PCR. Angezeigt werden die Komponenten und die jeweiligen Volumina, die zur Erstellung des Reaktionsmixes benötigt werden.

Komponente	Volumen 1x
2x Single Cell RT Reaction Buffer	0,50 µl
RNase Inhibitor (10 U/ µl)	0,02 µl
5x Single Cell RT Enhancer	0,15 µl
Single Cell RT Enzyme Mix	0,04 µl
Gesamt RNA	0,1 µl
Nuclease free water	1 µl
Eingesetztes Volumen je Probe	1 µl

Nach der cDNA- Synthese fand in einer qRT- PCR die weitere Verarbeitung der cDNA statt, welche in Tripletts durchgeführt wurde. Die für die Quantifizierung benötigten Primer wurden mit SYBR® Green 1 sowie Nuklease freiem Wasser angesetzt. Die eingesetzten Mengen sind in Tabelle 8 angegeben.

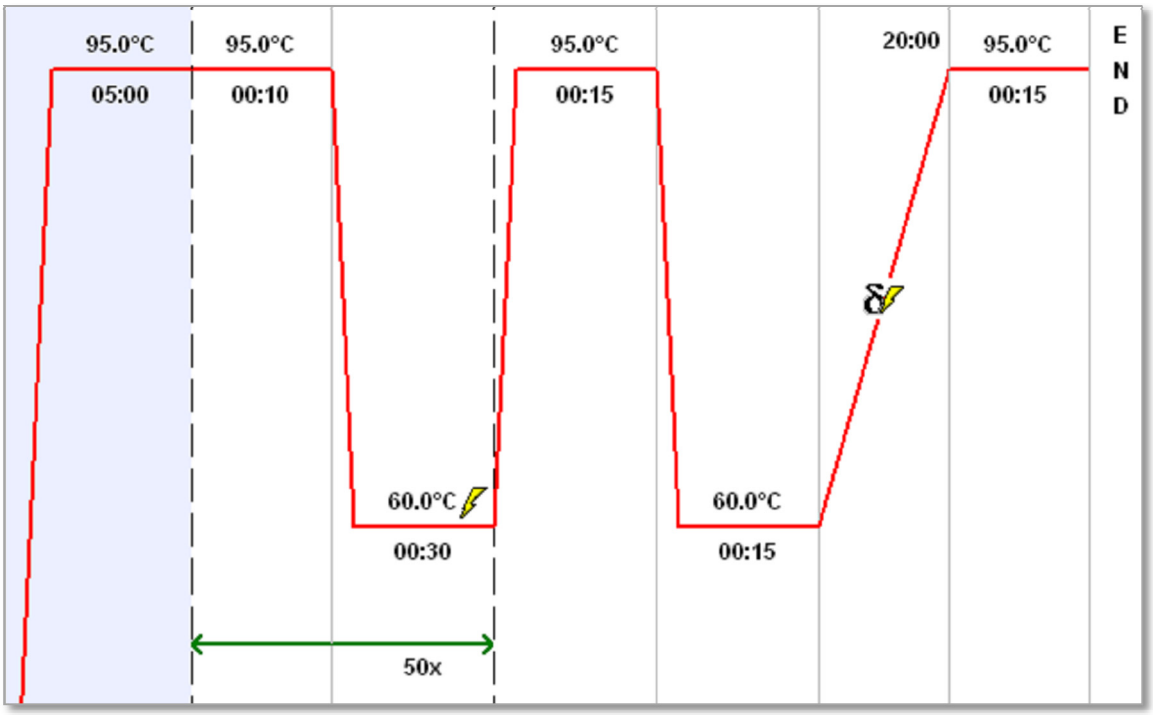

Abbildung 18| Schematische Darstellung des qRT-PCR Programms. Die Proben wurden zu Beginn des Programms auf 95 °C erwärmt, um die Hotstart- Polymerase zu aktivieren. Die darauffolgenden 50 Zyklen zeigten immer den gleichen Ablauf. Zur Aufschmelzung der DNA wurde die Probe für 10 Sekunden auf 95 °C erhitzt. Das Primerannealing und die Fluoreszenzmessung erfolgten dann für 30 Sekunden bei 60 °C. Um eine genaue Schmelzkurvenanalyse zu erhalten, wurden am Ende des Programms die Proben um 1,75 °C pro Minute von 60 °C auf 95 °C erhitzt und während dieser Zeit kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen.

Die Übertragung der cDNA vom AmpliGrid- Objektträger in die Multiwell-Platte erfolgte mittels Zugabe von 4 µl Nuklease freiem Wasser, welches, vermischt mit dem Amplifikat, wieder aufgenommen und überführt wurde. Je 9 µl der bereits angesetzten Primermixe wurden im Anschluss daran noch zu dem Amplifikat gegeben.

Tabelle 8| Volumenangaben der eingesetzten Komponenten für die Mastermixe der qRT-PCR.

Komponente	Volumen 1x
SYBR® Green 1	6,25 µl
Primer	1,25 µl
Nuklease freies Wasser	1,5 µl
Eingesetztes Volumen je Probe	9 µl

Um die Verdunstung der Proben während der Amplifikation zu verhindern, wurde die Multiwell- Platte mit einer Folie versiegelt und zur besseren Vermischung der Proben mit der Zentrifuge *Allegra® X-15R* (Beckman Coulter) bei maximal 4750 x g zentrifugiert. Die qRT- PCR fand unter Verwendung des Mastercyclers ep Realplex^2 mit dem in Abbildung 18 dargestellten Programm statt.

3.2.9 Quantitative Real-time PCR

Bei der qRT- PCR wird die Quantifizierung von Nukleinsäuren in Echtzeit dargestellt. Das Prinzip dieser Methode ist der sogenannte „Fluoreszenz- Resonanz- Energie-Transfer“ (FRET). Hierbei interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green 1 in der doppelsträngigen DNA und erhöht so die messbare Fluoreszenz.

Wie auch bei der SingleCell- PCR fand nach der cDNA- Synthese eine Quantifizierung der vorhandenen Gene in den Proben statt. Dies geschah in Dreifachansätzen in Multi- Well- Platten wobei der Reaktionsmix aus den in Tabelle 9 aufgeführten Komponenten zusammengesetzt wurde.

Tabelle 9| Volumenangabe der eingesetzten Komponenten des Reaktionsmix für die qRT-PCR.

Komponente	Volumen 1x
cDNA oder NTC	10,0 µl
SYBR® Green 1 Master Mix	12,5 µl
Primer- Mix	2,5 µl
Eingesetztes Volumen ja Probe	25,0 µl

Zur Überprüfung der Probe auf eventuell vorhandene gDNA wurden während der cDNA- Synthese Proben auch ohne Reverse Transkriptase umgeschrieben. Diese wurden als Non Template Control (NTC) für jede Probe während der qRT- PCR eingesetzt. Der gesamte Ablauf der qRT- PCR wurde mittels des Mastercyclers ep Realplex^2 (Eppendorf) durchgeführt. Der Ablauf der Reaktionen während der PCR ist in Abbildung 18 dargestellt. Zur Aktivierung der Hotstart- Polymerase wurden die Proben zu Beginn des Programms auf 95 °C erwärmt und für 5 Minuten bei dieser Temperatur belassen. Die danach folgenden 50 Zweischrittamplifikationszyklen setzten sich jeweils aus einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 10 Sekunden zur Aufschmelzung der DNA, und einem Annealingschritt bei 60 °C für 30 Sekunden für das Primerannealing und die Amplifikation durch die Polymerase zusammen. Am Ende jedes Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen. Im Anschluss an die 50 Zyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, wobei die Proben von 60 °C um 1,75 °C x min^{-1} auf 95 °C erhitzt und währenddessen kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen wurde. Für die gewonnenen Daten wurde mit Hilfe des *CalQplex*® Algorithmus der Schwellenwertzyklus (Ct) für jedes Amplifikat berechnet. Hier wird das Maximum der zweiten Ableitung berechnet, welches den größten Zuwachs an PCR- Produkten anzeigt. Für die relative Quantifizierung wurde die ΔΔCt- Methode angewandt. Diese Methode beruht auf der Normalisierung der Ct- Werte gegen eine endogene Kontrolle, in diesem Fall GAPDH, und der anschließende Vergleich zwischen einer unbehandelten (nicht eingefrorene Probe) und einer behandelten (eingefroren und wieder aufgetaute Probe) Probe. Das relative Genexpressionslevel (rG) der untersuchten Gene erhält man, wenn die gewonnen Daten mittels $rG = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ berechnet werden.

3.2.9.1 Kapillargelelektrophorese

Die Kapillargelelektrophorese (Qiagen) wurde zur Validierung der qRT- PCR- Daten durchgeführt. Hierzu wurden die PCR- Produkte elektrophoretisch aufgetrennt, wodurch die DNA- Fragmente anhand ihrer Größe in einem elektrischen Feld separiert werden.

Die Probe wurde bei diesem Vorgang bei angelegten 5 kV für zehn Sekunden in die Kapillare gezogen und für weitere 5 Minuten bei gleicher Spannung aufgetrennt. Durch das in den Kapillaren vorhandene, mit Ethidiumbromid versetzte Polymergel ist es möglich, die DNA- Fragmente zu detektieren, da diese mit dem Ethidiumbromid interkalieren. Für die bessere Auswertung und den Ausgleich von kleinen Unterschieden zwischen den Kapillaren wurde ein Alignmentmarker, der aus Fragmenten zwischen 15 und 500 bp (QIAxcell Alignment Marker) besteht, sowie die Software BioCalculator 3.0 verwendet. Weiterhin wurde ein DNA- Größenstandard (QX DNA Size marker

pUC18/HaeIII) verwendet, mit dem die Längenbestimmung der detektierten Fragmente ermöglicht wurde.

3.2.10 Elektrophysiologische Messungen

3.2.10.1 Mikroelektroden-Array (MEA)

Zur Ermittlung der elektrischen Signale in den frischen sowie eingefrorenen und wieder aufgetauten Geweben wurde das MEA (Multi Channel Systems, Abbildung 9) verwendet. Dieses System nimmt über 60 Elektroden (Abbildung 19 c, d (Pfeil)) die elektrischen Feldpotenziale (FP) der Gewebeproben auf. Diese Elektroden bestehen aus TitaniumNitride (TiN), haben einen Durchmesser von 30 µm und eine Interelektrodendistanz von 200 µm. Die Impedanz der Elektroden liegt bei 30-50 kΩ. Des Weiteren haben sie eine interne Referenz und eine Isolation aus 500 nm Silikonnitriden.

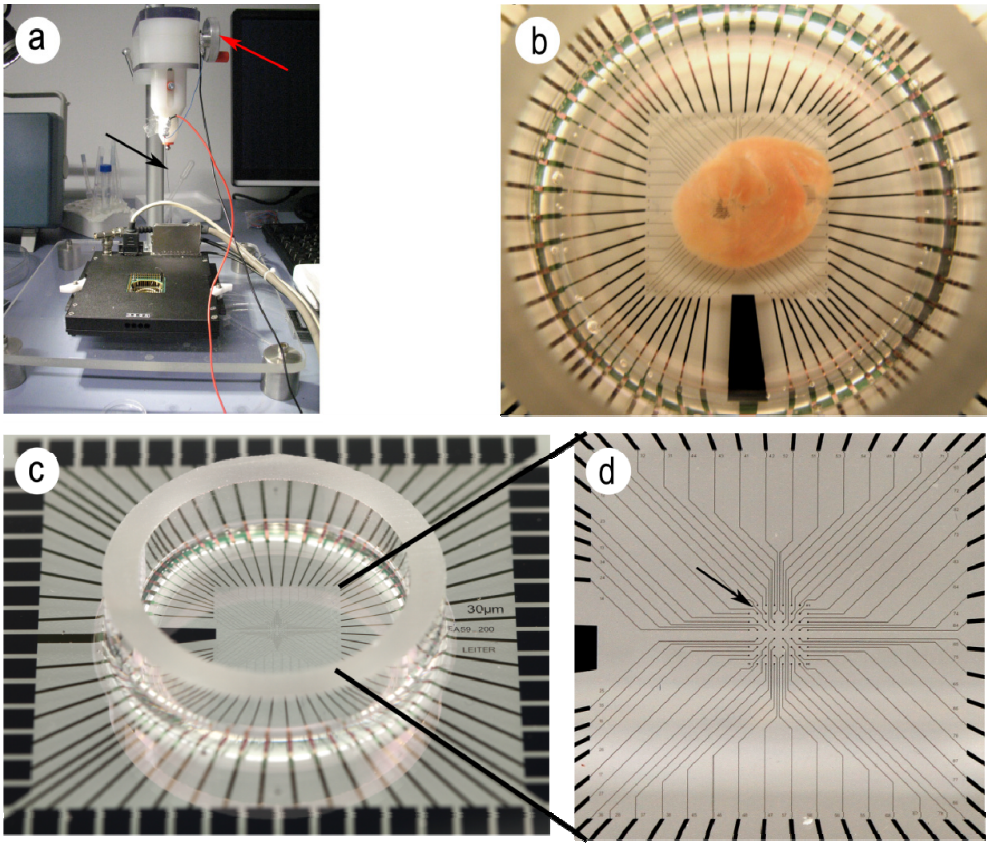

Abbildung 19| Mikroelektroden-Array (MEA). Versuchsaufbau des MEA (a). Über eine scharfe Elektrode (a, schwarzer Pfeil), die an einer fein justierbaren Halterung (a, roter Pfeil) befestigt war, wurden die Schnitte (b) stimuliert. Die durch die Stimulation hervorgerufenen Feldpotenziale wurden über die 60 Elektroden (c, d (Pfeil)), die in den Glasboden des MEA eingelassen sind, abgeleitet.

Die Verbindung der Elektroden zum Computer wird über 60 Kontaktelektroden, die im Außenbereich des MEA liegen, gewährleistet. Die externe Stimulation über eine spitze Elektrode (Tungsten, Standard Spitze, Abbildung 19 a (schwarzer Pfeil)) wird über den Stimulationsgenerator *STG 2004* (Multi Channel Systems) ermöglicht, der die vom Gewebe kommenden FP's an einen Verstärker weiterleitet, welcher die FP's mittels eines speziellen Programms (McRack) darstellt. Mit dem Stimulationsgenerator wurden Rechteckimpulse von 1,5 V und einer Zeitspanne von 1 ms sowie 1 s Impulspause generiert. Die zu stimulierenden Gewebeproben wurden aus der Air- Lift- Kultur mittels des Aufnehmers auf die Elektroden überführt (Abbildung 19 b), die bereits mit frischem, 37 °C warmen und Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2) begasten Messpuffer benetzt waren. Um ein Aufschwimmen des Gewebes zu verhindern, wurde dieses mit Gase und einem speziell angefertigten Metallring beschwert (ohne Abbildung). Die Stimulationselektrode war an einem Halter befestigt mit dem man die genaue Position einstellen konnte (Abbildung 19 a, roter Pfeil) an der das Gewebe stimuliert werden sollte. Die Stimulation lief immer über 15 Minuten. Als Positivkontrolle wurde jeweils ein frischer Schnitt gemessen und dann mit dem behandelten Gewebe verglichen.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung und Kultivierung organotypischer Gewebeschnitte vor und nach dem Einfrier- und Auftauvorgang

Die optimalen Kultivierungsbedingungen für die aus dem Rattenherzen und humanen Herzen gewonnen Gewebeschnitte wurden zu Beginn der Arbeit mittels der Kultur an der Luft-Flüssigkeits-Grenze (Air-lift-Kultur) untersucht (Abbildung 20). Durch die Zugabe von Insulin, Transferrin und Selenin (Viero et al., 2008), anstelle von FKS, in das Kulturmedium, konnten die gewonnenen Gewebeschnitte über einen Zeitraum von bis zu 30 Tagen in Kultur gehalten werden (ohne Abbildung). In Versuchen von Viero et al (2008) konnte gezeigt werden, dass Kardiomyozyten, die mit diesen Zusätzen kultiviert wurden, u.a. ihre Kontraktilität über einen Zeitraum von 10 Tagen sehr gut erhalten konnten. Die Versorgung der Schnitte also besser war als mit FKS.

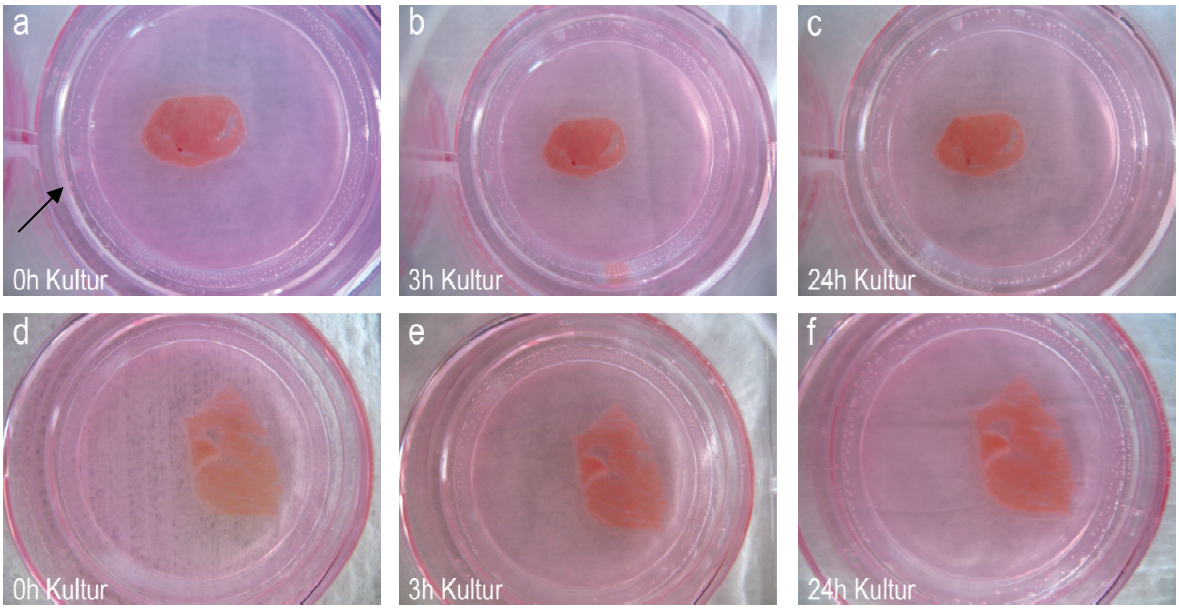

Abbildung 20| Rattenherzschnitte und humane Herzschnitte in Kultur. Die Schnitte des Rattenherzens (a-c) wie auch die Herzschnitte aus dem humanen Gewebe (d-f) zeigten im Verlauf der Kultur rein optisch nur geringe Veränderungen. Die Air-Lift-Kultivierung erfolgte auf speziellen Inserts (Pfeil). Nach 24 h in Kultur konnte bei beiden Spezies (c, f) eine verringerte Zugfestigkeit festgestellt werden.

Die Hauptuntersuchungen an den Gewebeproben wurden stets nach 0 h, 3 h und 24 h in Kultur vorgenommen. Innerhalb dieser Zeitabschnitte zeigten sich die größten Veränderungen in der Gewebestruktur und auch in der Vitalität der Gewebeschnitte. Dabei waren zwischen den Spezies Unterschiede auszumachen. Nach längerer Kultivierung wurden die Abweichungen auffallend

stärker. Das humane Herzgewebe konnte wesentlich länger kultiviert werden als die Präparate aus Gewebe des Rattenherzens. So konnte bei den Gewebeproben des Rattenherzens nach einer Kultivierungszeit von 7 Tagen nur noch eine geringe Vitalität gezeigt werden. In den humanen Gewebeschnitten konnte auch nach 30 Tagen noch mitochondriale Aktivität nachgewiesen werden. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Kultivierung der organotypischen Gewebeschnitte möglich ist, wurden diese in unterschiedlichen Kryomedien eingefroren und nach dem Auftauen unter den bereits validierten Kultivierungsbedingungen kultiviert. Die Analyse der kryokonservierten Gewebeproben ergab, dass die Vitalität dieser Proben mit der Kultivierungsdauer deutlicher abnahm, als bei den nicht eingefrorenen Geweben. Es war offensichtlich, dass die Schnitte und Streifen durch den Einfrier- und Auftauprozess geschädigt worden waren.
Zur Validierung der Vitalität, und damit zur Bestimmung der Lebensfähigkeit der Proben, wurden zu Beginn der Arbeit verschiedene Parameter ausgetestet. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden unterschiedliche Einfrierprotokolle getestet und die erfolgreichsten weiter verwendet.

4.2 Vitalitätstests

Zur Untersuchung der Vitalität der Gewebeschnitte wurden unterschiedliche Methoden angewandt. Die Far-Red-/ SYTO9-Färbung (4.2.1) wurde verwendet, um in einem ersten Schritt die Intaktheit der Zellen im Allgemeinen zu untersuchen. Die mitochondriale Aktivität wurde mittels des MTT-Assays (4.2.2) und der JC-1-Färbung (4.2.3) ermittelt. Der MTT-Assay basiert auf der Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes, welches durch die Reduktion in den Mitochondrien blaue Formazankristalle bildet. Die JC-1-Färbung hingegen zeigt die Potenzialdifferenz der Mitochondrienmembran durch die Fluoreszenz in unterschiedlichen Wellenlängen an.

4.2.1 Far- Red- /SYTO 9- Färbung

Mittels der Far-Red-/ SYTO 9-Färbung konnte gezeigt werden, dass eine Schädigung der behandelten Schnitte im Vergleich zu den unbehandelten Schnitten vorlag. Die Färbung sowie die Aufnahmen wurden direkt nach dem Auftauen angefertigt und immer nach dem gleichen Protokoll durchgeführt. Der Far-Red-Farbstoff bindet ubiquitär an Proteinase und ist nicht membrangängig. Eine zytoplasmatische Färbung zeigt deshalb eine Schädigung der Zellmembran an. Die SYTO 9-Färbung (siehe Abschnitt 3.2.6.1) ist eine Kontrollfärbung, mittels derer die Zellkerne (speziell das Chromatin) grün angefärbt werden. Diese sind dann unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 498 nm deutlich zu erkennen und gut zu detektieren. Die unbehandelten Schnitte

zeigten eine geringe Schädigung der äußeren Bereiche (Abbildung 21 a), die auf das Schneiden mit dem Vibratom zurückzuführen ist. Im Vergleich dazu konnte eine ausgeprägte Rotfärbung an den Rändern des mit EM behandelten Schnittes (Abbildung 21 b) ausgemacht werden. Ein Hinweis darauf, dass nicht nur die oberste Zellschicht der Schnitte geschädigt wurde, sondern es auch zu Schädigungen im Inneren des Gewebes gekommen war. Im Gegensatz zu dem mit EM eingefrorenen Schnitt, zeigten in kommerziellem EM eingefrorene Schnitte (IBIDI, Abbildung 21 c) ein besseres Ergebnis in ihrer Intaktheit. Um ausschließen zu können, dass die Gewebeveränderungen in dem kryokonservierten Schnitt nicht durch das Einfriermedium (DMSO etc.) hervorgerufen wurden, wurde ein Schnitt für 80 min bei 4 °C in EM kultiviert (Abbildung 21 d).

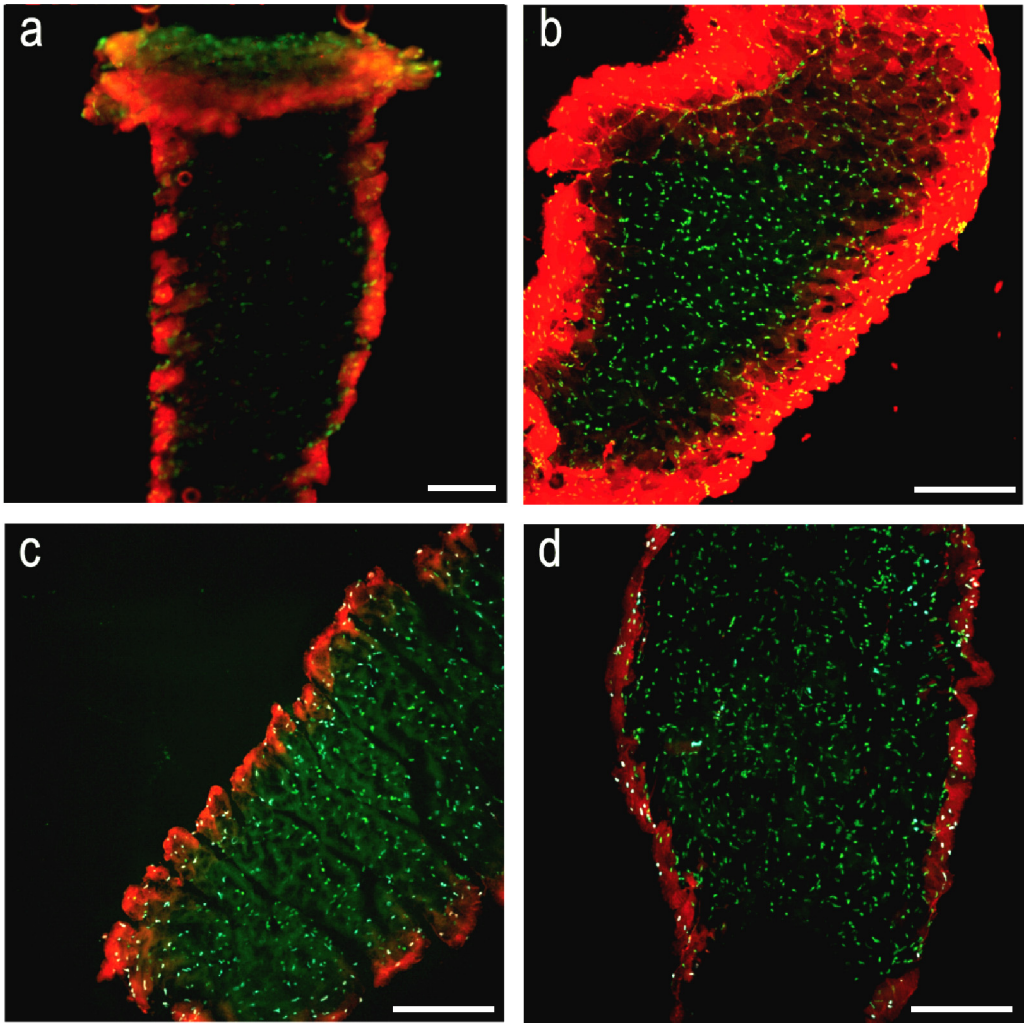

Abbildung 21| Far Red/ SYTO 9- Färbung. Im Vergleich zwischen den direkt nach dem Schneiden gefärbten Schnitten (a) und den in Einfriermedium (EM) eingefrorenen Schnitten (b), war zu erkennen, dass die Far-Red-Färbung an den Rändern der eingefrorenen Schnitte etwas stärker war, als bei den frischen Schnitten. Die Schnitte, die in einem kommerziellen EM (c) eingefroren wurden, zeigten bessere Ergebnisse, als solche Schnitte, die in eigenem EM (b) eingefroren wurden. Für den Nachweis, dass das EM ohne Einfrierprozess keine schädigende Wirkung auf die Schnitte hatte, wurden diese für 80 min bei 4 °C in EM kultiviert (d) und im Anschluss daran gefärbt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zu den akuten Schnitten festgestellt werden. Die Größenbalken entsprechen 100 µm.

Ein Zeitraum von 80 min wurde gewählt, da das Einfrieren der Schnitte bei 1 °C/ min auf -80 °C 80 min dauerte. Im Anschluss daran durchgeführte Untersuchungen ergaben, dass die Schädigungen nicht auf das EM zurückzuführen waren, sondern durch die Kryokonservierung hervorgerufen worden sein müssen.

4.2.2 MTT-Assay

Die in 4.2.1 geschilderten Ergebnisse legen zunächst nahe, dass die Schnitte durch die Behandlung mit einem kommerziellen Einfriermedium die Kryokonservierung tendenziell besser überleben als mit den im Labor hergestellten Kryomedien. Da die Unterschiede jedoch nicht signifikant waren, wurden die weiteren Experimente nur noch mit denen im Labor produzierten Einfriermedien durchgeführt. Zur weiteren Analyse der Vitalität wurde der MTT-Assay angewandt.

4.2.2.1 Rattengewebe

Die Schnitte des Rattenherzens (Abbildung 22), die direkt nach dem Schneiden untersucht wurden, zeigten eine geringere Umsetzung des Tetrazoliumsalzes als jene, die 3 h in Kultur waren. So lag die gemessene optische Dichte (OD) bei einer Anregungswellenlänge von 540 nm bei 10,7 direkt nach dem Schneiden und bei 16,2 nach 3 h Kultivierung. Einen Tag nach dem Schneidevorgang zeigte sich eine leichte Abnahme, dennoch lag der OD-Wert noch über dem der Akut-Messung. Der Unterschied zwischen den Schnitten die in EM und EM + BDM eingefroren wurden, war sehr gering. Direkt nach dem Auftauen konnten bessere Werte der in EM eingefrorenen Schnitte gemessen werden. Bei den Schnitten, die in EM eingefroren wurden, lag die OD direkt nach dem Auftauen deutlich unter dem Wert der frischen Schnitte. Im weiteren Verlauf der Kultivierung nahmen diese Werte weiter ab. Nach 24 h hatte sich die gemessene OD im Vergleich zum 3 h-Wert nochmals fast halbiert. Die Schnitte, die im EM + BDM eingefroren waren, wiesen im Vergleich zu den in EM eingefrorenen nochmals geringere Werte der OD auf. Die Negativkontrolle (nK) lag bei einer OD von etwa 0,6. Daraus folgt, dass die Schnitte, die eingefroren waren, auch nach 24 h noch vitale Zellen beinhalteten.

Um zu überprüfen, ob die rapide Abnahme der Vitalität der eingefrorenen Schnitte auf unzureichende Eindiffusion des Einfriermediums zurückführbar sei, wurden die Diffusionswege verkürzt. Es wurden statt dünner Schnitte Streifen von ca. 10 mm Länge, 500 µm Breite und 300 µm Dicke verwendet. Anhand derer sollte geprüft werden, ob diese den Einfrier- und Auftauvorgang besser überstehen. Hier zeigte sich, dass die Streifen (Abbildung 23) direkt nach dem Schneiden eine

höhere Vitalität aufwiesen als die Schnitte. Allerdings sank diese innerhalb der 24-stündigen Kultivierungsphase deutlich stärker ab als in den Schnitten. Im Vergleich zu den Schnitten zeigte sich auch bei den Streifen, dass durch den Einfrier- und Auftauvorgang die Vitalität der Mitochondrien im Gewebe stark abgenommen hatte.

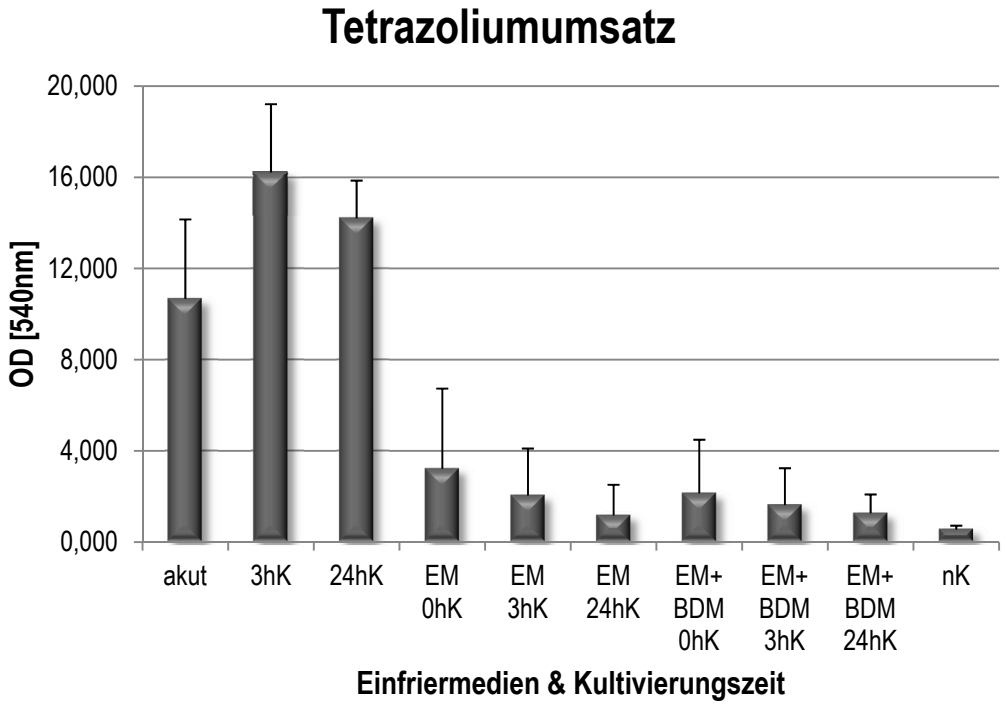

Abbildung 22| Tetrazoliumumsatz der Schnitte aus Rattenherz. Die Umsetzung des Tetrazoliumsalzes in den Mitochondrien der untersuchten Schnitte zeigte deutliche Unterschiede zwischen den unbehandelten und den eingefrorenen Schnitten. Die OD-Werte der unbehandelten Schnitte lagen akut bei 10,7 und stiegen nach 3 h Kultur auf 16,2 an um nach 24 h auf 14,2 abzusinken. Die OD-Werte der in EM eingefrorenen Schnitte lagen direkt nach dem Auftauen bei 3,2 und fielen nach 3 h auf 2,0 bzw. nach 24 h auf 1,2 ab. Bei den in EM + BDM eingefrorenen Schnitten lag der 0 h Kulturwert der OD bei 2,1. Nach 3-stündiger Kultivierung lag dieser bei 1,6 und nach 24 h bei 1,3. Die nK hatte einen Wert von 0,6.

Die Unterschiede zwischen dem EM und EM + BDM waren nur sehr gering, dennoch zeigte das EM direkt nach dem Auftauen leicht schlechtere Werte, als das EM + BDM. Im weiteren Verlauf der Kultivierung zeigte sich, dass die Streifen, die in EM eingefroren wurden, eine etwas bessere Vitalität hatten. 24 h nach dem Auftauen konnte fast kein Unterschied der OD mehr festgestellt werden.

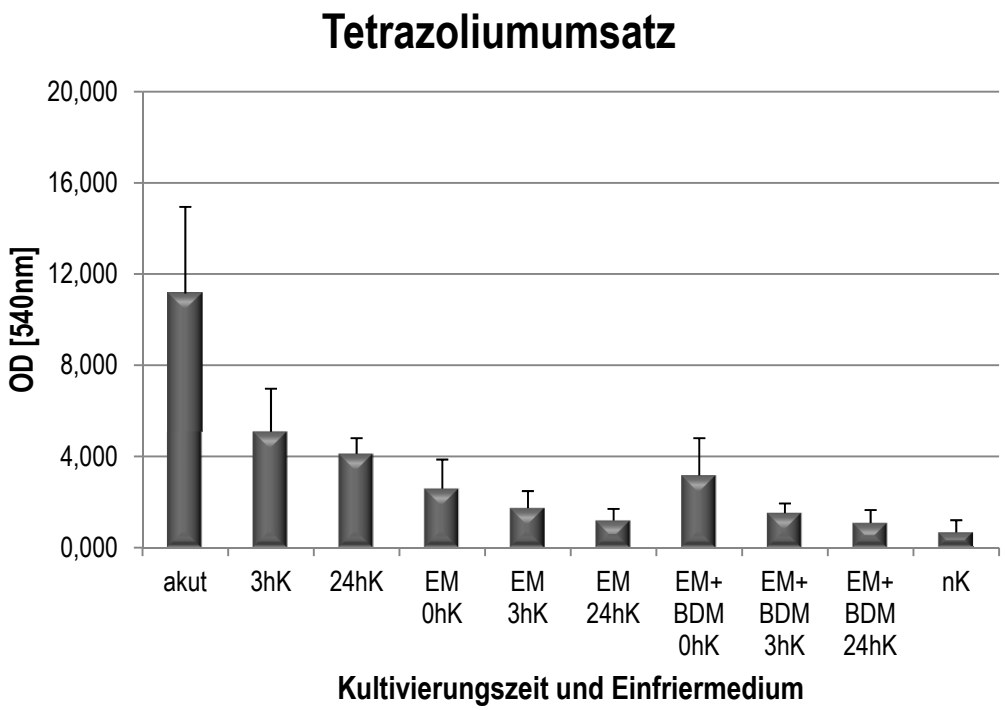

Abbildung 23| Tetrazoliumumsatz der Streifen aus Rattenherzschnitten. Die Verarbeitung des Tetrazoliumsalzes zu Formazan zeigte, dass die Vitalität der Mitochondrien durch das Einfrieren der Gewebe im Vergleich zu den unbehandelten Streifen stark zurück ging. Die gemessene OD lag direkt nach dem Schneiden bei 11,2.Nach 3 h in Kultur war diese auf 5,1 abgesunken und nach 24 h auf 4,1. Die behandelten Streifen zeigten deutlich geringere Werte schon direkt nach dem Auftauen. Hier lagen die Werte für die OD bei 2,6. 3 h nach dem Auftauen bei 1,7 und nach 24-stündiger Kultur bei 1,2. Die OD für die mit EM + BDM eingefrorenen Streifen nach 0 h in Kultur lagen mit 3,2 etwas höher als die der in EM eingefrorenen Streifen. Die Werte nach 3 h und 24 h in Kultur mit 1,5 und 1,1 wieder geringer. Die nK lag bei 0,6.

4.2.2.2 Humanes Gewebe

Neben den Schnitten und Streifen aus Rattenherzgewebe konnten auch Untersuchungen an humanem Herzgewebe durchgeführt werden. Hier zeigte sich ähnlich wie im Rattengewebe, dass durch den Einfrier- und Auftauprozess ein Großteil der mitochondrialen Aktivität verloren ging (Abbildung 24). Die akuten Schnitte wiesen eine bis zu 5-fach höhere Formazanbildung auf, als die eingefrorenen Schnitte. Direkt nach dem Schneiden konnte eine OD von 4,3 gemessen werden, diese sank innerhalb der ersten 24 h nach der Präparation deutlich ab. Die Vitalität der Schnitte die kryokonserviert wurden lag nochmals unter den gemessenen Werten der unbehandelten Präparate. Die Unterschiede zwischen den verwendeten Einfriermedien waren nur gering. wobei das EM ohne BDM etwas bessere Ergebnisse erzielte als jenes mit BDM. 24 h nach dem Auftauen sank die mitochondriale Aktivität bei den mit EM behandelten Schnitten auf einen Wert der OD von 0,60 ab. Bei den mit EM + BDM behandelten Schnitten wurde nach 24 h keine Aktivität mehr gemessen.

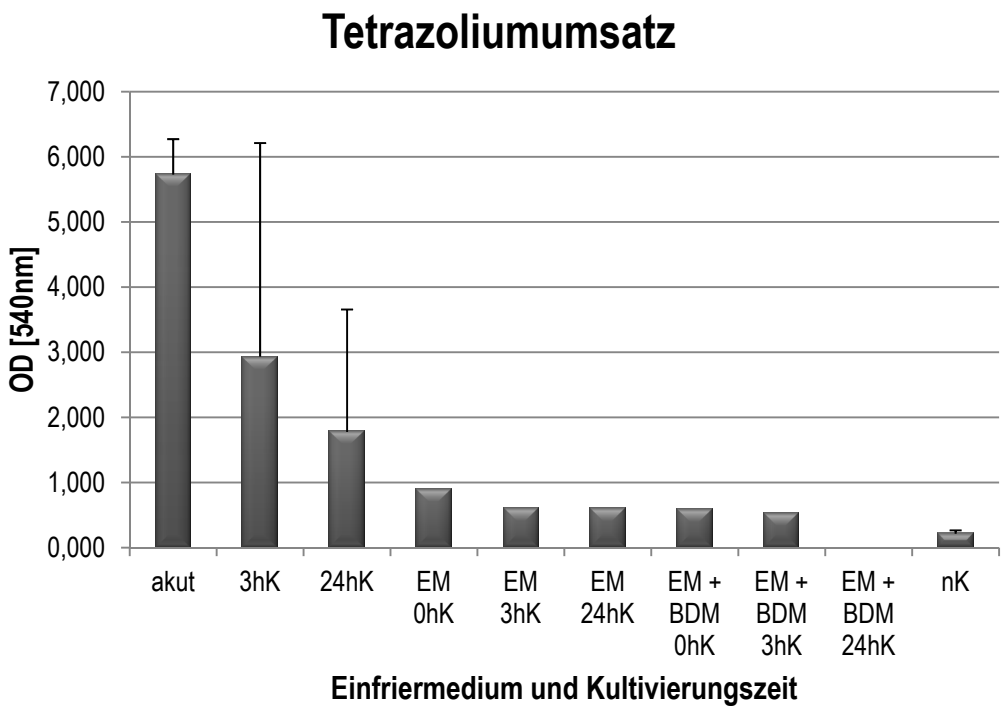

Abbildung 24| Tetrazoliumumsatz der Schnitte aus humanem Herz. Der Umsatz des Tetrazoliumsalzes zeigte, dass die Mitochondrien der eingefrorenen Schnitte eine wesentlich geringere Aktivität aufwiesen, als in den unbehandelten Schnitten. Die gemessene OD der unbehandelten Schnitte lag akut bei 4,3 um nach 3 h Kultur auf 2,9 und nach 24 h Kultur auf 1,8 abzusinken. Die in EM und EM + BDM eingefrorenen Schnitte wiesen ähnliche OD-Werte auf. So konnte direkt nach dem Auftauen eine OD von 0,9 (EM) bzw. 0,6 (EM + BDM) gemessen werden. Nach 3-stündiger Kultur lagen die Werte bei 0,61 (EM) und 0,5 (EM + BDM). Nach 24 h in Kultur viel die OD bei den in EM eingefrorenen Schnitten nochmals geringfügig auf 0,6 ab. Keine Werte konnten hier hingegen bei EM + BDM gemessen werden. Die nK lag bei 0,2

Wie schon in den Rattenschnitten festgestellt werden konnte, war der Verlust der mitochondrialen Aktivität in den Schnitten aus humanem Gewebe nach dem Auftauen ebenfalls ausgeprägt. Aus diesem Grund wurden die humanen Schnitte ebenso in Streifen geschnitten und vor sowie nach dem Einfrieren auf ihre Vitalität untersucht.

Im Vergleich zu den Schnitten konnte in den Streifen eine 4-mal so hohe OD direkt nach dem Schneiden (Abbildung 25) gemessen werden. Innerhalb der darauffolgenden 24-stündigen Kultur sank dieser Wert rapide ab. Die eingefrorenen Streifen wiesen im Allgemeinen eine geringere Aktivität der Mitochondrien auf, die sich im Verlauf der Kultivierung noch weiter verringerte. Im Vergleich zwischen den beiden Einfriermedien schnitt in diesem Fall das EM + BDM etwas besser ab, als jenes ohne BDM.

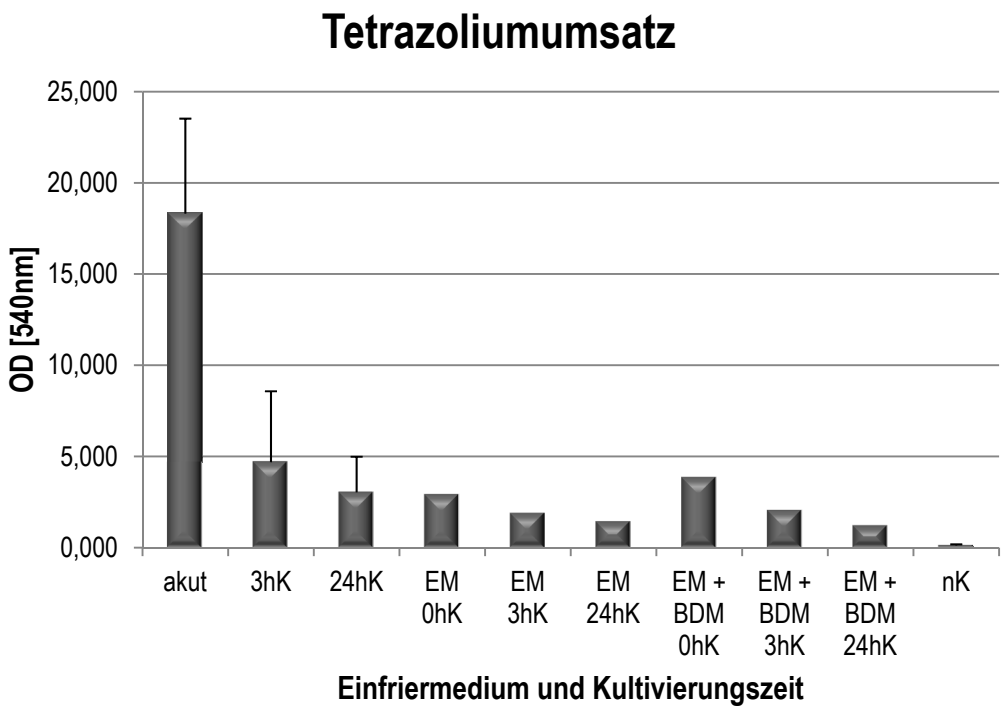

Abbildung 25| Tetrazoliumumsatz der Streifen aus humanen Herzschnitten. Die mitochondriale Aktivität ließ in den kultivierten und den eingefrorenen Streifen stark nach. So lag der OD-Wert der unbehandelten akut Streifen bei 18,3 und nach 3 h Kultivierung bei 4,7. 24 h nach dem Schneiden sank die OD nochmals auf 3,0 ab. Die eingefrorenen Streifen wiesen unmittelbar nach dem Auftauen eine OD von 2,9 (EM) bzw. 3,8 (EM + BDM) auf. Im weiteren Verlauf der Luft-Flüssigkeits-Kultur ergaben sich nach 3 h in Kultur Werte von 1,9 (EM) und 2,0 (EM + BDM). 24 h nach dem Auftauen der Streifen war der Abfall der Vitalität der in EM eingefrorenen Streifen mit einer OD von 1,4 etwas geringer als in jenen die in EM + BDM (OD 1,2) eingefroren waren. Die nK lag bei 0,1.

4.2.3 JC-1- Färbung

Die Verarbeitung des Tetrazoliumsalzes beim MTT-Test kann ungenaue Resultate liefern, wenn anderes, als mitochondrial hergestelltes NADH bzw. Enzyme reduzierend auf das Tetrazoliumsalz wirken (beispielsweise durch ausgelaufene Mitochondrien). Um sicherzustellen, dass die Mitochondrien funktional sind, wurde ein potenzialabhängiger Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der JC-1 heißt (Reers et al., 1991). Dadurch wird sowohl die Morphologie der Mitochondrien visualisiert, als auch ihre Aktivität bzw. Funktionalität überprüft.

Aufgrund der besseren Eindringmöglichkeit der Einfriermedien wurden auch für die JC-1- Färbung die Schnitte nochmals in Streifen geschnitten. So sollten eventuelle Diffusionsschwierigkeiten der Medien in die Gewebe verringert werden, um bessere Ergebnisse erzielen zu können.

4.2.3.1 Rattengewebe

Die Untersuchung der Gewebe wurde wie auch in den vorangegangenen Analysen direkt nach dem Schneiden bzw. Auftauen und nach 3 h und 24 h in Kultur durchgeführt. Die Analyse mit dem JC-1 Farbstoff ergab ähnliche Ergebnisse wie die Vitalitätsmessung mit dem MTT-Assay. Die untersuchten Gewebestücke wiesen direkt nach dem Schneiden die höchste mitochondriale Aktivität auf (Abbildung 26 a & Abbildung 27 a), wobei Unterschiede zwischen den Spezies zu erkennen waren. Die humanen Schnitte, die direkt nach der Präparation gemessen wurden (Abbildung 28 a, d, g), zeigten eine deutlich bessere Vitalität, als die vergleichbaren Rattenherzschnitte (Abbildung 26 a, d, g).

Direkt nach dem Schneiden zeigten die Mitochondrien in den Schnitten die beste Vitalität (Abbildung 26 a). Im weiteren Verlauf der Kultivierung hatte die Aktivität der Mitochondrien nach 3 h Air-Lift-Kultur nur geringfügig abgenommen (Abbildung 26 b). Ein wesentlich stärkerer Einbruch der Vitalität konnte 24 h nach dem Schneiden detektiert werden (Abbildung 26 c). Hier war kein aktives Mitochondrium mehr zu erkennen. Wie bei den unbehandelten Schnitten konnte die höchste Aktivität der Mitochondrien bei den in EM + BDM eingefrorenen Schnitten direkt nach dem Auftauen gemessen werden (Abbildung 26 g). Bei den in EM eingefroren Schnitten war die Vitalität hingegen direkt nach dem Auftauen geringer (Abbildung 26 d), als nach 3 h in Kultur (Abbildung 26 e). Die mit EM + BDM behandelten Schnitte zeigten dagegen nach 3-stündiger Kultivierung eine geringe Abnahme der Vitalität (Abbildung 26 h). Wies die Detektion der aktiven Mitochondrien zwischen den beiden Einfriermedien innerhalb der ersten 3 h nach dem Auftauen noch Unterschiede auf, so war nach 24 h in Air-Lift-Kultur (Abbildung 26 f, i) die Abnahme der rot fluoreszierenden Mitochondrien in beiden Proben zu erkennen.

Die Streifen zeigten ein ähnliches Muster wie die Schnitte. Im Unterschied zu den Schnitten war hier zu erkennen, dass die mitochondriale Aktivität nach der Air-Lift-Kultur deutlich geringere Werte aufwies (Abbildung 27). Waren die Mitochondrienmembranen nach dem Schneiden der Streifen noch aktiv und bildeten JC-1-Aggregate, die rot fluoreszierten (Abbildung 27 a), so nahm diese Aktivität in den Membranen über die Zeit der Kultur ab. Nach 3-stündiger Kultivierung (Abbildung 27 b) zeigten sich in den Streifen bereits deutliche Verluste an vitalen Mitochondrien.

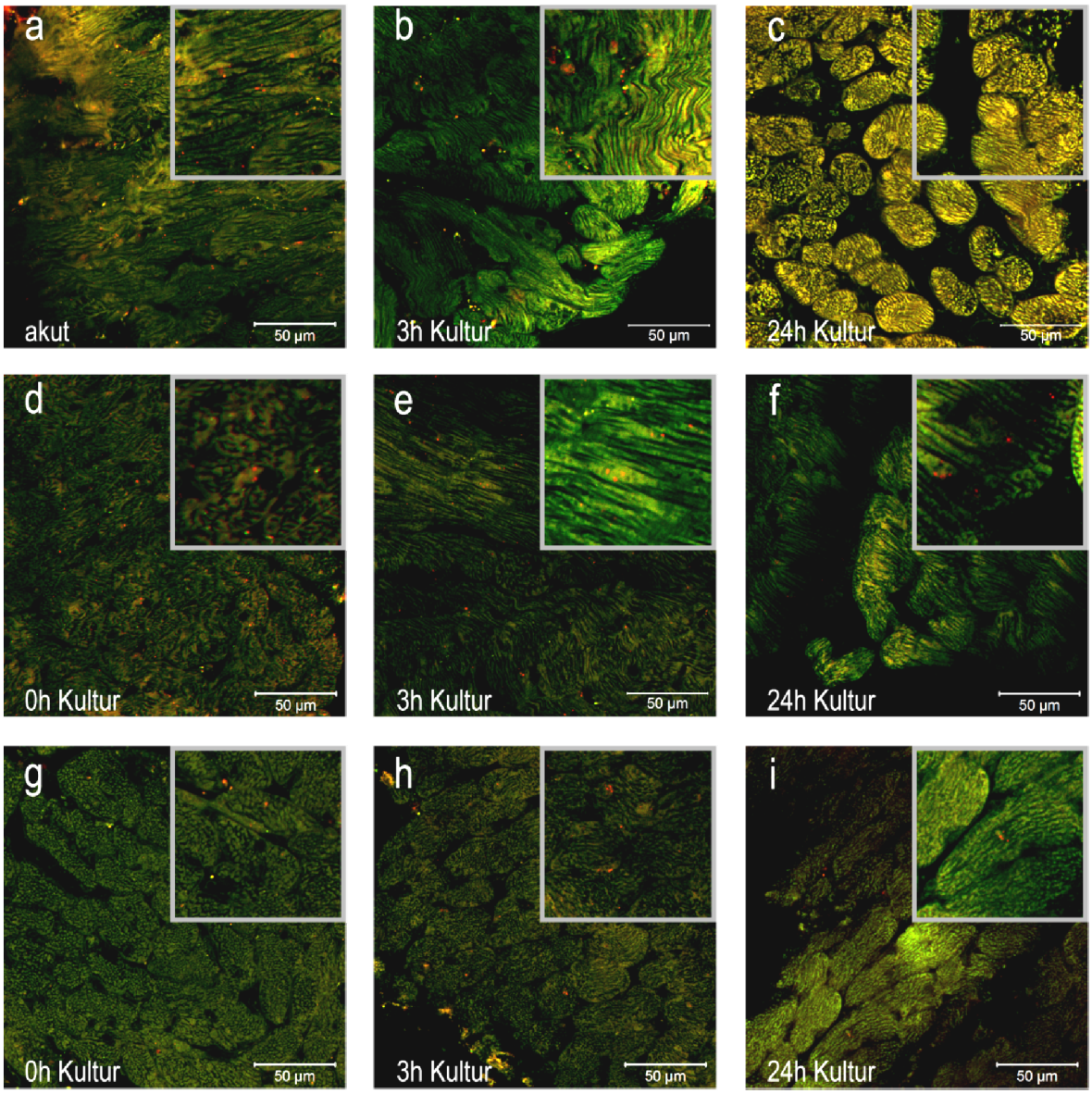

Abbildung 26| Untersuchung der mitochondrialen Membran an Rattenherzschnitten mittels JC-1. (a-c) unbehandelte und kultivierte Schnitte; (d-f) mit EM behandelte Schnitte; (g-i) mit EM + BDM behandelte Schnitte. Bei den nicht eingefrorenen Schnitten zeigte sich, dass die mitochondriale Aktivität mit der Zeit in Kultur abnahm und nach 24 h (c) keine aktiven Mitochondrien mehr gefunden werden konnten. Dieser Trend war auch in den behandelten Schnitten sichtbar. Die höchste Aktivität wiesen die Schnitte auf, die ohne weitere Kultivierung direkt nach dem Scheiden bzw. dem Auftauen untersucht wurden. Im Verlauf der Kultivierung nahm die Vitalität der Mitochondrien unter beiden Behandlungsbedingungen ab. In den Ausschnitten sind aktive (rot) und passive (grün) Mitochondrien vergrößert.

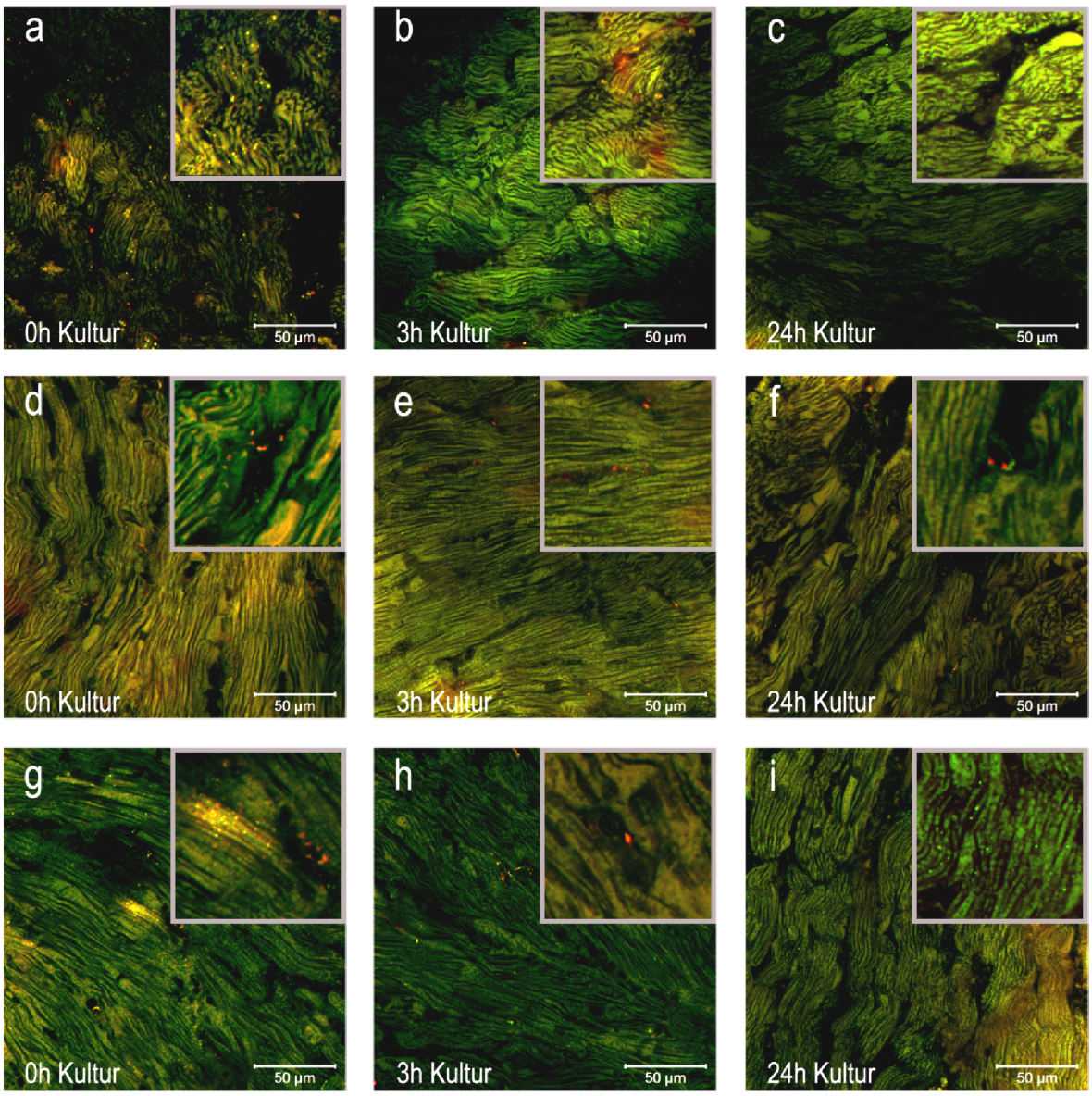

Abbildung 27| Untersuchung der mitochondrialen Membran an Rattenherzstreifen mittels JC1. (a-c) unbehandelte und kultivierte Streifen; (d-f) mit EM behandelte Streifen; (g-i) mit EM + BDM behandelte Streifen. Die Aktivität in den Streifen ohne Behandlung (a) war zu Beginn der Kultivierung am höchsten, ebenso wie in den mit EM (d) und EM + BDM (g) behandelten Streifen direkt nach dem Auftauen. Durch die 3- bzw. 24-stündige Kultivierung verringerte sich in allen unterschiedlich behandelten Streifen die mitochondriale Aktivität und nur noch vereinzelt waren rote (aktive) Mitochondrien zu erkennen. In den Ausschnitten sind aktive (rot) und passive (grün) Mitochondrien vergrößert.

Nach 24 h in Kultur (Abbildung 27 c) war bei den unbehandelten Streifen kein aktives Mitochondrium mehr zu detektieren. Während die mitochondriale Aktivität in den nicht eingefrorenen Streifen scheinbar recht schnell abnahm, zeigten sich in den mit EM eingefrorenen Streifen noch vereinzelt aktive Mitochondrien nach 24 h in Kultur (Abbildung 27 f). In den direkt nach dem Auftauen untersuchten Streifen (Abbildung 27 d) war die Anzahl der rot fluoreszierenden Mitochondrien geringer,

als bei den unbehandelten Streifen direkt nach dem Schneiden. Im weiteren Verlauf der Kultur nahm die Aktivität der Mitochondrien in den Streifen weiter ab, wobei zu beobachten war, dass sich zwischen der Analyse nach 3 h Kultur (Abbildung 27 e) und nach 24 h Kultur (Abbildung 27 f) kaum noch ein Unterschied ergab. Streifen, die in EM + BDM (Abbildung 27 g-i) eingefroren wurden, zeigten, ähnlich wie die mit EM behandelten Streifen, direkt nach dem Auftauen noch arbeitende Mitochondrien (Abbildung 27 g). Die danach folgende Kultivierung im Air-Lift-Verfahren konnte die Aktivität der Mitochondrien nicht mehr reaktivieren. 3 h nach dem Auftauen (Abbildung 27 h) hatte sich die Anzahl vitaler Mitochondrien weiter verringert und nach 24 h (Abbildung 27 i) konnten keine mehr detektiert werden.

4.2.3.2 Humanes Gewebe

Wie bereits unter 4.2.2.2 beschrieben, zeigte das humane Gewebe direkt nach dem Schneiden und auch nach dem Auftauen bessere Werte als das Rattengewebe. Die Analyse des humanen Gewebes gestaltete sich etwas schwieriger als die des Gewebes aus Rattenherz, da sich in den Schnitten noch Strukturen befanden, die stark rot fluoreszierten und die Detektion der aktiven Mitochondrien erschwerte.

Die Analyse des humanen Gewebes ergab, dass die unbehandelten Schnitte direkt nach dem Schneiden die beste Vitalität aufwiesen (Abbildung 28 a). Diese lag im Vergleich zum Gewebe aus dem Rattenherzen (Abbildung 26 a) höher. Innerhalb der ersten 3 h in Kultur fiel die Aktivität der Mitochondrien jedoch stark ab (Abbildung 28 b). Es konnten nur noch wenige aktive Mitochondrien detektiert werden. Im weiteren Verlauf der Kultivierung konnte nochmals ein Abfall der arbeitenden Mitochondrien festgestellt werden (Abbildung 28 c). Untersuchungen der Schnitte, die in unterschiedlichen Einfriermedien eingefroren waren, zeigten nur geringe Differenzen zwischen den Einfriermedien. Die mit EM behandelten Schnitte zeigten im Verlauf der Kultur eine Abnahme der vitalen Mitochondrien (Abbildung 28 d-f). Direkt nach dem Auftauen konnten noch rot fluoreszierende JC-1-Aggregate in den Schnitten gefunden werden (Abbildung 28 d). Nach 3-stündiger Kultur nahm die Anzahl der aktiven Mitochondrien ab (Abbildung 28 e) und nach 24 h in Air-Lift-Kultur konnten nur noch vereinzelt rot fluoreszierende Mitochondrien detektiert werden (Abbildung 28 f).

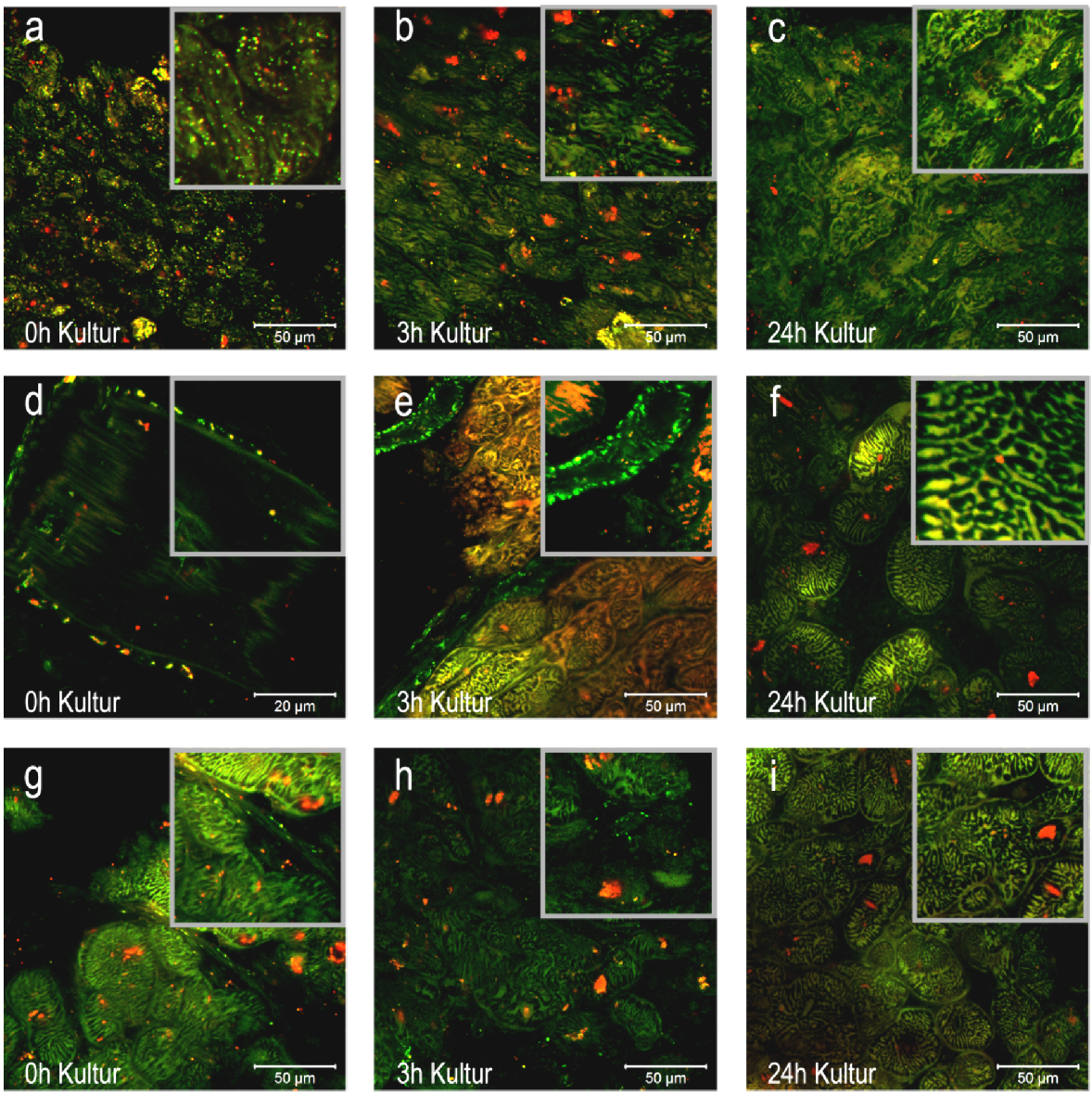

Abbildung 28| Aktivität der mitochondrialen Membran in humanen Herzschnitten. (a-c) unbehandelte Schnitte; (d-f) mit EM behandelte Schnitte; (g-i) mit EM + BDM behandelte Schnitte. In den unbehandelten Schnitten zeigte sich eine etwas höhere Aktivität als in den mit EM und EM + BDM behandelten Schnitten. In allen drei Kategorien wiesen die Schnitte, welche nicht in Kultur genommen wurden, die beste Vitalität auf. Die kultivierten Schnitte zeigten eine über die Zeit abnehmende mitochondriale Aktivität. In den Ausschnitten sind aktive Mitochondrien (rot) dargestellt. Die kräftig roten, etwas größeren Aggregate in den Schnitten sind möglicherweise Ansammlungen von Lipofuszinen, die eine starke Eigenfluoreszenz haben.

In den mit EM + BDM behandelten Schnitten (Abbildung 28 g-i) zeigte sich ein ähnlicher Verlauf wie in den in EM eingefrorenen Schnitten. Zu Beginn der Kultivierungsphase (Abbildung 28 g) konnten noch aktive Mitochondrien in den Schnitten ermittelt werden. Infolge der Kultur konnten nach 3 h (Abbildung 28 h) weniger noch arbeitende Mitochondrien gefunden werden als zu Anfang. 24 h nach der Platzierung auf dem Zellkultureinsatz konnten, wie in den mit EM behandelten Schnitten, nur noch vereinzelt rot fluoreszierende Mitochondrien detektiert werden (Abbildung 28 i).

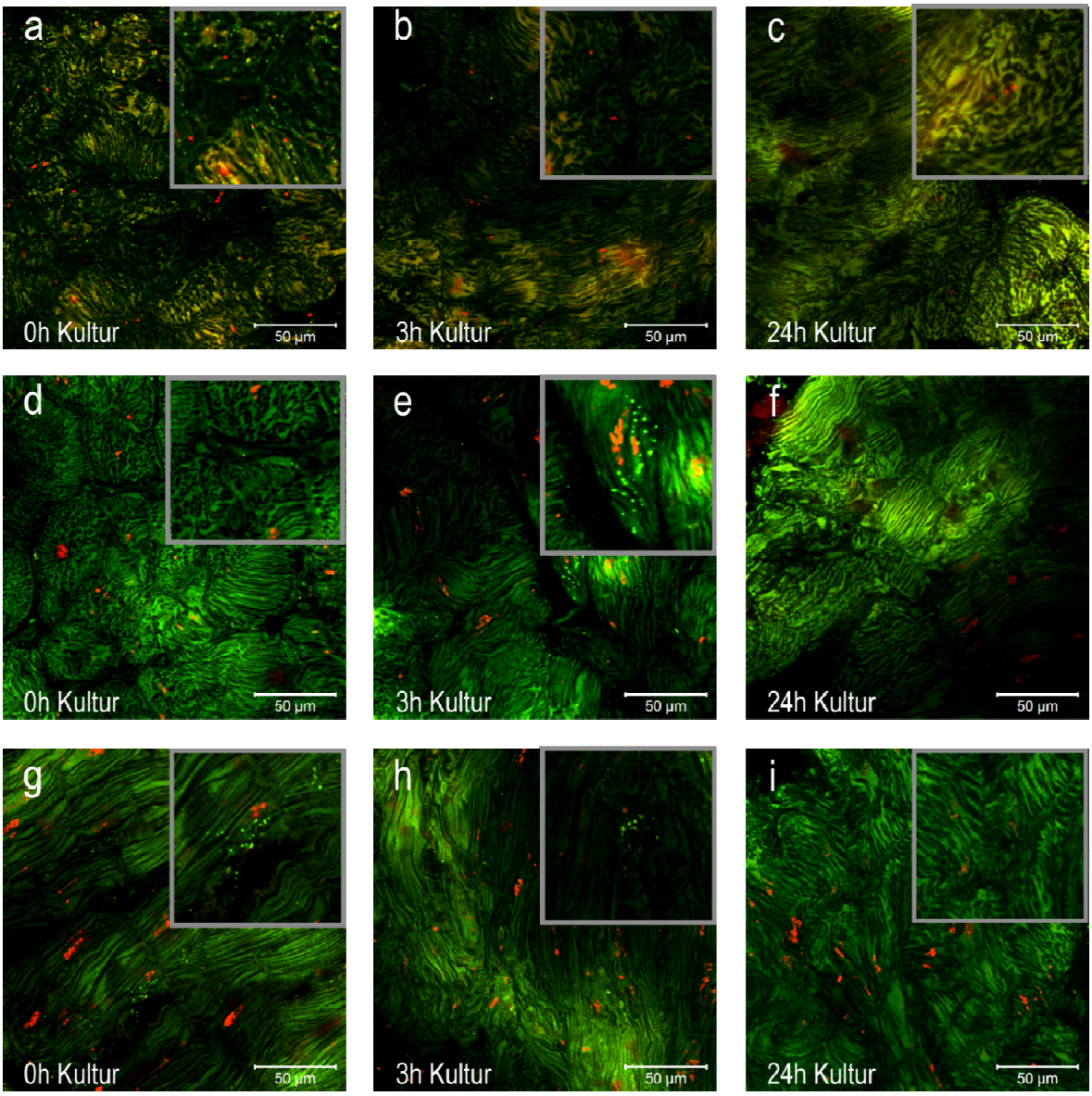

Abbildung 29| Aktivität der mitochondrialen Membran an humanen Herzstreifen. (a-c) unbehandelte Streifen; (d-f) mit EM behandelte Streifen; (g-i) mit EM + BDM behandelte Streifen. Die JC-1 Färbung zeigte in den Streifen direkt nach dem Schneiden eine etwas höhere Aktivität der Mitochondrien an, als in den kultivierten und den behandelten Streifen. Die untersuchte mitochondriale Aktivität in den Streifen wies in allen Proben nach 3- bzw. 24-stündiger Kultivierung eine starke Abnahme auf. In (f) konnte keine Aktivität mehr nachgewiesen werden. Die Ausschnitte zeigen aktive Mitochondrien (rot).

Die Analyse der Streifen direkt nach dem Schneiden (Abbildung 29 a) zeigte ein ähnliches Ergebnis wie es mit den Schnitten erzielt wurde. Die Kultur der Streifen ließ die Aktivität der Mitochondrien jedoch stark absinken (Abbildung 29 b-c). Innerhalb der ersten 3 h in Kultur waren nur noch ganz vereinzelt Mitochondrien zu erkennen (Abbildung 29 b), die rot fluoreszierten. Nach 24-stündiger Kultivierung war wie nach 3 h nur noch ein geringer Anteil der Mitochondrien aktiv (Abbildung 29 c). Die in EM eingefrorenen Streifen zeigten direkt nach dem Auftauen (Abbildung 29 d) weniger

arbeitende Mitochondrien als nach 3 h in Kultur (Abbildung 29 e). 24 h nach dem Auftauen konnten keine aktiven Mitochondrien mehr gefunden werden (Abbildung 29 f). In den mit EM + BDM behandelten Streifen konnten direkt nach dem Auftauen (Abbildung 29 g) noch aktive Mitochondrien detektiert werden. Im weiteren Verlauf der Kultur (Abbildung 29 h) nahmen die vitalen Mitochondrien ab und zeigten geringere Aktivität als die Mitochondrien der in EM eingefrorenen Streifen nach 3-stündiger Kultur. 24 h nach der Platzierung auf dem Kultureinsatz (Abbildung 29 i) waren auch hier nur noch sehr vereinzelt rot fluoreszierende Mitochondrien zu detektieren.

4.3 Untersuchungen der Morphologie und Ultrastruktur

4.3.1 HE-Übersichtsfärbung

Zur Untersuchung der strukturellen Intaktheit der Schnitte und Streifen wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) an den Präparaten durchgeführt. Die Zellkerne erscheinen dabei in Blau und der kontraktile Apparat in Rot. Die Glanzstreifen, die Teilbereiche in denen der Kontakt zwischen den Zellen besteht, sind als graue Streifen zwischen den Zellkernen zu erkennen. Sowohl das Rattengewebe als auch das humane Gewebe wurde untersucht.

4.3.1.1 Schnitte

Die beiden Gesamtherz-Färbungen zeigten keine großen Unterschiede zwischen den Spezies (Abbildung 30 a (Rattenherz), b (humanes Herz)). Es waren sowohl die Kerne und die typische Streifung der Muskulatur in beiden Geweben zu erkennen. Im Rattenherzgewebe waren auch Glanzstreifen (Pfeile) zu sehen. Das Gewebe war noch intakt und es konnten keine Veränderungen im Aufbau erkannt werden.

Die unbehandelten und direkt nach dem Schneiden fixierten Schnitte aus dem Rattenherzen (Abbildung 31 a) zeigten geringe Veränderungen in der Struktur. Der kontraktile Apparat war noch intakt und auch die Glanzstreifen (Pfeile) waren erkennbar. Dennoch war ein Unterschied zum Gesamtherzen (Abbildung 30 a) zu erkennen. Die Untersuchung der Schnitte nach 3 h (Abbildung 31 b) und 24 h (Abbildung 31 c) in Kultur zeigte Abweichungen der Struktur zu den nicht kultivierten Schnitten. So zeigte sich im Vergleich zur akut Untersuchung ein Verlust an muskulären Strukturen nach 3-stündiger Kultivierung. Auch die Anordnung der Muskelfasern wies

Veränderungen auf. Die Schnitte, welche 24 h in Air-Lift-Kultur gehalten wurden, wiesen eine etwas lockerere Struktur auf, der muskuläre Bau war im Vergleich zu der 3 h Kultur noch gut zu erkennen.

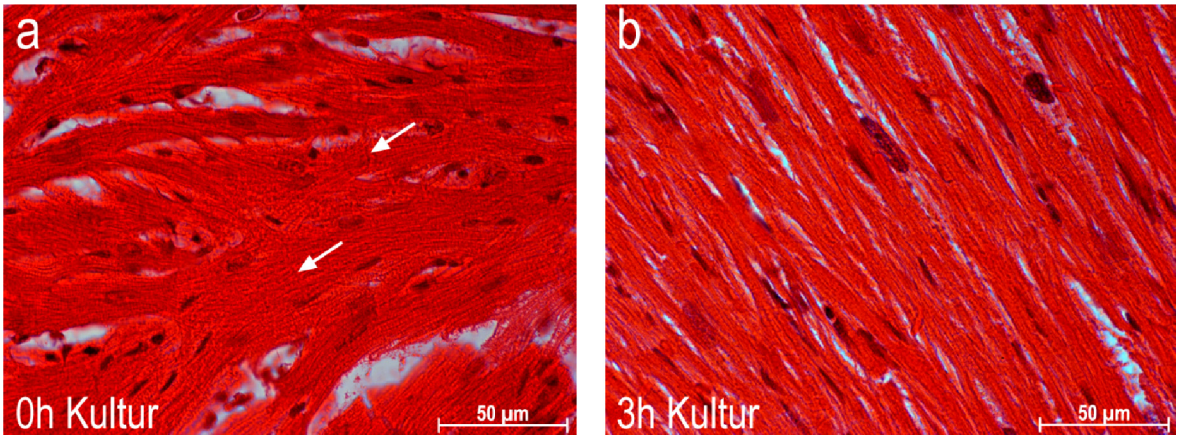

Abbildung 30| HE-Färbung der Gesamtherzschnitte aus Rattengewebe und humanem Gewebe. (a) Schnitt aus dem Rattenherzgewebe; (b) Schnitt aus dem humanen Herzgewebe. Sowohl im Schnitt aus dem Rattenherz als auch im humanen Herzschnitt konnte eine intakte muskuläre Struktur gezeigt werden, in a sind Glanzstreifen (Pfeile) zu sehen und die Muskelfasern sind in a und b nahezu parallel angeordnet waren.

Die in EM kryokonservierten Schnitte (Abbildung 31 d-f) zeigten im Verlauf der Kultivierung ebenso wie die unbehandelten Schnitte Veränderungen des Gewebes. Unmittelbar nach dem Auftauen war der Schnitt noch relativ intakt (Abbildung 31 d), die Muskelfilamente waren noch nachweisbar und auch die Zellen lagen noch dicht beisammen. Nach der 3-stündigen Kultivierungsphase (Abbildung 31 e) wurden die Räume zwischen den Muskelzellen größer und auch die für die Muskeln typische Struktur konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Schnitte, die 24 h kultiviert wurden (Abbildung 31 f), zeigten eine etwas bessere muskuläre Struktur, jedoch waren die einzelnen Zellen und auch die Myofilamente nicht mehr so dicht gepackt wie noch in den unbehandelten und nicht kultivierten Schnitten.

Schnitte welche in EM + BDM eingefroren wurden (Abbildung 31 g-i), wiesen ein ähnliches Bild auf, wie die in EM eingefrorenen Schnitte. Die direkt nach dem Auftauen fixierten Schnitte (Abbildung 31 g) zeigten sowohl deutlich die muskuläre Struktur als auch die Glanzstreifen zwischen den Zellen (weiße Pfeile). Auch die Myofibrillen lagen noch sehr eng beisammen. Im weiteren Verlauf der Kultivierung entfernten sich die Muskelzellen voneinander und auch die typische Streifung der Herzmuskelzellen ging verloren (Abbildung 31 h). Nach 24 h in Kultur lösten sich die Kontakte zwischen den Muskeln und Myofibrillen des Gewebes weiter auf (Abbildung 31 i). Dennoch war die durch Myosin und Aktin hervorgerufene Streifung der Muskelzellen wieder deutlicher zu erkennen, als nach 3 h Kultur.

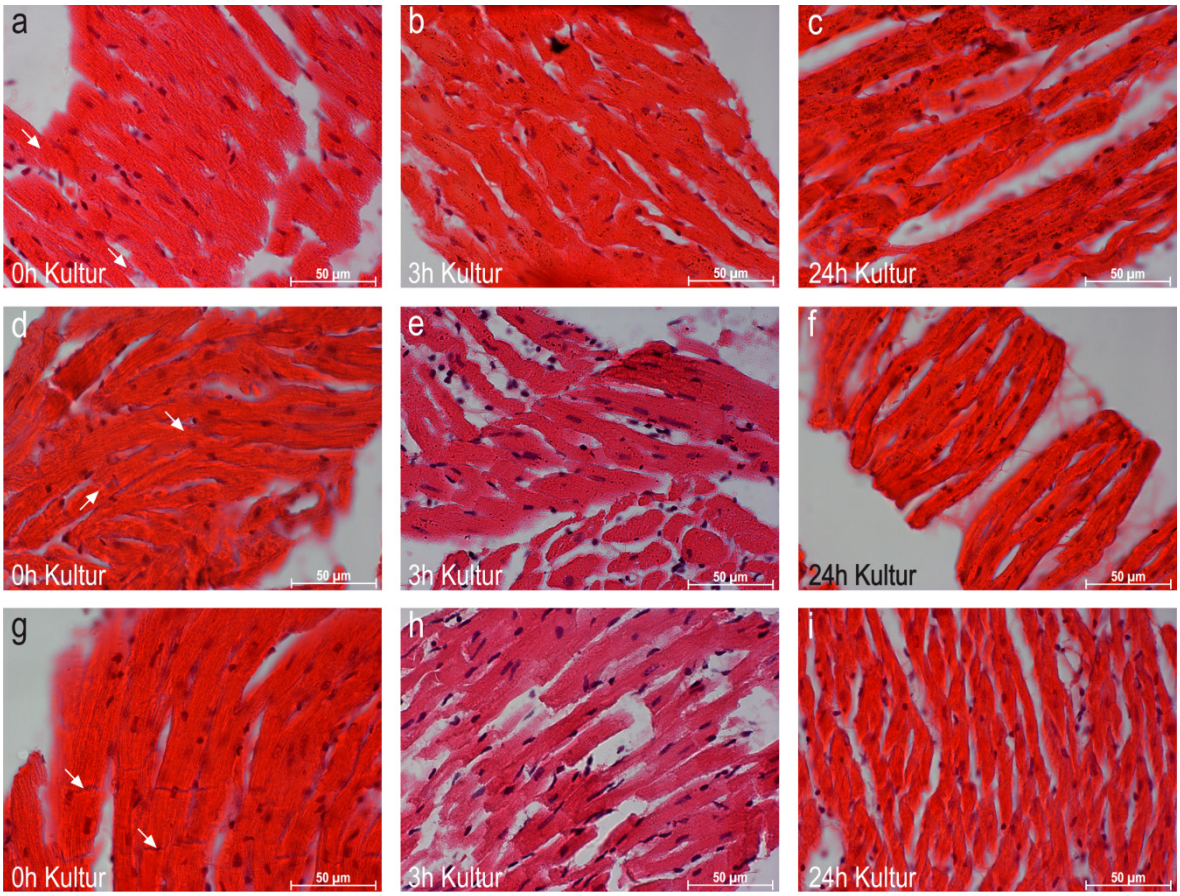

Abbildung 31| HE-Färbung der unbehandelten sowie kryokonservierten Rattenherzschnitte. Die unbehandelten Schnitte (a-c) zeigten im Verlauf der Kultur leichte Veränderungen. Die engen Verbindungen zwischen den Muskelzellen direkt nach dem Schneiden (a) weiteten sich im Verlauf der Kultur (b, c). Die muskulären Strukturen konnten nach 3 h Kultur weniger deutlich nachgewiesen werden, als nach 24 h Kultur. Die mit EM behandelten Schnitte (d-f) zeigten 3 h (e) nach dem Auftauen ebenfalls eine Verminderung der typischen muskulären Streifung. Diese konnte nach 24–stündiger Kultivierung (f) wieder nachgewiesen werden. Die Übergänge zwischen den Zellen dehnten sich auch hier im Verlauf der Kultivierung aus. Die Untersuchung der mit EM + BDM kryokonservierten Schnitte (g-i) zeigte unmittelbar nach dem Auftauen (g) noch intakte Zell-Zell-Kontakte sowie Glanzstreifen (Pfeile), die sich mit der Zeit in der Kultur immer mehr auflösten (h-i). Die muskuläre Struktur, welche nach dem Auftauen noch gut zu erkennen war, ließ sich nach 3 h kaum noch nachweisen (h). Nach 24 h in Kultur konnte sie wieder detektiert werden (i). Die Pfeile in a, d und g weisen auf Glanzstreifen hin.

Die humanen Schnitte (Abbildung 32), welche nicht kryokonserviert (Abbildung 32 a-c) wurden, zeigten direkt nach dem Schneiden noch eine intakte Struktur des Muskelgewebes. Hierbei waren schon erste Anzeichen der Weitung im Interzellularraum der Muskelzellen zu erkennen (Abbildung 32 a). Während der Air-Lift-Kultur konnten nach 3 h (Abbildung 32 b) die typische Querstreifung der Muskulatur und auch die Glanzstreifen nicht mehr deutlich nachgewiesen werden. Die Zellen lagen jedoch noch dicht beisammen. Nach 24 h konnte die Muskelzellstruktur nicht mehr detektiert werden (Abbildung 32 c), der Schnitt wies an einigen Bereichen sich auflösendes Gewebe (weiße Pfeile) auf. Die in EM kryokonservierten Schnitte zeigten direkt nach dem Auftauen (Abbildung 32 d) schon

Anzeichen für die Auflösung der engen Kontakte zwischen den Zellen und den Myofibrillen (weiße Pfeile). Die typische Struktur, die durch die Aktin- und Myosinfilamente hervorgerufen wurde, konnte noch dargestellt werden (schwarze Pfeile). In den 3 h kultivierten Schnitten (Abbildung 32 e) zeigten sich zwischen den Muskelzellen größere Lücken (weiße Pfeile), die ein Hinweis auf die Schädigung der Gewebestruktur darstellte. Die Querstreifung konnte nachgewiesen werden (schwarze Pfeile).

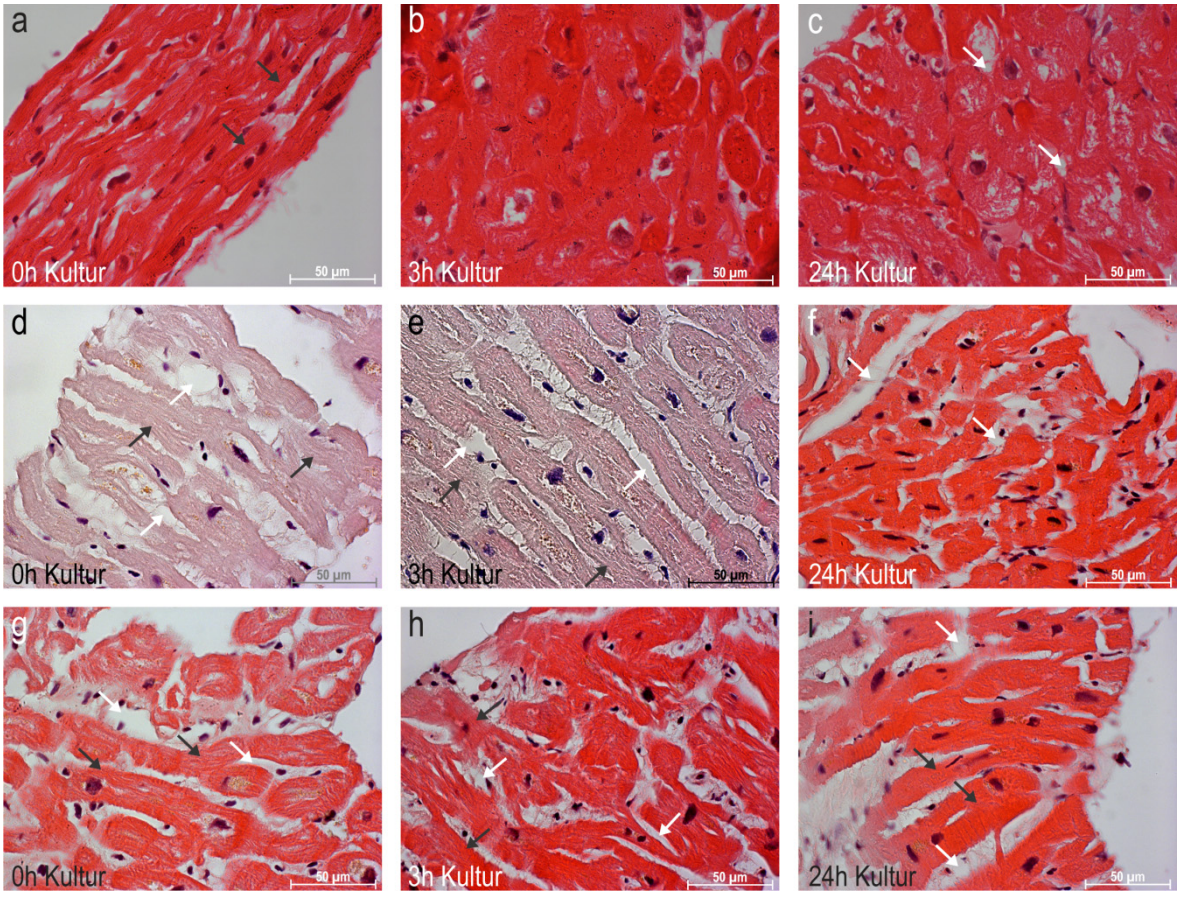

Abbildung 32| HE-Färbung an humanen Herzschnitten. Die nicht kultivierten Herzschnitte zeigten direkt nach dem Schneiden (a) noch deutlich die muskuläre Querstreifung (schwarze Pfeile), die im Verlauf der Kultur nicht mehr zu erkennen war (b, c). Die Verbindungen zwischen den Zellen waren unmittelbar nach dem Auftauen (a) leicht geweitet, nach 3 h lagen diese physiologisch korrekter vor (b). Nach 24 h in Kultur konnten ebenfalls Lücken im Gewebe (c) gefunden werden (weiße Pfeile). Die in EM kryokonservierten Schnitte (d-f) wiesen schon direkt nach dem Auftauen (d) stark vergrößerte Intrazellularräume auf (weiße Pfeile), die sich während der Kultur geringfügig verkleinerten (e, f, weiße Pfeile). Die durch Myosin und Aktin hervorgerufene Querstreifung des Muskels konnte unmittelbar nach dem Auftauen (d) und nach 3 h in Kultur (e) dargestellt werden (schwarze Pfeile). Nach 24-stündiger Kultivierung war im Gewebe keine Struktur mehr zu erkennen (f). Das Gewebe, welches in EM + BDM eingefroren war (g-i), zeigte zu allen drei Untersuchungszeitpunkten vergrößerte Intrazellularräume, die sich über die Zeit kaum veränderten (weiße Pfeile). Die muskuläre Struktur (schwarze Pfeile) konnte in den Schnitten nach 0 h (g), nach 3 h (h) und nach 24 h in Kultur nachgewiesen werden (i).

Nach 24 h Kultivierung war die Struktur nicht mehr deutlich erkennbar und auch das Gewebe löste sich immer weiter auf (weiße Pfeile). Der Kontakt zwischen den Zellen verringerte sich. In den mit

EM + BDM behandelten Schnitten (Abbildung 32 g-i) konnte sowohl nach dem Auftauen als auch nach 3 h und 24 h in Kultur die muskuläre Streifung nachgewiesen werden (Abbildung 32 g-i, schwarze Pfeile). Zu allen drei Untersuchungszeitpunkten konnte gezeigt werden, dass die Verbindungen zwischen den Myofibrillen und den Zellen sich lösten (Abbildung 32 g-i, weiße Pfeile).

4.3.1.2 Streifen

Neben den Schnitten wurden auch die Streifen aus dem Rattenherzen und dem humanen Herzgewebe mittels HE-Färbung untersucht. In den unbehandelten akuten und 3 h kultivierten Proben der Rattenherzstreifen (Abbildung 33) konnte keine typische Querstreifung des Gewebes mehr nachgewiesen werden (Abbildung 33 a, b). Nach 24 h Kultur war in einigen Bereichen der Streifen die charakteristische Maserung zu erkennen (Abbildung 33 c). Die gute Bindung zwischen den Zellen und Myofibrillen war zu allen drei Untersuchungszeitpunkten (Abbildung 33 a-c) im Gegensatz zu den Schnitten (Abbildung 32 a-c) noch deutlich erkennbar. Die kryokonservierten Proben (Abbildung 33 d-i) wiesen Unterschiede im Erhalt der Gewebestruktur auf. So konnte in den mit EM behandelten Streifen (Abbildung 33 d-f) keine Aktin- und Myosinstruktur angefärbt werden. Die Zellen lagen hier noch verhältnismäßig eng beisammen, dennoch waren erste Anzeichen für ein Auflösen der Verbindungen (d, schwarze Pfeile) vorhanden. In den Streifen, welche mit EM + BDM kryokonserviert wurden, zeigte sich sowohl unmittelbar nach dem Auftauen als auch nach 3 h und 24 h Kultur die für Muskelzellen typische Streifung (Abbildung 33 g-i, weiße Pfeile). Die Verbindung zwischen den Muskelzellen war jedoch in allen drei Proben auffallend geweitet und zeigte eine starke Veränderung des Gewebes durch die Kryokonservierung auf (Abbildung 33 g-i). Die Streifen des humanen Herzens (Abbildung 34) konnten auf Grund zu geringer Probenzahlen nur für die unbehandelten Proben (Abbildung 34 a-c) zu allen drei Zeitpunkten analysiert werden. Die kryokonservierten Streifen (Abbildung 34 d-f) konnten nur direkt nach dem Auftauen (EM und EM + BDM; Abbildung 34 d, e) und nach 3 h in Kultur (EM + BDM; Abbildung 34 f) auf ihre strukturellen Veränderungen untersucht werden. In den Streifen, die nur kultiviert wurden, konnten direkt nach dem Schneiden noch filamentäre Bereiche ausgemacht werden (Abbildung 34 a, rote Pfeile), die im Laufe der Kultivierung nicht mehr zu erkennen waren (Abbildung 34 b, c).

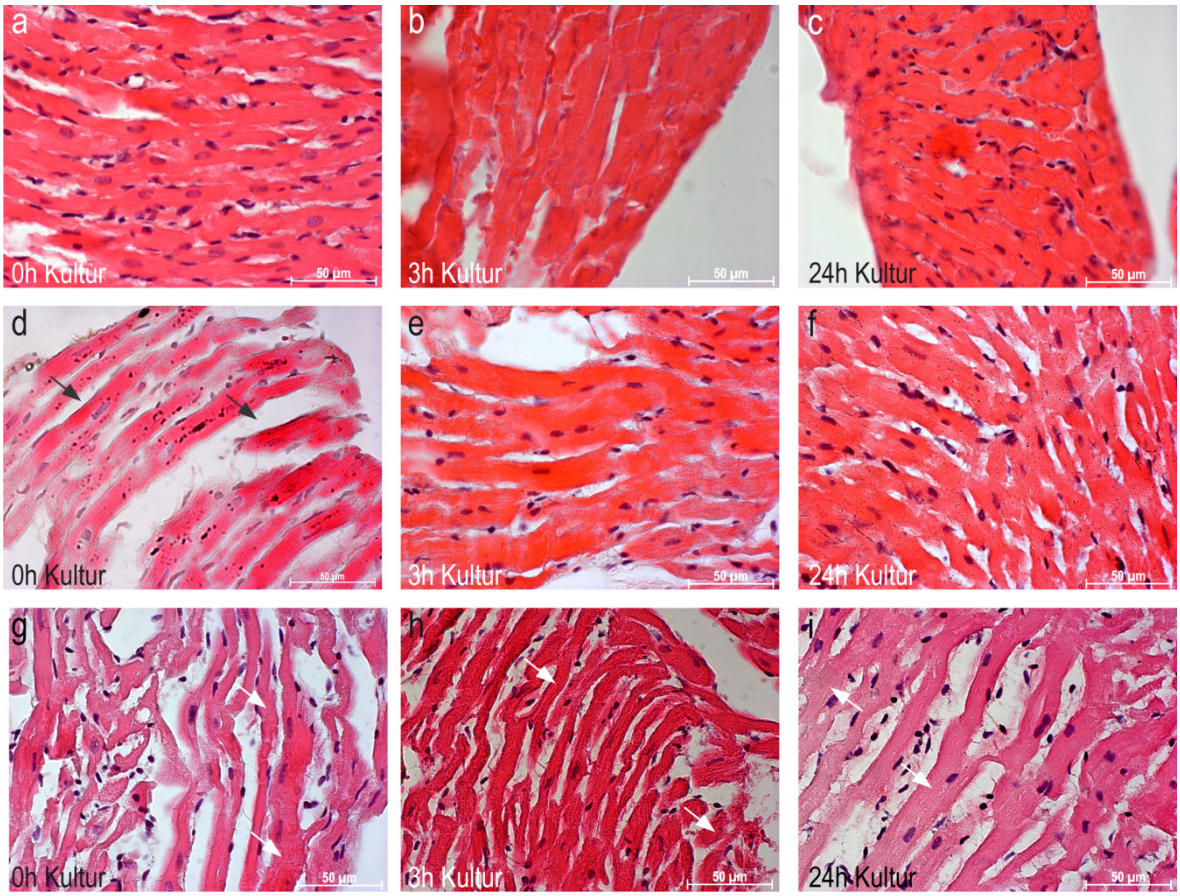

Abbildung 33| HE-Färbung der Rattenherzstreifen. Die unbehandelten Streifen (a-c) zeigten über den gesamten Untersuchungszeitraum gute Verbindungen zwischen den einzelnen Muskelzellen. Nach 3 h in Kultur (b) konnten jedoch Bruchstellen an den Glanzstreifen ausgemacht werden. Die Anzahl der Bruchstellen verringerte sich nach 24 h in Kultur (c) wieder. Die für die Muskulatur typische Querstreifung konnte in keinem der Streifen deutlich nachgewiesen werden. Die Kontakte zwischen den Zellen sind nach 24 h in Kultur wieder besser. Zwischen den in EM (d-f) und EM + BDM (g-i) kryokonservierten Streifen zeigten sich sowohl in der muskulären Struktur als auch in der Verbindung der Zellen untereinander Unterschiede. In den mit EM behandelten Streifen konnte die filamentäre Struktur nicht dargestellt werden, in den mit EM + BDM behandelten Streifen war dies an einigen Stellen der Streifen noch möglich (g-h, weiße Pfeile). Bei den in EM kryokonservierten Streifen konnten nach 0 h in Kultur größere Lücken (schwarze Pfeile) zwischen den Myofibrillen gezeigt werden, als nach 3 h und 24 h in Kultur. In den mit EM + BDM eingefrorenen Streifen waren die Zwischenräume der Zellen deutlich auseinander gezogen und zeigten eine Schädigung des Gewebes an.

Die Zellen und Myofibrillen lagen zu Beginn der Kultivierungsphase (Abbildung 34 a) nicht ganz so dicht beisammen (rote Pfeilspitzen), wie nach 3 h bzw. 24 h in Kultur (Abbildung 34 b, c). Die in EM eingefrorenen Streifen zeigten direkt nach dem Auftauen (Abbildung 34 d) noch die charakteristische Streifung der Muskelzellen (weiße Pfeile), allerdings zeigten die Verbindungen zwischen den Zellen erste Anzeichen für eine Vergrößerung der Abstände zwischen den Myofibrillen. In den Streifen, welche in EM + BDM eingefroren wurden (Abbildung 34 e, f), konnte direkt nach dem Auftauen (Abbildung 34 e) der kontraktile Apparat noch in einigen Bereichen des Gewebes ausgemacht werden (weiße Pfeile). Nach 3 h in Kultur war dies ebenfalls noch möglich (Abbildung 34 f, weiße Pfeile). Die Zellen lagen unmittelbar nach dem Auftauen noch recht eng beieinander, was nach 3-stündiger

Kultivierung nicht mehr der Fall war. Die Muskelzellen standen über große Bereiche des Streifens nicht mehr miteinander in Verbindung.

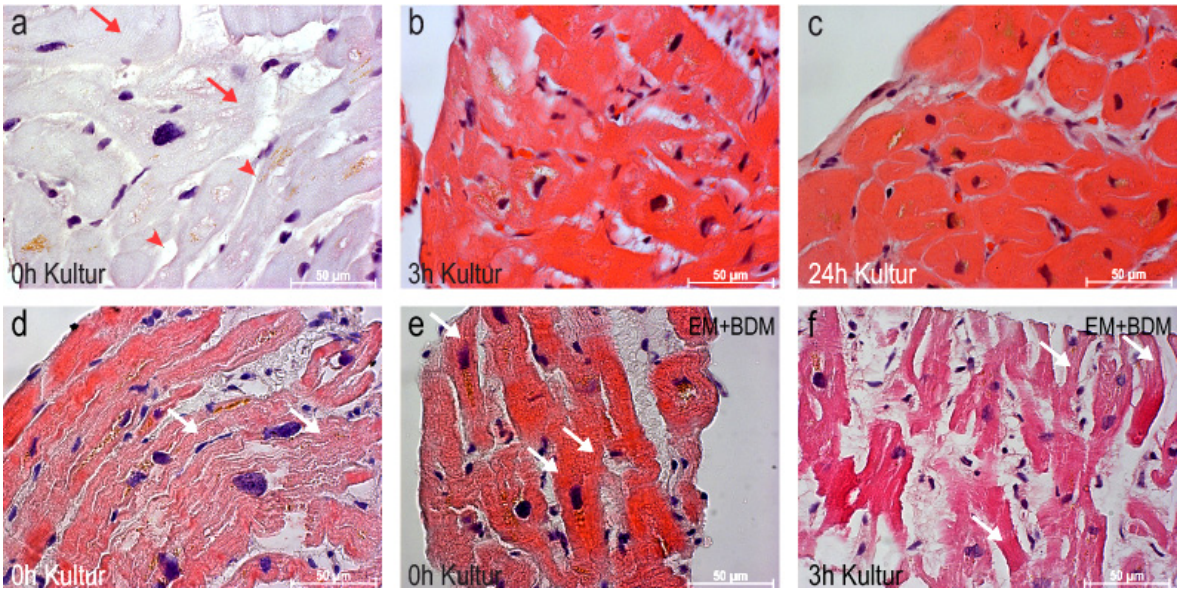

Abbildung 34| HE-Färbung an humanen Herzstreifen. Die unbehandelten humanen Streifen (a-c) zeigten direkt nach dem Schneiden noch die typische Querstreifung der Muskelzellen (a, rote Pfeile). Diese verschwanden im Verlauf der Kultur nach 3 h (b) und 24 h (c). Die Interzellularräume der Zellen waren zu Beginn der Kultivierungsphase (a, rote Pfeilspitzen) leicht vergrößert, verringerten sich aber im Laufe der Kultur wieder (b, c). In den mit EM behandelten Streifen (d) konnte unmittelbar nach dem Auftauen die muskuläre Struktur (weiße Pfeile) dargestellt werden, die Verbindungen zwischen den Zellen waren an einigen Stellen bereits etwas weiter. Die mit EM + BDM kryokonservierten Streifen (e, f) wiesen nach dem Auftauen (e) an einigen Stellen (weiße Pfeile) die muskuläre Querstreifung auf, die nach 3 h in Kultur ebenfalls noch zu erkennen war (f). Die intrazelluläre Verbindung zwischen den Zellen war ohne Kultivierung noch recht gut, nach der 3 h Kultur war diese Verbindung stark geschädigt (f).

4.3.2 Immunzytochemie

Um die Schädigungen des kontraktilen Apparates und der Zell-Zell-Kontakte auf Proteinebene untersuchen zu können, wurden die Schnitte und Streifen fixiert, in Paraffin eingebettet und Ultradünnschnitte (5 µm) hergestellt. Diese wurden immunzytochemisch mit Antikörpern gegen alpha-Aktinin, Myosin, N-Cadherin und Connexin 43 angefärbt. Es wurden jeweils Schnitte und Streifen aus Rattenherzgewebe und humanem Herzgewebe direkt nach dem Schneiden und Auftauen (akut) sowie nach 3 h und 24 h in Kultur untersucht. Aufgrund fehlenden Probenmaterials konnten bei den humanen Proben nicht alle Kultivierungszeitpunkte der unterschiedlich behandelten Gewebe untersucht werden.

4.3.2.1 Alpha-Aktinin

Das Protein alpha-Aktinin ist ein wichtiger Bestandteil des kontraktilen Apparates. Es stellt die Verbindung zwischen den Z-Linien und dem Aktin im Sarkomer her. Ist diese Bindung geschädigt, kann es zum Verlust der Kontraktilität des Muskels führen.

Die durchgeführten Analysen an den Rattenherzschnitten und -streifen auf Proteinebene zeigten eine starke Veränderung im Auftreten des alpha-Aktinin-Proteins. Während in den Schnitten (Abbildung 35) und den Streifen (Abbildung 36) aus dem Rattenherz direkt nach dem Schneiden die Strukturen des alpha-Aktinin-Proteins noch deutlich zu erkennen waren, kam es im weiteren Verlauf der Kultur zu einer Degeneration des Proteins. Sowohl bei den Schnitten (Abbildung 35 b) als auch bei den Streifen (Abbildung 36 b) konnten nach 3-stündiger Kultur noch vereinzelt alpha-Aktinin-Protein (Pfeile) nachgewiesen werden. Nach 24 h in Kultur konnte in den Schnittpräparaten (Abbildung 35 c) ebenso wie nach 3 h noch einige alpha-Aktinin-Strukturen (Pfeile) detektiert werden. In den Streifenpräparaten (Abbildung 36) konnte die typisch gestreifte Struktur nicht mehr aufgezeigt werden. Eine unspezifische Bindung der Proteine war dennoch zu erkennen. Die oben gesehenen Veränderungen konnten ebenfalls in den in EM (Abbildung 35 d-f) und EM + BDM (Abbildung 35 g-i) eingefrorenen Geweben festgestellt werden. Direkt nach dem Auftauen waren sowohl in den mit EM (Abbildung 35 d) behandelten als auch in den mit EM + BDM (Abbildung 35 g) behandelten Rattenherzschnitten noch vereinzelt Strukturen zu erkennen (Pfeile). In den Proben, die 3 h kultiviert wurden (Abbildung 35 h; d), konnte eine weitere Degeneration des alpha-Aktinin-Proteins beobachtet werden. Nach 24-stündiger Kultivierung zeigte sich in den EM behandelten Proben kein weiterer Rückgang des zu detektierenden alpha-Aktinin-Proteins (Abbildung 35 f). In den mit EM + BDM eingefrorenen Schnitten ließ sich nach 24 h Kultur kein Protein mehr finden (Abbildung 35 i). In den behandelten Rattenherzstreifen (Abbildung 36 d-i) konnte eine Proteindegeneration festgestellt werden. Die direkt nach dem Auftauen untersuchten Streifen (Abbildung 36 d, g) wiesen noch alpha-Aktinin-Strukturen (Pfeile) auf. Die in EM eingefrorenen Präparate zeigten nach 3 h Kultur (Abbildung 36 e) noch an wenigen Bereichen positiv angefärbt alpha-Aktinin-Filamente (Pfeile). In den Streifen, die mit EM + BDM behandelt wurden, konnten keine typischen filamentären Strukturen mehr dokumentiert werden, dennoch ließ sich das Protein nachweisen. Im Gegensatz zu den Schnitten zeigen die Streifen nach 24-stündiger Air-Lift-Kultur (Abbildung 36 f, i) alpha-Aktinin-Strukturen (Pfeile). Diese trat in den in EM eingefrorenen Streifen (Abbildung 36 f, Pfeile) stärker auf, als in jenen die mit EM + BDM eingefroren wurden (Abbildung 36 i, Pfeile).

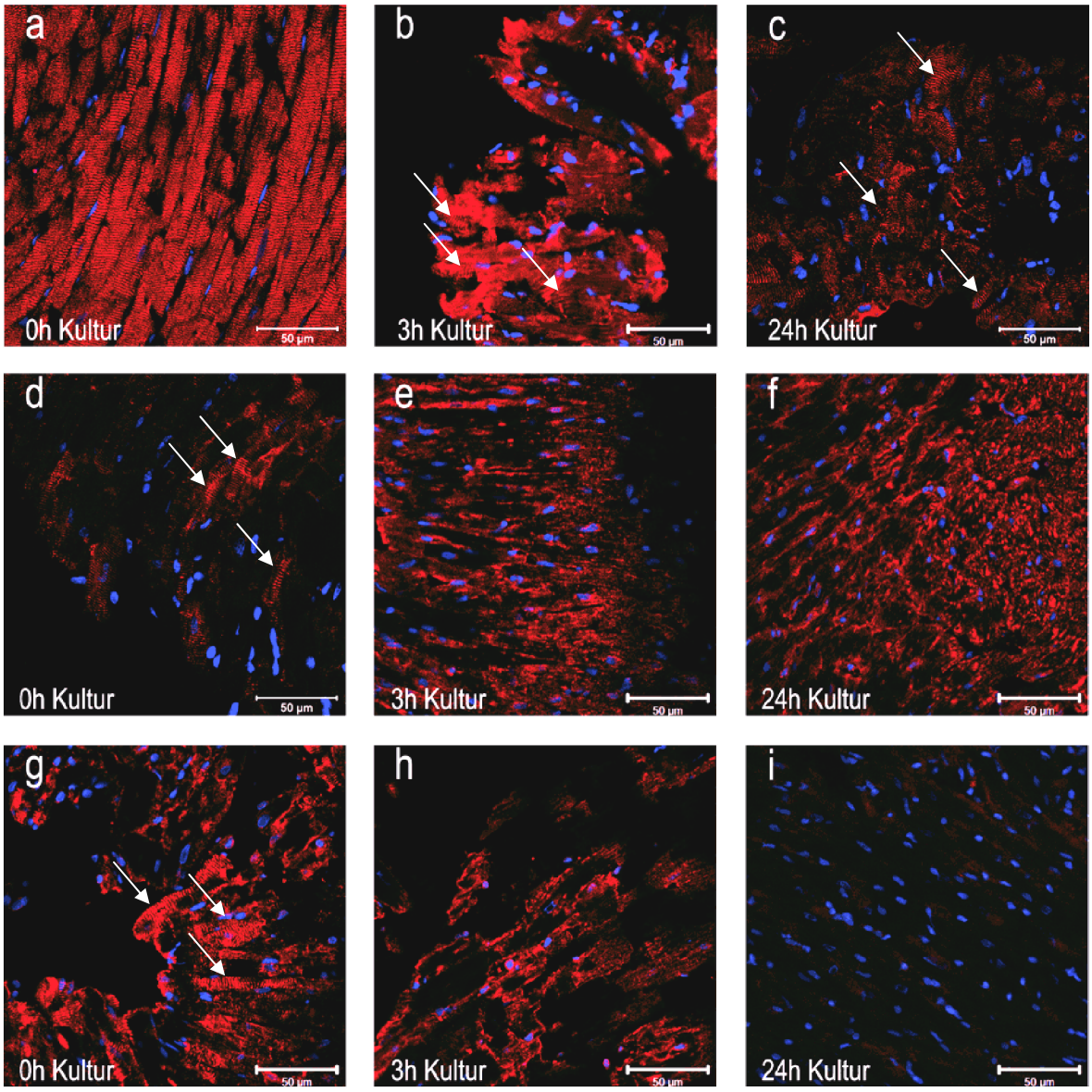

Abbildung 35| Alpha-Aktinin-Färbung der Schnitte aus Rattenherzgewebe. Der kontraktile Apparat wurde während der Kultur und durch den Einfrier- und Auftauprozess degradiert. Während bei dem 0 h Kultur Schnitt (a) noch deutlich die typische muskuläre Streifung der Zellen zu erkennen war, konnte diese nach 3 h (b) und 24 h (c) in Kultur nur noch schwach detektiert werden (Pfeile). In den mit EM (d-f) und EM + BDM (g-i) eingefrorenen Schnitten konnte direkt nach dem Auftauen (d, g) das Protein an einigen Stellen (Pfeile) nachgewiesen werden. 3 h nach Kultivierungsbeginn (e, h) verringertet sich die Menge an Protein zunehmend und seine wohlgeordnete Struktur löste sich auf. Nach 24 h in Kultur zeigten sich zwischen den beiden Einfriermedien Unterschiede. Die mit EM behandelten Schnitte (f) wiesen, im Vergleich zu den Schnitten, die 3 h in Kultur waren, keine weitere Verschlechterung der Proteinbindung auf. In den mit EM + BDM behandelten Schnitten konnten keine alpha-Aktinin-Strukturen ausgemacht werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

Die Analysen der humanen Gewebeschnitte (Abbildung 37) und Streifen (Abbildung 38) zeigte ebenfalls eine Abnahme des alpha-Aktinins während der Zeit in Kultur. In den Schnitten, die direkt nach dem Schneiden fixiert wurden (Abbildung 37 a), konnten noch intakte Proteinstrukturen (Pfeile) nachgewiesen werden. Die weitere Kultivierung der Schnitte verursachte eine starke Degeneration

der gesuchten Proteine, so dass sie nach 3 h nur noch sehr schwach und ohne Erhalt der filamentären Strukturen detektiert werden konnten (Abbildung 37 b). 24 h nach Beginn der Air-Lift-Kultur konnten keine alpha-Aktinin-Filamente mehr gefunden werden (Abbildung 37 c). Bei den mit EM (Abbildung 37 d-f) und EM + BDM (Abbildung 37 g-h) eingefrorenen Schnitten konnte ebenfalls ein Verlust der alpha-Aktinin-Proteine festgestellt werden.

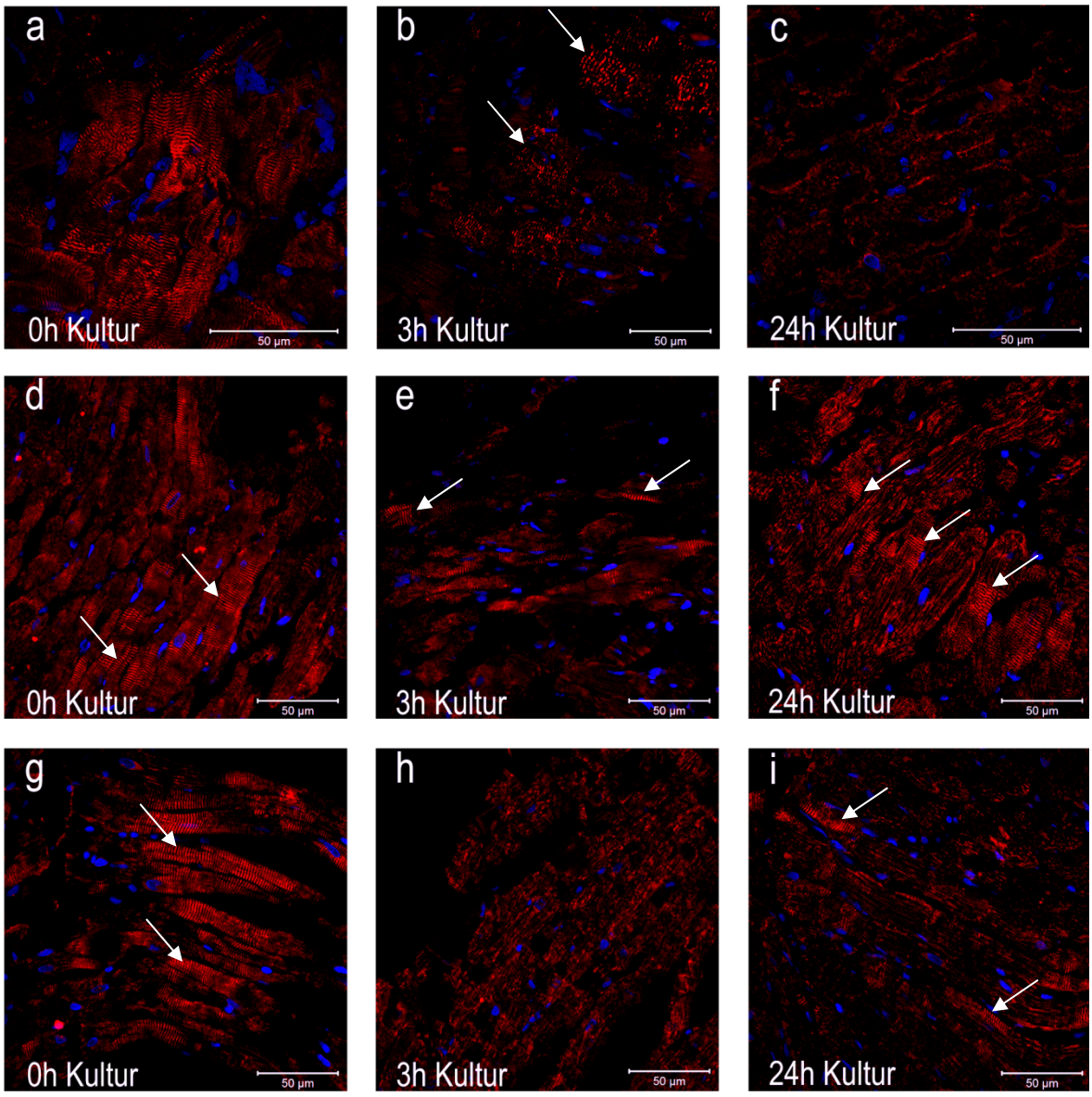

Abbildung 36| Alpha-Aktinin-Färbung der Rattenherzstreifen. Die Kultivierung der unbehandelten Streifen (a-c) zeigte, dass der kontraktile Apparat über die Zeit degenerierte. Die mit EM (d-f) und EM + BDM (g-i) behandelten Streifen wiesen weniger starke Verluste des Proteins alpha-Aktinin im Verlauf der Kultur auf. Die behandelten Streifen zeigten, dass das Protein nach 3 h (e & h) geringer wurde und nach 24 h, in den mit EM behandelten Streifen (f), wieder verstärkt detektiert werden konnte. Bei den mit EM + BDM (g-i) weggefrorenen Streifen konnten nur noch vereinzelt Bereiche mit positiver Struktur beobachtet werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

In den unvermittelt nach dem Auftauen untersuchten Schnitten (Abbildung 37 d, g) konnten nur in Abbildung 37 d vereinzelt Strukturen (Pfeile) aufgenommen werden.

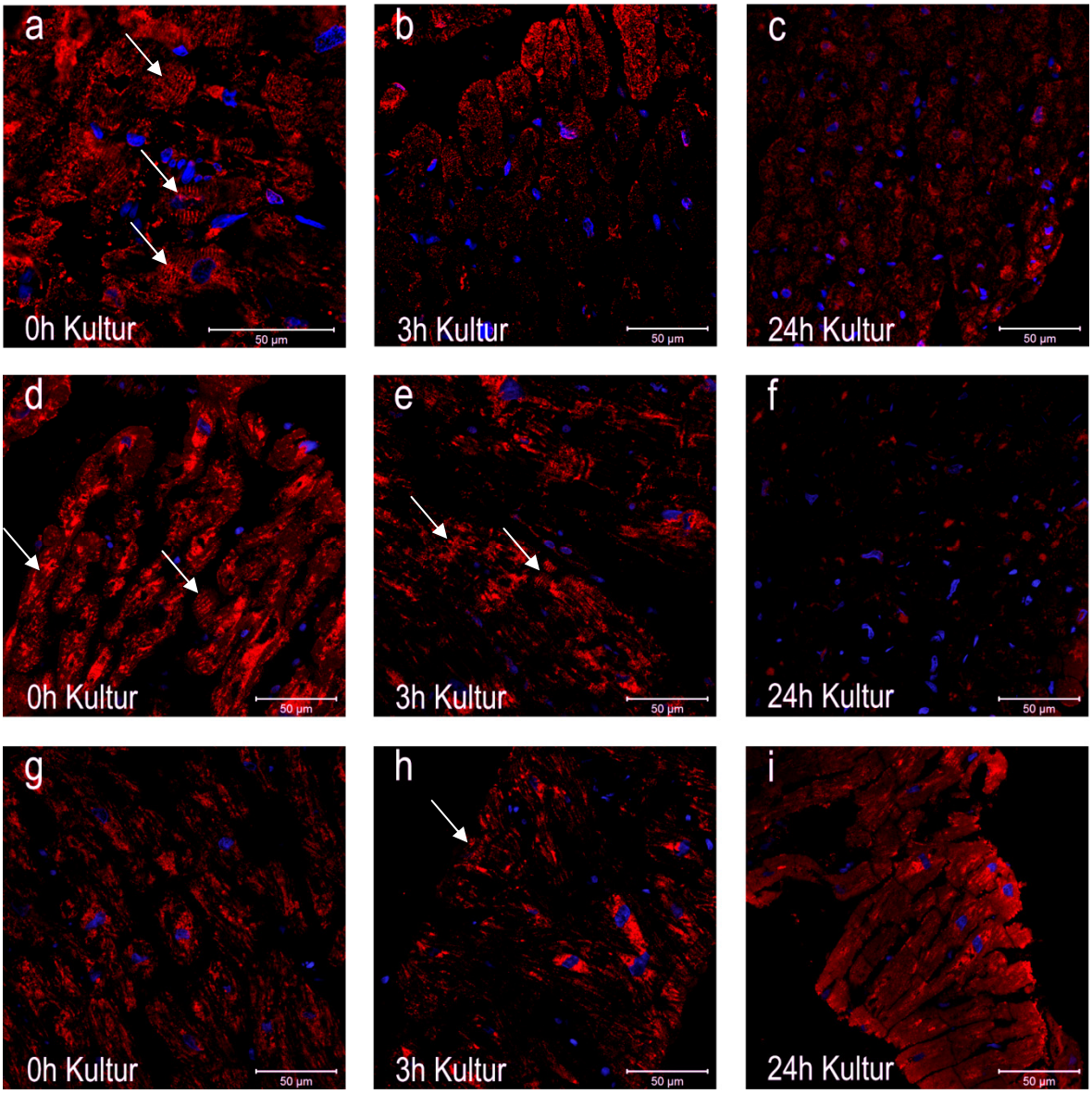

Abbildung 37| Alpha-Aktinin-Färbung der humanen Herzschnitte. In den nicht kultivierten Schnitten (a) konnte die muskuläre Streifung (Pfeile) der Zellen detektiert werden. Nach 3 h (b) in Kultur war eine starke Degeneration der Proteine zu erkennen, die nach 24 h (c) maximal war und keine Detektion der Proteine mehr zuließ. Bei den in EM (d-f) eingefrorenen Schnitten konnte direkt nach dem Auftauen (d) das Protein an einigen Stellen (Pfeile) detektiert werden. Bei den in EM + BDM (g-i) eingefrorenen Streifen war keine Struktur mehr nachweisbar. Nach 3 h Kultur zeigte sich in e (Pfeile) ein leichter Rückgang der Strukturen in h (Pfeil) konnte an einer Stelle Protein nachgewiesen werden. Nach 24 h in Kultur konnte sowohl in EM und auch in EM + BDM behandelten Schnitten keine alpha-Aktinin typische Struktur mehr nachgewiesen werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

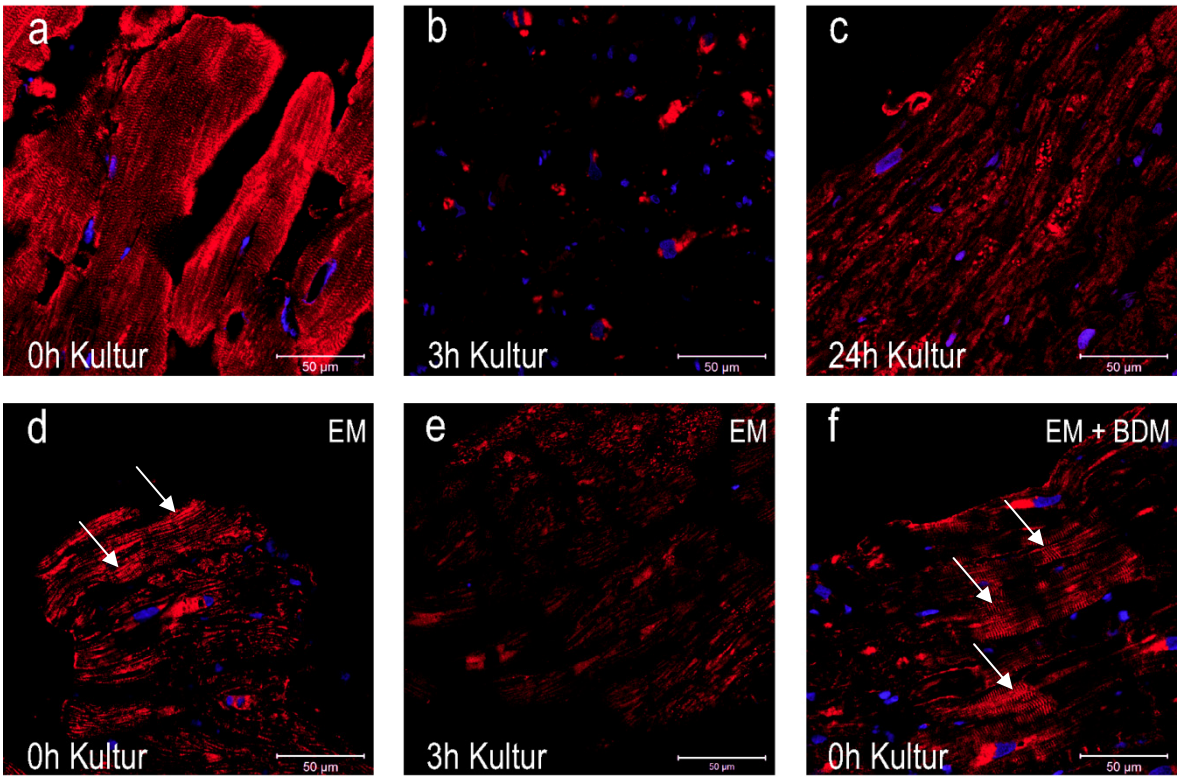

Abbildung 38| Alpha-Aktinin-Färbung der humanen Streifen. Der unmittelbar nach dem Schneiden untersuchte Streifen (a) zeigte noch deutliche alpha-Aktinin-Strukturen, die während der Kultur (3 h und 24 h) vollständig verschwanden (b, c). In den in EM (d-e) und EM + BDM (f) eingefrorene Streifen konnten direkt nach dem Auftauen noch alpha-Aktinin-Proteine nachgewiesen werden (Pfeile), die dann nach 3 h in Kultur (e) fast vollständig verloren gingen. Mangels ausreichender Mengen an Probenmaterial konnten keine Färbungen der 24 h Kultur der EM behandelten Streifen sowie der 3 h und 24 h Kultur der in EM + BDM eingefrorenen Streifen aufgenommen werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

In Abbildung 37 g war dies nicht möglich, wenngleich unspezifisch angefärbte Bereiche zu erkennen waren. Nach 3 h in Kultur konnten in beiden Proben (Abbildung 37 e, h) an wenigen Stellen (Pfeile) noch alpha-Aktinin-Protein detektiert werden. Die Schnitte, die 24 h kultiviert wurden, zeigten hingegen keinerlei strukturbedingte Anfärbungen der Proteine (Abbildung 37 f, i). Das heißt, dass das Protein zwar detektiert werden konnte, allerdings die typischen Strukturen des alpha-Aktinins nicht vorhanden waren.

Die Analyse der Streifen ohne Kultivierung zeigte deutlich erkennbar angefärbte alpha-Aktinin-Filamente (Abbildung 38 a). Dies änderte sich jedoch mit dem Beginn der Air-Lift-Kultur. Schon nach 3 h (Abbildung 38 b) konnte kein Protein mehr detektiert werden. Jedoch war es möglich, nach 24 h an vereinzelten Bereichen der Streifen wieder alpha-Aktinin-Proteine anzufärben (Abbildung 38 c). Allerdings fehlte die typische filamentäre Streifung. Die Betrachtung der mit EM (Abbildung 38 d, e) und EM + BDM (Abbildung 38 f) behandelten Streifen zeigte direkt nach dem Auftauen noch vereinzelt alpha-Aktinin (Abbildung 38 d, f, Pfeile). Nach dreistündiger

Kultur der in EM eingefrorenen Schnitte konnte kein Protein mehr detektiert werden (Abbildung 38 e).

4.3.2.2 Myosin

Neben alpha-Aktinin ist Myosin ein sehr wichtiger Bestandteil des Muskels. Die Mikrofilamente können nur dann kontrahieren, wenn die Myosin-Moleküle intakt sind und eine Verbindung mit den Aktin-Molekülen besteht. Da die Analyse der alpha-Aktinin-Proteine gezeigt hat, dass dieser Teil des kontraktilen Apparates defekt ist, wurden auch die Myosinproteine untersucht, um die Auswirkung der Kryokonservierung noch genauer eingrenzen zu können.

Die Anordnung der Myosin-Moleküle war in den Schnitten (Abbildung 39) bzw. Streifen (Abbildung 40) die direkt nach dem Schneiden (Abbildung 39 / 40 a (Pfeile)) untersucht wurden noch deutlich zu erkennen. Während bei den Schnitten nach einer dreistündigen Kultivierung (Abbildung 39 b, Pfeile) noch vereinzelt Myosin-Strukturen zu erkennen waren, konnte in den 3 h kultivierten Streifen keine Myosin-Proteine mehr nachgewiesen werden (Abbildung 40 b). Auch im weiteren Verlauf der Kultivierung zeigte sich, dass in den Schnitten nach 24 h nur noch in wenigen Bereichen Myosin vorhanden war (Abbildung 39 c, Pfeile). In den Streifen war es auch nach 24 h nicht mehr möglich, Myosin-Proteine zu detektieren (Abbildung 40 c). In den in EM (Abbildung 39 d-f) und EM + BDM (Abbildung 39 g-i) eingefrorenen Schnitten konnten nach dem Auftauen noch Bereiche detektiert werden, die positiv gegen das Myosinprotein angefärbt worden waren (Pfeile). Auch bei den mit beiden Einfriermedien behandelten Streifen (Abbildung 40 d, g) konnten unmittelbar nach dem Auftauen Myosin-Proteine (Pfeile) nachgewiesen werden. Die Analyse der eingefrorenen und wieder aufgetauten Schnitte (Abbildung 39 e, h) zeigte nach einer Kultivierung von 3 h eine Degeneration der Myosinproteine, die durch die Behandlung mit den beiden Einfriermedien unterschiedlich ausgeprägt war. So konnten in den mit EM eingefrorenen Schnitten (Abbildung 39 e) nur noch vereinzelt intakte Myosinstrukturen (Pfeile) detektiert werden. Die Schnitte, die mit EM + BDM behandelt wurden (Abbildung 39 h, Pfeile), wiesen mehr Teilbereiche mit Myosin auf. Nach 24 h in Kultur konnten in beiden behandelten Proben noch Myosinmoleküle nachgewiesen werden (Abbildung 39 f, i), die jedoch nicht mehr die typische Streifung aufwiesen. Die eingefrorenen Streifen (Abbildung 40 d-i) zeigten ein ähnliches Muster wie die Schnitte. Unmittelbar nach dem Auftauen konnten noch Myosinstrukturen nachgewiesen werden (Abbildung 40 d, g, Pfeile). Nach 3 h Kultur konnte eine Degeneration dokumentiert werden (Abbildung 40 e, h), wobei in den mit EM + BDM behandelten Streifen weniger positive Bereiche mit Myosinprotein auftraten (Abbildung 40 h, Pfeile), als in den mit EM behandelten (Abbildung 40 e, Pfeile). Im Vergleich zu den 3 h kultivierten Proben wiesen die Proben der 24-stündigen

Air-Lift-Kultur nur geringe Veränderungen in der Detektion der Proteine auf. Diese konnten vereinzelt noch dargestellt werden (Abbildung 40 f, i, Pfeile).

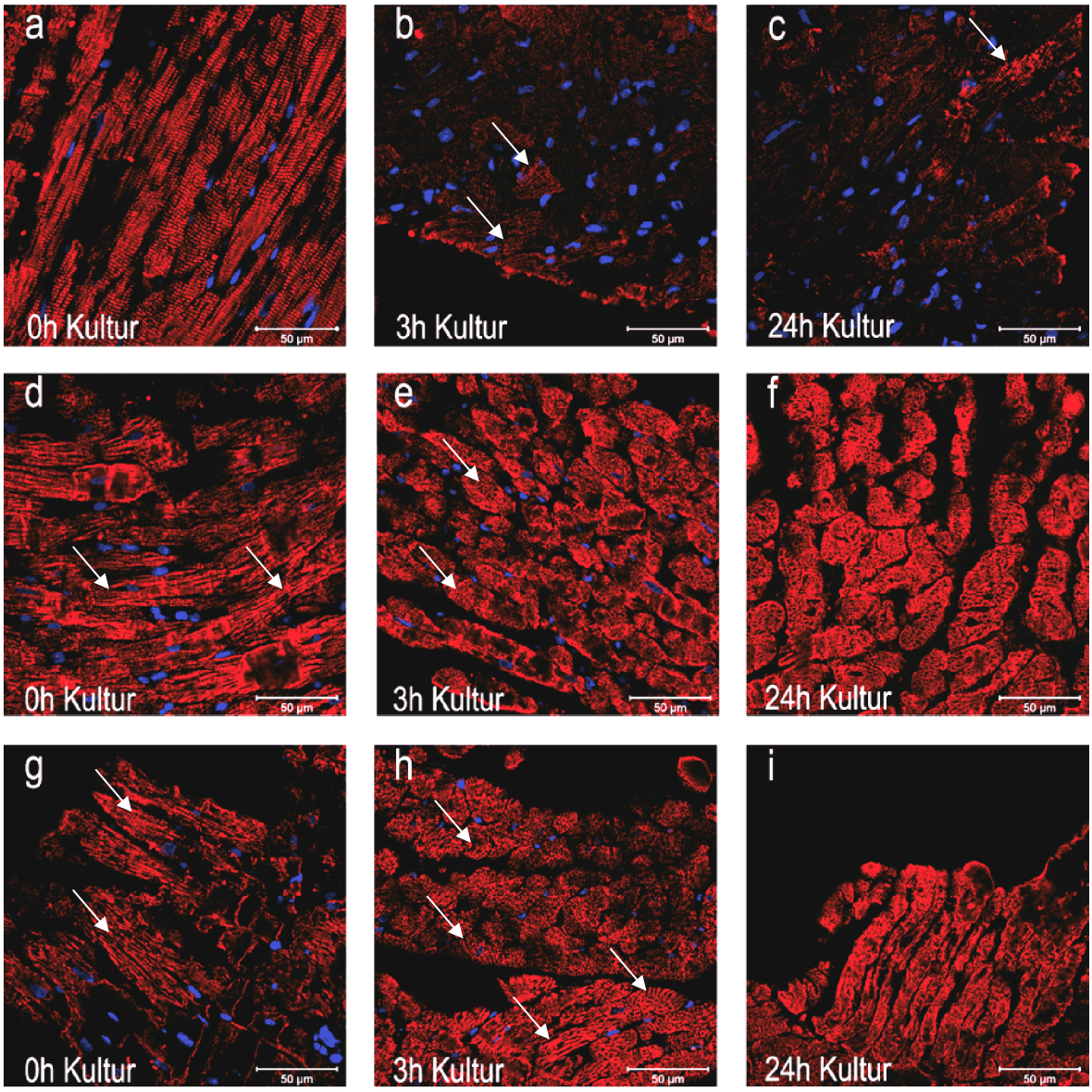

Abbildung 39| Myosin-Färbung der Schnitte aus Rattenherzgewebe. Während im 0 h Kultur-Schnitt (a) die Myosin-Struktur, deutlich sichtbar war, konnte diese im Laufe der Kultur über 3 h (b) und 24 h (c) nur noch an wenigen Stellen (Pfeile) detektiert werden. Die in EM eingefrorenen Schnitte wiesen direkt nach dem Auftauen noch deutliche Strukturen des Myosinproteins auf (d, Pfeile), im weiteren Verlauf der Kultivierung kam es zu einer Degenerierung der Strukturen (e-f, Pfeile). Der Verlust an Strukturproteinen war während der Kultivierung in den in EM + BDM kryokonservierten Schnitten (g-h) am höchsten. Direkt nach dem Auftauen (g) war die Struktur nur noch an einigen Stellen zu erkennen (Pfeile). Die Schnitte die nach 3 h bzw. 24 h in Kultur auf die Myosinproteine untersucht wurden, zeigten ebenfalls einen Verlust an Myosinproteinen. Dennoch konnten nach 3 h noch Struktur (h, Pfeile) gezeigt werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

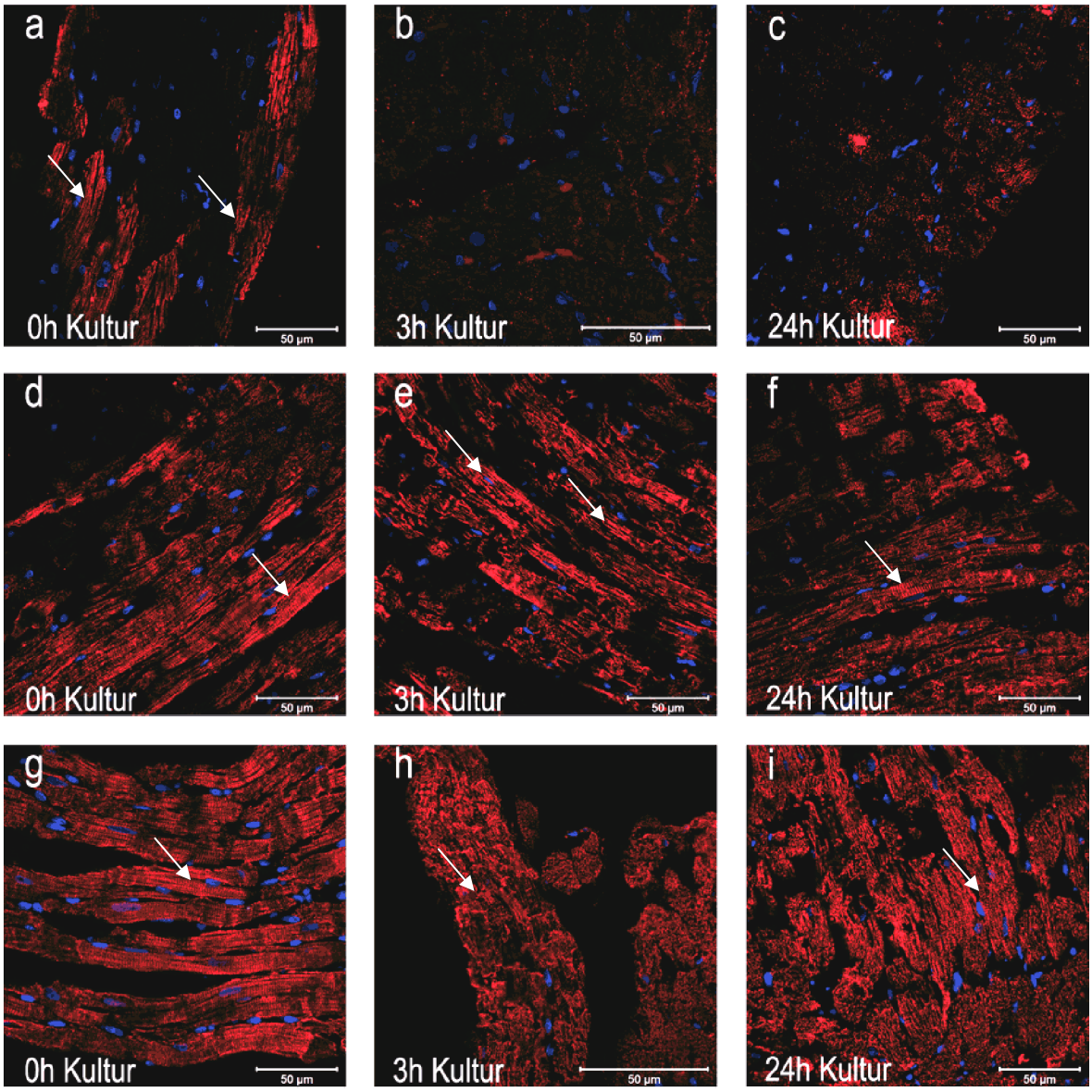

Abbildung 40| Myosin-Färbung der Rattenherzstreifen. Die immunzytochemische Analyse der Streifen auf Myosin-Proteine zeigte, dass diese während des Kultivierungsvorgangs sowohl in den akuten Streifen (a-c) wie auch in den mit Einfriermedium behandelten Streifen (d-i) zurück gingen. Unmittelbar nach dem Schneiden bzw. Auftauen (a, d, g) konnten geordnete Myosinbereiche nachgewiesen werden (Pfeile). In den unbehandelten Streifen konnte im weiteren Verlauf der Kultivierung (b, c) kein Protein mehr dargestellt werden. Nach 3 h in Kultur wurde in den kryokonservierten Streifen (e, h) ein Rückgang der Myosinproteine (Pfeile) beobachtet. 24 h nach dem Auftauen (f, i) konnten ebenfalls noch Proteine (Pfeile) in den Streifen nachgewiesen werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

In den humanen Gewebeproben konnte insgesamt weniger Myosinprotein detektiert werden als in den Proben aus Rattenherzgewebe. Die Schnitte, die direkt nach der Präparation untersucht wurden, zeigten noch intaktes Myosinprotein (Abbildung 41 a, Pfeile). Nach 3 h Kultur konnte ebenfalls noch Myosinprotein angefärbt werden (Abbildung 41 b, Pfeile), welches jedoch aufgrund der veränderten Schnittrichtung der Herzschnitte eine andere Struktur aufwies. Dies war auch bei der Analyse der Schnitte aus der 24-stündigen Kultivierung zu erkennen (Abbildung 41 c). Hier konnte

an einigen Stellen Myosinprotein (Pfeile) nachgewiesen werden. Bei den mit EM (Abbildung 41 d-f) und EM + BDM (Abbildung 41 g-i) behandelten Proben konnte unmittelbar nach dem Auftauen (Abbildung 41 d, g) nur an sehr wenigen Bereichen der Schnitte noch Myosinproteine (Pfeile) dokumentiert werden.

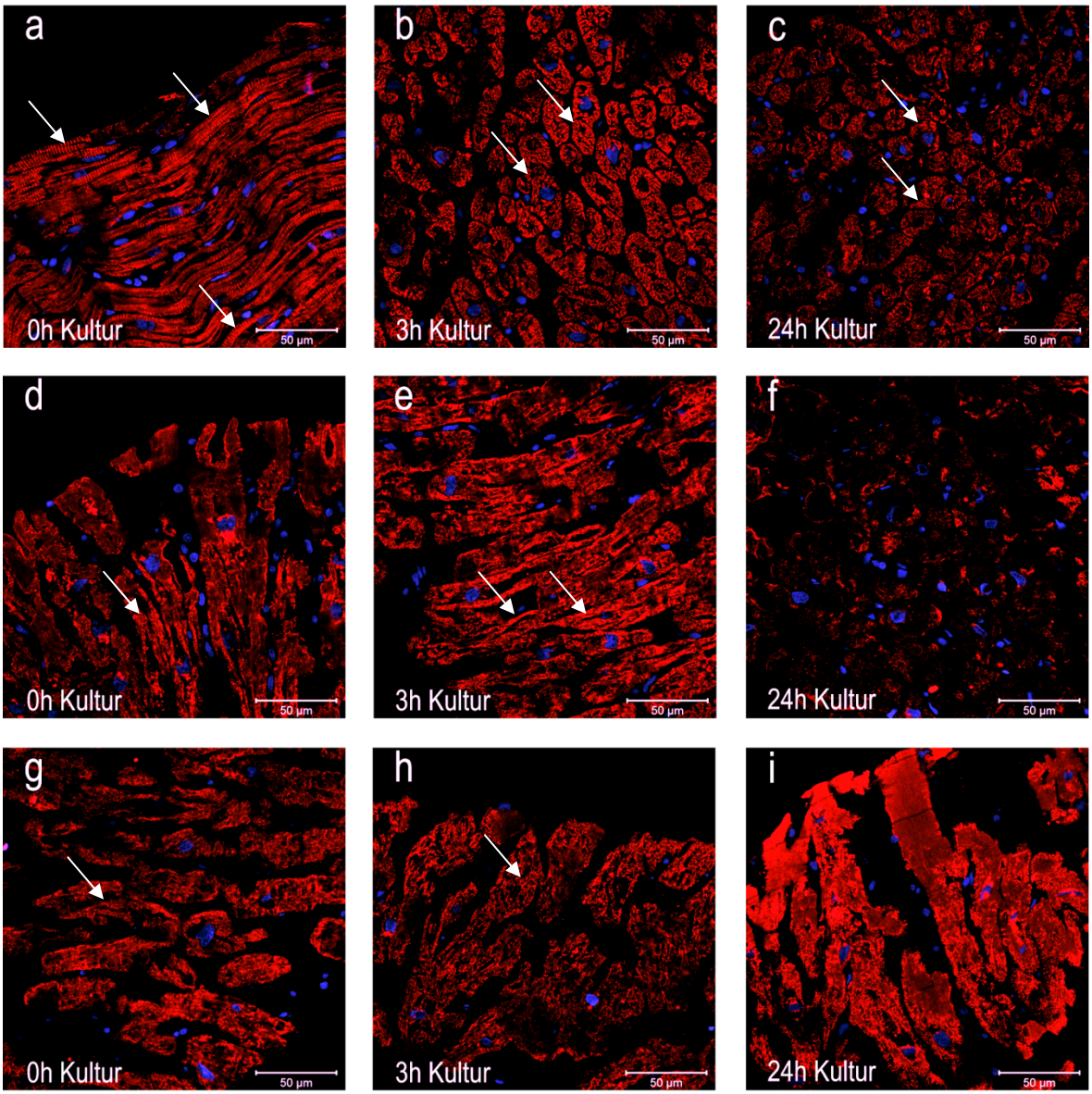

Abbildung 41| Myosin-Färbung der humanen Schnitte. Die nicht kultivierten Schnitte (a) zeigten die typische Myosinstruktur (Pfeile), die nach 3-stündiger Kultivierung (b) ebenfalls noch nachgewiesen werden konnte (Pfeile). Hier war die Schnittrichtung im Herzgewebe eine andere. Nach 24 h in Kultur (c) konnten an vereinzelten Arealen Myosinprotein nachgewiesen werden (Pfeile). Die in EM (d-f) und EM + BDM (g-i) eingefrorenen Schnitte wiesen direkt nach dem Auftauen (d, g) und nach 3 h in Kultur nur an wenigen Stellen Strukturen des Myosinproteins (Pfeile) auf. Nach 24 h Kultur (f, i) konnten noch rot gefärbte Bereiche detektiert werden, jedoch wiesen diese nicht mehr die typische Myosinstruktur auf. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

Die Untersuchung der 3 h kultivierten Schnitte (Abbildung 41 e, h,) ergab, dass auch hier nur an wenigen Stellen in den Schnitten noch intakte Myosinstrukturen (Pfeile) vorhanden waren. Nach 24 h

Air-Lift-Kultur konnte keine spezifische Myosinstruktur mehr nachgewiesen werden (Abbildung 41 f, i), dennoch waren unspezifische Anfärbungen zu erkennen.

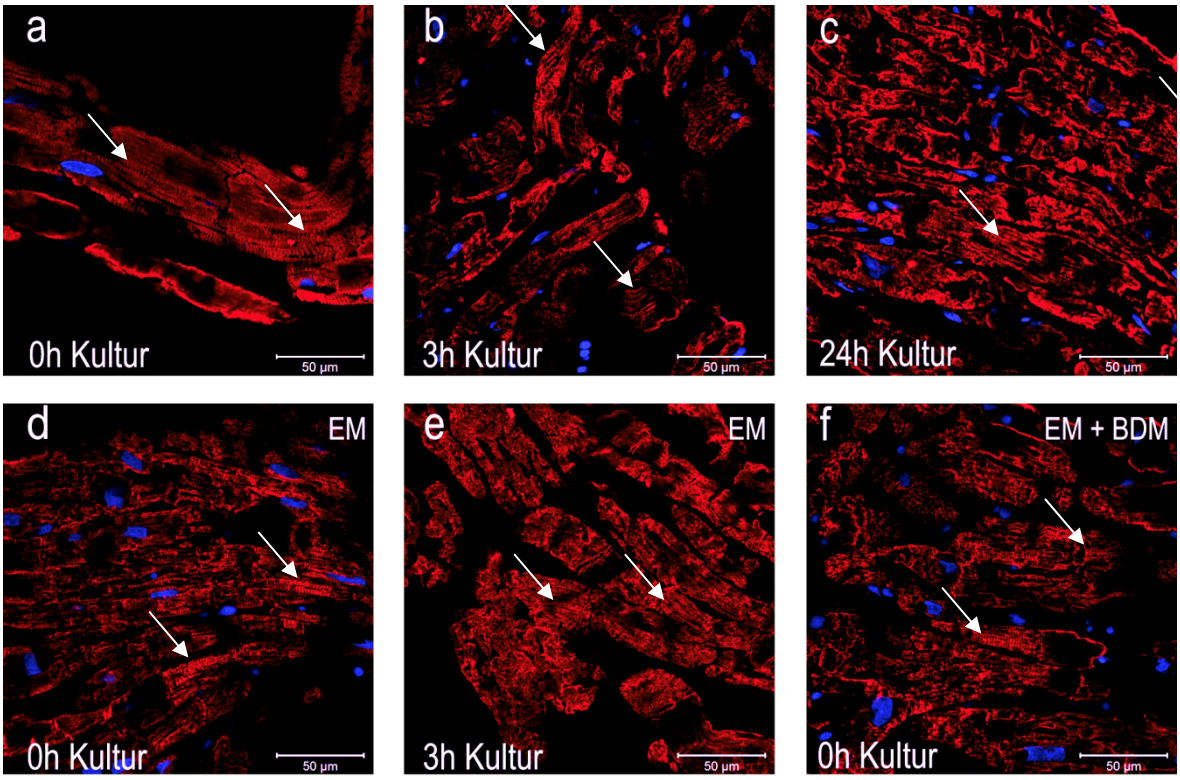

Abbildung 42| Myosin-Färbung der humanen Streifen. Die immunzytochemische Analyse der Streifen auf Myosin-Proteine zeigte, dass in allen drei Proben unmittelbar nach dem Schneiden und Auftauen Myosinprotein nachweisbar war (a, d, f, Pfeile). Nach 3 h in Kultur konnte in den unbehandelten und mit EM behandelten Proben (b, d) an wenigen Stellen noch Protein detektiert werden. Die Untersuchung nach 24 h in Kultur an den unbehandelten Streifen (c) zeigte, dass noch Proteine des Myosins in geringer Menge vorhanden waren. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

Die Untersuchung der Streifen ergab, dass die Myosinstrukturen schon direkt nach dem Schneiden nur in geringem Maße detektiert werden konnten (Abbildung 42 a, Pfeile). Im weiteren Verlauf der Kultivierung konnte nach 3 h bzw. nach 24 h (Abbildung 42 b, c) nur an vereinzelten Stellen noch Myosinstrukturen (Pfeile) ausgemacht werden. Die Analyse der Streifen unmittelbar nach dem Auftauen (Abbildung 42 d, f) korrespondiert gut mit den Ergebnissen der Schnitte. Auch hier konnten nur vereinzelt Myosinstrukturen (Pfeile) im Gewebe ausgemacht werden. Die weitere 3-stündige Kultivierung der Streifen, die mit EM eingefroren waren (Abbildung 42 e), zeigte keine Veränderungen zu den nicht kultivierten Streifen.

4.3.2.3 N-Cadherin

Die vorangegangenen Untersuchungen des kontraktilen Apparates zeigten, dass dieser sowohl durch das Kryokonservieren als auch durch die Kultur stark geschädigt, bzw. vollständig ab- oder

umgebaut wird. Die zusätzliche Analyse der Zell-Zell-Kontakt-Proteine, zu denen N-Cadherin und Connexin 43 gehören, sollte zeigen, ob durch die Kryokonservierung/Kultivierung auch die Kommunikationsbereiche zwischen den Zellen geschädigt werden. Die Untersuchung in den Rattenherzschnitten zeigte sowohl in den unbehandelten Schnitten (Abbildung 43 a-c) als auch in den mit EM (Abbildung 43 d-f) und EM + BDM (Abbildung 43 g-i) eingefrorenen Schnitten direkt nach dem Schneiden (Abbildung 43 a) und Auftauen (Abbildung 43 d, g) eine positive Färbung der N-Cadherin-Proteine. Im weiteren Verlauf der Kultivierung zeigte sich bei den unbehandelten Schnitten ein Rückgang der N-Cadherin-Proteine (Abbildung 43 b, c). Die Kultivierung der in EM kryokonservierten Schnitte zeigte nach 3 h (Abbildung 43 e) einen geringen Rückgang der nachzuweisenden N-Cadherin-Proteine, die sich auch nach 24 h in Kultur (Abbildung 43 f) noch dokumentieren ließen. Auch in den mit EM + BDM behandelten Schnitten konnten sowohl nach 3 h (Abbildung 43 h) als auch nach 24 h Kultur (Abbildung 43 i) Verbindungen zwischen den Zellen gezeigt werden. Die Analyse der Rattenherzstreifen zeigte, dass sich die N-Cadherin-Proteine in den unbehandelten wie auch in den kryokonservierten Streifen direkt nach der Präparation und dem Auftauen nachweisen ließen (Abbildung 44 a, d, g). Nach 3 h in Kultur konnten in den Streifen, die mit EM + BDM eingefroren waren keine N-Cadherin-Proteine detektiert werden (Abbildung 44 h). Die anderen beiden Proben wiesen das Protein nach 3 h Kultur auf (Abbildung 44 b (Pfeile), e). Nach 24 h Air-Lift-Kultur konnte in allen drei Proben das N-Cadherin-Protein positiv angefärbt werden (Abbildung 44 c, f, i), wobei in den unbehandelten Streifen das Protein (Abbildung 44 c, Pfeile) in geringerem Maße detektiert wurde, als in den anderen beiden Proben. In den humanen Schnitten zeigte die Proteinexpression von N-Cadherin nur eine geringe Änderung über die Zeit (Abbildung 45). Sowohl in den unbehandelten Proben (Abbildung 45 a-c) als auch in den Schnitten, welche in EM (Abbildung 45 d-f) und EM + BDM (Abbildung 45 g-i) eingefroren waren, konnte zu allen drei Messzeitpunkten das N-Cadherin-Protein angefärbt werden. Es waren dennoch leichte Unterschiede zwischen den behandelten Proben auszumachen. So war das Protein in den EM-Proben nach 3 h bzw. 24 h in Kultur besser zu detektieren als in den EM + BDM-Proben. Hier zeigte sich im Verlauf der Kultivierung ein Rückgang der nachzuweisenden Proteine. In den humanen Streifen war es ebenfalls möglich, das Protein in allen Proben nachzuweisen (Abbildung 46 a-e). Die mit den beiden Einfriermedien behandelten Streifen konnten nur direkt nach dem Auftauen analysiert werden (Abbildung 46 d, e). In den unbehandelten Proben war der Nachweis von N-Cadherin sowohl unmittelbar nach dem Schneiden (Abbildung 46 a) als auch nach 3 h und 24 h Kultur (Abbildung 46 b, c) möglich. In den mit EM (Abbildung 46 d) und EM + BDM (Abbildung 46 e) eingefrorenen Streifen konnte N-Cadherin direkt nach dem Auftauen gut nachgewiesen werden.

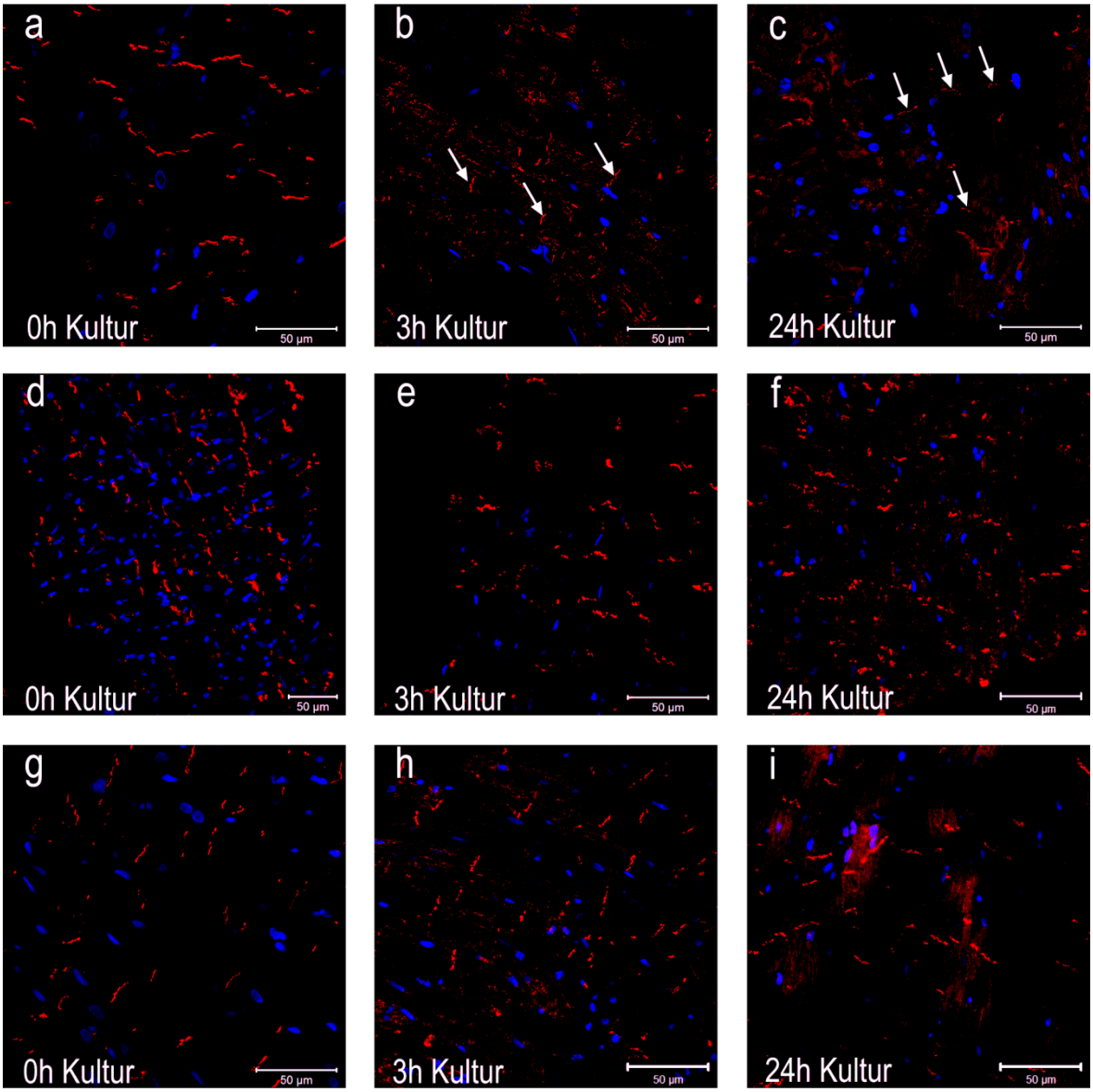

Abbildung 43| N-Cadherin-Färbung der Rattenherzschnitte. Die Struktur und Expressionslevel der N-Cadherin-Proteine zeigte kaum Veränderungen im Verlauf der Kultivierung. Sowohl in den unbehandelten Schnitten (a-c) als auch in den in EM (d-f) und EM + BDM (g-i) eingefrorenen Schnitten konnten N-Cadherine direkt nach dem Schneiden und dem Auftauen (a, d, g) sowie nach 3 h in Kultur (e, h) detektiert werden. Nach 3 h bzw. 24 h Kultivierung konnte in den unbehandelten Schnitten (b, c) nur noch an wenigen Stellen N-Cadherin-Protein (Pfeile) nachgewiesen werden. In den behandelten Proben konnten die Proteine nach 24 h noch gut detektiert werden (f, i). Die Zellkerne wurden mir DAPI (blau) angefärbt.

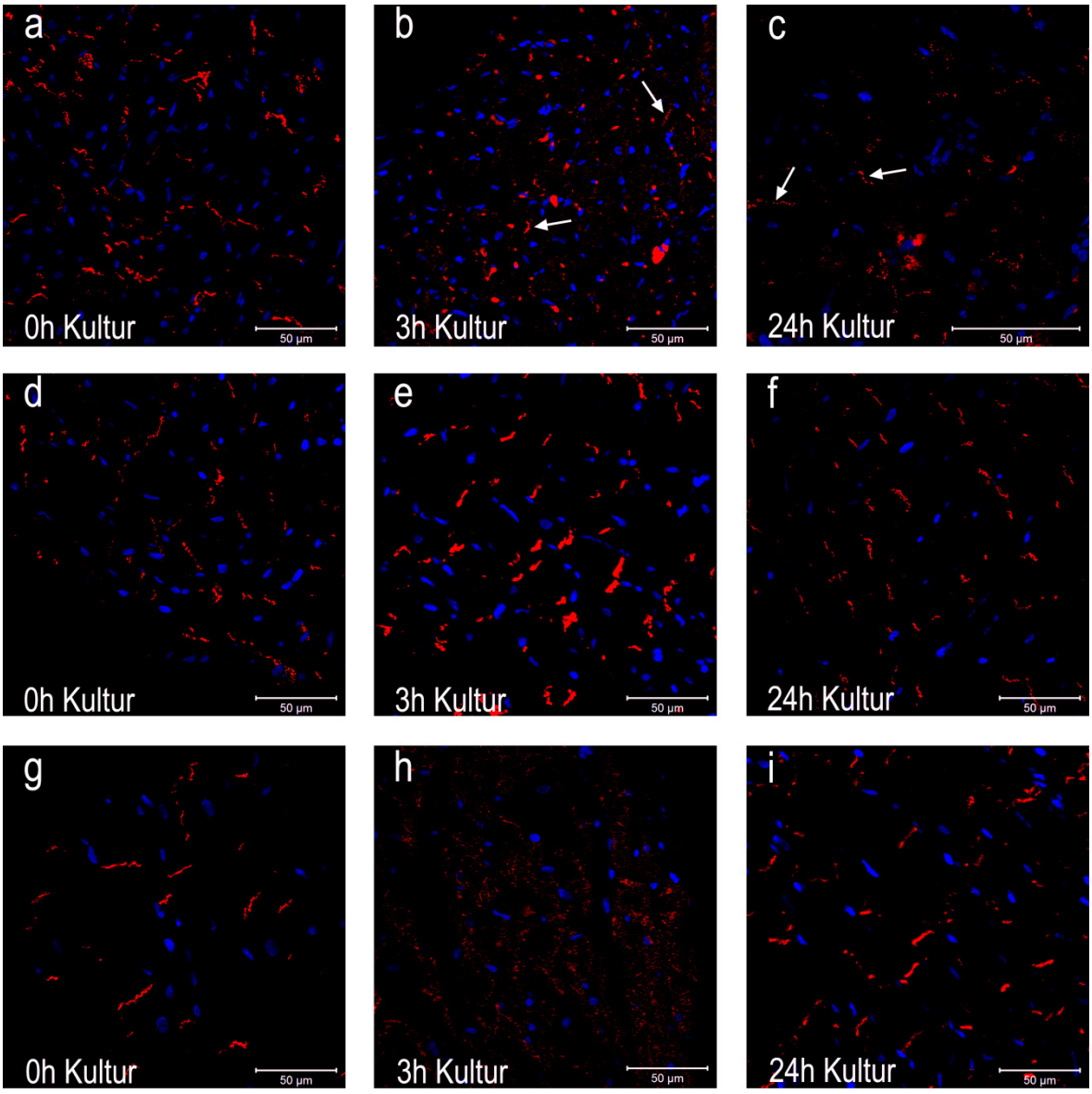

Abbildung 44| N-Cadherin-Färbung der Streifen aus Rattenherzgewebe. Die immunzytochemische Anfärbung der N-Cadherin-Streifen ergab, dass die Proteine unmittelbar nach dem Schneiden und dem Auftauen in allen 3 Proben vorhanden war (a, d, g). Nach 3 h in Kultur konnten in den unbehandelten und den mit EM eingefrorenen Streifen noch intakte Zell-Zell-Kontakte nachgewiesen werden (b (Pfeile), e). In der mit EM + BDM (h) behandelten Probe konnte kein N-Cadherin-Protein mehr detektiert werden. Nach 24 h in Kultur (c, f, i) konnte in allen Proben das gesuchte Protein nachgewiesen werden, wobei in c weniger positive Strukturen (Pfeile) detektiert werden konnten. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

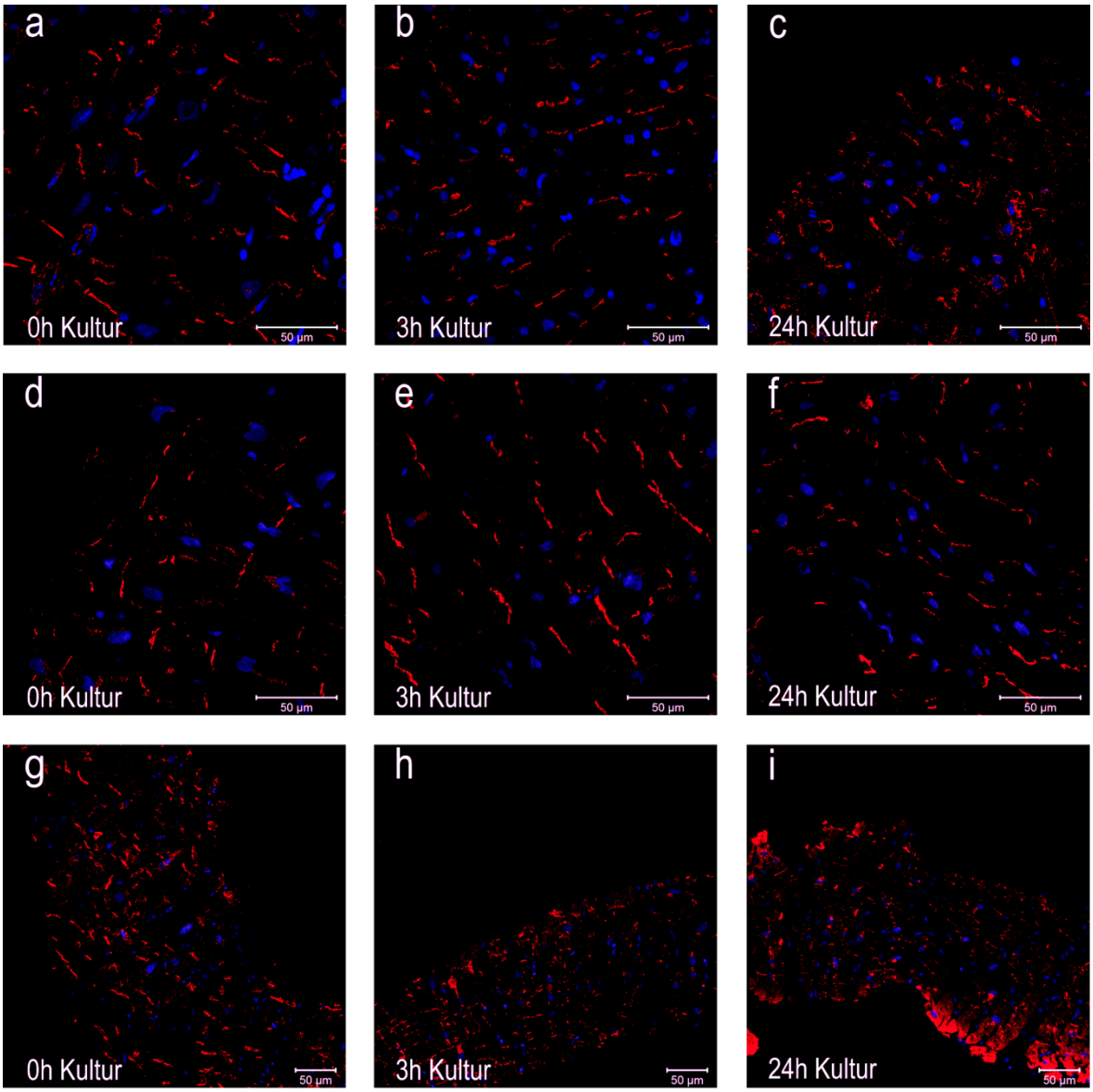

Abbildung 45| N-Cadherin-Färbung der humanen Schnitte. Die Betrachtung der Schnitte auf N-Cadherin-Proteine zeigte kaum Veränderungen im Verlauf der Kultivierung. Sowohl in den unbehandelten Schnitten (a-c) als auch in den in EM (d-f) eingefrorenen Schnitten konnte das Protein detektiert werden. In den mit EM + BDM (g-i) behandelten Schnitten konnte N-Cadherin unmittelbar nach dem Auftauen nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Kultivierung wurden geringere Mengen des Proteins dokumentiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

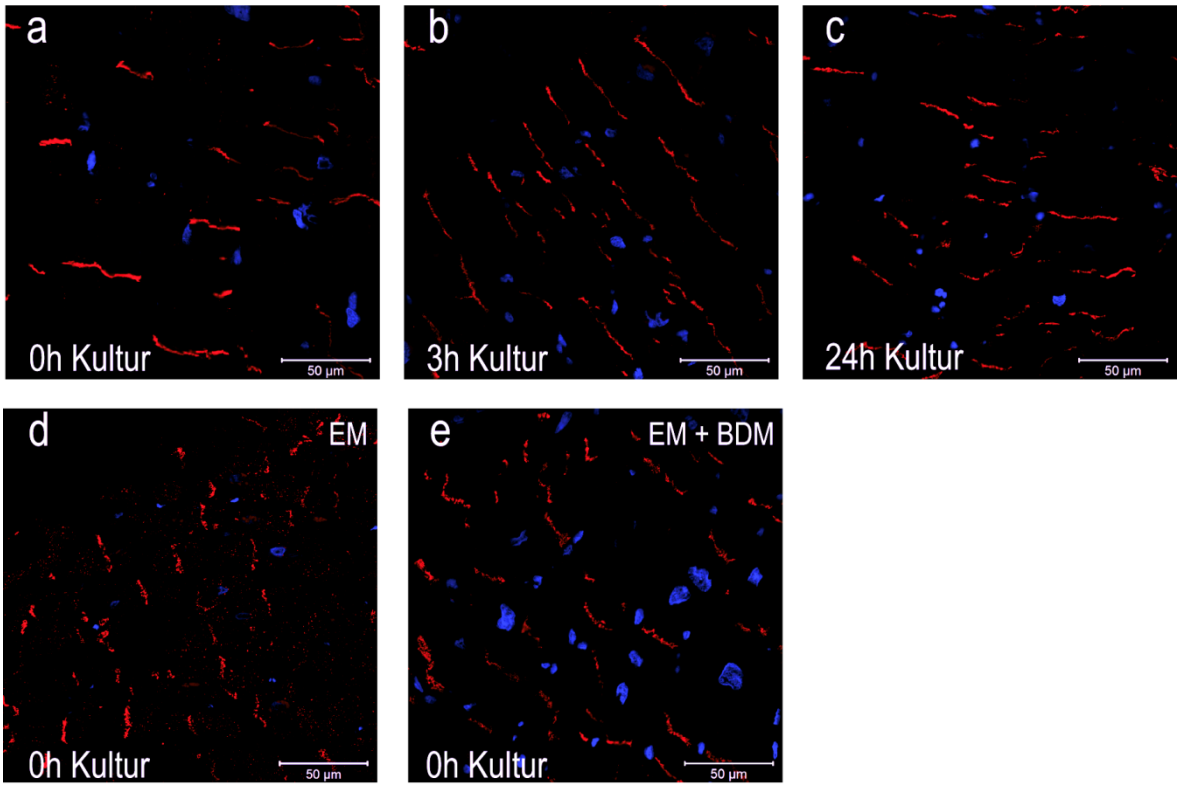

Abbildung 46| N-Cadherin-Färbung der humanen Streifen. Die immunzytochemische Untersuchung der Streifen auf N-Cadherin-Proteine zeigte kaum Veränderungen. Die Streifen ohne Kultivierung zeigten in allen drei unterschiedlich behandelten Proben (a, d, e) gut ausgeprägte N-Cadherin-Strukturen. Nach 3 h und 24 h Kultivierungszeit zeigten sich in der unbehandelten Probe (b, c) keine Unterschiede zur nicht kultivierten Probe (a). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

4.3.2.4 Connexin 43

Neben N-Cadherin ist auch das Protein Connexin 43 für die Kontakte zwischen den einzelnen Herzzellen verantwortlich. Aus diesem Grund wurden sowohl die nicht eingefrorenen als auch die mit EM und EM + BDM eingefrorenen Schnitte und Streifen hinsichtlich einer eventuellen Degradation von Connexin 43 untersucht.

Diese Analyse ergab, dass das Protein in den Schnitten aus dem Rattenherzen unmittelbar nach dem Schneiden bzw. Auftauen nachweisbar war (Abbildung 47 a, d, g). Durch die Kultivierung als Air-Lift-Kultur kam es nach 3 h zu einem Rückgang des Proteins in allen drei Proben (Abbildung 47 b, e, h). In beiden eingefrorenen/aufgetauten Proben (Abbildung 47 e, h) konnte das Connexin 43 besser nachgewiesen werden als in der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 47 b). Nach 24 h Kultur zeigte sich ein weiterer Rückgang des Proteins in der unbehandelten Probe (Abbildung 47 c), während es in den beiden kryokonservierten Proben (Abbildung 47 f, i) detektiert werden konnte. Die Versuche wurden mit Rattenherzstreifen wiederholt (Abbildung 48 a-i). In den

nicht kultivierten Proben konnten Unterschiede ausgemacht werden. So wurde in den unbehandelten Streifen ohne Kultur (Abbildung 48 a) das gesuchte Protein deutlich nachgewiesen. In den beiden in EM und EM + BDM eingefrorenen Streifen war die Detektion von Connexin 43 ebenfalls möglich (Abbildung 48 d, g).

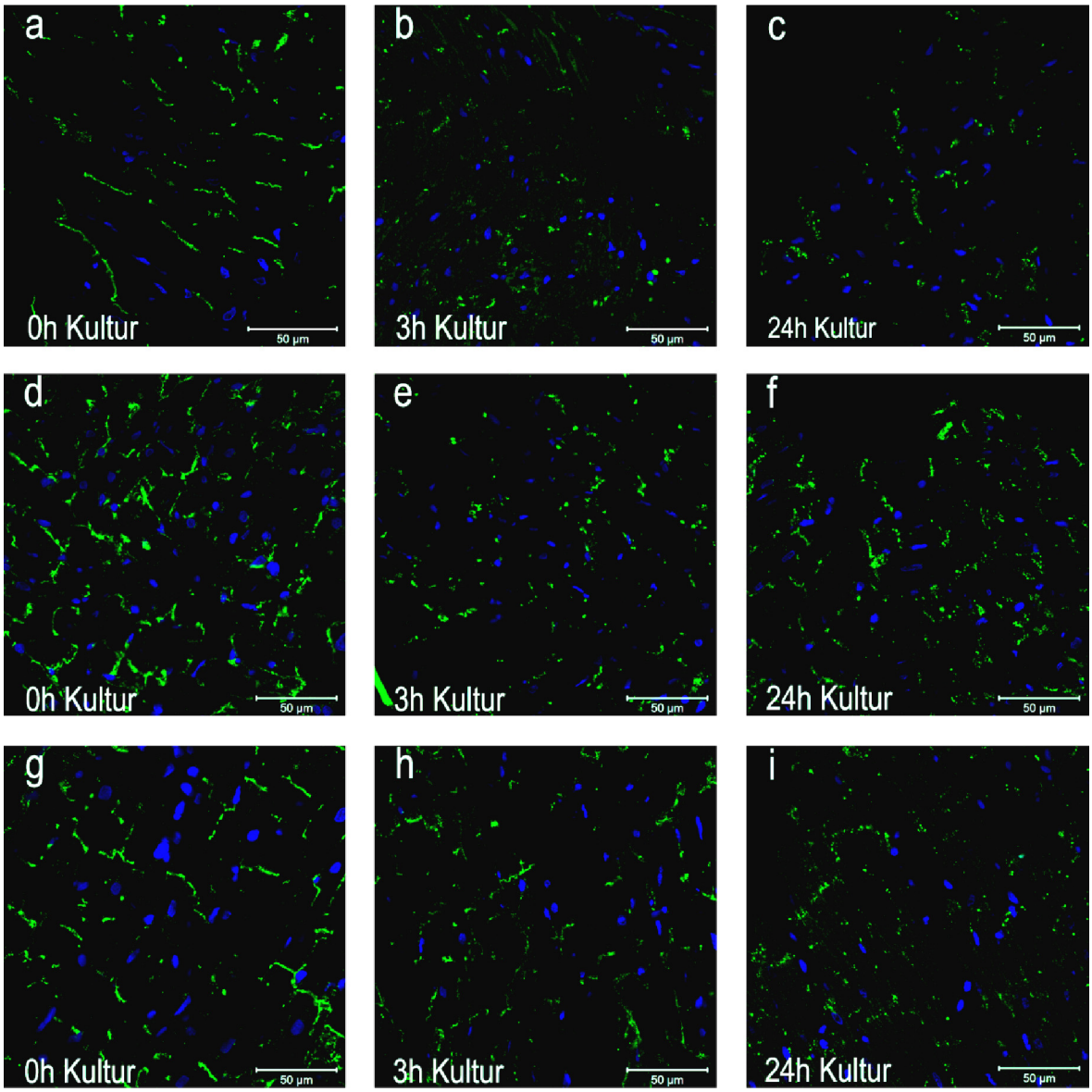

Abbildung 47| Connexin 43-Färbung der Schnitte aus Rattenherzgewebe. Die Betrachtung der immunzytochemischen Anfärbung von Connexin 43 wies direkt nach der Präparation (a) positive Zell-Zell-Kontakte auf, die während der Kultur in den unbehandelten Schnitten zurück gingen (b, c). Die mit EM behandelten Schnitte zeigten unmittelbar nach dem Auftauen (d) eine deutliche Anfärbung des Connexin 43-Proteins. Die positiv gefärbten Zell-Zell-Kontakte verringerten sich nach dreistündiger bzw. 24-stündiger Kultivierung (e, f). Einen ähnlichen Verlauf konnte bei den Schnitten, welche in EM + BDM (g-i) eingefroren waren, beobachtet werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt.

Die Betrachtung der Streifen, die 3 h kultiviert wurden, zeigte einen Rückgang des Proteins in allen 3 Proben (Abbildung 48 b, e, h). Wie auch in den Schnitten zeigte sich, dass das Protein in der

unbehandelten Kontrolle nach 24-stündiger Kultivierung in Air-Lift-Kultur (Abbildung 48 c) weiter abgebaut wurde. Die Expression in den kryokonservierten Proben war nach 24 h Kultur (Abbildung 48 f, i), im Gegensatz zur Expression nach 3 h Kultivierung, wieder erhöht.

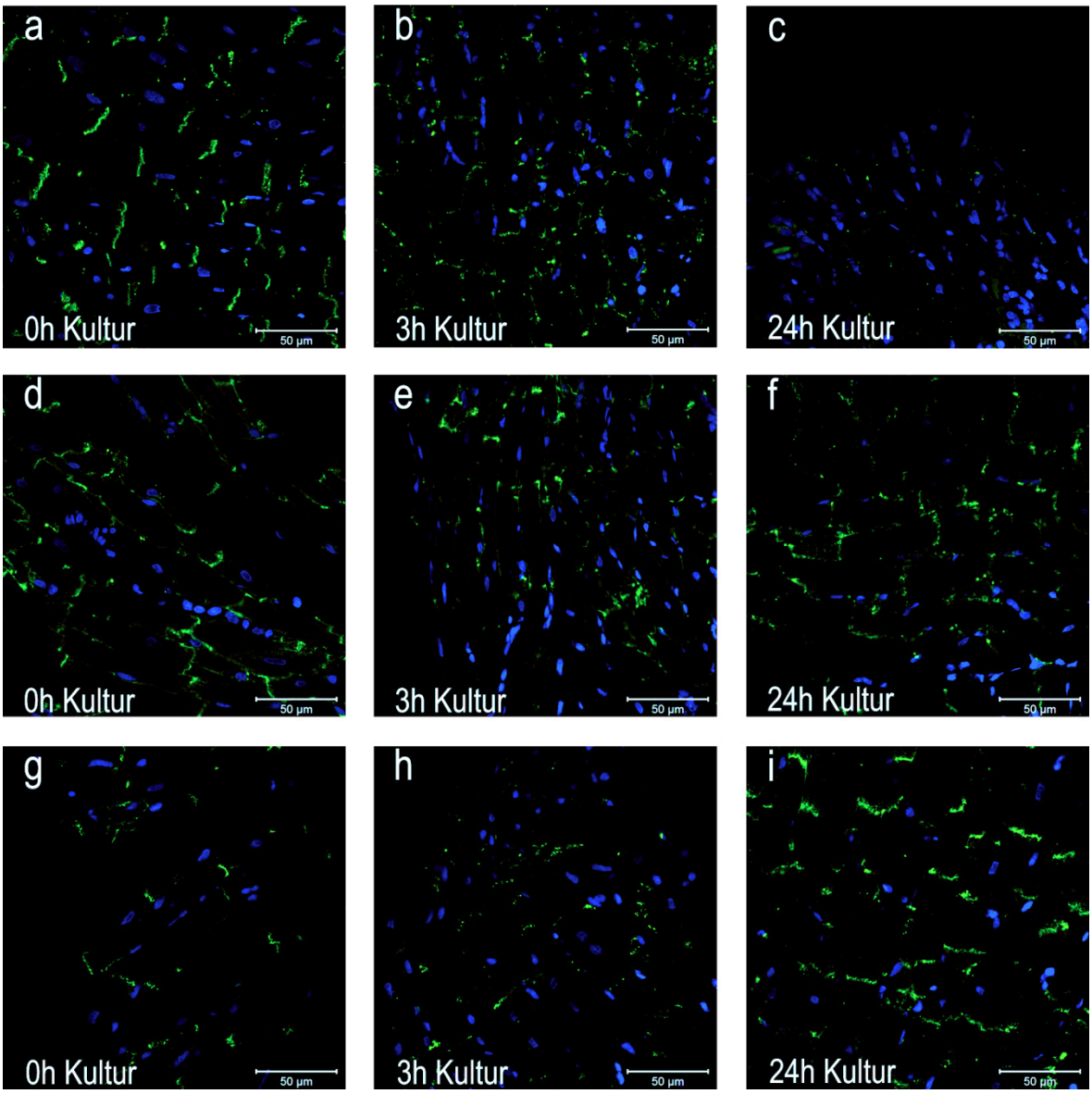

Abbildung 48| Connexin 43-Färbung der Rattenherzstreifen. Die Detektion der immunzytochemisch angefärbten Connexin 43-Proteine zeigte, dass diese Struktur während der Kultur der unbehandelten Streifen zurück ging und nach 24 h nicht mehr vorhanden war (a-c). Streifen, welche in EM eingefroren waren, wiesen nach dem Auftauen wie auch nach 3 h und 24 h Kultur noch Proteine auf (d-f). Während in den mit EM + BDM behandelten Proben unmittelbar nach dem Auftauen Connexin 43-Proteine nachweisbar waren, konnten nach 3 h Kultur (h) weniger Proteine detektiert werden. Die Analyse der Streifen nach 24-stündiger Kultur zeigte eine positive Reaktion der Proteine mit dem Connexin 43-Antikörper (i). Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt.

Neben den Rattenherzschnitten und –streifen wurde auch humanes Gewebe auf das Protein Connexin 43 untersucht. Die humanen Schnitte wiesen über die gesamte Kultivierungszeit in allen drei unterschiedlich behandelten Proben das Protein auf (Abbildung 49). Der Nachweis in den nicht

eingefrorenen Kontrollen zeigte unmittelbar nach dem Schneiden (Abbildung 49 a) eine schwächere Expression des Proteins als nach dreistündiger Kultur (Abbildung 49 b).

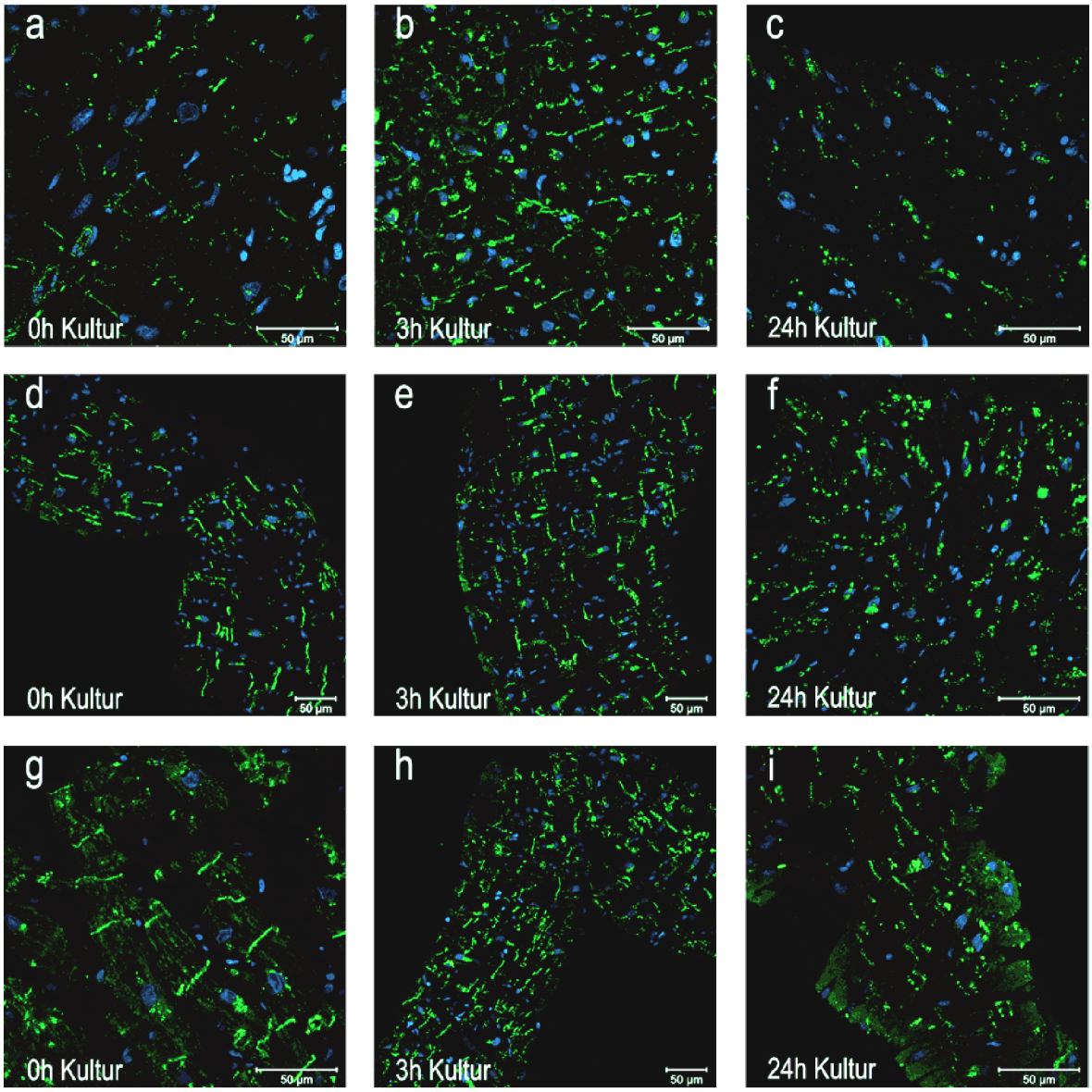

Abbildung 49| Connexin 43-Färbung der humanen Schnitte. Die Betrachtung der immunzytochemischen Anfärbung von Connexin 43 wies direkt nach der Präparation bei den unbehandelten Schnitten (a) positive Zell-Zell-Kontakte auf. Nach 3 h Kultur wiesen sie einen Anstieg an Connexin 43-Protein auf, der nach 24-stündiger Kultur wieder rückläufig war. Die mit EM und EM + BDM behandelten Schnitte zeigten kaum eine Veränderung des nachzuweisenden Connexin 43-Proteins unmittelbar nach dem Auftauen (d, g) und nach 3 h in Kultur (e, h). Eine leichte Degeneration des Proteins konnte in den Schnitten detektiert werden, welche 24 h kultiviert (f, i) worden waren. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt.

Nach 24 h war wiederum eine Degeneration von Connexin 43 in den Schnitten zu beobachten (Abbildung 49 c). In den mit EM und EM + BDM eingefrorenen Schnitten (Abbildung 49 d-i) war kaum ein Unterschied zwischen den Kultivierungszeitpunkten zu erkennen. Die Schnitte, welche unmittelbar nach dem Auftauen auf das Protein untersucht wurden (Abbildung 49 d, g), zeigten

ebenso wie die 3 h kultivierten Schnitte (Abbildung 49 e, h) eine Färbung des Connexin 43-Proteins. Nach 24 h in Kultur konnte in den mit EM kryokonservierten Schnitten Connexin 43 nachgewiesen werden (Abbildung 49 f). Das Protein lag jedoch nicht eindeutig bandförmig zwischen den Zellen vor, sondern zeigte vielmehr eine gepunktete Verteilung, scheinbar entlang der ursprünglichen Bänder. In den mit EM + BDM behandelten Schnitten (Abbildung 49 i) lag das Protein nach 24-stündiger Kultivierung in seiner typischen Struktur vor. Neben den Schnitten wurden auch hier die Streifen untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass in den nicht kultivierten Streifen das Connexin 43-Protein unmittelbar nach dem Schneiden und Auftauen noch detektierbar war (Abbildung 50 a, d, f).

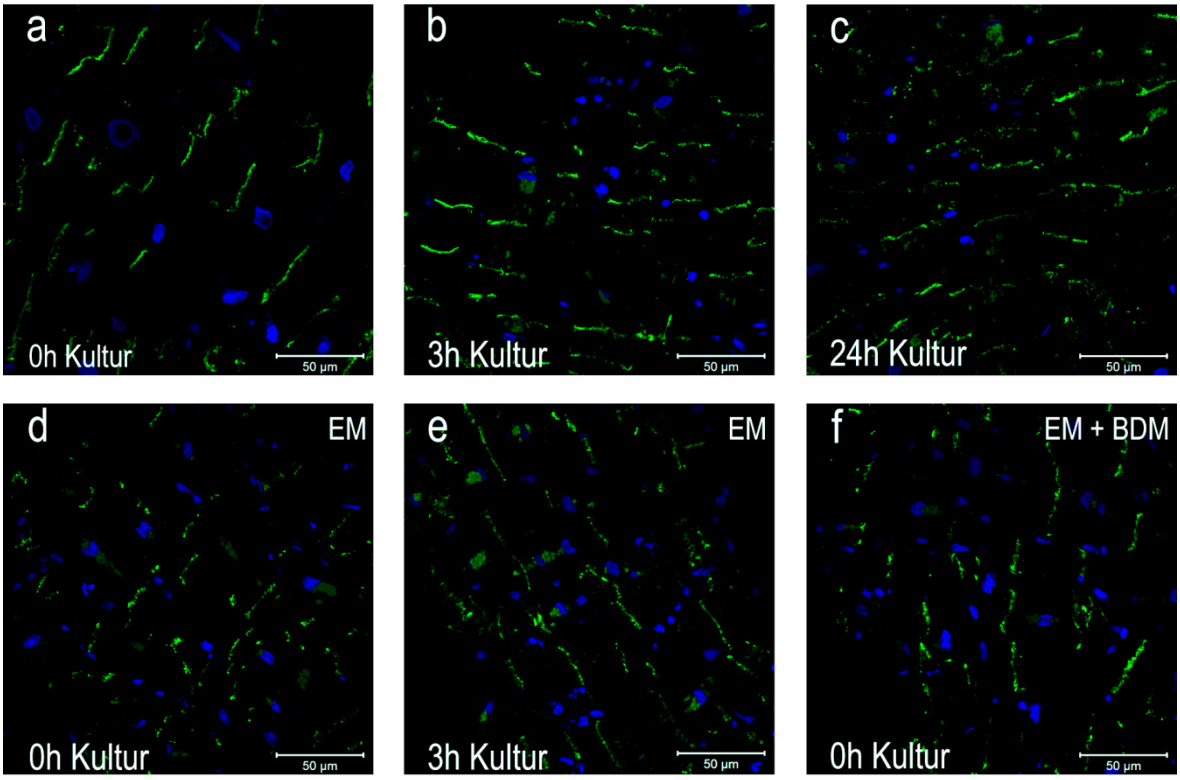

Abbildung 50| Connexin 43-Färbung der humanen Streifen. Die Untersuchung der auf Connexin 43 angefärbten Streifen zeigte unmittelbar nach dem Schneiden (a) und Auftauen (d, f) eine positive Anfärbung zwischen den Zellen. Auch nach 3 h in Kultur (b, e) konnte keine Veränderung in der Nachweisbarkeit des Proteins gezeigt werden. Die 24-stündige Kultur (c) der unbehandelten Streifen wies ebenfalls noch deutlich Connexin 43-Proteine auf. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt.

Über die Kultivierungszeit von 3 h konnte sowohl in den unbehandelten als auch in den mit EM behandelten Streifen kein Rückgang des Proteins festgestellt werden (Abbildung 50 b, e). Die Streifen, die 24 h in Air-Lift-Kultur kultiviert wurden zeigten ebenfalls keine Degeneration des Connexin 43-Proteins an (Abbildung 50 c). Aufgrund zu geringer Probenmenge musste hier auf eine Untersuchung der 24 h Kultur der in EM eingefrorenen Streifen sowie auf die 3 h und 24 h Kultur der in EM + BDM eingefrorenen Streifen verzichtet werden.

4.3.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Neben der Untersuchung der Herzfunktions-Strukturen mit Antikörpern wurde auch eine ultrastrukturelle Analyse der Schnitte und Streifen aus Rattenherzgewebe durchgeführt. Hierzu wurden die Gewebeproben mittels einer speziellen Fixierungstechnik (siehe Abschnitt 3.2.7.2) für die Aufnahmen mit dem Transmissionselektronenmikroskop vorbereitet. Die Aufnahmen der kultivierten und unbehandelten Schnitte zeigten, dass sich die muskuläre Struktur mit der Dauer in Kultur veränderte. Die mit EM und EM + BDM behandelten und in Kultur genommenen Schnitte wiesen ebenfalls eine Veränderung in ihrer Struktur auf. Die Rattenherzstreifen wurden auch mittels dieser Methode untersucht. Hier zeichnete sich ein ähnliches Bild wie bei den Schnitten ab. Die unbehandelten Proben zeigten in Vergleich zu den behandelten Proben ein besseres strukturelles Bild. Diese Strukturintaktheit nahm jedoch mit der Kultivierungsdauer ab.

4.3.3.1 Rattenherzschnitte

Die Veränderungen im Verlauf der Kultivierung der unbehandelten Schnitte zeigten, wie auch die immunzytochemischen Färbungen zuvor, eine Degenerierung des kontraktilen Apparates. So konnten direkt nach dem Schneiden (Abbildung 51 a) die Strukturen, die zur Kontraktion des Schnittes notwendig sind, noch deutlich erkannt werden. Im weiteren Verlauf der Kultur ereignete sich jedoch eine Veränderung der typischen Querstreifung der Herzmuskulatur. Die gleichmäßige Anordnung der muskulären Strukturen war bereits nach 3 h in Kultur (Abbildung 51 b) nicht mehr vollständig gegeben. Innerhalb der 24-stündigen Kultivierungsdauer (Abbildung 51 c) war deutlich zu sehen, dass sich die muskuläre Struktur zurückzubilden begann. Die in EM eingefrorenen Schnitte (Abbildung 51 d-f) zeigten direkt nach dem Auftauen schon Anzeichen für einen veränderten kontraktilen Apparat. Die normalerweise eng aneinander liegenden Myofibrillen waren in den behandelten Schnitten ohne Kultivierungszeit (Abbildung 51 d) nicht mehr konzentriert gepackt, sondern weiter auseinander liegend. Auch die Mitochondrien (Mi) waren vergrößert. Die typische Einfaltungsstruktur (Cristae) der inneren Membran der Mitochondrien veränderte sich mit der Zeit in Kultur und war immer schlechter zu erkennen. So konnte nach 3 h Kultivierung (Abbildung 51 e) festgestellt werden, dass die muskulären Strukturen sowohl durch die Kryokonservierung als auch durch die Air-lift-Kultur geschädigt wurden. In beiden Fällen entstanden Risse und die Anordnung der Muskelfasern wich zunehmend von der ursprünglichen Achse ab. Nach 24 h in Kultur konnte (Abbildung 51 f) ein Rückgang der Schädigungen festgestellt werden.

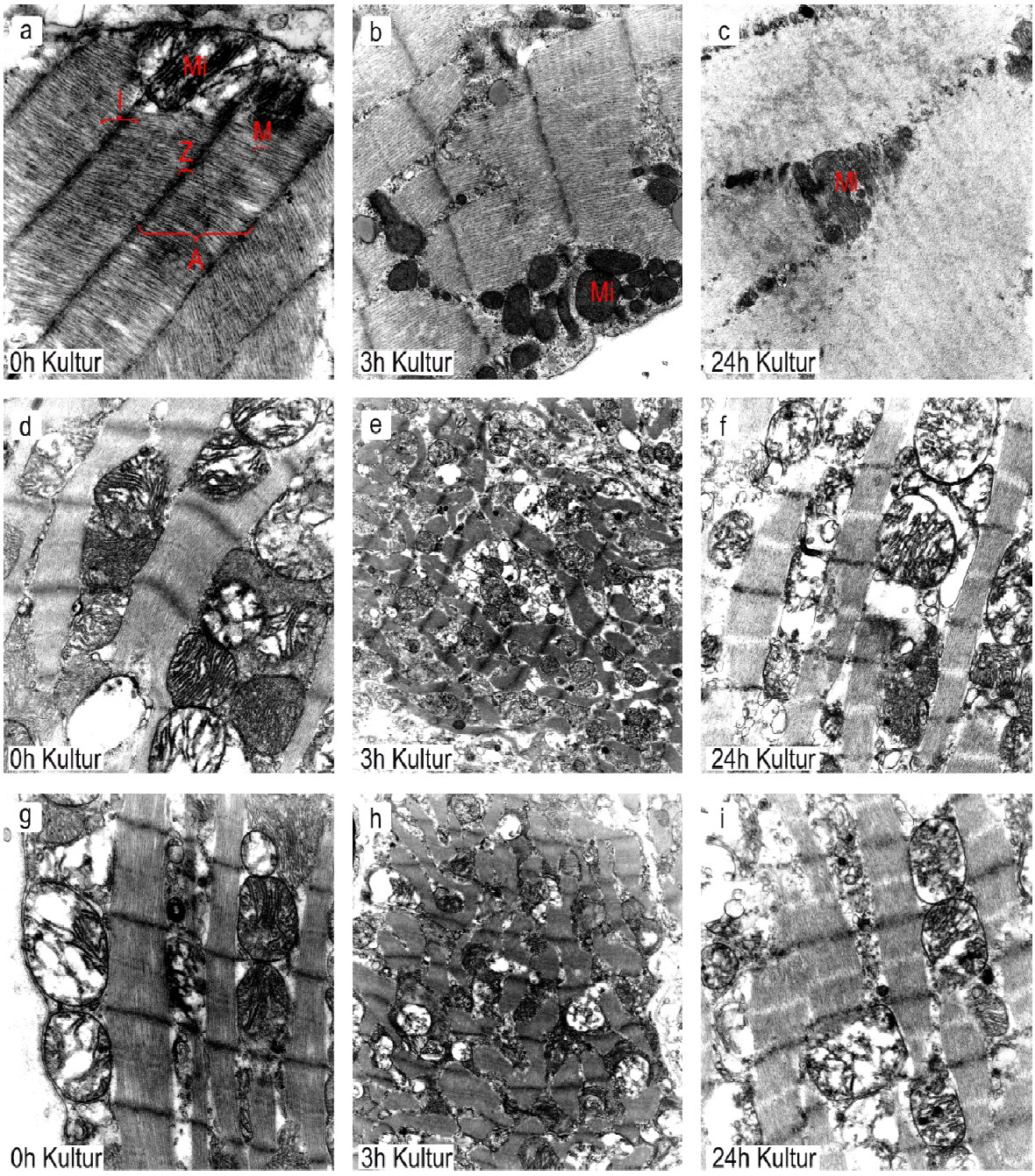

Abbildung 51| TEM-Aufnahmen der Rattenherzschnitte. (a-c) unbehandelte Schnitte; (d-f) in EM eingefrorenen Schnitte; (g-i) in EM + BDM eingefrorenen Schnitte. Die unbehandelten Schnitte zeigten Veränderungen in ihrem strukturellen Aufbau. So lag der kontraktile Apparat direkt nach dem Schneiden (a) noch intakt vor und der Aufbau der Myofibrillen war gut zu erkennen. Nach dreistündiger Kultur (b) konnten erste Verschiebungen zwischen den Myofibrillen ausgemacht werden. Nach 24 h in Kultur (c), wurden die strukturellen Elemente immer schwächer. Die kryokonservierten Schnitte (d-i) zeigten direkt nach dem Auftauen (d, g) noch parallel verlaufende Myofibrillen, die im weiteren Verlauf der Kultur immer stärkere Schäden aufwiesen (e, f, h, i). Die Interzellularräume zwischen den Zellen vergrößerten sich und auch die Mitochondrien zeigten eine deutliche Volumenzunahme im Vergleich zu den unbehandelten Schnitten. Mi = Mitochondrium; A = A-Band; I = I-Band; M = M-Linie; Z = Z-Linie. Die Strukturen wurden mit 17000x-Vergrößerung (a-d; f-g; i), 4600x-Vergrößerung (e) und 6000x-Vergrößerung (h) aufgenommen.

Dennoch war im Aufbau der Schnitte zu erkennen, dass auch hier ein Umbau der kardialen Filamente stattgefunden hat. Die für die Energieversorgung der Zellen verantwortlichen Mitochondrien waren vergrößert. Im Vergleich mit den in EM eingefrorenen Schnitten (Abbildung 51 d-f) wiesen die in EM + BDM eingefrorenen Schnitte (Abbildung 51 g-i) ähnliche Abweichungen in ihrer Struktur auf. So war direkt nach dem Auftauen (Abbildung 51 g) der kardiale Muskelaufbau noch zu erkennen und die Anordnung der Myofibrillen war parallel. Einzig die Mitochondrien waren vergrößert. Die 3 h kultivierten Schnitte (Abbildung 51 h) wiesen deutliche Risse auf und die Anordnung der Myofilamente war nicht mehr gegeben. Neben dem veränderten Aufbau waren auch die Mitochondrien nicht mehr in ihrem ursprünglichen Zustand. Sie waren stark vergrößert und in ihrer Struktur nicht mehr so deutlich von Membranen durchzogen. Nach 24 h Kultivierung (Abbildung 51 i) waren die Myofibrillen deutlich einheitlicher angeordnet als 21 h zuvor. Dennoch konnte eine Schädigung der Myofibrillen sowie deutlich vergrößerten Mitochondrien festgestellt werden.

4.3.3.2 Rattenherzstreifen

Neben den Rattenherzschnitten wurden auch die Rattenherzstreifen (Abbildung 52) elektronenmikroskopisch untersucht. Die unbehandelten Streifen (Abbildung 52 a-c) zeigten nach dem Schneidevorgang noch intakte myofibrilläre Strukturen. Zwischen den Mitochondrien (Mi) konnten größere vakuoläre Bereiche (Pfeile) dargestellt werden (Abbildung 52 a). Nach 3 h in Kultur (Abbildung 52 b) wiesen die Streifen Verschiebungen der Myofibrillen zueinander auf und in den bereits leicht vergrößerten Mitochondrien waren elektronendichte Strukturen zu erkennen. Nach 24-stündiger Kultivierung (Abbildung 52 c) lagen die Sarkomere in den Myofibrillen nicht mehr parallel zueinander und die typische Streifung zwischen den Z-Banden war schwächer. Die Cristae der Mitochondrien konnten zu diesem Zeitpunkt der Kultur nicht mehr eindeutig nachgewiesen werden. Die kryokonservierten Streifen (Abbildung 52 d-i) zeigten Unterschiede in der strukturellen Anordnung des kontraktilen Apparates. So wiesen die Myofibrillen der Streifen die in EM (Abbildung 52 d-f) eingefroren waren unmittelbar nach dem Auftauen (Abbildung 52 d) Risse (Pfeil) auf. Nach 3 h in Kultur (Abbildung 52 e) lagen die Myofibrillen nicht mehr vollständig parallel und die Mitochondrien hatten eine kugeligere Form als in den vergleichbaren Streifen die nicht kryokonserviert wurden. In den Streifen, welche 24 h (Abbildung 52 f) kultiviert wurden, lagen die Myofibrillen parallel nebeneinander.

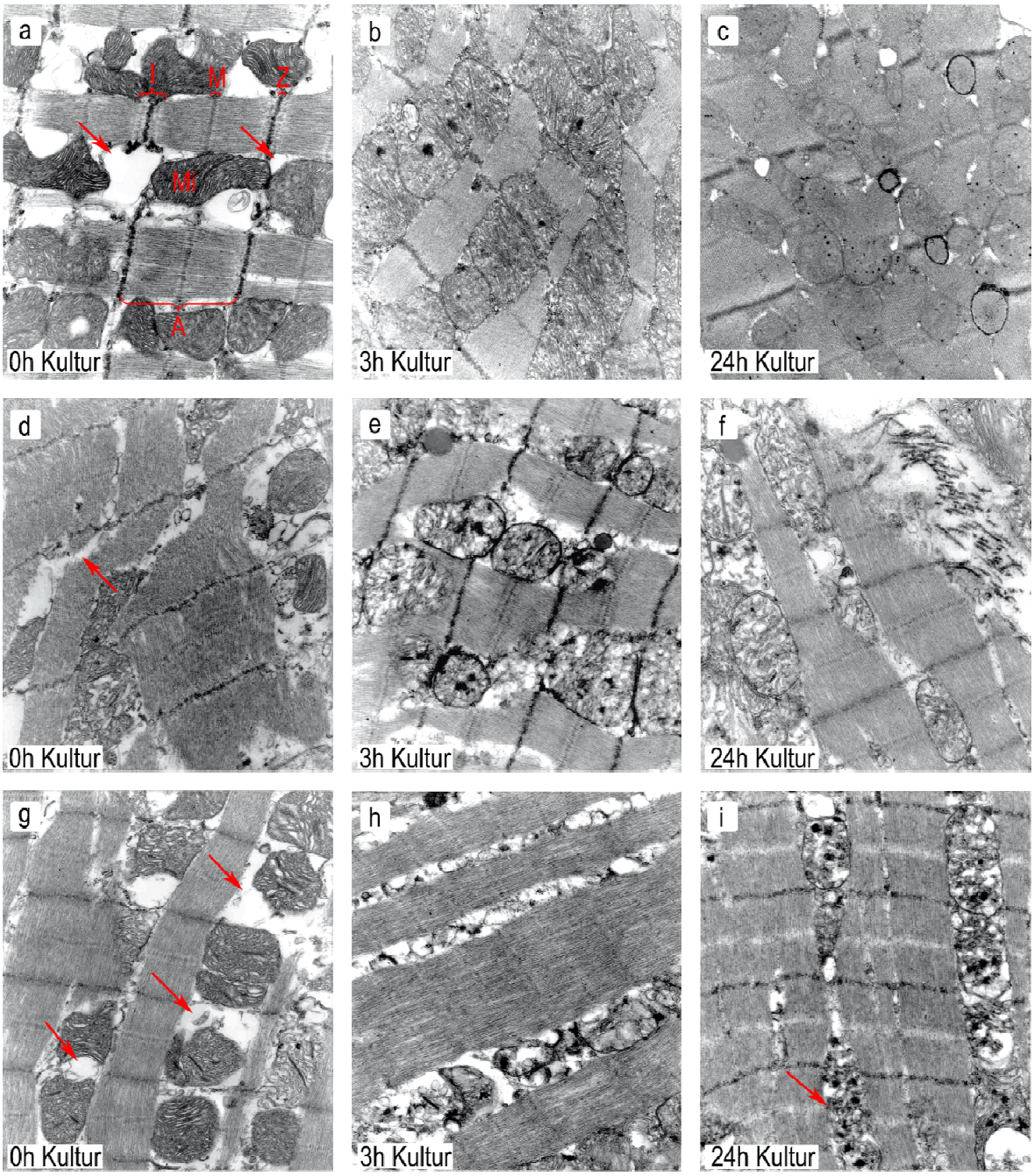

Abbildung 52| TEM-Aufnahmen der Rattenherzstreifen. (a-c) In den unbehandelten Streifen war über die Zeit in Kultur zu erkennen, dass die Myofibrillen nicht mehr parallel lagen. Die Mitochondrien wiesen Veränderungen der Cristae auf und in (a) zeigten sich vergrößerte vakuoläre Bereiche (Pfeile). (d-f) Die in EM kryokonservierten Streifen zeigten direkt nach dem Auftauen (d) geschädigte Myofibrillen (Pfeil) und auch während der Kultur (e, f) wurden Schäden im kontraktilen Apparat deutlich. (g-i) In EM + BDM eingefrorenen Streifen wiesen eine noch relativ intakte Struktur nach dem Auftauen (g) auf. Zwischen den Mitochondrien waren vergrößerte vakuoläre Bereiche zu erkennen (Pfeile). Nach 3 h in Kultur waren die Z-Banden zwischen den Sarkomeren nur schwach zu erkennen, wobei nach 24 h in Kultur die Strukturen wieder intakter aussahen. Neben runden Mitochondrien konnten auch längliche (Pfeil) ausgemacht werden. Mi = Mitochondrium; A = A-Band; I = I-Band; M = M-Linie; Z = Z-Linie. Die Strukturen wurden mit 17000x-Vergrößerung aufgenommen.

Neben den Sarkomeren zeigten sich Strukturen, welche auf geschädigte Mitochondrien hindeuten. Auch intakte Mitochondrien konnten im Gewebe gefunden werden. Die mit EM + BDM kryokonservierten Streifen (Abbildung 52 g-i) wiesen weniger strukturelle Schädigungen auf als die mit reinem EM eingefrorenen Streifen (Abbildung 52 d-f). Über die gesamte Kultivierungszeit konnten parallel angeordnete Myofibrillen ausgemacht werden. Unmittelbar nach dem Auftauen (Abbildung 52 g) lagen die Mitochondrien in kugeliger Form vor und es waren leicht geweitete vakuoläre Bereiche (Pfeil) zwischen den Mitochondrien und den Myofibrillen zu sehen. Nach dreistündiger Kultivierung (Abbildung 52 h) waren die Cristae der Mitochondrien und auch die Sarkomere, vor allem die Z-Banden nicht mehr eindeutig bzw. nur noch schwach zu erkennen. 24 h nach dem Auftauen (Abbildung 52 i) lagen die Sarkomere parallel zu einander vor, wobei in den Myofibrillen Bereiche vorhanden waren, die auf eine Schädigung des kontraktilen Apparates hindeuteten. Die Mitochondrien zeigten hier zum Teil abgerundete Formen aber auch längliche Mitochondrien (Pfeil) waren zu beobachten.

4.4 Untersuchung der herzspezifischen Genexpression

Die Kultivierung und die Kryokonservierung der Gewebeschnitte und Streifen haben nachweislich eine schädigende Wirkung auf zellulärer Ebene und auch auf die Vitalität der Schnitte, wie die unter 4.2 und 4.3 gewonnenen Ergebnisse zeigen. Auf Grund dieser Resultate sollte im folgenden Versuch analysiert werden, wie sich die Expression ausgewählter Gene wie Gja1 (Connexin 43), Slc8a1 (Natrium-Kalzium-Austauscher) und Atp1a1/ Atp1b1 (Natrium-Kalium-ATPase) durch die Kultur und die Kryokonservierung verändert. Damit sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Herzzellen während der Kultur ihre kardiale Identität verlieren und andere Expressionsnetzwerke aktivieren, oder ob sie vielmehr versuchen, den Schädigungen durch vermehrte Expression von herzspezifischen Genen entgegen zu wirken und sich zu reparieren.

4.4.1 Quantitative Real Time PCR

Die Überprüfung der Expression der oben genannten Gene wurde auf transkriptioneller Ebene mittels quantitativer real-time-PCR vorgenommen. Zum Vergleich der Proben untereinander wurden die gemessenen Werte auf das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), sowie auf die unbehandelten Proben ohne Kultivierung normiert. GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse bei der in der Zelle ATP hergestellt wird, was von essenzieller Bedeutung für die Zellatmung ist. Da es in allen Zellen vorkommt und die mRNA-Mengen relativ konstant sind, kann es

sehr gut als Normierungswert verwendet werden (Zhao et al., 1995; Apostolakos et al., 1993). Es wurden im Folgenden immer gleich behandelte Schnitte und Streifen vergleichend gegenübergestellt. Diese Gegenüberstellung wurde sowohl für die Proben aus dem Rattenherzen als auch aus dem humanen Herzgewebe durchgeführt. Aufgrund zu geringer RNA-Mengen musste für einige Schnitte und Streifen die cDNA mittels der SingleCell-PCR gewonnen werden. Trotz dieser Anstrengungen konnte für einige Proben der relative Genexpressionslevel nicht detektiert werden.

4.4.1.1 Einfluss der Kultivierungszeit auf die Expression herzspezifischer Gene im Rattenherzen

Die Werte der unmittelbar nach dem Schneiden untersuchten Schnitte wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normiert – daher der Wert 1 - und als Vergleichswerte für die kultivierten Proben herangezogen. Die Analyse der nicht eingefrorenen Schnitte und Streifen (Abbildung 53) aus dem Rattenherzen zeigte für die Schnitte im Verlauf der Kultur eine abnehmende Expression des Gens Gja1. Das relative Genexpressionslevel von Slc8a1 sowie Atp1b1 stieg hingegen im Verlauf der Kultur an.

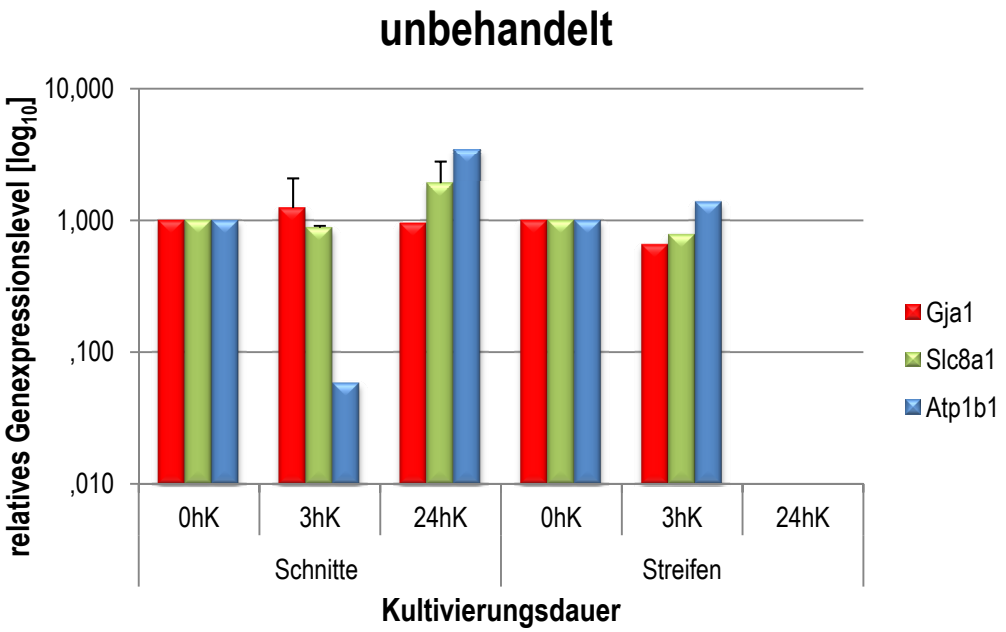

Abbildung 53| Relative Genexpressionslevel der mRNA-Expression unbehandelter Rattenherzschnitte und -streifen. Die Analyse der Gewebeproben zeigte in den Schnitten für Gja1 eine Erhöhung des relativen Expressionslevels auf 1,25 nach 3 h in Kultur. 24 h nach Kultivierungsbeginn fiel der Wert mit 0,95 unter die Normierungsgrenze von 1. Slc8a1 und Atp1b1 wurden nach dreistündiger Kultivierung auf Werte von 0,88 und 0,06 abreguliert, um nach 24 h Kultur auf 1,29 (Slc8a1) und 3,44 (Atp1b1) anzusteigen. Der Nachweis der mRNA von Gja1 in den Streifen nach 3 h in Kultur zeigte einen Abfall der Expression auf 0,66. Auch das Slc8a1-Gen zeigte mit 0,78 eine Erniedrigung an. Nur die Atp1b1-Gene wurden auf 1,39 hoch reguliert. Für die Streifen, die 24 h kultiviert wurden, konnten keine Daten erhoben werden. Normiert wurde auf die 0 h Kultur.

Wobei Atp1b1 innerhalb von 3 h in Kultur erst sehr stark absank, um nach 24 h Kultur wieder deutlich anzusteigen. Die Streifen zeigten bei der Expression der jeweiligen Gene Unterschiede zu den Schnitten. Die Expressionswerte des Gja1- und Slc8a1-Gen‘s sanken nach dreistündiger Kultur ab, der Wert von Atp1b1 dagegen stieg nach 3 h in Kultur an. Für die 24-stündige Kultur der Streifen konnte für keines der Gene ein Wert ermittelt werden. Ein direkter Zusammenhang zu den Kultivierungszeiten konnte hier nicht hergestellt werden, dennoch fiel auf, dass in den Schnitten die Gene Slc8a1 und Atp1b1 immer entgegengesetzt des Gja1-Gens exprimiert wurden. Wenn Gja1 hochreguliert wurde, zeigten Slc8a1 und Atp1b1 eine Abregulation. Das Expressionsmuster der mit EM kryokonservierten Proben (Abbildung 54) unterschied sich zu den unbehandelten Schnitten und Streifen. Die Normierung der Werte erfolgte hier auf die unbehandelten Proben. So konnte für alle 3 Gene in den Schnitten nach 0 h in Kultur ein Anstieg der Expressionswerte ermittelt werden.

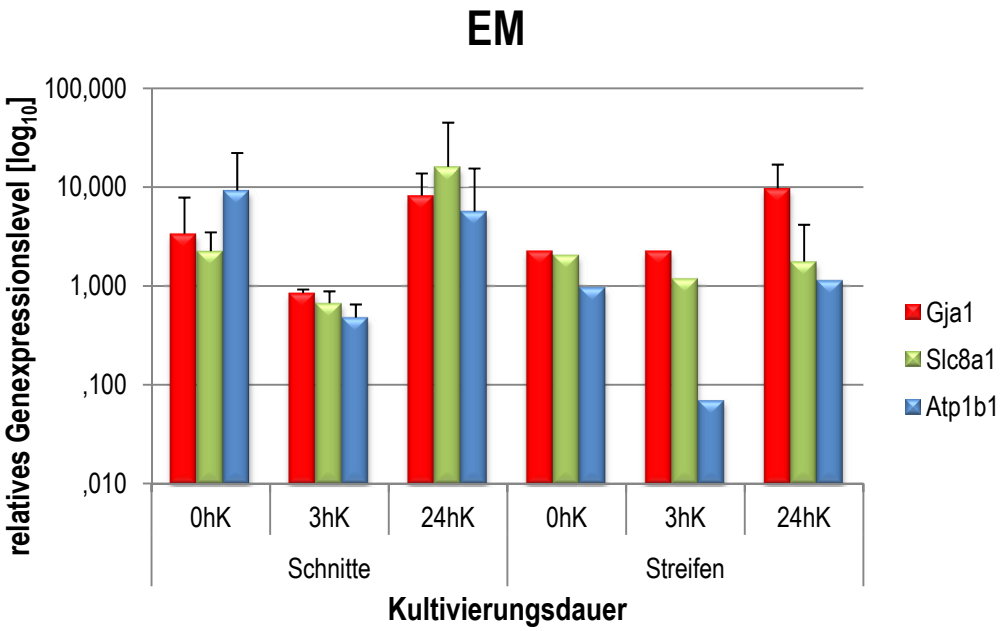

Abbildung 54| Relatives Genexpressionslevel der mRNA-Expression in EM kryokonservierten Schnitten und Streifen des Rattenherzens. Das relative Genexpressionslevel von Gja1 in den Schnitten lag unmittelbar nach dem Auftauen bei 3,37. Die dreistündige Kultivierung führte zu einem Abfall der mRNA-Expression auf 0,85, wobei nach 24 h in Kultur das Level bei 8,19 lag. Slc8a1 zeigte zu Beginn der Kultivierungsphase einen 2,25-fachen Anstieg, der nach 3 h in Kultur auf 0,67 ab geregelt wurde. Nach 24 h Kultur kam es erneut zu einem Anstieg der Genexpression auf 16,1. Wie auch bei den anderen beiden Genen konnte für Atp1b1 direkt nach dem Auftauen ein Anstieg der Expression auf 9,32 detektiert werden. Diese fiel nach 3 h auf 0,48 ab und wies nach 24 h in Kultur einen Wert von 5,68 auf. Die Gja1-mRNA konnte in den Streifen nach 0 h und 3 h in Kultur mit einem Expressionswert von 2,27 nachgewiesen werden. 24 h in Kultur ließen den Wert auf 9,69 ansteigen. Slc8a1 konnte nach dem Auftauen mit einer Expression von 2,06 und nach 3 h von 1,19 detektiert werden. Innerhalb von 24 h in Kultur stieg der Wert wieder auf 1,77 an. Die Expression des Atp1b1-Gens sank ohne Kultivierung auf 0,97 und nach 3 h auf 0,07, bevor es nach 24 h in Kultur wieder zu einem Anstieg auf 1,14 kam. Die Normierung erfolgte auf die unbehandelten Proben.

Innerhalb der ersten 3 h in Kultur senkte sich dieses Level ab, stieg aber sowohl beim Gja1- und Slc8a1-Gen nach 24-stündiger Kultur wieder über den Ausgangswert an. Auch beim Atp1b1-Gen zeigte sich nach 24 h eine Hochregulation der Expression. Diese blieb allerdings unter den Werten der 0 h-Kultur. In den Streifen zeigte sich ein Expressionsmuster des Gja1-Gens, welches mit dem in den Schnitten vergleichbar war. Hier bleiben die Werte ohne Kultivierung und nach 3 h Kultur jedoch gleich, bevor nach 24 h Kultur ein Anstieg der Expression zu erkennen war. Die gemessene mRNA-Expression des Slc8a1 in den Streifen blieb über die gesamte Kultivierungszeit von 24 h nahezu konstant. Auch das Atp1b1-Gen zeigte nur geringe Schwankungen im relativen Genexpressionslevel innerhalb von 24 h Kultur. Es fiel auf, dass die untersuchten Gene in den Schnitten alle zu Beginn der Kultivierung höhere Expressionswerte aufwiesen. Diese fielen nach 3 h in Kultur ab und wurden nach 24 h Kultur wieder hoch reguliert.

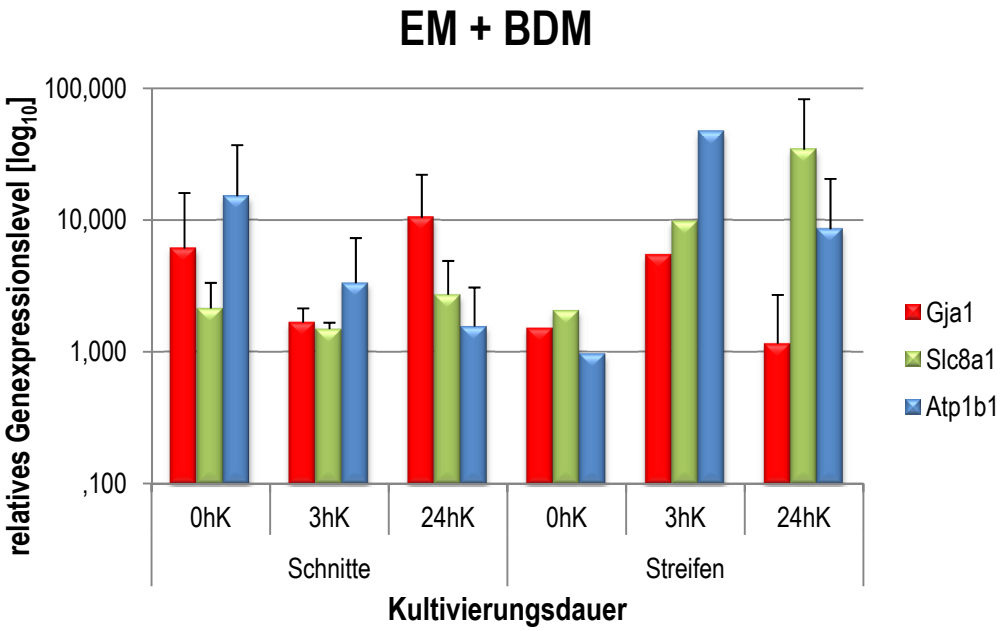

Abbildung 55| Relatives Genexpressionslevel auf mRNA-Ebene der in EM + BDM kryokonservierten Gewebeproben aus dem Rattenherz. Das Gja1-Gen lag bei den Schnitten nach 0 h in Kultur bei einer Expression von 6,08, fiel nach 3 h auf 1,67 ab und stieg nach 24 h wieder auf 10,42 an. Die mRNA-Expression von Slc8a1 lag nach dem Auftauen bei 2,14, nach 3 h in Kultur bei 1,49 und nach 24 h bei 2,71. Unmittelbar nach dem Auftauen konnte das Atp1b1-Gen mit einer Expression von 15,17 nachgewiesen werden, fiel nach 3 h auf 3,33 und nach 24 h auf 1,56 ab. Bei den Streifen waren die Expressionslevel zu Beginn der Kultivierungsphase am geringsten. Das relative Genexpressionslevel für Gja1 lag nach 0 h Kultur bei 1,51, nach 3 h bei 5,34 und nach 24 h bei 1,15. Für Slc8a1 konnte ohne Kultivierung ein Wert von 2,06, nach 3 h Kultur von 9,78 und nach 24-stündiger Kultivierung von 34,33 nachgewiesen werden. Die Genexpression des Atp1b1-Gens lag nach dem Auftauen bei 0,97, stieg nach 3 h Kultur auf 46,85 an und wurde nach 24 h in Kultur wieder auf 8,54 ab geregelt. Die Normierung erfolgte auf die unbehandelten Proben.

Die mit EM + BDM kryokonservierten Proben aus dem Rattenherzen (Abbildung 55) wiesen starke Unterschiede in der Expression der gesuchten Gene zwischen den Schnitten und Streifen auf. Die Untersuchung des Gja1-Gens in den Schnitten zeigte eine Senkung des Expressionslevel nach 3 h in Kultur. Dieses stieg nach 24-stündiger Kultur wieder an. Die ermittelten Werte des Slc8a1-Gen's blieben über die gesamte Kultivierungszeit nahezu konstant, während die Betrachtung des Atp1b1-Gens in den Schnitten eine abfallende mRNA-Expression innerhalb von 24 h zeigte. In den Streifen zeigte die Untersuchung des Gja1-Gen's eine gegenteilige Tendenz der Werte zu den Schnitten. Das relative Genexpressionslevel stieg nach 3 h in Kultur an und fiel nach 24 h wieder ab. Für das Slc8a1-Gen konnte eine kontinuierliche Hochregulation über die Kultivierungszeit beobachtet werden. Die mRNA-Expression von Atp1b1 stieg nach dreistündiger Kultur an und zeigte wiederum eine Abregulation der Werte nach 24 h.

4.4.1.2 Einfluss der Kultivierungszeit auf die Expression herzspezifischer Gene im humanen Herzen

Neben den Rattenherzschnitten und –streifen wurde auch humanes Gewebe auf die mRNA-Expression von Gja1, Slc8a1 und Atp1a1 nach den unterschiedlichen Behandlungen untersucht. Jedoch musste auch hier auf die Analyse der unbehandelten Streifen nach 3 h und 24 h in Kultur auf Grund nicht vorhandener RNA und cDNA verzichtet werden.

Die nicht kryokonservierten Schnitte und Streifen (Abbildung 56) zeigten sehr unterschiedliche Expressionswerte der gesuchten Gene, wobei die Schwankungen in der Höhe der Level nicht so stark waren wie in den Schnitten und Streifen aus dem Rattenherzgewebe. Die Werte der unmittelbar nach dem Schneiden untersuchten Schnitte lagen alle bei 1, da sie auf das Haushaltsgen GAPDH normiert und als Vergleichswerte für die kultivierten Proben verwendet wurden. In den unbehandelten Schnitten zeigte sich, dass die Gja1-Expression im Verlauf der Kultur abnahm. Das Expressionsmuster des Slc8a1-Gens zeigte einen analogen Trend zu Gja1. Einen entgegengesetzten Expressionsverlauf zeigte hingegen das Atp1a1-Gen. Die Werte der unmittelbar nach dem Schneiden untersuchten Streifen zeigten eine ähnliche mRNA-Expression des Gja1- und des Slc8a1-Gens. Das Level von Atp1a1 lag unter dem der anderen beiden Gene. Die Untersuchung der humanen Schnitte und Streifen, die mit EM kryokonserviert wurden (Abbildung 57), ergaben für die mRNA-Expression des Gja1-Gen in den Schnitten einen Anstieg nach 3 h und einen Absenkung nach 24 h in Kultur. Das Slc8a1-Gen konnte in diesen Proben nur in sehr geringem Maße ermittelt werden. Das relative Genexpressionslevel blieb über die gesamte Kultivierungsdauer nahezu konstant. Für Atp1a1 konnte eine leichte Hochregulation innerhalb der ersten 3 h in Kultur ermittelt

werden. Nach 24-stündiger Kultur zeigte sich jedoch ein starker Rückgang der Expression. Die Ermittlung der Gja1-Expression in den Streifen zeigte nahezu konstante Werte auf mRNA-Ebene mit der Zeit in Kultur. Slc8a1 wies einen Abfall des relativen Genexpressionslevel über die Kultivierungszeit von 24 h auf.

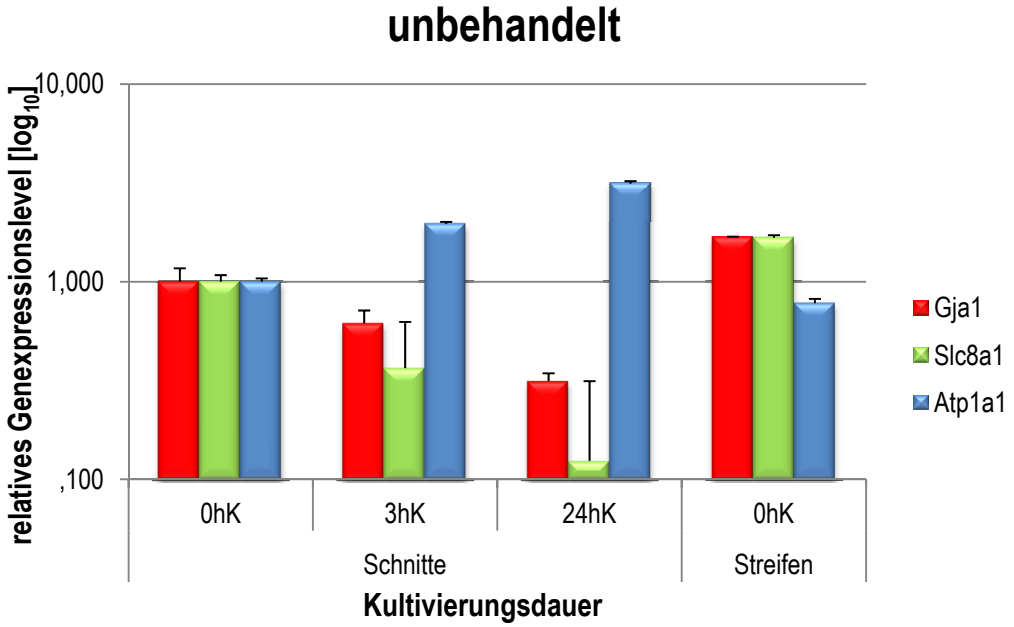

Abbildung 56| Relatives Genexpressionslevel auf mRNA-Ebene der unbehandelten Proben aus humanen Gewebe. In den Schnitten zeigte sich, dass die Expression des Gja1-Gens im Verlauf der Kultur abnahm (0,62-fach nach 3 hK und 0,31-fach nach 24 hK). Der gleiche Trend konnte bei der Analyse des Slc8a1-Gens (0,37-fach nach 3 hK; 0,12-fach nach 24 hK) beobachtet werden. Das Atp1a1-Gen wies nach 3 hK ein Expressionslevel von 1,96 und nach 24 hK von 3,14 auf. Die Streifen konnten nur direkt nach dem Schneiden untersucht werden und zeigten ein relatives Expressionslevel des Gens Gja1 von 1,68 und 1,65 des Gens Slc8a1. Für Atp1a1 konnte eine mRNA-Expression von 0,78 detektiert werden.

Wobei nach 24 h keine Slc8a1-mRNA mehr gefunden werden konnte. Die relative Genexpression von Atp1a1 war, wie beim Gja1-Gen, über 24 h Kultur nahezu gleichbleibend. In den mit EM + BDM kryokonservierten humanen Schnitten und Streifen (Abbildung 58) konnte festgestellt werden, dass das relative Genexpressionslevel der Schnitte unmittelbar nach dem Auftauen und nach 3 h in Kultur deutlich höher lag als in den restlichen Proben. Einzige Ausnahme bildete dabei das Slc8a1-Gen der Streifen ohne Kultivierung, das ebenfalls stark hochreguliert war. Die Expression des Gja1-Gens in den Schnitten wurde im Verlauf der Kultivierung deutlich herunter geregelt. Das Slc8a1-Gen konnte mit leicht erhöhten Expressionswerten zu den ersten beiden Messzeitpunkten detektiert werden. Nach 24-stündiger Kultur konnte das Slc8a1-Gen, ebenso wie das Gja1-Gen, nicht mehr nachgewiesen werden.

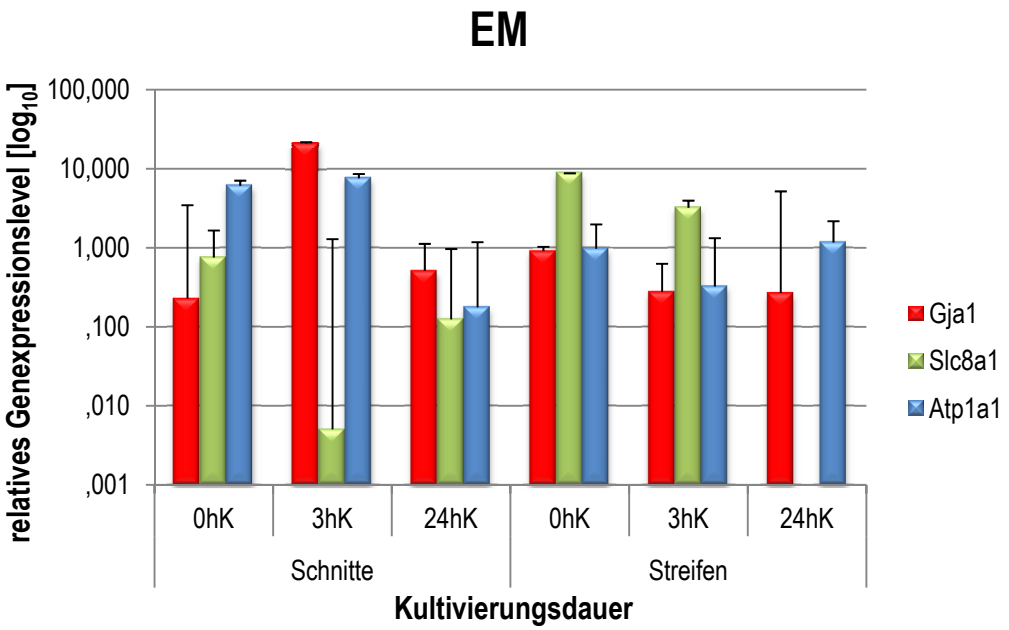

Abbildung 57| Relatives Genexpressionslevel auf mRNA-Ebene der in EM kryokonservierten humanen Herzgewebeproben. Der Nachweis des Gja1-Gens in den Schnitten zeigte unmittelbar nach dem Auftauen nur einen Expressionswert von 0,23, der nach 3 h Kultur bei 20,79 lag. Nach 24 h der Kultivierung konnte ein Wert von 0,51 detektiert werden. Das Slc8a1-Gen wurde ohne Kultivierung mit einem Wert von 0,75 detektiert, in den nachfolgenden Proben lag das Expressionslevel nach 3 h Kultur bei 0,01 und nach 24-stündiger Kultivierung bei 0,12. Atp1a1 konnte unmittelbar nach dem Auftauen mit einer mRNA-Expression von 6,06 nachgewiesen werden. Dieser Wert stieg in der 3 h Kultur nochmals auf eine 7,57-fach höhere Expression an. Nach 24 h in Kultur lag der Wert bei 0,18. In den Streifen konnte das Gja1-Gen nach dem Auftauen mit 0,91 detektiert werden, nach 3 h Kultur lag die Expression bei 0,28 und nach 24 h bei 0,27. Das relative Genexpressionslevel von Slc8a1 lag ohne Kultivierung bei 8,75. Nach 3 h in Kultur konnte das Expressionslevel mit 3,20 detektiert werden. In der 24 h Kultur konnte keine Expression nachgewiesen werden. Bei Atp1a1 lag das ermittelte Level unmittelbar nach dem Auftauen bei 0,97, nach 3 h bei 0,32 und nach 24 h Kultur bei 1,16.

Die Analyse des Atp1a1-Gens zeigte unmittelbar nach dem Auftauen bei den Schnitten einen Anstieg des Expressionslevels. Auch nach dreistündiger Kultivierung konnte noch eine Erhöhung der mRNA-Expression nachgewiesen werden. Nach 24 h in Kultur fiel der detektierte Wert wieder ab. In den Streifen wies das Gja1-Gen über 24 h Kultur fast unveränderte Werte auf. Die Analyse des Slc8a1-Gens ergab einen deutlichen Abfall des relativen Genexpressionslevel. Die mRNA-Expression von Atp1a1 hingegen zeigte einen leichten Anstieg der Werte.

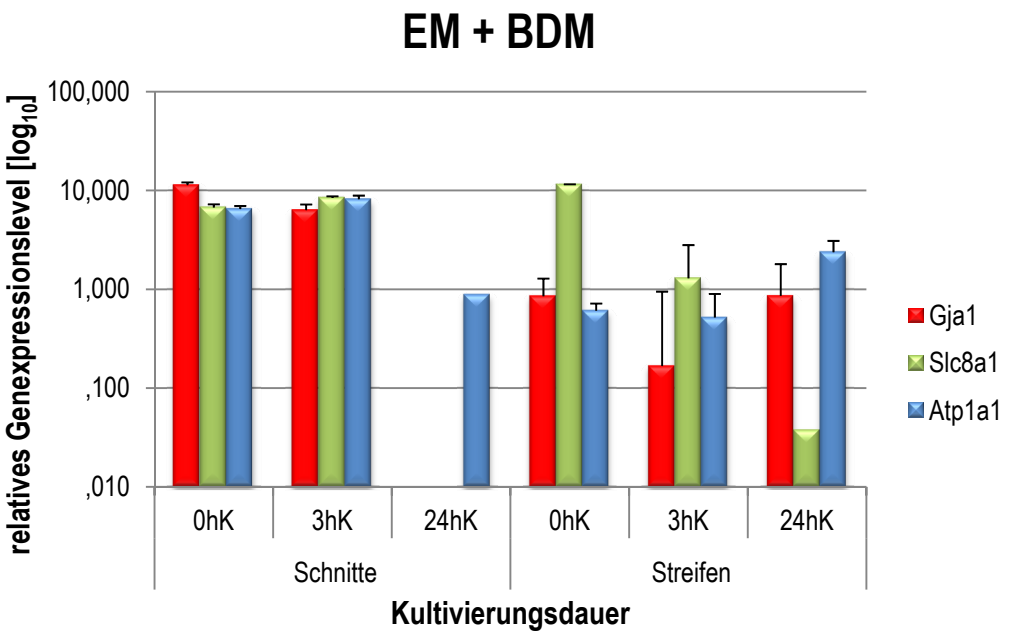

Abbildung 58| Relatives Genexpressionslevel der in EM + BDM eingefrorenen humanen Herzschnitte und –streifen. Die Expression des Gja1-Gens zeigte in den Schnitten eine Abnahme mit der Kultivierung. Nach 0 h in Kultur lag der Wert bei 11,31, nach 3 h Kultur bereits bei 6,32 und nach 24 h konnte er nicht mehr detektiert werden. Das Slc8a1-Gen ließ sich ohne Kultivierung mit einer Expression von 6,73 und nach 3 h mit 8,40 nachweisen. In der 24 h-Probe war keine Slc8a1 mehr detektierbar. Atp1a1 konnte bei den Schnitten nach 0 h in Kultur mit 6,5-facher Expression und nach 3 h Kultur mit 8,17-facher nachgewiesen werden. Nach der 24-stündigen Kultur lag der Wert nur noch bei 0,88. In den Streifen konnte die Gja1-mRNA nach 0 h Kultur mit 0,85, nach 3 h mit 0,17 und nach 24 h Kultur mit 0,86 nachgewiesen werden. Der Wert des Slc8a1-Gens unmittelbar nach dem Auftauen lag bei 11,39 und nach 3 h Kultur bei 1,29. Die Expression nach 24 h Kultur konnte mit einem Wert von 0,04 detektiert werden. Das Atp1a1-Expressionslevel lag nach 0 h in Kultur bei 0,61. Im weiteren Verlauf nach dreistündiger Kultur war die relative Genexpression bei 0,52, nach 24 h Kultur lag diese bei 2,38.

4.4.2 Kapillargelelektrophorese

Die Kapillargelelektrophorese wurde durchgeführt, um die erhaltenen Ergebnisse der quantitativen real-time-PCR zu verifizieren.

4.4.2.1 Rattenherzgewebe

Die Detektion der mit den Primern interkalierten DNA-Fragmente zeigte, dass die real-time-PCR mit der DNA aus den Rattenherzschnitten geklappt hat. Sowohl in den akut Schnitten als auch in den mit EM behandelten Schnitten konnten alle Primer-DNA-Fragmente nachgewiesen werden. In der 3 h Kultur der unbehandelten Schnitte war die Bande für den Atp1b1-Primer etwas schwächer als die anderen, konnte aber noch deutlich wahrgenommen werden. Die 24 h Probe der in EM

eingefrorenen Schnitte zeigte ebenfalls eine schwächere Bande für den Slc8a1-Primer, war aber ebenfalls noch gut zu detektieren. Bei den mit EM + BDM eingefrorenen Schnitten kam es zu einem Ausfall in der 24 h Kultur. Hier konnte keine Bande für den Slc8a1- Primer ermittelt werden. Auf Grund der geringeren RNA-Ausbeute bei den Rattenstreifen konnte in der 24 h Probe der akut Streifen keiner der untersuchten Primer mit der DNA interkalieren und wurde dementsprechend auch nicht in der Kapillargelelektrophorese gefunden. Die Interkalierung der Primer mit der DNA der mit EM eingefrorenen Streifen gelang in allen Proben, so dass für jeden Primer eine Bande detektiert werden konnte. In der 3 h und 24 h Kultur der mit EM + BDM behandelten Streifen war die Bande für Slc8a1 und für das Haushaltsgen GAPDH nur sehr schwach ausgeprägt, konnte aber dennoch ausgelesen werden.

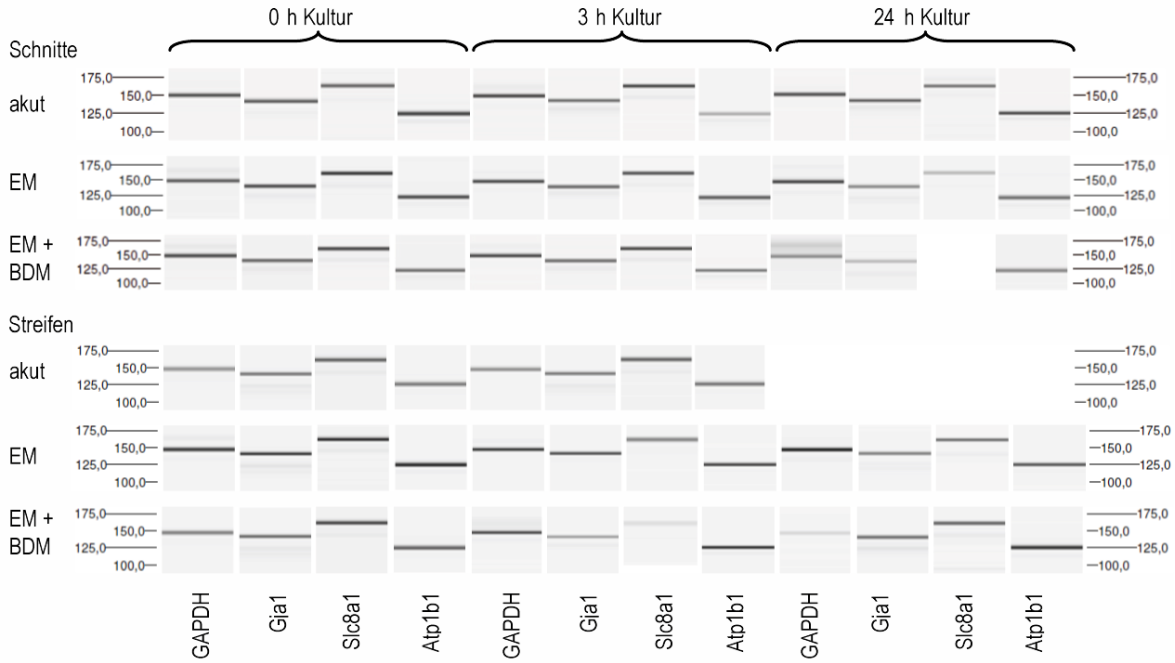

Abbildung 59| Expression herzspezifischer Marker für Zellkommunikation und Ionenkanäle. Die Expression von herzspezifischen Markern für die Zellkommunikation und die ATP-abhängigen Ionenkanäle konnte mittels einer Kapillargelelektrophorese aus dem PCR-Produkt der vorangegangenen real-time-PCR nachgewiesen werden. Zur Überprüfung der Fragmentgröße wurde ein DNA-Größenstandard von 15-500 bp verwendet.

4.4.2.2 Humanes Herzgewebe

Auch für die humanen Proben wurde nochmals eine Analyse der PCR-Produkte durchgeführt, um sichergehen zu können, dass die Genamplifizierung korrekt verlief. Bei den Schnitten aus humanem Herzgewebe konnten in der 24 h Probe, die mit EM + BDM behandelt wurde, die Primerbanden von Gja1 und Slc8a1 nicht detektiert werden. In den verbliebenen Proben waren alle Banden vorhanden.

Bei den Streifen aus humanem Herzgewebe konnte auf Grund des geringen Probenvolumens keine cDNA für die 3 h und 24 h Kultur der akuten Streifen hergestellt werden. In der 0 h Kultur interkalierten die Primer mit der cDNA und bildeten die gewünschten Produkte, die durch die vorhandenen Banden dargestellt wurden. Die Banden der in EM eingefrorenen Proben zeigten sowohl in der 0 h Kultur als auch in der 3 h Kultur weitere Banden bei den Primern für Atp1b1 und GAPDH. In der 24 h Kultur konnten weder das Haushaltsgen noch das Gen für Slc8a1 detektiert werden. In den mit EM + BDM behandelten Proben konnten alle gewünschten Produkte ermittelt werden, wobei auch hier in zwei Proben weitere Banden angezeigt wurden. Diese befanden sich in der GAPDH-Probe der 3 h Kultur und in der Atp1b1-Probe der 24 h Kultur.

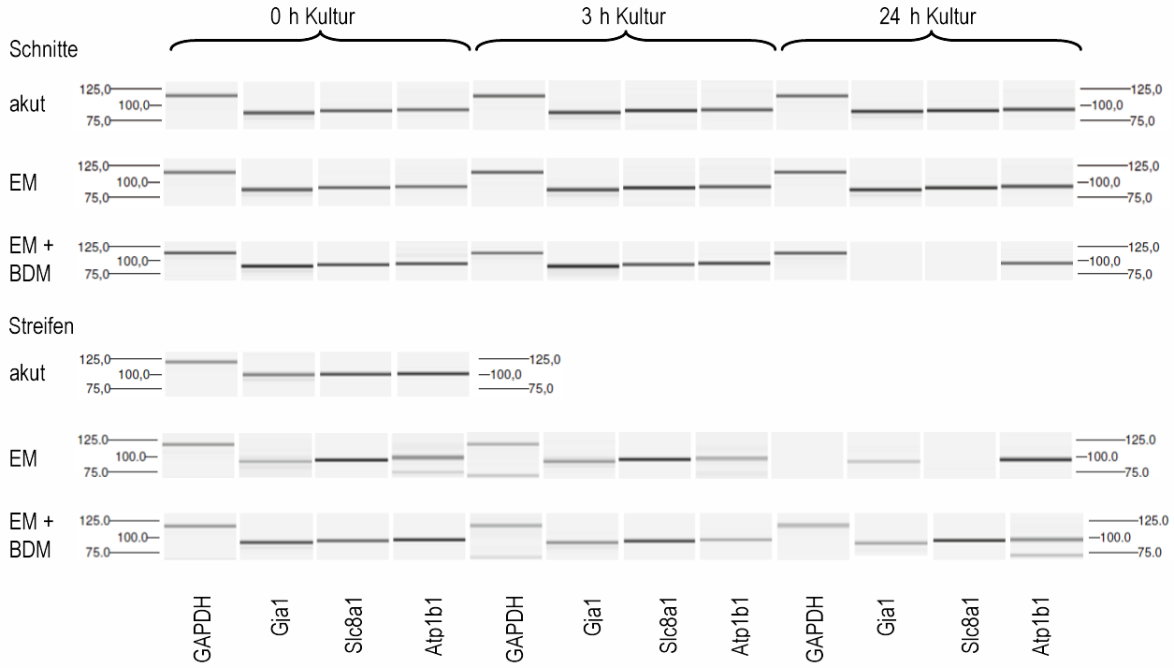

Abbildung 60| Expression herzspezifischer Marker für Zellkommunikation und Ionenkanäle. Die Expression von herzspezifischen Markern für die Zellkommunikation und die ATP-abhängigen Ionenkanäle konnte mittels einer Kapillargelelektrophorese aus dem PCR-Produkt der vorangegangenen real-time-PCR nachgewiesen werden. Zur Überprüfung der Fragmentgröße wurde ein DNA-Größenstandard von 15-500 bp verwendet.

4.5 Elektrophysiologische Untersuchungen

Die elektrophysiologischen Untersuchungen sollten sich der Frage widmen, ob die Schnitte und Streifen durch den Präparationsprozess funktionell geschädigt werden. Zur Messung der Elektrophysiologie der Schnitte und Streifen wurden das Mikroelektroden-Array von *Multi Channel Systems* sowie eine scharfe Elektrode verwendet. Auf Grund technischer Probleme konnten erst gegen Ende des Projektes die Aufnahmen mit dem Mikroelektroden-Array aufgenommen werden. Die Schnitte wurden sowohl in akutem Zustand als auch nach dem Auftauen gemessen.

4.5.1 Mikroelektroden-Array (MEA)

Das MEA wurde zur Untersuchung der Feldpotenziale (FP) der Gewebeschnitte eingesetzt. Die hier gezeigten Ableitungen der FP sind spontane Aktionen des akuten Herzgewebes (Abbildung 61). Es ist anhand der FP-Verteilung (Abbildung 61) deutlich zu sehen, wie der Herzschnitt auf den Elektroden des MEA platziert war. In den Bereichen, in denen Kontakt zwischen MEA und Schnitt bestand, waren deutliche FP zu erkennen (Elektroden 28, 36-38, 41-87), die sich hauptsächlich auf der rechten Seite des Arrays zeigten. Die Elektroden 53, 64 & 65 (Pfeile) innerhalb dieses Bereiches können durch starke Kontraktionen des Gewebes kurzzeitig ausgefallen sein. Die Elektroden, auf denen keine Signale zu sehen sind, wurden nicht von Herzgewebe bedeckt.

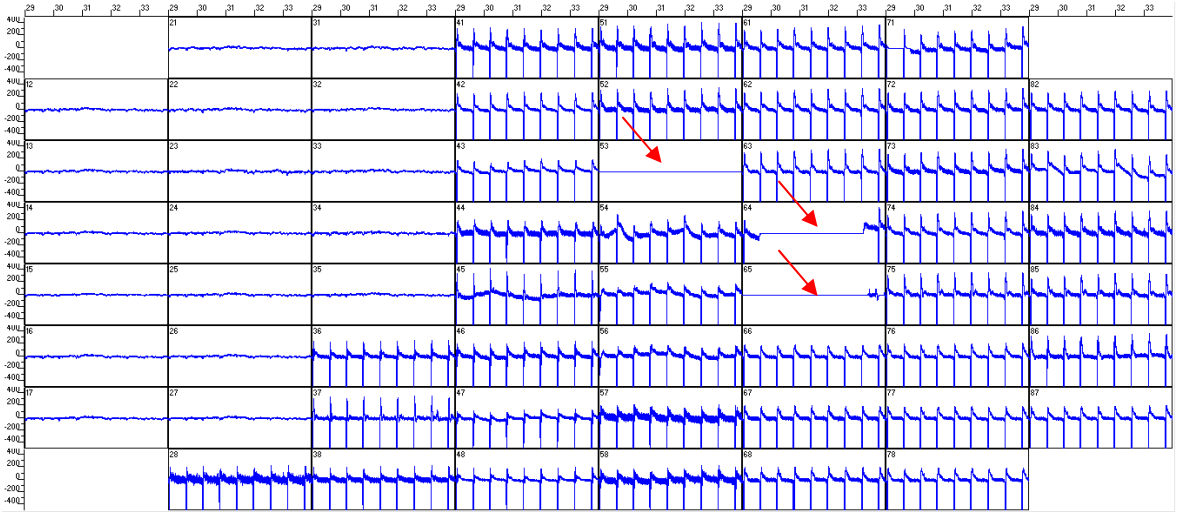

Abbildung 61| Übersichtsdarstellung der Feldpotenziale eines Rattenherzgewebeschnittes auf dem MEA. Die Lage der Feldpotenziale zeigte an, wo der Schnitt während der Messung Kontakt mit den Elektroden hatte. Während dieser Messung bedeckte der Schnitt die Elektroden 28, 36 bis 38 sowie 41 bis 87. Die Elektrode 53 (Pfeil) zeigt keine Aktionspotenziale, jedoch war zu Beginn der Messung auch hier ein Potenzial zu sehen. Die Elektroden 64 und 65 (Pfeile) fielen kurzzeitig aus und fingen wieder an die Potenziale anzuzeigen.

Die Vergrößerung einer Elektrode (62; Abbildung 62) zeigte, dass die FP immer im gleichen Rhythmus entstanden und die charakteristische *PQRST-Kurve* aufwiesen, die für FP typisch ist. Diese Form kommt zustande, da das Summenpotenzial der Erregung des Herzschnittes und nicht ein einzelnes AP einer Myokardfaser dargestellt wird. *PQRST* ist die Bezeichnung der einzelnen Peaks in einem Elektrokardiogramm. So entspricht die P-Welle der Vorhoferregung, die PQ-Zeit stellt den Beginn der Vorhoferregung bis zum Beginn der Kammererregung dar. Der QRS-Komplex zeigt die Kammererregung an, die ST-Strecke spiegelt die vollständige Ventrikelerregung wieder und die T-Welle stellt die Ventrikeldepolarisation dar (Schrader und Kelm, 2005; Nickoleit, 2008). Die

Bezeichnung PQRST ist eine willkürliche Namensgebung des Physiologens Willem Einthoven aus dem Jahre 1903, die heute noch verwendet wird (Nickoleit, 2008). Die Spannung der Potenziale über die Dauer der Messung veränderte sich nicht, der R-Peak lag bei etwa 200 µV und die T-Welle bei etwa 100 µV. Die leichte Rippelung des Signals rührt aus 50Hz Einstreuungen des Stromnetzes.

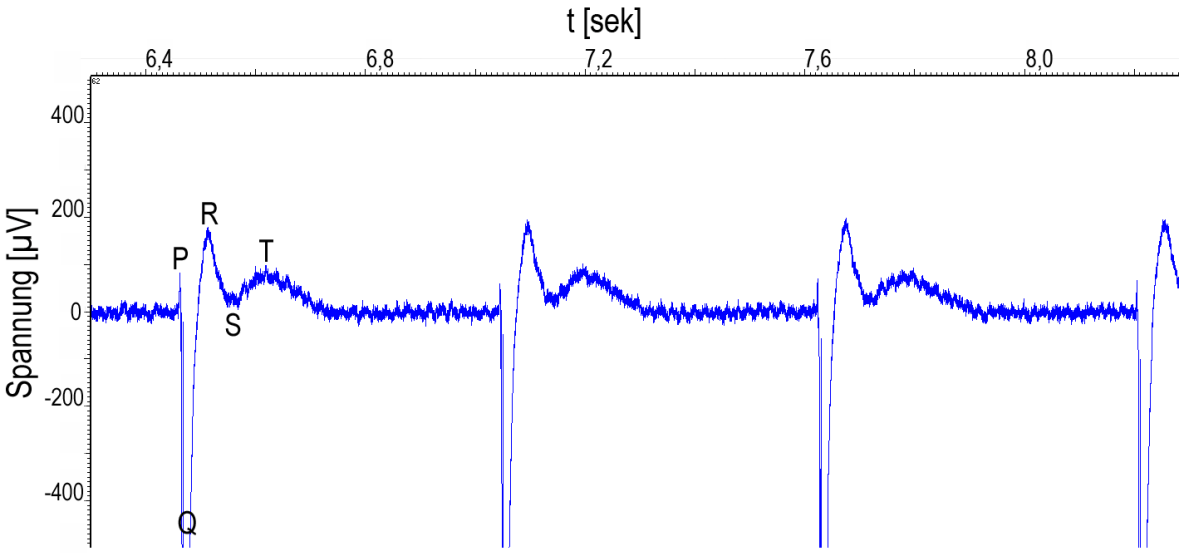

Abbildung 62| Feldpotenzial eines Rattenherzgewebeschnittes. Die Vergrößerung der gemessenen Feldpotenziale zeigt, dass die einzelnen Potenziale etwa alle 600 ms mit gleicher Spannungsintensität auftreten. Auch die für die Messung von FP typische *PQRST-Kurve* ist deutlich bei allen dargestellten Peaks zu sehen.

4.5.2 Elektrophysiologische Messungen mittels scharfer Elektrode

Die Messungen der Schnitte waren am MEA gut durchführbar, da die Möglichkeit bestand, die Gewebeschnitte mit Gaze und Metallring auf dem Boden des MEA zu halten. Die Streifen konnten jedoch auf Grund ihrer geringen Größe nicht auf dem MEA gemessen werden. Die Elektrophysiologie wurde in diesem Fall mit einer scharfen Elektrode untersucht. Dazu musste ein spezieller Halter aus Agarose hergestellt werden. Dieser verfügte über kleine Vertiefungen, in denen die Streifen mittels einer Glaskanüle arretiert wurden (Abbildung 63 a). Die Gewebestreifen wurden über eine Elektrode mit 1 mV stimuliert und die Ableitung über eine andere Elektrode am gegenüberliegenden Ende der Streifen aufgenommen. Das Ruhemembranpotenzial (RMP) liegt bei der Ratte normalerweise bei -80 mV. Vor der Stimulation lag das RMP der Streifen bei etwa -75 mV (Abbildung 63). Die maximale Spannung, die das AP erreicht, lag bei etwa 30 mV und ist geringer als im gesunden Herzen einer Ratte. Die Aktionspotenzialdauer nach 90 % der Zeit (APD_{90}) lag bei etwa 80 bis 90 ms, nach ca. 100 ms war mit -70 mV der Ausgangswert des RMP von -75 mV nahezu erreicht. Ein wichtiges, wenngleich negatives Resultat dieser Arbeit war, dass die Ableitung eingefrorener und

wieder aufgetauter Herzgewebeschnitte und -streifen nicht gelang. Sowohl auf dem MEA als auch mit der scharfen Elektrode war keine Messung von Ableitungen möglich. Dennoch konnte ein RMP in den in EM eingefrorenen Streifen von -34 bis -44 mV gemessen werden.

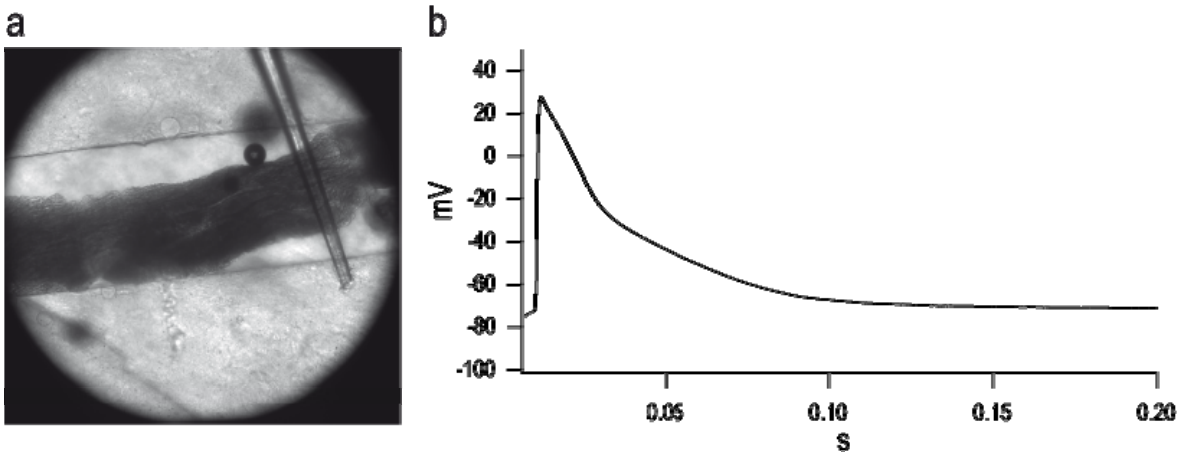

Abbildung 63| Ableitung eines Streifens aus Rattenherzgewebe. (a) Der Rattenherzstreifen wurde für die Messung in einem speziell angefertigten Halter mit Hilfe einer Glaskanüle arretiert und mittels einer Elektrode mit 2 V angeregt. (b) Die daraus hervorgegangene Ableitung belegte, dass die Vitalität des Gewebes auch nach der Präparation noch gegeben war. Vor der Stimulation lag das RMP bei -78 mV und 0,20 Sekunden nach dem Spannungsimpuls bei -70 mV. Neben dem RMP lag auch die Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotenzials im Normbereich eines gesunden Rattenherzens.

5. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass organotypische Gewebeschnitte aus Rattenherzen und humanen Herzen, ohne ihre Vitalität zu verlieren, einfrierbar und wieder auftaubar sind. Um die Überlebensrate der eingefrorenen Zellen zu erhöhen wurden unterschiedliche Einfriermedien sowie Einfriergeschwindigkeiten getestet. Einfriermedien mit 10 % DMSO und 90 % FKS sowohl mit und ohne BDM zeigten bei Einfrierraten von -1 °C/min die besten Ergebnisse. Zwischen den Schnitten und Streifen wurden nur geringe Unterschiede deutlich, die auf die Oberflächengröße der Gewebe zurückzuführen ist. Der Vergleich von humanem mit rodentem Gewebe zeigte unterschiedliche Reaktionen des Zellsynzytiums auf die Kryokonservierung.

Die Untersuchungen der Gewebe mittels speziell für diese Arbeit angepasster Färbemethoden und Lebend-Tod-Assays wiesen darauf hin, dass der kontraktile Apparat in den Gewebeproben durch die Vorgänge bei der Kryokonservierung stark in Mitleidenschaft gezogen wird. Die Zell-Zell-Kontakte wurden durch das Einfrieren/Auftauen jedoch nur geringfügig beschädigt. Auch die mitochondriale Aktivität war nach der Kryokonservierung noch nachweisbar (MTT und JC-1), so dass die Schädigung des kontraktilen Apparates vermutlich die Hauptursache für die Dysfunktionalität der kryokonservierten Herzschnitte ist.

5.1 Untersuchung der Vitalität in Herzgewebeschnitten und -streifen

Bereits das Schneiden des Gewebes mit dem Vibratom erzeugt eine Schädigung der Kardiomyozyten, die entweder direkt durchgeschnitten oder von der schnellen Bewegung der Klinge zerrissen werden. Diese mechanische Beschädigung konnte in der Far-Red-Färbung als deutliche Rotfärbung der äußeren Bereiche der Schnitte beobachtet werden. Der Farbstoff kann durch die Schädigung der Plasmamembran der Zellen in diese eindringen und bindet so auch an Proteine im Intrazellularraum (Molecular Probes, 2009).

Der Vergleich der akuten (frisch geschnittenen) mit den kryokonservierten Schnitten zeigte, dass der Einfrier-/Auftauvorgang die Zellen auch im Inneren des Schnittes beschädigt. Im Gegensatz zu den akuten Schnitten, wiesen auch weiter innen liegende Zellen eine erhöhte Permeabilität der Plasmamembran auf. Diese stärkeren Schädigungen der Membran sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Bildung von extrazellulärem Eis während der Kryokonservierung zurückzuführen. Es ist allerdings eher unwahrscheinlich, dass intrazelluläres Eis für die Schädigungen verantwortlich ist. In diesem Fall wären die Vitalitätswerte mit hoher Wahrscheinlichkeit niedriger ausgefallen, denn

intrazelluläres Eis führt bereits bei Kristallen, die größer als ca. 300 nm sind zum Zelltod (vgl. eg. Takahashi et al. 1988).

Zur Analyse der Schädigungen durch den Einfrierprozess wurde weiterhin untersucht, welchen Anteil das Gefrierschutzmittel (ohne den Kryokonservierungsprozess) am Zellschaden in den Schnitten hat. Es zeigte sich, dass die Kryomedien ohne das Einfrieren keinen Einfluss auf die Vitalität der Schnitte hatten. Nach 80 min in 4 °C kalter EM-Lösung konnte im Vergleich mit den nicht kryokonservierten Schnitten kein Unterschied hinsichtlich der Membranschädigung erkannt werden. Zurückzuführen ist dies auf einen durch Hypothermie verlangsamten Zellmetabolismus, wodurch das normalerweise toxisch wirkende DMSO langsamer in die Zellen eindringt (Meryman, 2007).

Durch die Far-Red-Färbung konnte gezeigt werden, wie stark die Membranintegrität der Zellen durch den Kryokonservierungsprozess geschädigt wurde. Dennoch konnte mittels dieser Technik keine genaue Aussage über die Vitalität der Schnitte getroffen werden. Um diese beurteilen zu können, wurde der MTT-Assay durchgeführt. Der Test beruht auf der Reduktion von Tetrazoliumsalz mittels mitochondrial gebildetem NADP(H) zu Formazan (Mosmann, 1983; Berridge und Tan, 1993).

Mit dem Assay konnte gezeigt werden, dass die nicht behandelten Rattenherzschnitte nach den ersten 24 h in Kultur noch vital waren. In den kryokonservierten Schnitten konnte ebenfalls Vitalität nachgewiesen werden, allerdings lagen die gemessenen Werte deutlich unter denen der unbehandelten. Mit der Zeit in Kultur war ein deutlicher Abwärtstrend des produzierten Formazans zu erkennen. Die Vitalität in den humanen Schnitten nahm ebenfalls über die Zeit sowohl in den unbehandelten als auch in den eingefrorenen Schnitten ab. Dabei lagen die Werte der behandelten Schnitte deutlich unter denen der akuten Schnitte. Es ist demnach davon auszugehen, dass die schlechteren Werte unter anderem durch Stress hervorgerufen werden, der zur Apoptose beziehungsweise zur Nekrose der Zellen führen kann (Green et al., 2011). Der Stress kann sowohl durch den Schneidevorgang als auch die Kryokonservierung hervorgerufen werden. Auch kann aus dem Stress ein Um- bzw. Abbau der mitochondrialen Komponenten resultieren, was zu einer verringerten ATP-Produktion (Terman et al., 2003) und somit zu einem Rückgang der Tetrazolium-verarbeitung führen kann. Sowohl bei den 300 µm dicken Streifen aus Rattenherzen als auch bei den Schnitten und Streifen aus humanem Herzgewebe konnte ein Rückgang der Tetrazolium-verarbeitung über die Zeit gezeigt werden. Die besseren Werte der unbehandelten humanen Streifen direkt nach dem Schneiden, im Vergleich zu denen der humanen Schnitte, können mit der besseren Diffusion der Reagenzien in die Gewebestücke zusammenhängen. Dies ist damit zu erklären, dass die relative Oberfläche der Streifen größer ist, als die der Schnitte. Neben dem oben beschriebenen Stress kann die Abnahme der Werte auch durch apoptotische Zellen in den Schnitten hervorgerufen

werden, welche Signalstoffe abgeben, die angrenzende Zellen ebenfalls zur Apoptose stimulieren. Eine Zerstörung der Membranen durch die Eiskristalle kann zur Freigabe bestimmter Stoffe führen, welche die Signalkaskade der Apoptose in den noch gesunden Zellen und deren Mitochondrien anregen. Dies kann ebenfalls zu einem Abfall in der Verarbeitung des Tetrazoliums führen. Ein weiterer Aspekt, der hier beachtet werden muss, ist die Reaktion des Tetrazoliumsalzes mittels NADP(H) zu Formazan. So ist es möglich, dass durch die Schädigung der Zellen NADP(H) in das Kultivierungsmedium gelangt und es zu einer Reaktion mit der MTT-Lösung kommt.

Um zu kontrollieren, dass die gemessenen MTT-Werte tatsächlich mit der Vitalität der Mitochondrien korrelieren, wurde mit der JC-1-Färbung ein weiterer Test zur Untersuchung der mitochondrialen Aktivität durchgeführt. Smiley et al. (1991) konnten zeigen, dass mit Hilfe des potentialsensitiven JC-1-Farbstoffes das mitochondriale Membranpotenzial ($\Delta\Psi_m$) der inneren Mitochondrienmembran dargestellt werden kann. Diese Potenzialsensitivität entsteht durch eine potenzial-abhängige Aggregatbildung. Hierbei kommt es bei einem positiven Membranpotenzial zu Aggregatbildung des Farbstoffes, während dieser bei negativem Membranpotenzial in Lösung bleibt.

Die Anzahl der Mitochondrien mit einem aktiven Redox-Potential (>-0,32 V (Berg et al., 2013)) nahm sowohl in den Schnitten als auch in den Streifen über den Kulturzeitraum ab. Sowohl in den Proben aus dem Rattenherzen, als auch in den aus dem humanem Herzen stammenden Proben konnten zu Beginn der Kultur deutlich mehr Aggregate gezeigt werden, als im weiteren Verlauf. Ein Unterschied zwischen den Spezies konnte ebenfalls festgestellt werden; in den akuten humanen Schnitten konnten mehr rot fluoreszierende Mitochondrien detektiert werden, als in den Gewebeproben aus Rattenherzen. Die Untersuchung der kryokonservierten Schnitte ergab eine Abnahme der mitochondrialen Aktivität sowohl im humanen als auch im rodenten System. Diese Ergebnisse befestigten die mittels des MTT-Assays gewonnene Hypothese, dass die Abnahme der Vitalität nach Kryokonservierung tatsächlich auf der verminderten Aktivität der Mitochondrien beruht. Eine Verfälschung des MTT-Tests durch andere reduzierende Agentien als NADH ist somit sehr unwahrscheinlich. Bei den Streifen ergab sich ein ähnliches Ergebnis. Hier konnte ebenfalls akut, bzw. direkt nach dem Auftauen die höchste mitochondriale Aktivität festgestellt werden, die im weiteren Verlauf der Kultivierung abnahm.

Mitochondrien bilden während der Atmungskette Sauerstoffradikale (ROS, *reactive oxygen species*), welche eine Oxidierung von Lipiden, Proteinen und Nukleobasen hervorrufen. Dies schädigt die Mitochondrien wiederum selbst und eine verstärkte Bildung der ROS wird ausgelöst. Durch diesen Prozess entsteht eine positive Rückkopplung (Bereiter-Hahn und Jendrach, 2010). Dieser oxidative Stress kann durch die Ischämie, welche beim Transport des Gewebes hervorgerufen wird, durch den Schneidevorgang, durch die Kultivierung und besonders durch die Kryokonservierung induziert

werden. Dies würde erklären, warum die Zellen im Verlauf der Kultur und nach der Kryokonservierung immer schlechter werdende Werte in der MTT-Verarbeitung und der JC-1-Färbung zeigten. Um eine weitere Schädigung der Zelle zu verhindern (Green et al., 2011), können geschädigte Mitochondrien durch Mitophagie eliminiert werden. Doch je größer der Stress wird, desto schwieriger wird es für die Zelle, den oxidativen Stress zu bewältigen (Terman et al., 2003). Es können nicht beliebig viele Mitochondrien abgebaut werden, weil für den Erhalt der Zellvitalität eine gewisse Mindestzahl an Mitochondrien vorhanden sein muss, die die Atmung bewerkstelligen und sich durch Teilung und Fusion vermehren können (Jendrach et al., 2008; Bereiter-Hahn und Jendrach, 2010). Die frühzeitige Alterung der Mitochondrien (Jendrach et al., 2008) kann auch durch Stress hervorgerufen werden und könnte einen weiteren Aspekt für den starken Rückgang der aktiven Mitochondrien in den Schnitten und Streifen sein. Die besseren Ergebnisse der humanen Schnitte und Streifen können unter anderem mit der besseren Vorbereitung des Gewebes vor der Explantation zusammen hängen. So hat das eingesetzte Anästhetikum eine kardioprotektive Wirkung (Zaugg et al., 2003; Zaugg et al., 2002; Lee et al., 2006; Tritapepe et al., 2007), welche durch die längere Einwirkungszeit, also durch eine höhere Präkonditionierung, bei dem humanen Gewebe besser greifen kann, als bei den Rattenherzen. Die Ratten sind bis zur Entnahme des Herzens nur sehr kurze Zeit betäubt, was eine Präkonditionierung des Gewebes nicht erlaubt. Ein weiterer Aspekt der beachtet werden muss, ist die Methode, mit der die Ratten getötet worden sind. Durch das Ausbluten, das mittels Durchtrennung der Aorta hervorgerufen wird, kann es zu ischämischen Schäden des kardialen Gewebes kommen (Angele et al., 2008). Die Durchdringung des Gewebes mit der BDM-haltigen, kardioplegen Lösung kann unterschiedlich schnell erfolgen. Das humane Gewebe wird in 1 cm^3 großen Stücken transportiert und weist so eine größere Diffusionsfläche für die Lösung auf, als das Rattenherz. Hier muss der Puffer durch die letzten Pumpbewegungen des Herzens über die Arterien und Venen im Gewebe verteilt werden. Durch das Nachpumpen mit einer Pinzette kann die Verteilung noch erhöht werden, dies kann aber wiederum zu Druckschäden am Gewebe führen. Es ist auch davon auszugehen, dass durch das verlangsamte Eindringen des BDM-haltigen kardioplegen Puffers der Ca^{2+}-Ausstrom aus den Kardiomyozyten länger stattfindet und die kardioprotektive Wirkung nicht unmittelbar einsetzen kann.

Die Zugabe von BDM zu dem Einfriermedium hat den Hintergrund, dass BDM als Kontraktionshemmer gilt (Blanchard et al., 1990; Li et al., 1985) und an den unterschiedlichsten Stellen in der Energiegewinnung sowie der Kontraktionsabläufe der Zelle eingreift (Hebisch et al., 1993). Mit Hilfe dieser Zugabe kann eine Hyperkontraktion der Zellen während der Verarbeitung weitestgehend verhindert werden (Schlüter et al., 1991). Um bereits vor dem Schneiden einer Verkrampfung der Muskelzellen vorzugreifen, wurde BDM auch den kardioplegen Lösungen für Transport und

Schneidevorgang zugefügt. Hier könnte es sonst zu einem sogenannten Kalzium- Paradoxon kommen. Bei dem Kalzium- Paradoxon handelt es sich um einen absoluten Kalziumentzug der Kardiomyozyten, welcher eine Erhöhung der Membranleitfähigkeit bewirkt. Bei der Überführung in eine mit Kalzium versetzte Lösung kommt es daher zur Aufnahme erhöhter Mengen an Ca^{2+} ,um die leeren Kalziumspeicher wieder aufzufüllen (Altschuld et al., 1991). Dies führt dazu, dass die Zellen stark kontrahieren. Um den kardioprotektiven Effekt von BDM gewährleisten zu können, sollte daher die Verarbeitung der Schnitte und Streifen bei niedrigen Temperaturen stattfinden (Hebisch et al., 1993).

Die in den humanen Schnittpräparaten gefundenen Einlagerungen, die auf Grund ihrer starken Eigenfluoreszenz die Suche nach noch intakten Mitochondrien erschwerte, sind mit großer Wahrscheinlichkeit sogenannte Lipofuszine. Lipofuszin ist eine Struktur, die sich aus oxidierten Protein- und Lipidclustern zusammensetzt und nicht degradierbar ist. Dies hat zur Folge, dass in den postmitotischen Zellen die Exozytose nicht greift und sich immer mehr Lipofuszinakkumulate ansammeln (Brunk und Terman, 2002). Diese Strukturen können sich im Laufe der Alterung bilden (Terman und Brunk, 2004) und da die humanen Herzgewebeproben von vornehmlich älteren Menschen (> 60 Jahre) stammten, ist das Auftreten dieser Strukturen in den Präparaten möglich. Die Abnahme des $\Delta\Psi_m$ während der Kultur vor und nach der Kryokonservierung könnte nicht nur auf die Zerstörung durch Eiskristalle zurückgeführt werden, sondern auch aufgrund von Lipofuszinakkumulationen in den Mitochondrien hervorgerufen werden. Die Akkumulate führen häufig zu einem Anschwellen der Mitochondrien, die in Folge dessen apoptotisch werden, beziehungsweise den Energiestoffwechsel nicht mehr korrekt ausführen können. Die so stark angeschwollenen und nicht mehr korrekt arbeitenden Mitochondrien können auch nicht mehr über die Autophagozytose der Zelle abgebaut werden (Terman et al., 2003), was im weiteren Verlauf zu einem Absterben der Zellen führen kann.

Die Abnahme der vitalen, bzw. mitochondrialen Aktivität sowohl in den unbehandelten als auch in den kryokonservierten Schnitten und Streifen fällt deutlich mit den ersten drei Stunden in Kultur zusammen. Ein besseres Überleben in Kultur könnte eventuell durch eine weitere Verbesserung der Nähr- und Sauerstoffversorgung insbesondere während dieser Zeit gewährleistet werden. Für die im Kulturmedium verwendeten Zusätze Insulin, Transferrin und Selen konnten Brandenburger et al. (2011) zeigen, dass diese für eine optimale Nährstoffversorgung sowie zur Vermeidung von oxidativem Stress geeignet sind. Dennoch könnte man durch veränderte Anteile der Bestandteile und eventuell weiterer Zusätze, den Ansprüchen der behandelten Schnitte und Streifen wahrscheinlich besser entsprechen. Die Anpassung bzw. Regelung des Sauerstoffanteils in der Atmosphäre des Kulturschrankes könnte ebenfalls eine Verbesserung der Vitalität der behandelten Gewebeproben bewirken.

5.2 Strukturelle Schädigung durch Kryokonservierung

Die Kryokonservierung von Zellen, Spermien sowie Oozyten ist bereits ohne Probleme über mehrere Jahre möglich (Mazur und Seki, 2011; Polge et al., 1949; Youssry et al., 2008). Die Lagerung von Gewebedünnschnitten in LN_2 muss jedoch noch genauer erforscht werden.

Die Etablierung der Vitalitätstests konnte zeigen, dass sowohl die Gewebeschnitte als auch die Gewebestreifen unter den gegebenen Kultivierungs- und Kryokonservierungsbedingungen teilweise noch vital sind. Zwar geht der Anteil vitaler Mitochondrien nach der Kryokonservierung, bzw. über die Zeit in Kultur zurück, aber ein Teil der Zellen ist dennoch über lange Zeiträume vital. Da aber nicht allein die Energieversorgung und der Aufrechterhalt der für das reine Überleben wichtigen Prozesse, sondern auch ein intakter kontraktiler Apparat für die Kontraktion wichtig ist, wurden strukturelle Veränderungen in den Präparaten untersucht. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch die Kultivierung und Kryokonservierung Schäden entstehen, die die Fähigkeit zur Kontraktion des Gewebes reduzieren, beziehungsweise zum Erliegen bringen.

Zur Verdeutlichung der Schäden an den Schnitten und Streifen wurde die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) durchgeführt. Um einen Vergleich zwischen intaktem Herzgewebe und den Schnitten zu haben, wurden Gewebeschnitte aus dem gesamten Rattenherzen und einem humanen Herzgewebeblock angefärbt. Hier sind die zusammenhängenden Kardiomyozyten noch deutlich zu erkennen und auch der interstitielle Raum ist noch kompakt. Mit Hilfe der HE-Färbung konnte gezeigt werden, dass der interstitielle Raum in den Schnitten beider Spezies sich mit der Zeit in Kultur langsam auflöst. Aufgrund dessen entfernen sich die Kardiomyozyten immer weiter voneinander. Diese Auseinanderbewegung der Herzmuskelzellen erklärt auch die wesentlich weichere Konsistenz des Gewebes, die während der Kultivierung festgestellt wurde. Die Veränderungen des Gewebes treten in den kryokonservierten Schnitten deutlicher zu Tage als in den unbehandelten Schnitten. Die Schnitte sind während der Kryokonservierung größerem Stress ausgesetzt als die unbehandelten Schnitte. Auch die Kristallbildung, die während des Auftauens wahrscheinlich den größten Schaden anrichtet, führt zu einer Umstrukturierung des Gewebes. Da so wahrscheinlich schon ein erheblicher Teil der Zellen in den Schnitten nekrotisch ist, kann die Apoptose in den noch intakten Zellen induziert werden (Garcia-Dorado et al., 2004; Turner, 2011). Während des Einfrier- und Auftauvorgangs kann es im Gewebe zu einer Ischämie beziehungsweise einer Unterversorgung mit Nährstoffen kommen, was ebenfalls eine Schädigung nach sich zieht und die Gewebestruktur verändert. In Anbetracht der Tatsache, dass die Schnitte bereits nach dem Auftauen stärker geschädigt sind, wäre eine Versorgung mit aufbauenden Nährstoffen hilfreich.

Auch die Streifen aus dem humanen und dem rodenten Herzgewebe wurden mit der HE-Färbung analysiert. Im Vergleich zeigten die Rattenherzstreifen deutlich bessere Ergebnisse als die humanen Streifen. Das interstitielle Bindegewebe wurde weniger stark abgebaut als jenes in den humanen Schnitten. Es zeigte sich auch hier eine stärkere Auflösung des Bindegewebes in den eingefrorenen Streifen im Vergleich zu den unbehandelten Streifen. Die Idee hinter der Erstellung der Streifen war die verbesserte Eindringmöglichkeit des Einfriermediums mit dem Kryoprotektans, da sich die relative Oberflächengröße in den Streifen erhöht. In den Analysen der Streifen konnte jedoch keine eindeutige Verbesserung der Vitalität/Funktionalität nach der Kryokonservierung nachgewiesen werden. Die auftretende Degeneration des Gewebes kann auch hier durch apoptotische Zellen hervorgerufen worden sein. Um solche Vorgänge zu minimieren, wurden die Schnitte und Streifen nach dem Schneiden und nach dem Auftauen in Messpuffer beziehungsweise in Medium gespült. Der Spülvorgang sollte möglichst viele tote und apoptotische Zellen entfernen. Da aber auch innerhalb des Gewebes tote Zellen auftreten können, kann nicht gewährleistet werden, dass alle defekten Zellen ausgespült werden.

Eine weitere, in dieser Arbeit jedoch nicht verfolgte Strategie zur Vermeidung von Kryoschäden besteht im Einsatz von *Anti-Freezing-Glycoproteinen* (AFGP) oder *Anti-Freezing-Proteinen* (AFP) (Fletcher et al., 2001; Jorov et al., 2004). AFP und AFGP konnten unter anderem aus Fischen (antarktische Nothotenioide (Eisfische), atlantischer Kabeljau (Jorov et al., 2004; Crevel et al., 2002)), Pflanzen (Griffith et al., 1992; Regand und Goff, 2006) und Insekten (Graham et al., 1997) isoliert werden. Die Eisfische leben in den polaren Meeren mit Wassertemperaturen unter dem Gefrierpunkt und dennoch gefriert ihr Blut aufgrund von AFGP nicht. Das Wachstum der Eiskristalle wird hier kinetisch dadurch gehemmt, dass die AFGPs an den Facetten, entlang derer die Kristalle wachsen würden, adsorbieren und die Anlagerung weiterer Wassermoleküle verhindern. Erste Versuche konnten zeigen, dass es mit dem Zusatz von AFGP zum Kryomedien möglich ist, Rattenleber (Rubinsky et al., 1994) und Rattenherz (Amir et al., 2004; 2005) zwischen -1,3 °C und -3,6 °C bis zu 24 h zu kühlen und funktional wieder auf Körpertemperatur zu bringen (Elami et al., 2008). Die tatsächliche Einsetzbarkeit in der langfristigen Kryokonservierung von Zellen und Gewebeschnitten muss jedoch noch getestet werden. Die Größe der Proteine muss dabei ebenso beachtet werden, wie die Konzentration, die Reinheit, die Interaktion mit den eingesetzten Kryomedien, sowie das Wärmeregime während des Einfrier- und Auftauvorgangs (Fletcher et al., 1999). Mit Hilfe dieser Proteine ist es jedoch prinzipiell möglich, Kryomedien zu entwickeln, die speziell auf die Bedürfnisse des Herzgewebes angepasst sind.

Die immunzytochemischen Färbungen sollten neben den strukturellen Veränderungen der Schnitte, welche durch die HE-Färbung gezeigt werden konnten, eventuelle Modulationen der Strukturen auf

Proteinebene zeigen, bzw. Änderungen ihrer Zusammensetzung. Hierzu wurden Myosin als Bestandteil des kontraktilen Apparates, alpha-Aktinin als Protein des sarkomeren Zellskeletts sowie Connexin 43 und N-Cadherin als Bestandteil der *Gap Junctions* und *Adhaerens Junctions* auf ihre Veränderungen durch die Kultur und die Kryokonservierung untersucht.

Myosin ist, neben Aktin, einer der beiden Hauptbestandteile des kontraktilen Apparates. Es setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, die über Konformationsänderungen an das Aktin binden und eine „Ruderbewegung" der Myosinkopfdomäne bewirken. Dadurch kommt es zu einer Kontraktion des Sarkomers und dem Gesamtmuskel (Brenner, 2005). In den hier gewonnen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass das Myosin in den Schnitten aus den Rattenherzen sowie den humanen Herzen mit der Zeit in Kultur abnimmt. Auch nach der Kryokonservierung nahm das Protein im Laufe der Kultvierung ab. Eine Schädigung kann durch den Stress, der von den oben genannten Aspekten ausgeht, ausgelöst werden. Deshalb lässt sich vermuten, dass die Degeneration des Myosins über die Zeit und nach der Kryokonservierung auch durch die stressbedingten Proteinabbaumechanismen hervorgerufen werden (Munoz et al., 2010). In den Streifen ergaben sich ähnliche Ergebnisse. In einigen Fällen scheint das Myosin nach 24 h in Kultur wieder zu regenerieren. Dies ist jedoch nicht unbedingt auf die Regeneration des Muskelgewebes zurück zu führen, sondern auf die unterschiedliche Beschaffenheit der Schnitte und Streifen vor dem Einfrieren. So kann es sein, dass die Schnitte und Streifen unterschiedlich gute Vitalwerte aufweisen und für die direkten Untersuchungen Gewebe mit schlechteren Voraussetzungen verwendet wurden als für die Untersuchungen nach 24 h. Es ist nicht möglich, während der Kultur und nach der Kryokonservierung zu sagen, welche der Schnitte und Streifen rein subjektiv in ihrer gesamten Konstitution noch am besten sind. Daraus resultieren große Streuungen in den Ergebnissen.

Im Sarkomer einer Muskelzelle ist neben dem Titin das alpha-Aktinin ein wichtiger Bestandteil (Kostin et al., 2000). Es kommt in den Z-Linien des Sarkomers vor und verbindet die Aktin-Filamente benachbarter Sarkomere (Djinovic-Carugo et al., 1999). In den kardialen Myozyten sind die Z-Linien aufgrund der größeren Anzahl der Quervernetzungen durch alpha-Aktinin dicker und weisen daher eine höhere mechanische Stabilität auf als in Myozyten der Skelettmuskulatur (Gautel, 2011). Die Untersuchungen dieser Arbeit konnten zeigen, dass die Bindung des Antikörpers an das für die Kontraktion so wichtige alpha-Aktinin-Protein im Verlauf der Kultivierung sowie nach der Kryokonservierung stark zurück geht. Somit ist ein wesentlicher Grund erhellt, warum die Kontraktionsfähigkeit der Schnitte sowohl nach Kultivierung als auch nach Kryokonservierung nicht mehr gegeben ist. Dies konnte sowohl für das Gewebe aus dem Rattenherzen als auch für das humane Gewebe nachgewiesen werden. Die durch die Rekristallisierung auftretenden Schäden nach dem Auftauvorgang können unter anderem auch eine Degeneration der Proteine hervorrufen. Diese

Degeneration kann eine Reaktion auf die Zellvergrößerung durch Flüssigkeitseintritt während der Auftauphase sein. Schaper et al. (1991) konnten zeigen, dass die Expression kontraktiler Proteine wie alpha-Aktinin bei Hypertrophie abnimmt. Ebenfalls nicht außer Betracht lassen darf man die während der Kultur auftretende Proteindegeneration. Der Stress, der auf die Schnitte wirkt z. B. eine Atrophie, kann zur Folge haben, dass die Struktur der Proteine des kontraktilen Apparates verloren geht oder modifiziert wird (Kostin et al., 2000), so dass die Epitope, gegen die der Antikörper sich richtet, nicht mehr nachgewiesen werden können. In den humanen Proben konnten Degenerationen des Proteins alpha-Aktinin im Verlauf der Zeit und auch nach der Kryokonservierung gezeigt werden. Das drückte sich auch in den, im Vergleich zu den Rattenproben, diffuseren Färbungen bei den humanen Herzschnitten aus.

Die muskuläre Stabilität und die Verbindungen zwischen den Myozyten werden durch spezielle Proteine gewährleistet. Hier spielt das Protein N-Cadherin eine wichtige Rolle. N-Cadherin ist ein membranständiges, Ca^{2+}-abhängiges Adhäsionsmolekül, das in den *Adhaerens Junctions* (*Fascia adhaerens*) der Kardiomyozyten auftritt (Soler und Knudsen, 1994). In den Schnitten und Streifen aus Ratten und humanem Herzgewebe konnten diese Proteine nachgewiesen werden. In den in EM + BDM kryokonservierten Streifen konnte nach 3 h in Kultur kein N-Cadherin nachgewiesen werden. Für alle anderen Proben konnte gezeigt werden, dass sich die N-Cadherin-Moleküle über die Zeit kaum verändern und auch nach 24 h in Kultur noch nachweisbar sind. Diese Ergebnisse scheinen nicht mit denen der HE-Färbung zusammen zu passen, in der festgestellt wurde, dass sich die Zellen auseinander bewegen. Es verhält sich jedoch so, dass die Zellen nur an einigen Stellen delaminieren; außerdem geschieht dies in der Regel in lateraler Richtung (d.i. entlang der Längsseiten der Kardiomyozyten), an den terminalen Bereichen bleiben sie noch verbunden. Da das N-Cadherin-Molekül hauptsächlich in den endständigen Bereichen der Zellen lokalisiert ist (Goncharova et al., 1992) konnte es in den Gewebeproben nachgewiesen werden. In den *Adhaerens Junctions* verbinden sich die jeweiligen Cadherine mit denen der Nachbarzelle und erhöhen so die mechanische Stabilität (Geiger et al., 1985), welche im kardialen Gewebe von großer Bedeutung ist. Sind diese Verbindungen geschädigt, ist die Kontraktilität des Muskelgewebes, selbst bei kontraktionsfähigen Einzelzellen nicht mehr vollständig gewährleistet (Oda und Takeichi, 2011).

Für die elektrischen Signale gibt es ebenfalls spezielle Verbindungsstellen in den Membranen der benachbarten Zellen. Hier spielt Connexin 43 eine entscheidende Rolle. Die Connexin-Proteine bilden die *Gap Junctions* (Severs, 1990; Hesketh et al., 2010), die sich an den terminalen Kontaktstellen der Zellen befinden. Sie bilden den Durchgang für elektrische Impulse, welche die Kontraktion der Zellen hervorrufen und gewährleisten auch die Synchronisation der mechanischen Antwort der Zellen (Severs et al., 2004; 2006; 2008). In den hier untersuchten Proben konnte das

Connexin 43-Molekül in allen Proben nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich in den Rattenproben ein Rückgang mit der Zeit in Kultur. Aufgrund der kurzen *Turnover*-Raten von Connexin 43 (Laird et al., 1991; Beardslee et al., 1998) kann es sein, dass sich zu den jeweiligen Messzeitpunkten ein Teil der zu detektierenden Proteine gerade im Umbau befanden. Es kann aber auch ein Hinweis darauf sein, dass durch die stimulationslose Kultivierung die Proteine degenerieren. In den rodenten unbehandelten sowie kryokonservierten Schnitten konnte festgestellt werden, dass nach 3 h in Kultur ein geringer Verlust der Connexin 43-Proteine zu detektieren und nach 24 h wieder ausgeglichen war. Der positive Nachweis nach 24 h in Kultur kann zum einen aufgrund der Heterogenität der Schnitte erklärt werden. Zum anderen ist es möglich, dass die hier fotografierten Gewebebereiche stärker mit *Gap Junctions* durchzogen waren, da die Connexin 43-Proteine nicht überall im Herzen gleichmäßig verteilt sind (Severs et al., 2008; 2006; 2004). Durch die auftretende Ischämie während der Kryokonservierung können ebenfalls Veränderungen in der Verteilung auftreten (Lampe et al., 2006).

Die mittels Immunzytochemie gewonnenen Daten zeigen, dass sowohl Kryokonservierung, also auch Kultivierung den *Adhaerens Junctions* und den *Gap Junctions,* d.i. den mechanischen und elektrischen Mediatorstellen zwischen den Zellen, vergleichsweise wenig Schaden zufügen. Die Beschädigung des kontraktilen Apparates fiel weitaus drastischer aus. Demnach sollte die Weiterleitung der elektrischen Signale von Zelle zu Zelle kein Problem darstellen. Die Schädigungen des kontraktilen Apparates jedoch (hier speziell das Myosin und das alpha-Aktinin) bewirkten, dass dennoch keine Kontraktion als Antwort auf einen Impulsstimulus erfolgte. Die lebensnotwendige Pumpkraft der Herzmuskulatur ist also sowohl in Langzeit-kultivierten als auch in kryokonservierten Herzschnitten nicht mehr gegeben. Dies zeigt deutlich, dass die Kardiomyozyten sowohl elektrisch als auch metabolisch miteinander verbunden sind (Verheule et al., 1997) und eine fehlende Komponente nicht kompensiert werden kann.

Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen der behandelten und unbehandelten Rattengewebeschnitte und –streifen sollten genauer zeigen, in welchen Bereichen das Gewebe Schaden genommen hat. Neben den strukturellen Veränderungen des kontraktilen Apparates konnten durch diese Aufnahmen nochmals die Mitochondrien hinsichtlich ihrer Struktur untersucht werden.

In den unbehandelten Rattenherzschnitten ist deutlich zu erkennen, dass die Struktur des kontraktilen Apparates mit der Zeit in Kultur verloren geht. Nach 24 h konnten nur noch sehr schwach eindeutige Strukturen detektiert werden. Die Bedingungen in der Kultur sind zwar so gut wie möglich an die Bedürfnisse der Schnitte und Streifen angepasst, dennoch kam es zu einer Degeneration des Gewebes. Neben den oben genannten Problematiken wie Stress und Ischämie, hervorgerufen durch

eine zu geringe Sauerstoffzufuhr, ist die statische Kultur ohne Stimulation ein weiterer Punkt, der zum Abbau des kontraktilen Apparates führen kann. Die Gewebedegeneration könnte eventuell verlangsamt werden, wenn man die Gewebeschnitte elektrisch stimulieren würde. Eschenhagen et al. (1997) konnten zeigen, dass neonatale Rattenkardiomyozyten, die über einen längeren Zeitraum stimuliert werden nach Beendigung der Stimulation eigenständig mit der Stimulationsfrequenz weiter kontrahierten. Durch die Anregung der Schnitte und Streifen in Kultur könnte so eine Degeneration der kardialen Muskelzellen verringert werden, da dies den *in vivo*-Bedingungen näher kommt als eine statische Kultur. Im Herzen sind die Kardiomyozyten ständiger Reizung ausgesetzt, eine statische Kultur könnte also auch das „Gedächtnis" der Zelle verändern (d.i. epigenetische Veränderungen hervorrufen). Durch die elektrischen Stimuli könnten „Trainingseffekte" erreicht werden, die die Degeneration verringern beziehungsweise ganz aufhalten könnten. In den kryokonservierten Schnitten und Streifen tritt der Abbau des kontraktilen Apparates nicht so deutlich zu Tage, was mit den Ergebnissen aus der HE-Färbung und der Immunzytochemie, die allerdings auf einer anderen Größenskala abbilden, nicht uneingeschränkt korreliert. Dennoch zeigen die Myofibrillen Schädigungen 3 h bzw. 24 h nach dem Auftauen. Im kontraktilen Apparat konnten direkt nach dem Auftauen noch keine konkreten Schädigungen ausgemacht werden. Im Vergleich dazu zeigen die Mitochondrien schon erste Anzeichen eines Defektes. Die Mitochondrien sind sowohl in den mit EM als auch in den mit EM + BDM eingefrorenen Schnitten und Streifen voluminöser und verlieren mit der Zeit in Kultur ihre typische doppelwandige Struktur. Dieser Verlust zeigt deutlich, dass die Mitochondrien geschädigt sind (Terman und Brunk, 2004). Im Normalfall zeigen sich solche Veränderungen der Cristae im Alterungsprozess, welcher ebenfalls mit einem Anschwellen der Zellorganellen einhergeht und in der Apoptose endet (Terman et al., 2003). Aufgrund der Vergrößerung der Mitochondrien kommt die Autophagozytose nicht mehr zum Greifen und die Zellen können absterben (Terman und Brunk, 2004). Die Vergrößerung der Interzellularräume zwischen den Zellen kann auch mit dem Eindringen von intrazellularer Zellflüssigkeit zusammenhängen. Durch die Kristalle, die sich während des Kryoprozesses bilden, kann es zu Schäden der Zellmembranen kommen. Die aus den Zellen austretende Zelllymphe ruft Volumenvergrößerungen der Zellzwischenräume hervor und bewirkt so eine Zerstörung der kardiomuskulären Strukturen. Der Schutz dieser Zellstrukturen sollte demnach weiter verbessert werden.

5.3 Genexpression spezieller Herzmarker

Neben der Proteindetektion in den Schnitten und Streifen wurden auch Untersuchungen auf mRNA-Ebene durchgeführt. Es wurde gemessen, wie sich die Expression herzspezifischer Gene,

wie Connexin 43 (Gja1, Zell-Zell-Kontakte) sowie die der Na^+-K^+-ATPase (Atp1a1; Atp1b1) und die des Na^+-Ca^{2+}-Austauschers (Slc8a1) während der Kultur verändert. Diese Experimente sind als eine unabhängige Methode anzusehen, um die vorangehenden Befunde (Vitalität, Struktur, Proteinexpression) zu überprüfen, bzw. weitergehende Informationen über das System zu erhalten. Insbesondere wurde der Frage nachgegangen, ob der Stress der Langzeitkultur bzw. Kryokonservierung die Bildung herzspezifischer Gene anregt – als eine Art Negativ-Feedback-Mechanismus, um die Funktionalität des Gewebes aufrecht zu erhalten – oder hemmt, etwa infolge von unspezifischen Stressreaktionen oder Degeneration des Gewebes.

Für die Ionen-Homöostase, also der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtszustandes von Ionen in einem offen dynamischen System, spielen sowohl das Atp1a1-Gen als auch das Slc8a1-Gen eine wichtige Rolle (Zwadlo und Borlak, 2005). Sie sind unter anderem dafür zuständig den Elektrolythaushalt, das Zellvolumen und den pH-Wert der Zelle aufrecht zu erhalten (Zwadlo und Borlak, 2005). Dieses Gleichgewicht kann durch die Kryokonservierung und die nachfolgende Kultur gestört werden und zu Schädigungen der Zellen führen. Damit das Ungleichgewicht wieder ausgeglichen wird, kann es zu einer erhöhten Expression von Atp1a1 sowie von Slc8a1 kommen. So konnten Ranu et al. (2002) zeigen, dass der Na^+/Ca^{2+}-Austauscher der wichtigste Transporter für Ca^{2+}-Ionen aus der Zelle ist. Kommt es durch die oben beschriebene Schädigung der Zellen zu einem vermehrten Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle, ist der Na^+/Ca^{2+}-Austauscher verstärkt aktiv, um das Ionen-Gleichgewicht zwischen Intra- und Interzellularraum wieder herzustellen. Dies würde die erhöhte Genexpression des Slc8a1-Gens in den unbehandelten Rattenherzschnitten und den kryokonservierten Rattenherzstreifen erklären. In fast allen untersuchten Gewebeproben sinkt die Slc8a1-Expression nach 3 h in Kultur erst ab und steigt nach 24-stündiger Kultivierung wieder an. Es ist anzunehmen, dass dies auch bei den unbehandelten Rattenherzstreifen nach 24 h der Fall sein könnte. Hier konnten jedoch aufgrund von Ausfällen keine Daten erhoben werden. Der Anstieg des Atp1b1-Gens in den unbehandelten und mit EM kryokonservierten Rattenherzschnitten und –streifen deutet ebenfalls auf einen veränderten Elektrolythaushalt in den Zellen hin. So konnten Zwadlo & Borlak (2005) an hypertonen Herzen nachweisen, dass durch einen erhöhten Na^+-Ausstrom aus der Zelle sowohl das Atp1b1-Gen als auch das Slc8a1-Gen hochreguliert werden. Da, wie oben beschrieben, die Ca^{2+}-Ionen durch den Na^+/Ca^{2+}-Austauscher aus den Zellen ausgeschleust und Na^+-Ionen in die Zelle transportiert werden, muss nun die Na^+-Konzentration reguliert werden, was durch die Na^+-K^+-ATPase geschieht. Die Senkung der Atp1b1-Genexpression in den in EM + BDM kryokonservierten Schnitten und Streifen deutet auf eine Schädigung des Gewebes, unter anderem durch den Zusatz BDM hin. Auch wenn die Expression in den Streifen nach 3 h in Kultur nochmals deutlich erhöht ist, kann eine nachwirkende Schädigung durch BDM hervorgerufen worden sein.

Connexin 43 (Gja1) ist in den *Gap Junctions* das am häufigsten exprimierte Protein im Ventrikelmuskel von Säugern (Hesketh et al., 2010) und dementsprechend auch mit vielfältigen Veränderungen durch Krankheiten assoziiert unter anderem auch bei ischämischen Herzerkrankungen (Smith et al., 1991). In den unbehandelten und in EM eingefrorenen Rattenherzschnitten und -streifen ist das Gja1-Gen hochreguliert, wobei nach 3 h in Kultur zuerst ein Abregulation zu erkennen ist, bevor es zu einem erneuten Anstieg der Genexpression kommt. Beardslee et al. (1998) konnten zeigen, dass die Umsatzrate des Connexin 43 in adulten Rattenherzen bei 1,3 h liegt. Dies könnte eine Erklärung für die nach 3 h festgestellte Abregulation und danach folgende Hochregulation des Gja1-Gens sein. In den mit EM + BDM kryokonservierten Schnitten und Streifen aus den Rattenherzen zeigt sich ein anderer Trend. Hier ist in den Schnitten ein kontinuierlicher Abfall der relativen Genexpression auszumachen. In den Streifen hingegen steigt die Expression nach 3-stündiger Kultur erst an, bevor sie wieder stark abreguliert wird. Ein Einfluss des BDM auf die Transkription der mRNA während der real time PCR könnte demnach möglich sein. Auch der Verteilung des Connexin 43 in den Herzschnitten könnte eine Rolle in den unterschiedlichen Ergebnissen der Proben sein. Die Expression des Gja1-Gens ist in den *Gap Junctions* im Herzen nicht einheitlich verteilt (Hesketh et al., 2010). So kommt Connexin 43 im Vergleich zu den Connexinen 40 und 45 zwar hauptsächlich im rechten und linken Ventrikel vor (Severs et al., 2008), dennoch können bei den Streifen Teilbereiche untersucht worden sein, die aus Bereichen stammen, in denen das Gja1-Gen nicht so stark exprimiert wird. Die unterschiedlichen *Turnover*-Raten könnten zum Zeitpunkt der Messung ebenfalls zu den vorliegenden Ergebnissen geführt haben.

In den humanen Schnitten und Streifen sind die relativen Genexpressionslevel von Atp1a1, Slc8a1 und Gja1 im Vergleich zum Rattengewebe anders verteilt. So zeigt sich eine Anti-Korrelation zwischen den humanen Genen Atp1a1 und Slc8a1. Steigt die Expression für das Slc8a1-Gen, so sinkt die Genexpression für Atp1a1 und umgekehrt. Zwadlo und Borlak (2005) konnten in ihren Analysen zeigen, dass die Expression von Na^+/Ca^{2+}-Austauscher und Na^+-K^+-ATPase in Rattenherzen und humanen Herzen differieren.

Der Vergleich zwischen den humanen Schnitten und Streifen zeigt eine gegensätzliche Genexpression, d. h. steigt die Expression in den Schnitten, so fällt sie in den gleich behandelten Streifen ab. Eine Ausnahme bilden die unbehandelten Streifen, hier verhält sich die Genexpression wie in den Schnitten. Auch muss beachtet werden, dass auf Grund von Ausfällen während der PCR und zu geringen Probenvolumina, teilweise nach 3 h Kultur, keine Daten mehr zur Verfügung standen. Die unbehandelten humanen Schnitte zeigen einen Anstieg im Expressionslevel von Atp1a1 und eine Abregulation von Slc8a1. Die Abnahme des Slc8a1-Gens könnte ein Indiz dafür sein, dass die kontraktilen Funktionen des Schnittes gestört sind, wie Schaeffer et al. (2009) zeigen konnten. Der

Anstieg im Expressionslevel von Atp1a1 könnte auf ein gestörtes Ionen-Equilibrium hindeuten, welches die Zelle versucht wieder auszugleichen. Der K^+-Einstrom bewirkt eine Muskelrelaxation, da durch K^+-Ionen die Repolarisation des Muskels hervorgerufen wird. Die Zelle könnte also versuchen, so die Expression des Slc8a1-Gens wieder anzukurbeln und eine Kontraktion wieder möglich zu machen. In den unbehandelten Streifen zeigt das Expressionsmuster eine Abregulation der Na^+-K^+-ATPase sowie des Na^+/Ca^{2+}-Austauschers. Hier spricht vieles dafür, dass die Streifen in Kultur absterben und sich dadurch die Expression der Gene verringert. Die kryokonservierten Proben zeigen ansatzweise das gleiche Expressionsmuster der Slc8a1- und Atp1a1-Gene. Wie auch bei den unbehandelten Proben verläuft die Expression der Gene antikorreliert. Bei den in EM kryokonservierten humanen Schnitten fällt die relative Genexpression von Slc8a1 nach 3 h in Kultur etwas ab, die des Atp1a1-Gens steigt an. Nach 24-stündiger Kultur hat sich das Level der beiden Gene angepasst, heißt, die Expression des Na^+/Ca^{2+}-Austauschers steigt leicht an und die der Na^+-K^+-ATPase fällt stark ab. Der Angleich auf ein ähnliches Level könnte ein Anzeichen für das Ionenequilibrium der Zelle sein. Die vorangegangenen Differenzen in der Expression müssten in diesem Fall eine Anpassung des Ionenverhältnisses innerhalb und außerhalb der Zelle sein. In den mit EM behandelten humanen Streifen zeigt sich bis zu 3 h in Kultur sowohl für das Slc8a1-Gen als auch für das Atp1a1-Gen ein Rückgang der Expression, lässt also auf ein Absterben der Zellen schließen. Die gewonnen Werte nach 24 h in Kultur für die Na^+/K^+-ATPase verweisen darauf, dass die Zellen wieder anfangen Gene zu exprimieren, die für den Ionenaustausch mittels der ATPase benötigt werden. Aufgrund nicht auswertbarer Daten des Na^+/Ca^{2+}-Austauschers fehlen für die in EM kryokonservierten Streifen die Vergleichswerte. Würde hier die Expression ebenfalls nach oben gehen, könnte von einem Versuch der Zellen gesprochen werden, das Ca^{2+}-Verhältnis im Intra- und Extrazellularraum wieder herzustellen und so eine Kontraktion zu ermöglichen. Die in EM + BDM eingefrorenen humanen Schnitte zeigen zunächst einen Anstieg der Genexpression der Slc8a1- und Atp1a1-Gene nach 3-stündiger Kultivierung. Dies spricht dafür, dass die Ca^{2+}-Konzentration ausgeglichen werden soll (Zwadlo und Borlak, 2005). Nach 24 h kommt es jedoch zu einem starken Abfall des Atp1a1-Gens. Entweder hat zu diesem Zeitpunkt ein Annähern des Ionenhaushalts stattgefunden und die Transkription der mRNA ging zurück, oder aber die Zellen in den behandelten Schnitten sind bereits nekrotisch bzw. apoptotisch. In den humanen Streifen fällt die Expression des Slc8a1-Gens während der 24-stündigen Kultivierung stark ab, wohingegen das Atp1a1-Gen in den ersten 3 h auf einem nahezu konstanten Level exprimiert wird und nach 24 h Kultur ansteigt. Dies könnte ein Anhaltspunkt dafür sein, dass die Zelle sich einem Ionenequilibrium nach etwas mehr als 3 h annähert. Der weitere Expressionsanstieg des Atp1a1-Gens weist jedoch darauf hin, dass die Zelle eine Erschlaffung der Kardiomyozyten anstrebt, um die Kontraktilität wieder zu ermöglichen.

Wie oben schon beschrieben konnten Schaeffer et al. (2009) zeigen, dass ein Absenken der Slc8a1-Expression mit einer gestörten Kontraktilität einhergeht. Die Connexin 43-Expression zeigt in den unbehandelten humanen Schnitten und Streifen eine Abregulation nach 3 h in Kultur. In den Schnitten setzt sich der Abwärtstrend auch nach 24-stündiger Kultivierung fort. Die Abnahme der Gja1-Expression ist ein Hinweis auf die nicht mehr intakten Kardiomyozyten (Severs et al., 2004), die wahrscheinlich während der Kryokonservierung geschädigt worden sind. Es gibt aber auch Grund zu der Annahme, dass sich die Connexin 43-Expression aufgrund ihrer hohen *Turnover*-Rate auch im adulten Herzen (Beardslee et al., 1998) gerade in einer Abbauphase befinden und aufgrund dessen eine Abnahme der Expression detektiert werden konnte. In den mit EM kryokonservierten Schnitten steigt die Expression des Gja1-Gens 3 h nach Auftauen stark an, fällt aber nach 24-stündiger Kultivierung wieder rapide ab. Der starke Anstieg innerhalb der ersten 3 Kultivierungsstunden legt die Vermutung nahe, dass es in dieser Zeit zu einer Erneuerung der Connexin 43-Verbindungen zwischen den Zellen kommt. In der darauffolgenden Kultivierungsphase lässt die Expression nach, da die *Gap Junctions* wieder aufgebaut sind und die mechanische Verbindung zwischen den Zellen wieder hergestellt ist. In den in EM kryokonservierten Streifen ist die Expression wesentlich weniger stark ausgeprägt, was eventuell damit zusammenhängt, dass in Streifen durch die mechanische Zerkleinerung (weniger Zellen, relativ mehr zerstörte Randzellen) zu viele Gap-Junctions geschlossen werden mussten. Sind in Zellsynzytien, die über *Gap Junctions* miteinander verbunden sind, einige Zellen zerstört, schließen die *Gap Junctions* der intakten Zellen, um ein „auslaufen“ des Zellplasmas zu verhindern (Herve und Derangeon, 2012). Würden sich die Verbindungen zwischen den Zellen nicht schließen, würden die gesunden Zellen ebenfalls absterben. Im Verlauf der 24-stündigen Kultur verändert sich das Expressionsmuster nur wenig, zeigt aber dennoch einen leichten Abfall während der Kultivierungsphase. Die mit EM + BDM behandelten humanen Gewebeproben zeigen ein ähnliches Muster wie die in EM kryokonservierten humanen Schnitte und Streifen. Die Schnitte zeigen eine im Vergleich erhöhte Expression nach 0 h Kultur zu den unbehandelten Schnitten, die in den ersten 3 h der Kultur absinkt. Die Streifen hingegen zeigen ein fast gleichbleibendes Level der relativen Genexpression über die gesamte Kultivierungszeit. Auch hier kann vermutet werden, dass die mechanische Verbindung in den Streifen die Kryokonservierung besser überstanden haben als in den Schnitten.

Die hier erhobenen Daten deuten darauf hin, dass die Schnitte und Streifen nach der Kryokonservierung sowie der Kultur noch vital sind. Die Veränderungen der relativen Genexpressionslevel zeigen an, dass in den Schnitten und Streifen Mechanismen in Gang gesetzt werden, die der Verbesserung des inneren Zellmilieus dienlich sind und den ursprünglichen funktionalen Status wieder anstreben. Die sehr stark variierenden Daten können auf die konstitutionellen Unterschiede in

den Streifen und Schnitten zurück geführt werden sowie auf die teilweise nur sehr geringen Mengen an zu kopierender cDNA. Des Weiteren muss bedacht werden, dass die untersuchten Herzschnitte von Schnitt zu Schnitt unterschiedlich auf die Bedingungen reagieren und so nicht immer ein einheitliches Bild geschaffen werden kann. Die Ausgangswerte der Gewebeproben von Tier zu Tier und von Mensch zu Mensch waren unterschiedlich, so dass ein große Varianz zu erwarten war.

5.4 Elektrophysiologische Veränderungen der Gewebeschnitte und -streifen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten zeigen, dass die Schnitte und Streifen sowohl nach der Kultivierung, als auch nach der Kryokonservierung noch vital sind. Mittels der HE-Färbung und den TEM-Aufnahmen wurde deutlich, dass sich das interstitielle Bindegewebe zwischen den Zellen während der Kultur und nach der Kryokonservierung langsam auflöst. Elektrophysiologische Untersuchungen sollten einen Hinweis darauf geben, ob die Schnitte nach der Kultur, bzw. der Kryokonservierung noch in der Lage sind, elektrische Impulse über das Gewebe-Synzytium weiter zu leiten. Akut, d.i. nach dem Schneiden, konnten an Rattenherzschnitten Feldpotenziale über ein Mikroelektroden-Array aufgenommen werden. Sie wurden nachweisbar über den Schnitt weitergeleitet. Diese Weiterleitung der elektrischen Signale im unbehandelten Schnitt deutet auf intakte *Gap Junctions* sowie *Adhaerens Junctions* hin. Ohne die elektrische und mechanische Verbindung zwischen den einzelnen Zellen in den Schnitten wären solche Aufnahmen nicht möglich gewesen. Camelliti et al. (2011), Bussek et al. (2009) und Meyer et al. (2010) konnten ebenfalls zeigen, dass es möglich ist, organotypische Gewebeschnitte mittels des MEA's auf deren elektrophysiologische Intaktheit zu untersuchen. Allerdings kann ein zu großer Abstand zwischen Schnitt und Elektroden leicht dazu führen, dass keine Potenziale angezeigt werden (Bussek et al., 2009). So sind auch die fehlenden Potenziale in Abbildung 42 zu erklären. Können die Feldpotenziale nur punktuell detektiert werden und eine Weiterleitung der Signale ist nicht zu erkennen, kann von geschädigtem Gewebe ausgegangen werden. In den hier durchgeführten Versuchen konnte eine verlängerte Dauer der einzelnen Potenziale in den Herzschnitten gezeigt werden. Bei einer gesunden Ratte liegt die Dauer eines Herzaktionspotenzials bei etwa 100 ms (Farraj et al., 2009). Hier liegt diese bei ca. 300 ms, ist also etwa 3-mal so lang. Aufgrund eines verlangsamten und damit längeren Kalziumeinstroms kann es in den Schnitten zu einer längeren Plateauphase kommen, was in einem 300 ms langen Feldpotenzial mündet. Die Präparation der Schnitte mit dem Vibratom erzeugt demnach keine größeren Schäden in der Kontraktilität sowie der Elektrophysiologie und die Vitalität kann als gegeben angenommen werden. Die spontane Kontraktilität bleibt erhalten und die Stimulation (z. B. mit 1 mV alle 2 ms) ist ebenfalls möglich. Weitere Aufnahmen konnten nicht gemacht werden, da kein adäquates

Zu- und Ablaufsystem für den Messpuffer vorhanden war und so die Versorgung der Schnitte mit Sauerstoff und frischer kardioplegischer Nährlösung nicht gegeben war. Ein Einträufeln der Substanzen über eine Pipette verursachte starkes Rauschen bzw. führte zu einem Ausfall der Elektroden. Aufgrund der fehlenden Zu- und Abläufe konnten ebenfalls keine Langzeitmessreihen durchgeführt werden. Für humane Schnitte konnten Wenzel (2011) und Brandenburger (2011) zeigen, dass es auch nach mehrtägiger Kultur möglich ist die Schnitte elektrophysiologisch abzuleiten und sogar Kraftmessungen an diesen durchzuführen. Demgegenüber zeigten Messungen an kryokonservierten Schnitten keine Ergebnisse. Diese mangelnde Reizantwort kann auf Membranschädigungen sowie Änderungen des Ionenhaushalts bzw. der Ionenkanal-Verhältnisse zurück geführt werden. Auch wenn, wie in den vorangegangenen Versuchen gezeigt, die *Adhaerens Junctions* noch weitestgehend intakt waren, genügt dies nicht, um die Schnitte wieder zum Zucken zu bringen. Der mangelnden Kraftentfaltung liegt hier wahrscheinlich die Schädigung des kontraktilen Apparates zu Grunde. Ein weiterer Aspekt, warum die Kontraktilität nicht mehr gegeben ist, könnte der Verlust der benötigten Ca^{2+}-, Na^{+}- und K^{+}-Kanäle sein, die für die Ausbildung eines Aktions- bzw. Feldpotenzials notwendig sind. Ist einer der Kanäle nicht mehr funktionstüchtig, kann keine Reaktion mehr zustande kommen (Tan et al., 2010). In den Untersuchungen der Genexpression konnte zwar gezeigt werden, dass in den Gewebeproben noch mRNA für die Na^{+}/K^{+}-ATPase und den Na^{+}/Ca^{2+}-Austauscher nachweisbar ist. Es kann darüber aber noch keine Aussage getroffen werden, ob die Ionenkanäle noch intakt und funktionsfähig sind. Die Versuche mit dem MEA konnten dennoch zeigen, dass die Verwendung der Schnitte zur Aufnahme der elektrophysiologischen Eigenschaften sehr gut geeignet ist. Das gesamte Zusammenspiel in den Herzmuskelzellen kann gut dargestellt werden und die Stimulation der Schnitte über eine externe Elektrode ist möglich. Als Testsysteme sind die Gewebeschnitte demnach geeignet. Dennoch muss darauf geachtet werden, dass nicht jeder Zelltyp, der im Herzen vorhanden ist auch in den Schnitten vertreten ist. Die hier verwendeten Schnitte sind ausschließlich aus den Ventrikeln der Herzen gewonnen. Die Schrittmacher-Zellen aus dem Sinusknoten, der im rechten Atrium des Herzens zu finden ist (Schrader und Kelm, 2005), können hier nicht untersucht werden. Dagegen können Reaktionen der Zellen aus den Ventrikeln sowie den weiterleitenden Einheiten (Atrioventrikular-Knoten, Purkinjefasern und His-Bündel) auf Grund ihrer unterschiedlichen Aktionspotenzialform aufgenommen werden.

Die Streifen können in diesem System nur schwer getestet werden, da diese zu schmal sind, um sie adäquat mit einem Halter an die Elektroden des MEA anzudrücken. Deswegen wurden die Untersuchungen der Streifen mittels einer scharfen Elektrode durchgeführt. Zur besseren Fixierung des Streifens in der kardioplegen Messlösung wurden spezielle Agarosehalter mit schmalen Vertiefungen entwickelt, in denen die Streifen platziert wurden. Die Messung zeigte, dass auch die Streifen

nach dem Schneiden und Choppen noch Aktionspotenziale weiterleiteten, die mit einer Elektrode an der einen Seite des Streifes ausgelöst und am anderen Ende von einer in den Streifen platzierten Elektrode aufgenommen werden. Das Ruhemembranpotenzial des Rattenherzens liegt normalerweise bei -80 mV (Bouchard et al., 2004), in der Untersuchung der Rattenherzstreifen konnte ein RMP von -75 mV aufgenommen werden. Innerhalb der ersten 100 ms des Aktionspotenzials wurde das RMP nahezu wieder erreicht. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Streifen vital sind und auch die Reizweiterleitung sowie die Ionenkanäle intakt sind. Die Streifen, die vor der Messung kryokonserviert waren, zeigten keine Reaktion auf die Stimulation mittels der externen Elektrode. Selbst bei einer angelegten Spannung von 13 Hz zeigte sich kein Aktionspotenzial in den Streifen.

Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen am unbehandelten Rattenherzgewebe lassen den Schluss zu, dass die Streifen ebenso wie die Schnitte nur geringfügig Schaden durch den Schneidevorgang im Vibratom und am Chopper, nehmen. Die Verwendung als Testsysteme für die Medikamentenforschung wäre demnach gegeben. Dennoch muss die Testung an Herzstreifen im Hinblick auf ihre Handhabbarkeit noch verbessert werden.

Zur Verbesserung der Vitalität der Streifen nach dem Einfrieren sollten weitere mögliche Parameter verbessert werden. Bei den bisherigen Kultivierungsbedingungen der Schnitte und Streifen wurde hauptsächlich das perfekte „Klima“ für die unbehandelten Gewebeproben bedacht. In weiteren Versuchen sollte nochmals speziell auf die veränderten Ansprüche der kryokonservierten Herzschnitte und Herzstreifen nach dem Auftauen eingegangen werden. Mit den Anpassungen an die Bedürfnisse des Gewebes könnten die elektrophysiologischen Eigenschaften eventuell erhalten bleiben.

5.5 Fazit & Ausblick

Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit gewonnen werden konnten, zeigen, dass es möglich ist Herzgewebeschnitte und –streifen aus dem Rattenherz und dem humanen Herzen zu kryokonservieren und vital wieder aufzutauen. Jedoch ist die Kontraktilität nicht gegeben.

Die zelluläre Intaktheit sowie die mitochondriale Aktivität konnten mittels verschiedener Systeme wie der Far Red-Färbung, dem MTT-Assay und der JC 1-Färbung ermittelt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass weniger die mitochondriale Aktivität durch die Kryokonservierung in Mitleidenschaft gezogen wird, als vielmehr der kontraktile Apparat der Zellen. Die HE-Färbung zeigte den Rückgang des interstitiellen Gewebes zwischen den Kardiomyozyten sowie den Verlust der typischen kardialen Strukturen. Weiterhin wiesen die Aufnahmen mit dem Transmissionselektronenmikroskop auf eine Veränderung der Cristae in den Mitochondrien der Zellen hin, was trotz prinzipieller Intaktheit auf einen gewissen Verlust der ATP-Produktion hinweist. Die immunzytochemischen Untersuchungen von Myosin und alpha-Aktinin konnten den Rückgang wichtiger Proteine im kontraktilen Apparat verdeutlichen. Eine Analyse der Zell-Zell-Kontakte mittels Connexin 43 in den *Gap Junctions* und N-Cadherin in den *Adhaerens Junctions* legte dennoch intakte Verbindungen dar. Die Weiterleitung elektrischer Signale sollte also noch gewährleistet sein, auch wenn der kontraktile Apparat defekt ist.

Zur genaueren Analyse der Regelung herzspezifischer Gene nach erheblichen Stresseinflüssen (Langzeitkultivierung; Kryokonservierung) wurde die Genexpression der Connexin 43-kodierenden Gene, sowie der Membrantransporter Na^+-K^+-ATPase und Na^+-Ca^{2+}-Transporter in den Herzgewebeproben untersucht. Die Expression zeigte keinen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Einfriermedien sowie den Schnitten und Streifen. In den mit EM und EM + BDM behandelten Gewebeproben konnte keine Korrelation zwischen den untersuchten Proteinen erkannt werden. Zur Verifizierung der aus der real-time-PCR gewonnen Daten wurde nochmals eine Kapillargelelektrophorese durchgeführt, die zeigte, dass die gewonnen mRNA-Fragmente die richtigen Basenpaargrößen aufwiesen.

Elektrophysiologische Untersuchungen mittels des MEA's und einer scharfen Elektrode sollten zeigen, in wieweit die Gewebeproben vor und nach der Kryokonservierung im Stande waren elektrische Signale zu empfangen und über das gesamte Gewebesynzytium weiter zu leiten. Die akuten, unbehandelten Schnitte/Streifen wiesen messbare Feldpotenziale auf. Im Gegensatz dazu zeigten die kryokonservierten Schnitte und Streifen keine Reaktion auf die Stimulation mittels einer externen Elektrode

Die Verwendung der Gewebeschnitte als Testsystem in unbehandeltem Zustand konnte bereits als durchführbar von Brandenburger (2011) und Wenzel (2011) gezeigt werden. Eine Kryokonservierung der Gewebeproben zur Anwendung als Testsystem für Medikamente ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich. Dennoch sollte weiterhin an der Verbesserung des Systems sowie der Erhaltung des kontraktilen Apparates und der Zell-Zell-Kontakte während und nach der Kryokonservierung gearbeitet werden, da Vitalität nach dem Auftauen nachgewiesen werden konnte. Durch den Einsatz von Anti-Freeze-Proteinen und weiteren Zusätzen in den Kryomedien sollte es möglich sein, auch kontraktile Gewebeproben funktional zu kryokonservieren. Der Vorteil an diesem System wäre unter anderem die ständige Verfügbarkeit von organotypischen Geweben zur Verwendung als Testsystem. Zurzeit ist es noch nicht möglich, Gewebeschnitte funktional auf Vorrat zu halten, um bei Bedarf darauf zurückzugreifen. Diese Vorratshaltung wäre aber in der Medikamentenentwicklung ein entscheidender Vorteil, denn im Moment dauert die Zulassung von neuen Medikamenten noch bis zu 10 Jahren (BASG, 2011). In den letzten drei Phasen dieser Zeit kann sich immer noch herausstellen, dass das Medikament am humanen Organ nicht die gewünschte Wirkung zeigt und so neue Versuche mit verbessertem Medikament notwendig sind.

6. Referenzen

2008. Gesetz zur Sicherstellung des Embryonenschutzes im Zusammenhang mit Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen (Stammzellgesetz - StZG). *BGBl. I S. 2277.*

ALBERTS, B. 2002. *Molecular biology of the cell,* New York, Garland Science.

ALTSCHULD, R. A., GANOTE, C. E., NAYLER, W. G. & PIPER, H. M. 1991. What constitutes the calcium paradox? *J Mol Cell Cardiol,* 23**,** 765-7.

AMIR, G., HOROWITZ, L., RUBINSKY, B., YOUSIF, B. S., LAVEE, J. & SMOLINSKY, A. K. 2004. Subzero nonfreezing cryopresevation of rat hearts using antifreeze protein I and antifreeze protein III. *Cryobiology,* 48**,** 273-82.

AMIR, G., RUBINSKY, B., BASHEER, S. Y., HOROWITZ, L., JONATHAN, L., FEINBERG, M. S., SMOLINSKY, A. K. & LAVEE, J. 2005. Improved viability and reduced apoptosis in sub-zero 21-hour preservation of transplanted rat hearts using anti-freeze proteins. *J Heart Lung Transplant,* 24**,** 1915-29.

ANGELE, M. K., SCHNEIDER, C. P. & CHAUDRY, I. H. 2008. Bench-to-bedside review: latest results in hemorrhagic shock. *Crit Care,* 12**,** 218.

APOSTOLAKOS, M. J., SCHUERMANN, W. H., FRAMPTON, M. W., UTELL, M. J. & WILLEY, J. C. 1993. Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. *Anal Biochem,* 213**,** 277-84.

BASG. 2011. *Arzneimittelentwicklung* [Online]. Bundesamt für Sicherheit im Gesundheitswesen. Available: http://www.basg.at/ [Accessed].

BEARDSLEE, M. A., LAING, J. G., BEYER, E. C. & SAFFITZ, J. E. 1998. Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ Res,* 83**,** 629-35.

BEREITER-HAHN, J. & JENDRACH, M. 2010. Mitochondrial dynamics. *Int Rev Cell Mol Biol,* 284**,** 1-65.

BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L. & STRYER, L. 2013. *Biochemie,* New York, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

BERRIDGE, M. V. & TAN, A. S. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys,* 303**,** 474-82.

BLANCHARD, E. M., SMITH, G. L., ALLEN, D. G. & ALPERT, N. R. 1990. The effects of 2,3-butanedione monoxime on initial heat, tension, and aequorin light output of ferret papillary muscles. *Pflugers Arch,* 416**,** 219-21.

BOUCHARD, R., CLARK, R. B., JUHASZ, A. E. & GILES, W. R. 2004. Changes in extracellular K+ concentration modulate contractility of rat and rabbit cardiac myocytes via the inward rectifier K+ current IK1. *J Physiol,* 556**,** 773-90.

BRANDENBURGER, M. 2011. *Etablierung und Charakterisierung von Langzeitkulturen humaner Herzschnitte.* PhD, Universität Lübeck.

BRANDENBURGER, M., WENZEL, J., BOGDAN, R., RICHARDT, D., NGUEMO, F., REPPEL, M., HESCHELER, J., TERLAU, H. & DENDORFER, A. 2011. Organotypic slice culture from human adult ventricular myocardium. *Cardiovasc Res*.

BREHM, M., DARRELMANN, E. & STRAUER, B. E. 2008. Stem cell therapy in acute myocardial infarction. *Internist (Berl),* 49**,** 1068-78.

BRENNER, B. 2005. Muskulatur - Herzmuskel. *In:* KLINKE, R., PAPE, H. C. & SILBERNAGEL, S. (eds.) *Physiologie.* Stuttgard, New York: Georg Thieme Verlag.

BRUNK, U. T. & TERMAN, A. 2002. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med,* 33**,** 611-9.

BURNASHEV, N. A., EDWARDS, F. A. & VERKHRATSKY, A. N. 1990. Patch-clamp recordings on rat cardiac muscle slices. *Pflugers Arch,* 417**,** 123-5.

BURSAC, N., PAPADAKI, M., WHITE, J. A., EISENBERG, S. R., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. & FREED, L. E. 2003. Cultivation in rotating bioreactors promotes maintenance of cardiac myocyte electrophysiology and molecular properties. *Tissue Eng,* 9**,** 1243-53.

BUSSEK, A., WETTWER, E., CHRIST, T., LOHMANN, H., CAMELLITI, P. & RAVENS, U. 2009. Tissue slices from adult mammalian hearts as a model for pharmacological drug testing. *Cell Physiol Biochem,* 24**,** 527-36.

CAMELLITI, P., AL-SAUD, S. A., SMOLENSKI, R. T., AL-AYOUBI, S., BUSSEK, A., WETTWER, E., BANNER, N. R., BOWLES, C. T., YACOUB, M. H. & TERRACCIANO, C. M. 2011. Adult human heart slices are a multicellular system suitable for electrophysiological and pharmacological studies. *J Mol Cell Cardiol,* 51**,** 390-8.

CHAPIN, R. E. & STEDMAN, D. B. 2009. Endless possibilities: stem cells and the vision for toxicology testing in the 21st century. *Toxicol Sci,* 112**,** 17-22.

CREVEL, R. W., FEDYK, J. K. & SPURGEON, M. J. 2002. Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure. *Food Chem Toxicol,* 40**,** 899-903.

DAUM, N., KUEHN, A., HEIN, S., SCHAEFER, U. F., HUWER, H. & LEHR, C. M. 2012. Isolation, cultivation, and application of human alveolar epithelial cells. *Methods Mol Biol,* 806**,** 31-42.

DE BOER, T. P., CAMELLITI, P., RAVENS, U. & KOHL, P. 2009. Myocardial tissue slices: organotypic pseudo-2D models for cardiac research & development. *Future Cardiol,* 5**,** 425-30.

DILGER, K. 2009. Klinische Arzneimittelentwicklung und Pharmakovigilanz. *In:* AKTORIES K., F. U., HOFMANN F., STARKE K. (ed.) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* München: Elsevier.

DILLER, K. R. 1997. Engineering-Based Contributions in Cryobiology. *Cryobiology,* 34**,** 304-14.

DJINOVIC-CARUGO, K., YOUNG, P., GAUTEL, M. & SARASTE, M. 1999. Structure of the alpha-actinin rod: molecular basis for cross-linking of actin filaments. *Cell,* 98**,** 537-46.

DREXLER, B., HENTSCHKE, H., ANTKOWIAK, B. & GRASSHOFF, C. 2010. Organotypic cultures as tools for testing neuroactive drugs - link between in-vitro and in-vivo experiments. *Curr Med Chem,* 17**,** 4538-50.

ELAMI, A., GAVISH, Z., KORACH, A., HOUMINER, E., SCHNEIDER, A., SCHWALB, H. & ARAV, A. 2008. Successful restoration of function of frozen and thawed isolated rat hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg,* 135**,** 666-72, 672 e1.

EMA 2006. General Considerations for Clinical Trials. *In:* 8, I. T. E. (ed.). European Medicines Agency.

ESCHENHAGEN, T. 2009. Pharmakologie des cardiovasculären Systems - das Herz. *In:* AKTORIES K., F. U., HOFMANN F., STARKE K. (ed.) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 10 ed. München: Elsevier GmbH.

ESCHENHAGEN, T., FINK, C., REMMERS, U., SCHOLZ, H., WATTCHOW, J., WEIL, J., ZIMMERMANN, W., DOHMEN, H. H., SCHAFER, H., BISHOPRIC, N., WAKATSUKI, T. & ELSON, E. L. 1997. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J,* 11**,** 683-94.

EVANS, M. J. & KAUFMAN, M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature,* 292**,** 154-6.

FARRAJ, A. K., HAYKAL-COATES, N., WINSETT, D. W., HAZARI, M. S., CARLL, A. P., ROWAN, W. H., LEDBETTER, A. D., CASCIO, W. E. & COSTA, D. L. 2009. Increased non-conducted P-wave arrhythmias after a single oil fly ash inhalation exposure in hypertensive rats. *Environ Health Perspect,* 117**,** 709-15.

FLETCHER, G. L., GODDARD, S. V. & WU, Y. 1999. Antifreeze proteins and their genes: From basic research to buisness opportunity. *Chemtech* 29**,** 17-28.

FLETCHER, G. L., HEW, C. L. & DAVIES, P. L. 2001. Antifreeze proteins of teleost fishes. *Annu Rev Physiol,* 63**,** 359-90.

FOLDES, G., HARDING, S. E. & ALI, N. N. 2008. Cardiomyocytes from embryonic stem cells: towards human therapy. *Expert Opin Biol Ther,* 8**,** 1473-83.

FÖRSTERMANN, U. 2009. Pharmakologie des cardiovaskulären Systems - die Blutgefäße - Behandlung von Hypertonie und Hypotonie. *In:* AKTORIES K., F. U., HOFMANN F., STARKE K. (ed.) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 10 ed. München Elsevier.

FROELING, F. E., MARSHALL, J. F. & KOCHER, H. M. 2010. Pancreatic cancer organotypic cultures. *J Biotechnol,* 148**,** 16-23.

GARCIA-DORADO, D., RODRIGUEZ-SINOVAS, A. & RUIZ-MEANA, M. 2004. Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res,* 61**,** 386-401.

GAUTEL, M. 2011. The sarcomeric cytoskeleton: who picks up the strain? *Curr Opin Cell Biol,* 23**,** 39-46.

GEIGER, B., VOLK, T. & VOLBERG, T. 1985. Molecular heterogeneity of adherens junctions. *J Cell Biol,* 101**,** 1523-31.

GONCHAROVA, E. J., KAM, Z. & GEIGER, B. 1992. The involvement of adherens junction components in myofibrillogenesis in cultured cardiac myocytes. *Development,* 114**,** 173-83.

GORE, A., LI, Z., FUNG, H. L., YOUNG, J. E., AGARWAL, S., ANTOSIEWICZ-BOURGET, J., CANTO, I., GIORGETTI, A., ISRAEL, M. A., KISKINIS, E., LEE, J. H., LOH, Y. H., MANOS, P. D., MONTSERRAT, N., PANOPOULOS, A. D., RUIZ, S., WILBERT, M. L., YU, J., KIRKNESS, E. F., IZPISUA BELMONTE, J. C., ROSSI, D. J., THOMSON, J. A., EGGAN, K., DALEY, G. Q., GOLDSTEIN, L. S. & ZHANG, K. 2011. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature,* 471**,** 63-7.

GOSDEN, R. 2011. Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation. *Fertility and Sterility,* in press.

GRAHAM, L. A., LIOU, Y. C., WALKER, V. K. & DAVIES, P. L. 1997. Hyperactive antifreeze protein from beetles. *Nature,* 388**,** 727-8.

GREEN, D. R., GALLUZZI, L. & KROEMER, G. 2011. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science,* 333**,** 1109-12.

GRIFFITH, M., ALA, P., YANG, D. S., HON, W. C. & MOFFATT, B. A. 1992. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiol,* 100**,** 593-6.

HALBACH, M., PILLEKAMP, F., BROCKMEIER, K., HESCHELER, J., MULLER-EHMSEN, J. & REPPEL, M. 2006. Ventricular slices of adult mouse hearts--a new multicellular in vitro model for electrophysiological studies. *Cell Physiol Biochem,* 18**,** 1-8.

HEATH, J. K. & SMITH, A. G. 1988. Regulatory factors of embryonic stem cells. *J Cell Sci Suppl,* 10**,** 257-66.

HEBISCH, S., BISCHOFF, E. & SOBOLL, S. 1993. Influence of 2,3-butanedione monoxime on heart energy metabolism. *Basic Res Cardiol,* 88**,** 566-75.

HERVE, J. C. & DERANGEON, M. 2012. Gap-junction-mediated cell-to-cell communication. *Cell Tissue Res*.

HESKETH, G. G., SHAH, M. H., HALPERIN, V. L., COOKE, C. A., AKAR, F. G., YEN, T. E., KASS, D. A., MACHAMER, C. E., VAN EYK, J. E. & TOMASELLI, G. F. 2010. Ultrastructure and regulation of lateralized connexin43 in the failing heart. *Circ Res,* 106**,** 1153-63.

HICK, C. & HICK, A. 2009. Herz. *In:* HICK, C. & HICK, A. (eds.) *Intensivkurs Physiologie.* 6 ed. München: Elsevier.

HUBEL, A. 1997. Parameters of cell freezing: implications for the cryopreservation of stem cells. *Transfus Med Rev,* 11**,** 224-33.

HUNT, C. J., TAYLOR, M. J. & PEGG, D. E. 1982. Freeze-substitution and isothermal freeze-fixation studies to elucidate the pattern of ice formation in smooth muscle at 252 K (-21 degrees C). *J Microsc,* 125**,** 177-86.

HUSSEIN, S. M., BATADA, N. N., VUORISTO, S., CHING, R. W., AUTIO, R., NARVA, E., NG, S., SOUROUR, M., HAMALAINEN, R., OLSSON, C., LUNDIN, K., MIKKOLA, M., TROKOVIC, R., PEITZ, M., BRUSTLE, O., BAZETT-JONES, D. P., ALITALO, K., LAHESMAA, R., NAGY, A. & OTONKOSKI, T. 2011. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature,* 471**,** 58-62.

HWANG, K. & LAMB, D. J. 2010. New advances on the expansion and storage of human spermatogonial stem cells. *Curr Opin Urol,* 20**,** 510-4.

IAIZZO, P. A. 2005. *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices,* Totowa, NJ, Humana Press Inc.

JENDRACH, M., MAI, S., POHL, S., VOTH, M. & BEREITER-HAHN, J. 2008. Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion,* 8**,** 293-304.

JOROV, A., ZHOROV, B. S. & YANG, D. S. 2004. Theoretical study of interaction of winter flounder antifreeze protein with ice. *Protein Sci,* 13**,** 1524-37.

KOSTIN, S., HEIN, S., ARNON, E., SCHOLZ, D. & SCHAPER, J. 2000. The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. *Heart Fail Rev,* 5**,** 271-80.

KRUMDIECK, C. L., DOS SANTOS, J. E. & HO, K. J. 1980. A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Anal Biochem,* 104**,** 118-23.

LAIRD, D. W., PURANAM, K. L. & REVEL, J. P. 1991. Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem J,* 273(Pt 1)**,** 67-72.

LAMPE, P. D., COOPER, C. D., KING, T. J. & BURT, J. M. 2006. Analysis of Connexin43 phosphorylated at S325, S328 and S330 in normoxic and ischemic heart. *J Cell Sci,* 119**,** 3435-42.

LEBONVALLET, N., JEANMAIRE, C., DANOUX, L., SIBILLE, P., PAULY, G. & MISERY, L. 2010. The evolution and use of skin explants: potential and limitations for dermatological research. *Eur J Dermatol,* 20**,** 671-84.

LEE, M. C., CHEN, C. H., KUO, M. C., KANG, P. L., LO, A. & LIU, K. 2006. Isoflurane preconditioning-induced cardio-protection in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur J Anaesthesiol,* 23**,** 841-7.

LEICA BIOSYSTEMS. 2013. *Fully automated vibrating blade microtome Leica VT1200 S* [Online]. Available: http://www.leicabiosystems.com/products/sectioning/vibrating-blade-microtomes/details/product/leica-vt1200-s/gallery/ [Accessed].

LEMMER, B. & BRUNE, K. 2010. *Pharmakotherapie: Klinische Pharmakologie,* Heidelberg, Springer Medizin Verlag.

LEVY, D., LARSON, M. G., VASAN, R. S., KANNEL, W. B. & HO, K. K. 1996. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA,* 275**,** 1557-62.

LI, T., SPERELAKIS, N., TENEICK, R. E. & SOLARO, R. J. 1985. Effects of diacetyl monoxime on cardiac excitation-contraction coupling. *J Pharmacol Exp Ther,* 232**,** 688-95.

LISTER, R., PELIZZOLA, M., KIDA, Y. S., HAWKINS, R. D., NERY, J. R., HON, G., ANTOSIEWICZ-BOURGET, J., O'MALLEY, R., CASTANON, R., KLUGMAN, S., DOWNES, M., YU, R., STEWART, R., REN, B., THOMSON, J. A., EVANS, R. M. & ECKER, J. R. 2011. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature,* 471**,** 68-73.

LOVELOCK, J. E. & BISHOP, M. W. 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature,* 183**,** 1394-5.

MAZUR, P. & SEKI, S. 2011. Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196 degrees C at 95 degrees to 70,000 degrees C/min and warmed at 610 degrees to 118,000 degrees C/min: A new paradigm for cryopreservation by vitrification. *Cryobiology,* 62**,** 1-7.

MERYMAN, H. T. 1956. Mechanics of freezing in living cells and tissues. *Science,* 124**,** 515-21.

MERYMAN, H. T. 2007. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion,* 47**,** 935-45.

MERYMAN, H. T., WILLIAMS, R. J. & DOUGLAS, M. S. 1977. Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology,* 14**,** 287-302.

MEYER, T., STUERZ, K., GUENTHER, E., EDAMURA, M. & KRAUSHAAR, U. 2010. Cardiac slices as a predictive tool for arrhythmogenic potential of drugs and chemicals. *Expert Opin Drug Metab Toxicol,* 6**,** 1461-75.

MOLECULAR PROBES, I. 2009. LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kits. *In:* MOLECULAR PROBES, I. (ed.).

MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods,* 65**,** 55-63.

MUHLFELD, C., CETEGEN, C., FREESE, S., VOLKMANN, R., HELLIGE, G. & VETTERLEIN, F. 2010. Phosphorylation of extrajunctional Cx43 in ischemic-preconditioned rat hearts. *J Surg Res,* 162**,** e1-8.

MÜLLER-SCHWEINITZER, E. 1988. Cryopreservation of isolated blood vessels. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch,* 115**,** 405-9.

MÜLLER-SCHWEINITZER, E. 1992. Cryopreserved human tissue in pharmacological research. *Pharmacol Res,* 25**,** 103-11.

MÜLLER-SCHWEINITZER, E. 2009. Cryopreservation of vascular tissues. *Organogenesis,* 5**,** 97-104.

MUNOZ, J. J., CONTE, V. & MIODOWNIK, M. 2010. Stress-dependent morphogenesis: continuum mechanics and truss systems. *Biomech Model Mechanobiol,* 9**,** 451-67.

NICKOLEIT, J. 2008. *Herzrhythmusstörungen: EKG - Bilder Raten mit Jörn,* Norderstedt, Books on Demand.

ODA, H. & TAKEICHI, M. 2011. Evolution: structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. *J Cell Biol,* 193**,** 1137-46.

PADMALA, S. & DEMIR, S. S. 2003. Computational model of the ventricular action potential in adult spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Electrophysiol,* 14**,** 990-5.

PARRISH, A. R., GANDOLFI, A. J. & BRENDEL, K. 1995. Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci,* 57**,** 1887-901.

PAYNTER, S. J. 2008. Principles and practical issues for cryopreservation of nerve cells. *Brain Res Bull,* 75**,** 1-14.

PEARSON, O. H., HASTINGS, A. B. & BUNTING, H. 1949. Metabolism of cardiac muscle; utilization of C14 labeled pyruvate and acetate by rat heart slices. *Am J Physiol,* 158**,** 251-60.

PEGG, D. E. 2007. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol,* 368**,** 39-57.

PEGG, D. E., HUNT, C. J. & FONG, L. P. 1987. Osmotic properties of the rabbit corneal endothelium and their relevance to cryopreservation. *Cell Biophys,* 10**,** 169-89.

PHARMACEUTICALS, H. 2005. The Non-Clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals. Federal Register (FDA).

PIEPER, W. 2007. Krankheiten des Herzkreislaufsystems. *In:* PIEPER, W. (ed.) *Innere Medizin.* Heidelberg: Springer Medizin Verlag.

PILLEKAMP, F., HALBACH, M., REPPEL, M., RUBENCHYK, O., PFANNKUCHE, K., XI, J. Y., BLOCH, W., SREERAM, N., BROCKMEIER, K. & HESCHELER, J. 2007. Neonatal murine heart slices. A robust model to study ventricular isometric contractions. *Cell Physiol Biochem,* 20**,** 837-46.

PILLEKAMP, F., REPPEL, M., DINKELACKER, V., DUAN, Y., JAZMATI, N., BLOCH, W., BROCKMEIER, K., HESCHELER, J., FLEISCHMANN, B. K. & KOEHLING, R. 2005. Establishment and characterization of a mouse embryonic heart slice preparation. *Cell Physiol Biochem,* 16**,** 127-32.

PLATTNER, H. & HENTSCHEL, J. 2006. *Zellbiologie,* Stuttgart, New York, Thieme Verlag.

POLGE, C., SMITH, A. U. & PARKES, A. S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature,* 164**,** 666.

RANU, H. K., TERRACCIANO, C. M., DAVIA, K., BERNOBICH, E., CHAUDHRI, B., ROBINSON, S. E., BIN KANG, Z., HAJJAR, R. J., MACLEOD, K. T. & HARDING, S. E. 2002. Effects of Na(+)/Ca(2+)-exchanger overexpression on excitation-contraction coupling in adult rabbit ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol,* 34**,** 389-400.

REERS, M., SMITH, T. W. & CHEN, L. B. 1991. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry,* 30**,** 4480-6.

REGAND, A. & GOFF, H. D. 2006. Ice recrystallization inhibition in ice cream as affected by ice structuring proteins from winter wheat grass. *J Dairy Sci,* 89**,** 49-57.

RUBINSKY, B., ARAV, A., HONG, J. S. & LEE, C. Y. 1994. Freezing of mammalian livers with glycerol and antifreeze proteins. *Biochem Biophys Res Commun,* 200**,** 732-41.

SARKAR, A. 2009. *Embryonic Stem Cells,* Delhi, Discovery.

SCHAEFFER, P. J., DESANTIAGO, J., YANG, J., FLAGG, T. P., KOVACS, A., WEINHEIMER, C. J., COURTOIS, M., LEONE, T. C., NICHOLS, C. G., BERS, D. M. & KELLY, D. P. 2009. Impaired contractile function and calcium handling in hearts of cardiac-specific calcineurin b1-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* 297**,** H1263-73.

SCHAPER, J., FROEDE, R., HEIN, S., BUCK, A., HASHIZUME, H., SPEISER, B., FRIEDL, A. & BLEESE, N. 1991. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation,* 83**,** 504-14.

SCHAUB, M. C., HEFTI, M. A., ZUELLIG, R. A. & MORANO, I. 1998. Modulation of contractility in human cardiac hypertrophy by myosin essential light chain isoforms. *Cardiovasc Res,* 37**,** 381-404.

SCHLÜTER, K. D., SCHWARTZ, P., SIEGMUND, B. & PIPER, H. M. 1991. Prevention of the oxygen paradox in hypoxic-reoxygenated hearts. *Am J Physiol,* 261**,** H416-23.

SCHMIDT, P. J. 2006. Basile J. Luyet and the beginnings of transfusion cryobiology. *Transfus Med Rev,* 20**,** 242-6.

SCHMITZ, S. 2009. *Der Experimentator: Zellkultur,* Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

SCHRADER, J., GÖDECKE, A. & KELM, M. 2010. Das Herz - Herzaktionspotential. *In:* KLINKE, R., PAPE, H. C., KURTZ, A. & SILBERNAGEL, S. (eds.) *Physiologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

SCHRADER, J. & KELM, M. 2005. Das Herz - Herzaktionspotential. *In:* KLINKE, R., PAPE, H. C. & SILBERNAGEL, S. (eds.) *Physiologie.* 5 ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

SEVERS, N. J. 1990. The cardiac gap junction and intercalated disc. *Int J Cardiol,* 26**,** 137-73.

SEVERS, N. J., BRUCE, A. F., DUPONT, E. & ROTHERY, S. 2008. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res,* 80**,** 9-19.

SEVERS, N. J., COPPEN, S. R., DUPONT, E., YEH, H. I., KO, Y. S. & MATSUSHITA, T. 2004. Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovasc Res,* 62**,** 368-77.

SEVERS, N. J., DUPONT, E., THOMAS, N., KABA, R., ROTHERY, S., JAIN, R., SHARPEY, K. & FRY, C. H. 2006. Alterations in cardiac connexin expression in cardiomyopathies. *Adv Cardiol,* 42**,** 228-42.

SMILEY, S. T., REERS, M., MOTTOLA-HARTSHORN, C., LIN, M., CHEN, A., SMITH, T. W., STEELE, G. D., JR. & CHEN, L. B. 1991. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 88**,** 3671-5.

SMITH, A. G. & HOOPER, M. L. 1987. Buffalo Rat Liver Cells Produce a Diffusible Activity Which Inhibits the Differentiation of Murine Embryonal Carcinoma and Embryonic Stem Cells. *Developmental Biology,* 121**,** 1-9.

SMITH, J. H., GREEN, C. R., PETERS, N. S., ROTHERY, S. & SEVERS, N. J. 1991. Altered patterns of gap junction distribution in ischemic heart disease. An immunohistochemical study of human myocardium using laser scanning confocal microscopy. *Am J Pathol,* 139**,** 801-21.

SOLER, A. P. & KNUDSEN, K. A. 1994. N-cadherin involvement in cardiac myocyte interaction and myofibrillogenesis. *Dev Biol,* 162**,** 9-17.

STOPPINI, L., BUCHS, P. A. & MULLER, D. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods,* 37**,** 173-82.

SUGI, H., MINODA, H., INAYOSHI, Y., YUMOTO, F., MIYAKAWA, T., MIYAUCHI, Y., TANOKURA, M., AKIMOTO, T., KOBAYASHI, T., CHAEN, S. & SUGIURA, S. 2008. Direct demonstration of the cross-bridge recovery stroke in muscle thick filaments in aqueous solution by using the hydration chamber. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 105**,** 17396-401.

SYSTEMS, M. C. 2011. MEA Amplifier with Blanking Circuit for Inverse Microscopes. *In:* SYSTEMS, M. C. (ed.). Reutlingen: Multi Channel Systems.

TAKAHASHI, K., TANABE, K., OHNUKI, M., NARITA, M., ICHISAKA, T., TOMODA, K. & YAMANAKA, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell,* 131**,** 861-72.

TAKAHASHI, K. & YAMANAKA, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell,* 126**,** 663-76.

TAKAKI, M., KOHZUKI, H., KAWATANI, Y., YOSHIDA, A., ISHIDATE, H. & SUGA, H. 1998. Sarcoplasmic reticulum Ca2+ pump blockade decreases O2 use of unloaded contracting rat heart slices: thapsigargin and cyclopiazonic acid. *J Mol Cell Cardiol,* 30**,** 649-59.

TAN, B. H., PUNDI, K. N., VAN NORSTRAND, D. W., VALDIVIA, C. R., TESTER, D. J., MEDEIROS-DOMINGO, A., MAKIELSKI, J. C. & ACKERMAN, M. J. 2010. Sudden infant death syndrome-associated mutations in the sodium channel beta subunits. *Heart Rhythm,* 7**,** 771-8.

TAYLOR, M. J. & PEGG, D. E. 1983. The effect of ice formation on the function of smooth muscle tissue stored at -21 or -60 degrees C. *Cryobiology,* 20**,** 36-40.

TERMAN, A. & BRUNK, U. T. 2004. Myocyte aging and mitochondrial turnover. *Exp Gerontol,* 39**,** 701-5.

TERMAN, A., DALEN, H., EATON, J. W., NEUZIL, J. & BRUNK, U. T. 2003. Mitochondrial recycling and aging of cardiac myocytes: the role of autophagocytosis. *Exp Gerontol,* 38**,** 863-76.

THOMSON, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S. S., WAKNITZ, M. A., SWIERGIEL, J. J., MARSHALL, V. S. & JONES, J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science,* 282**,** 1145-7.

TRITAPEPE, L., LANDONI, G., GUARRACINO, F., POMPEI, F., CRIVELLARI, M., MASELLI, D., DE LUCA, M., FOCHI, O., D'AVOLIO, S., BIGNAMI, E., CALABRO, M. G. & ZANGRILLO, A. 2007. Cardiac protection by volatile anaesthetics: a multicentre randomized controlled study in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Eur J Anaesthesiol,* 24**,** 323-31.

TURNER, N. A. 2011. Therapeutic regulation of cardiac fibroblast function: targeting stress-activated protein kinase pathways. *Future Cardiol,* 7**,** 673-91.

VERHEULE, S., VAN KEMPEN, M. J., TE WELSCHER, P. H., KWAK, B. R. & JONGSMA, H. J. 1997. Characterization of gap junction channels in adult rabbit atrial and ventricular myocardium. *Circ Res,* 80**,** 673-81.

VIERO, C., KRAUSHAAR, U., RUPPENTHAL, S., KAESTNER, L. & LIPP, P. 2008. A primary culture system for sustained expression of a calcium sensor in preserved adult rat ventricular myocytes. *Cell Calcium,* 43**,** 59-71.

WATT, F. M. & DRISKELL, R. R. 2010. The therapeutic potential of stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,* 365**,** 155-63.

WEIL, J. & SCHUNKERT, H. 2006. Pathophysiology of chronic heart failure. *Clin Res Cardiol,* 95 Suppl 4**,** 1-15; quiz 16-7.

WENZEL, F., DITTRICH, M., HESCHELER, J. & GROTE, J. 2002. Hypoxia influences generation and propagation of electrical activity in embryonic cardiomyocyte clusters. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol,* 132**,** 111-5.

WENZEL, J. 2011. *Humane Herzschnitte als elektrophysiologisches Langzeitmodel.* Universität Lübeck.

WHO. 2008. *Causes of death in 2008* [Online]. Available: www.who.int/gho/mortalitiy_burden_disease/causes_death_2008/en/index.html [Accessed].

WOBUS, A. M. & BOHELER, K. R. 2005. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev,* 85**,** 635-78.

WOBUS, A. M., HUCHO, F., DAELE VAN DEN, W., KÖCHY, K., REICH, J., RHEINBERGER, H. J., MÜLLER-RÖBER, B., SPERLING, K., BOYSEN, M., KÖLSCH, M., HAUSKELLER, C. & TAUPITZ, J. 2006. Stammzellforschung und Zelltherapie - Stand des Wissens und der Rahmenbedingungen in Deutschland ; Supplement zum Gentechnologiebericht. Spektrum-Akademischer Vlg.

WOBUS, A. M., ROHWEDEL, J., MALTSEV, V. & HESCHELER, J. 1995. Development of Cardiomyocytes Expressing Cardiac-Specific Genes, Action Potentials, and Ionic Channels during Embryonic Stem Cell-Derived Cardiogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences,* 752**,** 460-469.

WOBUS, A. M., WALLUKAT, G. & HESCHELER, J. 1991. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca2+ channel blockers. *Differentiation,* 48**,** 173-82.

YASUHARA, S., TAKAKI, M., KIKUTA, A., ITO, H. & SUGA, H. 1996. Myocardial VO2 of mechanically unloaded contraction of rat ventricular slices measured by a new approach. *Am J Physiol,* 270**,** H1063-70.

YOUSSRY, M., OZMEN, B., ZOHNI, K., DIEDRICH, K. & AL-HASANI, S. 2008. Current aspects of blastocyst cryopreservation. *Reprod Biomed Online,* 16**,** 311-20.

ZAUGG, M., LUCCHINETTI, E., GARCIA, C., PASCH, T., SPAHN, D. R. & SCHAUB, M. C. 2003. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part II. Clinical implications. *Br J Anaesth,* 91**,** 566-76.

ZAUGG, M., LUCCHINETTI, E., SPAHN, D. R., PASCH, T., GARCIA, C. & SCHAUB, M. C. 2002. Differential effects of anesthetics on mitochondrial K(ATP) channel activity and cardiomyocyte protection. *Anesthesiology,* 97**,** 15-23.

ZHAO, J., ARAKI, N. & NISHIMOTO, S. K. 1995. Quantitation of matrix Gla protein mRNA by competitive polymerase chain reaction using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an internal control. *Gene,* 155**,** 159-165.

ZHMAKIN, A. I. 2009. *Fundamentals of Cryobiology - Physical Phenomena and Mathematical Models,* Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag.

ZWADLO, C. & BORLAK, J. 2005. Disease-associated changes in the expression of ion channels, ion receptors, ion exchangers and Ca(2+)-handling proteins in heart hypertrophy. *Toxicol Appl Pharmacol,* 207**,** 244-56.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1| Blutfluss im Herzen. 5
Abbildung 2| Erregungsleitung im Herzen. 7
Abbildung 3| Ionenströme während des Aktionspotenzials. 8
Abbildung 4| Elektromechanische Kopplung in der Muskelzelle. 9
Abbildung 5| Aufbau eines Sarkomers. 10
Abbildung 6| Schematische Darstellung des Querbrückenzyklus. 11
Abbildung 7| Testphasen der Medikamentenentwicklung. 16
Abbildung 8| Gewinnung von embryonalen Stammzellen. 18
Abbildung 9| Aufbau eines Mikroelektroden Arrays (MEA). 23
Abbildung 10| Schematische Darstellung der Vibrationsüberprüfung. 39
Abbildung 11| Schneiden von organotypischen Schnitten mittels des Vibratom *Microtom VT1200 S*. 40
Abbildung 12| Erstellung von organotypischen Streifen. 41
Abbildung 13| Air- Lift- Kultur der organotypischen Gewebeschnitte. 42
Abbildung 14| Grant Asymptote. 45
Abbildung 15| Strukturformel von JC-1 in nicht aggregiertem Zustand. 50
Abbildung 16| Strukturformel der Reduktion von MTT zu Formazan. 51
Abbildung 17| AmpliGrid- Objektträger. 56
Abbildung 18| Schematische Darstellung des qRT-PCR Programms. 57
Abbildung 19| Mikroelektroden-Array (MEA). 60
Abbildung 20| Rattenherzschnitte und humane Herzschnitte in Kultur. 62
Abbildung 21| Far Red/ SYTO 9- Färbung. 64
Abbildung 22| Tetrazoliumumsatz der Schnitte aus Rattenherz. 66
Abbildung 23| Tetrazoliumumsatz der Streifen aus Rattenherzschnitten. 67
Abbildung 24| Tetrazoliumumsatz der Schnitte aus humanem Herz. 68
Abbildung 25| Tetrazoliumumsatz der Streifen aus humanen Herzschnitten. 69
Abbildung 26| Untersuchung der mitochondrialen Membran an Rattenherzschnitten mittels JC-1. 71
Abbildung 27| Untersuchung der mitochondrialen Membran an Rattenherzstreifen mittels JC1. 72
Abbildung 28| Aktivität der mitochondrialen Membran in humanen Herzschnitten. 74
Abbildung 29| Aktivität der mitochondrialen Membran an humanen Herzstreifen. 75
Abbildung 30| HE-Färbung der Gesamtherzschnitte aus Rattengewebe und humanem Gewebe. 77

Abbildung 31| HE-Färbung der unbehandelten sowie kryokonservierten Rattenherzschnitte. 78
Abbildung 32| HE-Färbung an humanen Herzschnitten. 79
Abbildung 33| HE-Färbung der Rattenherzstreifen. 81
Abbildung 34| HE-Färbung an humanen Herzstreifen. 82
Abbildung 35| Alpha-Aktinin-Färbung der Schnitte aus Rattenherzgewebe. 84
Abbildung 36| Alpha-Aktinin-Färbung der Rattenherzstreifen. 85
Abbildung 37| Alpha-Aktinin-Färbung der humanen Herzschnitte. 86
Abbildung 38| Alpha-Aktinin-Färbung der humanen Streifen. 87
Abbildung 39| Myosin-Färbung der Schnitte aus Rattenherzgewebe. 89
Abbildung 40| Myosin-Färbung der Rattenherzstreifen. 90
Abbildung 41| Myosin-Färbung der humanen Schnitte. 91
Abbildung 42| Myosin-Färbung der humanen Streifen. 92
Abbildung 43| N-Cadherin-Färbung der Rattenherzschnitte. 94
Abbildung 44| N-Cadherin-Färbung der Streifen aus Rattenherzgewebe. 95
Abbildung 45| N-Cadherin-Färbung der humanen Schnitte. 96
Abbildung 46| N-Cadherin-Färbung der humanen Streifen. 97
Abbildung 47| Connexin 43-Färbung der Schnitte aus Rattenherzgewebe. 98
Abbildung 48| Connexin 43-Färbung der Rattenherzstreifen. 99
Abbildung 49| Connexin 43-Färbung der humanen Schnitte. 100
Abbildung 50| Connexin 43-Färbung der humanen Streifen. 101
Abbildung 51| TEM-Aufnahmen der Rattenherzschnitte. 103
Abbildung 52| TEM-Aufnahmen der Rattenherzstreifen. 105
Abbildung 53| Relative Genexpressionslevel der mRNA-Expression unbehandelter Rattenherzschnitte und -streifen. 107
Abbildung 54| Relatives Genexpressionslevel der mRNA-Expression in EM kryokonservierten Schnitten und Streifen des Rattenherzens. 108
Abbildung 55| Relatives Genexpressionslevel auf mRNA-Ebene der in EM + BDM kryokonservierten Gewebeproben aus dem Rattenherz. 109
Abbildung 56| Relatives Genexpressionslevel auf mRNA-Ebene der unbehandelten Proben aus humanen Gewebe. 111
Abbildung 57| Relatives Genexpressionslevel auf mRNA-Ebene der in EM kryokonservierten humanen Herzgewebeproben. 112
Abbildung 58| Relatives Genexpressionslevel der in EM + BDM eingefrorenen humanen Herzschnitte und –streifen. 113

Abbildung 59| Expression herzspezifischer Marker für Zellkommunikation und Ionenkanäle. 114
Abbildung 60| Expression herzspezifischer Marker für Zellkommunikation und Ionenkanäle. 115
Abbildung 61| Übersichtsdarstellung der Feldpotenziale eines Rattenherzgewebeschnittes auf dem MEA. 116
Abbildung 62| Feldpotenzial eines Rattenherzgewebeschnittes. 117
Abbildung 63| Ableitung eines Streifens aus Rattenherzgewebe. 118
Abbildung 64| JC-1-Färbung an pankreatischen Rattenzellen. 156

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1| Verwendete Primer.....36
Tabelle 2| getestete Kryomedien 43
Tabelle 3| Programmablauf während der Fixierung von Gewebe für die spätere Paraffineinbettung.....46
Tabelle 4| Ablaufprotokoll der HE- Färbung an Paraffinschnitten 47
Tabelle 5| Primär und Sekundär Antikörper für die immunzytochemische Untersuchung. 48
Tabelle 6| Mastermix (MM) für die Generierung von cDNA aus RNA. 55
Tabelle 7| Volumenangaben für den Reaktionsmix der cDNA- Synthese in der SingleCell PCR. 57
Tabelle 8| Volumenangaben der eingesetzten Komponenten für die Mastermixe der qRT-PCR. 58
Tabelle 9| Volumenangabe der eingesetzten Komponenten des Reaktionsmix für die qRT-PCR. 58

7.3 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BDM	2,3-Butanedione monoxime
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	*complementary DNA*
Cx43	Connexin 43
Cy3	Cyanin 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DMEM	*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EM	Einfriermedium
FITC	Fluorescin-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FP	Feldaktionspotential
FR	Far Red
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
ITS	Insulin- Transferrin- Selenium
JC- 1	5,5',6,6'-tetrachloro- 1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarbocyanin Iodid
LSM	Laser- Scanning- Mikroskop
MEA	Microelektrodenarray
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Myo	Myosin
N- Cad	N- Cadherin
NGS	Normal goat serum
NTC	Non template control
NTC	Non template control
OD	optische Dichte
PBS	*Phosphate buffered Saline*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PTFE	Polytetrafluorethylen

qPCR	quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
rG	Relatives Genexpressionslevel
RMP	Ruhemembranpotenzial
RT	Reverse Transkriptase
U	Unit
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig Holstein
α- act	α- actinin

7.4 JC-1 Vorversuche mit pankreatischen Rattenzellen

Um die Funktionalität des Farbstoffes sicher zu stellen wurde er vorab an Rattenzellen aus dem Pankreas angewandt. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass der Farbstoff so arbeitet wie unter 3.2.6.2 beschrieben.

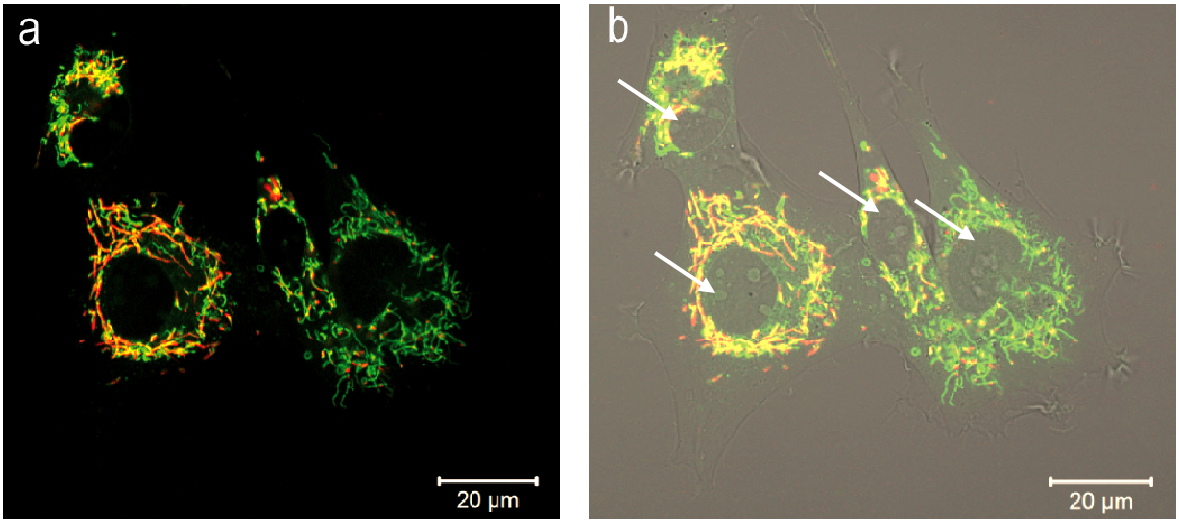

Abbildung 64| JC-1-Färbung an pankreatischen Rattenzellen. Die Färbung zeigt die hyperpolarisierten Mitochondrien in rot und die depolarisierten in grün (a). Es ist deutlich zu erkennen, dass die linke Zelle zur Zeit der Messung aktiviere Mitochondrien hat als die Zelle in der rechten Bildhälfte. Mittels der Durchlichtaufnahme (b) kann die Lage der Mitochondrien in der Zelle sichtbar gemacht werden. In den Ausläufern der Zelle sind im Gegensatz zur Kernregion kaum Mitochondrien zu erkennen. Die Kerne der Zellen sind durch Pfeile markiert.

Die aktiven, also hyperpolarisierten Mitochondrien waren deutlich als rote Streifen (Abbildung 64 a) zu erkennen. Die zum Zeitpunkt der Färbung depolarisierten Mitochondrien zeigten eine grüne Fluoreszenz (Abbildung 64 a). Mittels der Durchlichtaufnahme (Abbildung 64 b) konnte die Lage der Mitochondrien hauptsächlich um den Kern der Zellen ausgemacht werden. In den Ausläufern der Zellen hingegen wurden fast gar keine Mitochondrien gefunden.

7.5 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.

Hundsmühlen, den 23.05.2014

7.6 Danksagungen

Prof. Dr. Charli Kruse möchte ich für die Überlassung des hochinteressanten Themas in dem BMBF-Projekt und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an der Fraunhofer EMB herzlich danken. Danke für die Unterstützung meiner Vorhaben und die wertvollen Anregungen sowie für die Freiheit eigene Entscheidungen treffen zu können.

Ich danke Dr. Daniel Rapoport für die hervorragende Betreuung und die Hilfestellungen bei der Erstellung der Arbeit. Jederzeit gewährte er mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung.

Danken möchte ich auch allen Kollegen der EMB. Insbesondere den „Techis“ für die tolle Zusammenarbeit und den freundlichen Umgang miteinander. Besonderer Dank geht an Carolin Wiencke für die Aufnahmen am LSM und die Herstellung der Herzschnitte am Vibratom und an PD Dr. Matthias Klinger und Jutta Endler für die TEM-Aufnahmen.

Ein großer Dank gilt auch Frau Frackowski aus dem Institut für Physiologie an der Universität zu Lübeck für die Überlassung der Rattenherzen.

Dr. Matthias Brandenburger und Dr. Jan Wenzel möchte ich für die Bereitstellung des humanen Herzmaterials sowie die Hilfe bei den elektrophysiologischen Messungen und für die anregenden Gespräche danken.

Dr. Anna E. Matthießen, Dr. Sebastian Rakers und Miriam Voigt danke ich für die kritischen Anmerkungen sowie die detaillierte Durchsicht des ersten Entwurfes meiner Arbeit. Auch bedanke ich mich bei Rita Kuhn und Hildegard Beck für ihre Hilfsbereitschaft bei der Korrektur meiner Arbeit.

Mein persönlicher Dank gebührt „Room No. 5 and Friends“ für eine tolle Zeit sowie die Unterstützung und Motivation während meiner Zeit an der Fraunhofer EMB.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Bruder, die immer für mich da sind, die während des Studiums und der Doktorarbeit stets an mich geglaubt und mich unterstützt haben; und ganz besonders an Tammo, für seinen unermüdlichen Rückhalt und seine umfassende Liebe. Danke!

8. Sonstiges

8.1 Lebenslauf

8.2 Wissenschaftliche Publikationen

Artikel *peer-reviewed*:

"**Langner, S**., Rakers, S., Ciba, P., Petschnik, A. E., Rapoport, D. H., Kruse, C.: "New cell line from adipopancreatic tissue of Atlantic herring Clupea harengus." *Aquatic Biology*, Vol. 11: 271–278, **2011**, doi: 10.3354/ab00317 2011

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,* Vol. 27 (1): 01-12, **2011, doi:** 10.1159/000325212 000325212

weitere Artikel:

Langner S, Petschnik AE. Etablierung einer (Stamm)-Zellbibliothek wilder Tierarten – Von der Zellisolation bis zur Kryokonservierung. *BIOforum* 1/**2009**, S. 26–27

Langner, S., Petschnik, A.E., Maass, A., Kajahn, J., Rapoport, D.H., Kruse, C. „A co-culture model improves differentiation of glandular stem cells into cardiomyocytes", *Regenerative Medizin* 2008 Heft 1/2, 100-101

Langner, S., Rapoport, D. H., Nguemo, F., Reppel, M., Hescheler, J., Kruse, C. "Cryopreserved Heart Slices: an Innovative Approach for Cardiovascular Test Systems", *Regenerative Medicine* 2009 Nov 4 (6), S215, Supple. 2

Posterpräsentationen:

Langner S, Petschnik AE, Maass A, Kajahn J, Rapoport DH. A Co-Culture Model improves Differentiation of Glandular Stem Cells into Cardiomyocytes. *Fraunhofer Life Science Symposium,* 24.10 - 25.10.2008, Leipzig

Langner, S., Rapoport, D. H., Nguemo, F., Reppel, M., Hescheler, J., Kruse, C. “Cryopreserved Heart Slices: an Innovative Approach for Cardiovascular Test Systems”. *World conference on regenerative Medcine*, 29.10 - 31.10.2009, Leipzig

Langner, S., Rapoport, D. H., Kruse, C. “Influence of cryopreservation on intercellular integrity in heart slices”. *Stem Cells*, 19.11 - 22.11.2009, Antigua

Langner, S., Rapoport, D. H., Kruse, C. “Challenges of cryopreservation of heart slices for organotypical test systems”. *Birth, Life and Death of the Cardiac Myocyte Conference,* 02.06 - 04.06.2010, Napa Valley, United States of America

Langner, S., Rapoport, D. H., Kruse, C. ”Cryopreservation of heart tissue for organotypical test systems”. *Cellular Therapy Summit*, 24.08. – 25.08.2010, Edinburgh, United Kingdom

Vorträge

Human heart Models. BMBF-Konsortialtreffen 2008, 09.09 – 10.09.2008 Tübingen

Human heart Models. BMBF-Konsortialtreffen 2009, 12.02.2009 Lübeck

Human heart Models. BMBF-Konsortialtreffen 2009, 28.09.2009 Lübeck

Human heart Models. BMBF-Konsortialtreffen 2010, 25.03. - 26.03.2010 Saarbrücken