

Entwicklung eines autokontraktilen Herzmuskelmodells zur funktionalen Medikamenten- und Toxinforschung

Dissertation

zur Erlangung der akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

Matthias Goßmann

geboren in Lindlar

Institut für Anorganische Chemie
der
Universität Duisburg-Essen

2015

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer kooperativen Promotion zwischen der Universität Duisburg-Essen und der Fachhochschule Aachen im Zeitraum von Juni 2012 bis Januar 2015 durchgeführt. Die kooperativen Partner waren an der Universität Duisburg Essen der Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Epple am Institut für Anorganische Chemie sowie an der Fachhochschule Aachen das Labor für Molekulare und Medizinische Biologie von Frau Prof. Dr. Dr. Artmann am Institut für Bioengineering. Teile der experimentellen Arbeiten wurden in den Labors der Axiogenesis AG in Köln durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. M. Epple
Prof. Dr. Dr. A. (Temiz) Artmann

Vorsitzender: Prof. Dr. E. Hasselbrink

Tag der Disputation: 26.10.2015

*Für Sonja, Mathilda und unsere
gemeinsame Zukunft*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Gesellschaftliche Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen.....	1
1.2 Legislative Rahmenbedingungen.....	1
1.3 Motivation.....	2
2 Grundlagen	4
2.1 Das Herz.....	4
2.1.1 Zellulärstruktur kontraktiler Kardiomyozyten.....	5
2.1.2 Kardiales Aktionspotential.....	7
2.1.3 Myokardiale Kontraktion.....	10
2.2 Kraft und Spannung.....	11
2.3 Stand der Technik.....	13
2.3.1 Kraftmessung.....	13
2.3.2 Optische Calcium-Assays.....	16
2.3.3 Impedanz-Messung.....	18
2.4 Die CellDrum-Technologie.....	19
2.4.1 PDMS als Zellkulturmaterial.....	21
2.4.2 Funktionalisierung von PDMS-Oberflächen.....	23
2.5 Induzierte pluripotente Stammzellen.....	26
3 Material und Methoden	29
3.1 Zellkultur.....	29
3.1.1 Vorkultur der verschiedenen Zelltypen.....	29
3.1.2 Dissoziation.....	30
3.1.3 Kryokonservierung.....	30
3.2 CellDrum-Herstellung.....	30
3.3 CellDrum-Funktionalisierung.....	33
3.4 Charakterisierung der Funktionalisierung.....	34
3.4.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX).....	34
3.4.2 UV/Vis-Spektroskopie.....	36
3.4.3 Infrarot-Spektroskopie.....	40
3.5 Messdatenerfassung mittels Tissue-Tension-Analyzer.....	40
3.5.1 Lasertriangulation.....	42

3.5.2 Druckmessung.....	43
3.5.3 LabView-Software.....	43
3.6 Durchführung der Messungen.....	46
3.6.1 Mechanische Charakterisierung ohne Zellen.....	46
3.6.2 Kultur und pharmakologische Untersuchungen an hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten und Ko-Kulturen.....	46
3.7 Messdatenauswertung.....	49
3.7.1 Glättung durch gleitenden Mittelwert.....	50
3.7.2 Korrektur des Messsignals um den hydrostatischen Druck.....	52
3.7.3 Berechnung der Spannung σ	52
3.7.4 Detektion der Kontraktions-Maxima.....	54
3.7.5 Vereinigen der Einzelpeaks.....	55
3.7.6 Parameteranalyse.....	57
3.8 Statistische Methoden.....	57
3.8.1 Wilcoxon Rangsummen-Test.....	57
4 Ergebnisse und Diskussion.....	59
4.1 Bestimmung der Dicke der CellDrum-Membranen.....	59
4.2 Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der CellDrum-Membranen.....	60
4.2.1 Spannungs-Dehnungs-Kurven.....	60
4.2.2 Effekt der Funktionalisierung auf die mechanischen Eigenschaften.....	61
4.3 Charakterisierung der Funktionalisierung.....	63
4.3.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	63
4.3.2 Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX).....	65
4.3.3 Infrarot-Spektroskopie.....	67
4.4 Messdatenerfassung und -auswertung.....	68
4.4.1 Gleitender Mittelwert.....	68
4.4.2 Erosionsverfahren zur Bestimmung der optimalen Glättung.....	69
4.4.3 Detektion der Kontraktions-Maxima.....	71
4.5 Biologische Charakterisierung.....	72
4.5.1 Vergleich der Bioverfügbarkeit mit/ohne Funktionalisierung.....	72
4.5.2 Adhäsionskinetik von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten.....	75
4.6 Gewebefähigkeitsvermögen von Ko-Kulturen mit kardialen Fibroblasten.....	81
4.7 Histologische Untersuchung.....	84

4.8 Vergleich der gemessenen kontraktiven Eigenschaften von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten mit Literaturdaten.....	86
4.9 Pharmakologische Validierung.....	88
4.9.1 Kontrollmessungen.....	88
4.9.2 Untersuchungen an Monokulturen von Kardiomyozyten.....	91
4.9.3 Untersuchungen an Ko-Kulturen von Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten.....	98
4.10 Einordnung der pharmakologischen Ergebnisse.....	106
4.11 Ausblick.....	108
5 Zusammenfassung / Summary.....	110
6 Literaturverzeichnis.....	113
7 Anhang.....	126
7.1 Quellcodes.....	126
7.1.1 Schichtdickenbestimmung.....	126
7.1.2 Erosionsverfahren.....	130
7.1.3 Peak-Analyse.....	131
7.2 Abkürzungsverzeichnis.....	148
7.3 Chemikalienverzeichnis.....	149
7.4 Verzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen.....	150
7.5 Lebenslauf.....	153
7.6 Eidesstattliche Erklärung.....	154
7.7 Danksagung.....	155

1 Einleitung

1.1 Gesellschaftliche Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems sind noch vor Krebsleiden die häufigste Todesursache in Deutschland.¹ Obwohl die Mortalität durch die kontinuierliche Verbesserung der notfallmedizinischen Versorgung stetig sinkt,² führen Spätfolgen zum Verlust der Lebensqualität und hohen Folgekosten für das Gesundheitswesen. Eine der Spätfolgen ist die links-ventrikuläre Herzinsuffizienz, die durch Medikamente mit Kraft-steigernder (positiv-inotroper) Wirkung behandelt werden kann. Durch die medikamentöse Behandlung wird die Lebensqualität der Betroffenen signifikant gesteigert. Bei der Entwicklung und Charakterisierung von inotrop wirkenden Substanzen ist die Pharmaindustrie bis dato auf Tierversuche angewiesen, die neben einem hohen Kostenaufwand auch vermehrt ethische Bedenken in der Bevölkerung auslösen. Letztere führten dazu, dass der Gesetzgeber zunehmend regulierend in die Entwicklung von Arzneimitteln eingreift.

1.2 Legislative Rahmenbedingungen

Seit 1986 ist die Durchführung von Tierexperimenten durch verbindliche Richtlinien auf europäischer Ebene geregelt. Die aktuell gültige *Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere* sieht in Artikel 10 vor, „[...] Verfahren mit lebenden Tieren für wissenschaftliche Zwecke und Bildungszwecke vollständig zu ersetzen, sobald dies wissenschaftlich möglich ist. Zu diesem Zweck zielt diese Richtlinie darauf ab, die Weiterentwicklung alternativer Ansätze zu erleichtern und zu fördern“.³ Darüber hinaus wurde mit der *Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel* die Durchführung von Tierversuchen für die Herstellung und das Inverkehrbringen von Kosmetika grundsätzlich verboten.⁴ Seit dem 31. März

2013 gilt dies auch verbindlich für Studien über Toxizität und den Einfluss auf die Reproduktion, welche zuvor über Ausnahmeregelungen erlaubt waren. Parallel zur angestrebten Substitution von Tierexperimenten wurde mit der *Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe [...]*“ (REACH) ein umfassender legislativer Rahmen zum Inverkehrbringen von chemischen Substanzen geschaffen.⁵ Die Verordnung schreibt verbindliche Verfahren zur Risikobewertung vor, welche auch Experimente an Wirbeltieren einschließen.

Zur Harmonisierung der Anforderungen, die sich aus den oben genannten Verordnungen ergeben, wurde im Jahr 2011 das *European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM)* gegründet. Das Ziel dieser Einrichtung ist die zentralisierte Bewertung und Zulassung von *in-vitro*-Verfahren, die Tierexperimente ersetzen können. Die Methodendatenbank des ECVAM umfasste im Januar 2015 die folgenden Themenfelder: Biokinetik, Effekte auf Reproduktion, Hepatotoxizität, lokale Toxizität (Substitution für Draize-Test) und Neurotoxizität. Zum derzeitigen Stand beinhaltet die Liste kein Verfahren, um Substanzeffekte auf Herzmuskelzellen zu testen.

1.3 Motivation

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines *in-vitro*-Herzmuskelmodells, basierend auf der CellDrum-Technologie und humanen Herzmuskelzellen. Hierdurch soll eine Alternative zu Tierexperimenten etabliert werden, die es ermöglicht, Substanzeffekte auf die Kontraktilität von Herzmuskelzellen qualitativ und vor allem quantitativ zu bestimmen. Durch den Einsatz von humanen stammzell-abgeleiteten Kardiomyozyten soll hierdurch ein Verfahren etabliert werden, das Tierexperimenten insofern überlegen ist, dass es pharmakologische Aussagen direkt auf den Zielorganismus Mensch ermöglicht und somit die Diskussion über die „Translatability“ von vornherein umgeht.

Darüber hinaus stellt die Anwendung von Kardiomyozyten aus humanen induzierten

pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) in Aussicht, in Zukunft das Feld der sogenannten *personalisierten Medizin*⁶ signifikant voranzutreiben.⁷ Durch die Reprogrammierung von patienten-spezifischen Gewebezellen (zum Beispiel aus Hautgewebe) ist es bereits heute möglich, ein persönliches *in-vitro*-Abbild des Patienten zu erzeugen, das den gleichen genetischen Code und somit auch die gleichen Mutationen trägt wie der Patient selbst.⁸ Durch die weitere Differenzierung der Zellen zu Herzmuskelzellen konnten hierdurch genetisch bedingte Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems *in-vitro* modelliert werden.⁹ Durch den kombinierten Einsatz der CellDrum-Technologie mit hiPS-abgeleiteten Herzmuskelzellen könnte in Zukunft die Wirkung von inotrop wirkenden Medikamenten patienten-spezifisch analysiert werden, um so eine optimale Auswahl und Dosierung der Medikamente zu ermöglichen.

Zum Erreichen dieser Ziele soll die CellDrum-Technologie weiterentwickelt werden, um zum einen eine Dauerkultur von autonom schlagenden Herzmuskelzellen zu ermöglichen und zum anderen eine präzise und wiederholbare Quantifizierung bekannter Substanzeffekte zu gestatten.

2 Grundlagen

2.1 Das Herz

Das Herz versorgt den Körper mit Sauerstoff und Nährstoffen und sorgt für den Abtransport von Stoffwechselprodukten. Durch rhythmische Kontraktion pumpt es das Blut durch das Kreislaufsystem. Bei einer angenommenen Schlagfrequenz von einem Hertz (= 1 Schlag pro Sekunde) und einer Lebenserwartung von 80 Jahren schlägt das Herz eines Menschen in seinem Leben ca. $2,5 \cdot 10^9$ mal. Mit einem geförderten Blutvolumen von 70 mL pro Zyklus¹⁰ beträgt die Pumpleistung im Menschenleben ca. $1,8 \cdot 10^8$ Liter.

Das Herz besteht aus zwei Vorhöfen (Atrien) und zwei Kammern (Ventrikel). Jeweils ein Atrium und ein Ventrikel bilden eine funktionale Einheit, die als Druck-Saug-Pumpe fungiert. Das Blut strömt aus dem Körperkreislauf über das rechte Atrium in das rechte Ventrikel, von wo aus es in die Lunge gepumpt wird. Dort wird das Blut mit Sauerstoff angereichert, während Kohlendioxid abgegeben wird. Von der Lunge aus gelangt es über den linken Vorhof in das linke Ventrikel, welches das Blut in den Körperkreislauf pumpt.

Um die optimale Pumpleistung zu erbringen, ist eine präzise zeitlich-räumliche Abfolge der Kontraktion aller Zellen des Herzens nötig. Der (physiologische) Kontraktionszyklus beginnt bei den nodalen Zellen des Sinusknotens am rechten Atrium. Diese erzeugen periodische elektrische Signale, die sich in der Folge über das gesamte Herz ausbreiten. An der Reizweiterleitung innerhalb des Herzens sind – im Gegensatz zu den meisten anderen Geweben des Körpers – keine Nervenzellen beteiligt. Sie erfolgt ausschließlich über Zell-Zell-Verbindungen von Kardiomyozyten durch *gap junctions*. Während die Zellen des *His-Purkinje-Systems* auf die Erregungsweiterleitung spezialisiert sind, erfolgt die Weiterleitung innerhalb der Atrien und Ventrikel durch die kontraktile Muskelzellen selbst.

Lange Zeit wurden im Herzen nur die Myozyten betrachtet, da diese die Hauptfunktion des Herzens bewerkstelligen. Tatsächlich machen Myozyten im

adulten menschlichen Herzen nur ca. 30 % aller Zellen aus.¹¹ Das Gros der restlichen Zellen entfällt auf kardiale Fibroblasten. Diese erfüllen eine ganze Reihe von Aufgaben, die von essentieller Bedeutung für die Funktion der kontraktile Myozyten sind: Schon in der Entwicklung des embryonalen Herzens nehmen sie entscheidenden Einfluss auf die Organstruktur und ermöglichen so die gerichtete Differenzierung von Herzmuskelzellen der unterschiedlichen Gewebe (atrial/ventrikulär).¹² Den maßgeblichen Einfluss auf die Struktur nehmen sie durch die Sezernierung extrazellulärer Matrixproteine wie Fibronectin, Collagen und Laminin. Neben dem Aufbau der extrazellulären Matrix spielt auch ihre kontinuierliche Umbildung der extrazellulären Matrix durch Matrix-Metalloproteinasen (*MMP remodeling*) eine entscheidende Rolle. Hierdurch ist zum einen die Erhaltung der Homöostase des Gewebes gewährleistet, zum anderen ermöglicht die Umbildung eine direkte Reaktion des Gewebes auf veränderte Bedingungen wie z.B. Bluthochdruck.¹³ Darüber hinaus nehmen kardiale Fibroblasten über die Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen direkten Einfluss auf essentielle Funktionen von Kardiomyozyten wie Proliferation, Kontraktilität und Apoptose.¹⁴ Letztlich nehmen sie durch direkte Zell-Zell-Verbindungen (*gap junctions*) auch an der Reizweiterleitung innerhalb des Herzgewebes teil.¹⁵

2.1.1 Zellulärstruktur kontraktile Kardiomyozyten

Hauptmerkmale der kontraktile Kardiomyozyten sind die sogenannten *Myofibrillen*. Hierbei handelt es sich um Zellorganellen, deren Funktion in der Entwicklung von mechanischer Kraft durch Längenänderung liegt. Die Myofibrillen selbst bestehen aus funktionalen Untereinheiten, den Sarkomeren. Diese geometrisch hoch definierten Strukturen bestehen im Wesentlichen aus den Proteinen *Aktin*, *Myosin* und *Titin*.¹⁶

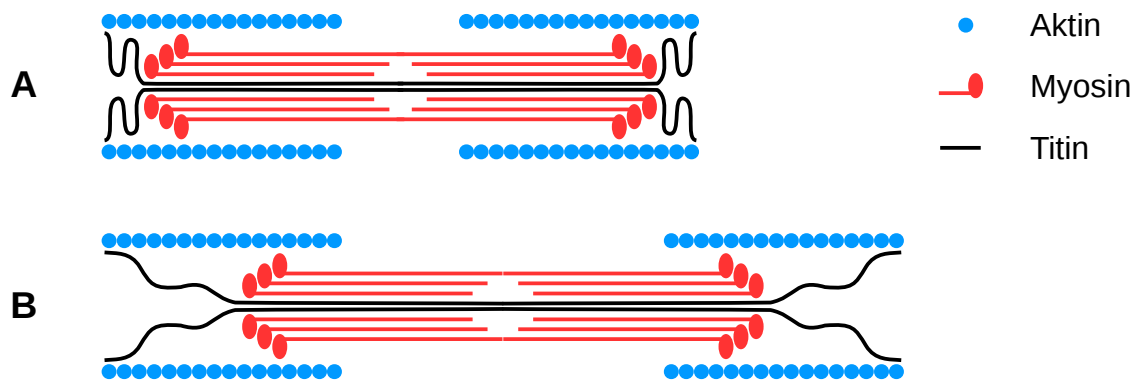


Abbildung 1: Grundstruktur eines einzelnen Sarkomers. A: kontrahiert. B: relaxiert.

Grundstruktur eines einzelnen Sarkomers. A: kontrahiert. B: relaxiert.

Aktin ist ein zentrales und ubiquitäres eukaryotisches Strukturprotein. Es bildet den Hauptbestandteil des Zytoskeletts. Dadurch erfüllt es nicht nur Aufgaben in der Aufrechterhaltung der zellulären Struktur, sondern auch in Prozessen, die auf der Reorganisation des Zytoskeletts beruhen, wie z.B. der Fortbewegung (Motilität) und dem intrazellulären Vesikeltransport. In den Sarkomeren bildet das globuläre Aktin-Molekül (G-Aktin) lange, helikale Filamente, die als F-Aktin bezeichnet werden. Diese Filamente sind zu aneinandergereihten, Tubus-förmigen Strukturen zusammengelagert (Abbildung 1).

Myosin ist ein sogenanntes Motorprotein. Es liegt im Sarkomer als Aggregat vieler Monomere vor, die zusammen eine Muskelfaser bilden. Das Myosin-Monomer besteht aus einer schweren Kette (Heavy Chain) und einer leichten Kette (Light Chain). Während die leichte Kette vorwiegend für die Erhaltung der Struktur des Myosins und seiner Aggregate verantwortlich ist, ermöglicht die schwere Kette die Kontraktion des Sarkomers durch Konformationsänderung. Die Energie hierfür erhält es durch die Spaltung von Adenosintriphosphat (ATP) in Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat. Es handelt sich also um eine ATPase.

Titin ist mit 3,6 MDa das größte bekannte Protein im menschlichen Körper. Es verbindet die Z-Scheibe des Sarkomers mit den Myosinfilamenten, wodurch es die Myosin-Aggregate im Aktin-Schlauch zentriert. Wird das Sarkomer gedehnt, so

entfaltet sich das Titin und baut somit eine passive Kraft auf, die wie eine molekulare Sprungfeder wirkt. Dadurch ist es in der Lage, die Myosinköpfe nach der Dehnung wieder in die optimale Position für eine erneute Kontraktion zu bringen.

2.1.2 Kardiales Aktionspotential

Bei der Kontraktion der Sarkomere nimmt Calcium eine Schlüsselrolle ein.¹⁷ Die Längenänderung steht in direkter Relation zur intrazellulären Konzentration freien Calciums. Letztere wird durch den konzentrierten Strom weiterer Ionen – vor allem von Natrium und Kalium – über die Zellmembran gesteuert.¹⁸

Beim Ruhepotential von ca. -90 mV ist Kalium das dominierende Kation im Zytoplasma, während Natrium hauptsächlich außerhalb der Zelle vorliegt (siehe Tabelle 1). Dieser Zustand wird maßgeblich durch Na⁺/K⁺-ATPasen aufrechterhalten, die unter ATP-Verbrauch je 2 Kaliumionen in die Zelle und 3 Natriumionen aus der Zellen transportieren.

Tabelle 1: Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb von Kardiomyozyten

	Extrazellulär [mM] ¹⁹⁻²¹	Intrazellulär [mM] ^{19,22}
Kalium	4 - 5,4	140 - 145
Natrium	140	10
Calcium	1,2 - 1,8	(1 - 1,2) · 10 ⁻⁴

Die Gesamt-Calciumkonzentration im Zytoplasma liegt in der gleichen Größenordnung wie außerhalb der Zelle. Allerdings sind die Calciumionen innerhalb der Zelle komplexiert bzw. gebunden, sodass die freie Calcium-Konzentration unter 1 µM liegt.²³

Die Aktivierung der Zellen und somit auch die Reizausbreitung im Herzen erfolgt maßgeblich über sogenannte *Gap junctions*. Dies sind Ansammlungen von Poren-

Proteinen in der Zytoplasmamembran, die den Fluss von Ionen von einer Zelle in eine benachbarte Zelle ermöglichen. Kommt es in einer Zelle zu einem Aktionspotential, so strömt ein Teil der Ionen (hauptsächlich Natrium und Calcium) aus dieser Zelle auch in die benachbarte Zelle (Abbildung 2).

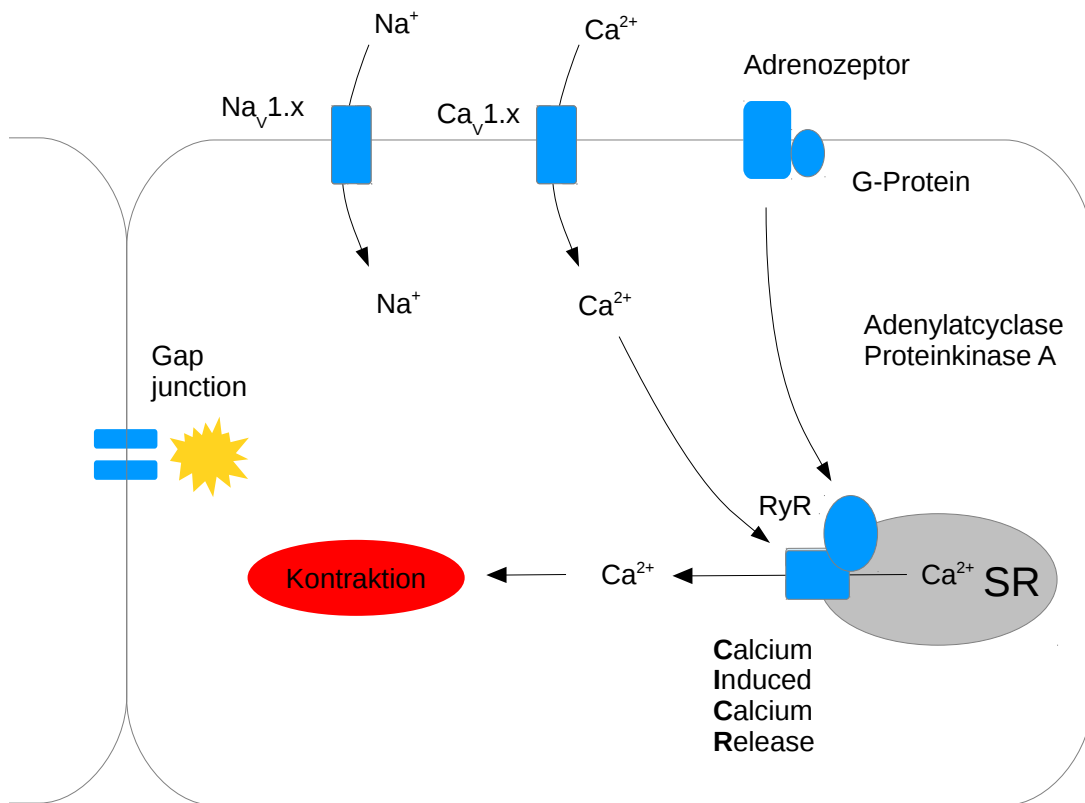


Abbildung 2: Einfluss der Ionenströme und der G-Protein-gekoppelten Signalkaskade auf die Kontraktion

Dadurch kommt es zur Verringerung des Membranpotentials (Depolarisation) von -90 mV auf ca. -65 mV .¹⁹ Hier öffnen spannungsabhängige Natriumkanäle ($\text{Na}_v1.x$) in der Zytoplasmamembran, wodurch es zu einem kurzen und starken Einstrom von Natrium in die Zelle kommt. In der Folge verringert sich das Potential weiter, bis es schließlich in den positiven Bereich überschießt (Abbildung 3).

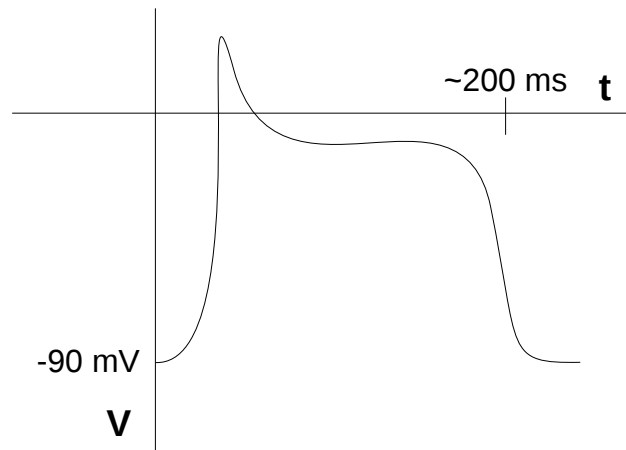


Abbildung 3: Darstellung des humanen ventrikulären Aktionspotentials

Zwischen dem Beginn des Aktionspotentials und dem Erreichen des Maximums öffnen sich spannungsabhängige Calciumkanäle ($Ca_v1.x$) bei ca. -30 mV,²⁴ die den Fluss von Calcium aus dem Extrazellulärraum in die Zelle hinein ermöglichen. Diese Calciumionen bewirken eine Öffnung der Ryanodin-Rezeptoren (RyR) in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums, wodurch dieses weiteres Calcium freisetzt und die Konzentration freien Calciums um den Faktor 1000 erhöht. Diese vorübergehend hohe Calcium-Konzentration ermöglicht die Kontraktion der Muskelzelle (siehe nächstes Kapitel). Ebenfalls in der Depolarisationsphase werden spannungsabhängige Kalium-Kanäle ($K_v4.x$) aktiviert, durch die Kalium aus der Zelle hinaus diffundiert. Dies geschieht jedoch mit einer gewissen Verzögerung. Als Ergebnis der gegenläufigen Diffusion von Calcium und Kalium bleibt das Membranpotential vorübergehend konstant.²⁵ Diese Phase wird als *Plateau-Phase* bezeichnet. Am Ende der Plateau-Phase schließen sich die Calcium-Kanäle, während die verzögerten Kalium-Kanäle noch offen sind. Als Ergebnis repolarisiert die Zelle, bis sie das Ruhepotential wieder erreicht hat, welches durch die Na^+/K^+ -ATPasen bis zur nächsten Erregung gehalten wird.

2.1.3 Myokardiale Kontraktion

Die Aktin-Filamente der Sarkomere werden durch regulatorische Proteine ergänzt, welche die Interaktion des Aktins mit den Myosinköpfen steuern.

Beim Tropomyosin handelt es sich um eine fibrilläres Protein, das in die helikale Struktur des F-Aktins eingebunden ist. Im inaktivierten Zustand des Sarkomers blockiert es die Myosin-Bindestellen, sodass es zu keiner Kontraktion kommen kann. Die Konformation der Tropomyosin-Moleküle steht unter dem Einfluss von sogenannten Troponin-Komplexen, die ebenfalls an die Aktin-Filamente gebunden sind.

Die Calciumionen, die während des kardialen Aktionspotentials aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma eingeströmt sind, binden an das Troponin und führen zu einer Konformationsänderung des Proteinkomplexes. In der Folge werden die Myosin-Bindungsstellen auf den Aktinfilamenten freigegeben (Abbildung 4).

Die Myosin-Köpfe erfüllen zwei Funktionen während der Kontraktion: Zum einen besitzen sie eine Bindestelle für Aktin. Zwar beruhen diese Bindungen auf den vergleichsweise schwachen Van-der-Waals-Kräften, jedoch ermöglichen sie in der Summe die Entwicklung von Kraft bis auf die makroskopische Ebene. Diese mechanische Kraft entsteht durch die zweite Funktion der Myosin-Köpfe: Sie besitzen eine ATPase-Aktivität. Durch die bei der Spaltung von ATP in ADP + P_i gewonnene Energie kommt es zu einer Konformationsänderung des Myosin-Kopfes. Dies ermöglicht das Aneinandervorbeigleiten der Myosin- und Aktinfilamente und somit die Entwicklung von mechanischer Kraft durch Längenänderung des Sarkomers.

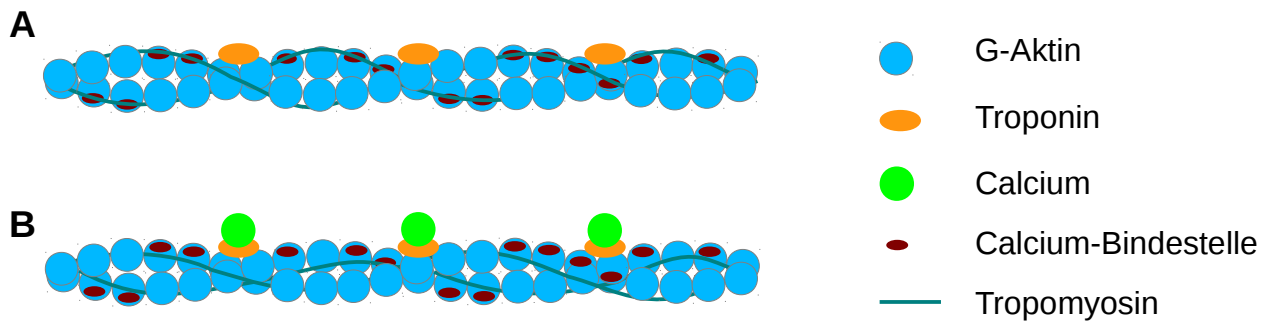


Abbildung 4: Molekülstruktur des kardialen Aktin-Filaments. A: Inaktive Form. B: Calcium-aktivierte Form. Durch die Bindung von Calcium an das Troponin werden die Myosin-Bindestellen auf dem Aktin-Filament frei.

2.2 Kraft und Spannung

In der Physiologie werden drei grundlegende Arten der Muskelkontraktion unterschieden. Ihre Definition basiert auf dem Verhältnis der von den Zellen aufbrachten Kontraktionskraft und dem Widerstand des umgebenden Gewebes (Abbildung 5).

Bei der *isometrischen* Kontraktion ist die Kraft der Muskelzellen gleich dem entgegengebrachten Widerstand. In der Konsequenz kommt es zu keiner Längenänderung. Diese Art der Kontraktion ist vor allem bei Skelettmuskelzellen im Zusammenhang statischer Handlungen wie Stehen, Sitzen oder dem Halten von Gegenständen von Bedeutung. Darüber hinaus basieren viele experimentelle Ansätze zur Messung von Zellkraft – auch von Kardiomyozyten – auf isometrischer Kontraktion.

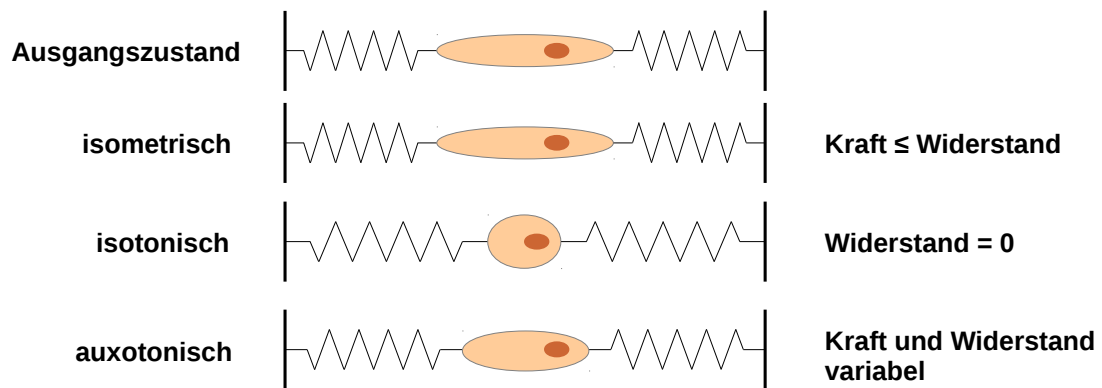


Abbildung 5: Darstellung des Zusammenhangs von Zellkraft und Widerstand.

Im Falle der *isotonischen* Kontraktion ist der Widerstand gleich 0. Somit resultiert die gesamte aufgebrauchte Kraft der Zelle in einer Längenänderung (Deformation). Hierbei handelt es sich um einen theoretischen Grenzfall, der nur *in-vitro* simuliert werden kann, da in natürlichen Geweben immer ein Widerstand durch die Steifigkeit des umgebenden Gewebes gegeben ist.

Die dritte physiologisch definierte Art der Muskelkontraktion ist die sogenannte *auxotonische* Kontraktion. Hier führt die Aufwendung von Kraft zu einer Deformation des umgebenden Gewebes, welche in der Folge wiederum zu einer erhöhten Steifigkeit und somit auch zu einem erhöhten Widerstand führt. Infolgedessen verringert sich die Plastizität des Gewebes. Es entsteht eine negative Feedback-Schleife, die das Verhältnis von Kraft und Widerstand reguliert (Abbildung 6).

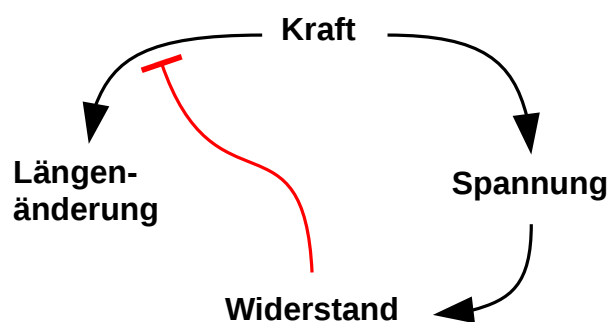


Abbildung 6: Zusammenhang von Kraft, Längenänderung und Spannung unter Einbezug des Widerstands

2.3 Stand der Technik

2.3.1 Kraftmessung

Seit seiner Erstbeschreibung im Jahr 1895 ist das so genannte *Langendorff-Herz*²⁶ die Standardmethode bei der Beurteilung inotroper Wirkungen auf das Herz.^{27,28} Bei diesem Messaufbau wird ein explantiertes Wirbeltier-Herz (meist Meerschweinchen oder Ratte, seltener Hund) in einem temperierten Organbad mit einer Nährstofflösung perfundiert. Dies ermöglicht es, das Organ für eine kurze Zeit (einige Minuten bis wenige Stunden) funktionstüchtig zu halten und auf seine Reaktion auf kardioaktive Substanzen hin zu untersuchen. Dabei können sowohl elektrische Ableitungen aufgezeichnet werden wie auch der links-ventrikuläre Druck bestimmt werden. Letzterer dient als direktes Maß für den inotropen Zustand des Herzgewebes. Trotz seiner Vorteile bezüglich der Aufrechterhaltung der Organstruktur während der Messung birgt der Langendorff-Messaufbau eine Reihe substantieller Nachteile: Zum einen muss für jedes Experiment ein Versuchstier getötet werden. Dies steht in direktem Widerspruch zu den Direktiven der Europäischen Union (siehe Einleitung). Des Weiteren ist die Übertragbarkeit von Messergebnissen aus Tierversuchen auf die menschliche Physiologie von je her Gegenstand intensiver Diskussionen.²⁹ Ferner ergibt sich das Problem der Generalisierbarkeit der Ergebnisse von Versuchen an Einzeltieren auf die gesamte Population. Hierzu müssten Studien im Hochdurchsatz-Verfahren durchgeführt werden, was aufgrund der oben genannten ethischen Aspekte und des komplexen Messaufbaus praktisch nicht möglich ist. Um dem Abhilfe zu schaffen wurde in den vergangenen 30 Jahren eine Reihe von *in-vitro*-Messaufbauten entwickelt, welche die Kraftentwicklung von Herzmuskelzellen quantifizieren sollen:

Im Jahr 1986 veröffentlichten *Shepherd et al.* eine Studie,³⁰ in der sie einzelne atriale Myozyten des Ochsenfroschs an feinen Glasstäben mit definierter Elastizität fixierten und elektrisch stimulierten. Die Auslenkung der Glasstäbe wurde optisch erfasst und daraus die kontraktile Kraft der Myozyten bestimmt. Später wurde die optische Analyse durch den Einsatz von piezoelektrischen Messfühlern ersetzt.³¹⁻³⁴ *Harris et*

al. beobachteten, dass Zellen in der Lage sind, durch Kontraktion Falten in einem dünnen Silikon-Substrat zu erzeugen.³⁵ Sie schlugen vor, die Kraft der Zellen durch Mikromanipulation des Substrats, ähnlich wie beim oben vorgestellten Konzept, mit kalibrierten Mikronadeln zu bestimmen. Trotz des augenscheinlich direkten Zugangs zu den mechanischen Eigenschaften der Zellen bringen diese Methoden zwei wesentliche Nachteile mit sich: Zum einen basieren sie auf der Mikromanipulation von Einzelzellen bzw. Gewebekonstrukten, was die Verwendung der Methode im Hochdurchsatz erheblich erschwert, wenn nicht sogar unmöglich macht. Zum anderen sind sie von geometrische Faktoren wie der Ausrichtung und Form der Zellen abhängig, da es sich bei der gemessenen Kraft um eine vektorielle Größe handelt (Abbildung 7). Da diese Faktoren nur schwer zu kontrollieren sind, sind die Messungen mit großen Fehlern behaftet.

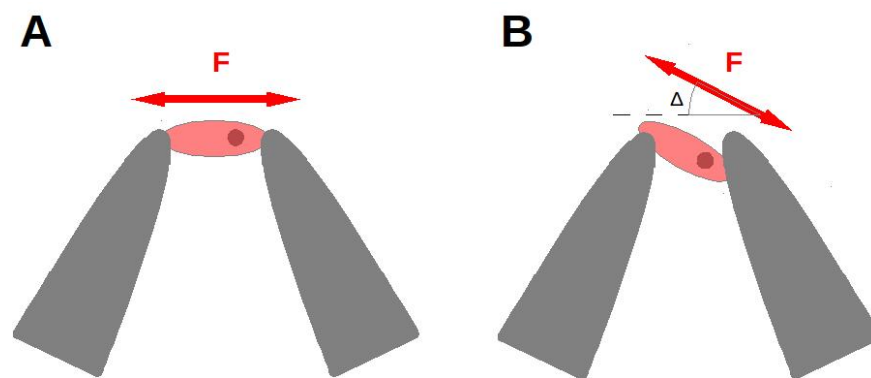


Abbildung 7: Prinzipskizze der „Isometric Force Transduction“-Methode. A: Kraftentwicklung der Zelle in optimaler Richtung. B: Abweichung des Kraftvektors von der Optimalenebene

Technologische Fortschritte bei der Mikrostrukturierung von Materialien ermöglichten die Weiterentwicklung des beschriebenen Konzeptes: Durch die Kultivierung von Myozyten auf Arrays aus elastischen Mikrosäulen konnte auf Mikromanipulation verzichtet werden.^{36,37} Auch hier wurde die Auslenkung der Säulen optisch bestimmt und so Rückschlüsse auf die Kraftentwicklung der Zellen gezogen. Zwar hat dieser Messaufbau den Vorteil, dass die Zellen auf einem weichen Substrat kultiviert werden, was die natürliche mechanische Umgebung der Zellen imitiert, jedoch ist diese Technologie bis dato nur für einzelne Zellen anwendbar. Aufgrund der Tatsache, dass es in einem höher organisierten Gewebeaufbau – wie z.B. in einem Monolayer – nicht zu einer zur Kraft proportionalen Auslenkung der Mikrosäulen

kommen kann, bleibt es fraglich, ob diese Technologie auf physiologische Gewebekonstrukte angewendet werden kann.

Yin et al. nutzten magnetische Kügelchen zur Bestimmung der Schlagkraft von Kardiomyozyten.³⁸ Diese wurden an ein Ende der Zelle geklebt und ihre Bewegung in einem externen, variablen magnetischen Feld optisch untersucht. Neben dem komplizierten Versuchsaufbau unter Zuhilfenahme von Mikromanipulation limitiert die Notwendigkeit der Kultur auf einem festen Substrat die Aussagekraft der gemessenen Parameter, da diese signifikant von der mechanischen Umgebung der Zellen abhängen.^{39,40} Die gleiche Einschränkung gilt für die Rasterkraftmikroskopie, welche ebenfalls für die Untersuchung von Einzelzellen eingesetzt wurde.⁴¹

Im Jahr 2010 publizierten *Parker et al.* eine Studie über den Einsatz von Biohybriden zur Messung kontraktile Kräfte von Kardiomyozyten.⁴² Bei den Biohybriden handelte es sich um dünne Polymerschichten, auf denen die Zellen kultiviert wurden. Die Kontraktion der Zellen erzeugte eine Biegung der Hybride, welche lateral mikroskopisch analysiert wurde. Später wurde die Deformation von oben aufgenommen aufgenommen, was den Einsatz laborüblicher Mikroskope ermöglichte.^{43,44} Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei diesem Verfahren um eine uniaxiale Deformation der Konstrukte handelt, ist die Orientierung der Zellen von entscheidender Bedeutung für das Messergebnis. Wenn die Zellen isotrop verteilt wären, das heißt wenn ihre Orientierung zufällig wäre, würde nur ein Bruchteil der erzeugten Kraft tatsächlich zur Deformation des Biohybrids beitragen. In Anbetracht dieser Tatsache wurde ein Verfahren zur Mikrostrukturierung der Oberfläche eingesetzt, um die Ausrichtung der Zellen zu erzwingen.⁴⁵ In einer weiteren Studie wurde das optimale Verhältnis von Breite zu Länge der Mikrostrukturen untersucht, um die maximale Kraftaufwendung der Kardiomyozyten zu ermöglichen.⁴⁶

Eschenhagen et al. entwickelten ein weiteres Konzept zur Messung der kontraktile Kräfte von Kardiomyozyten, das sie *engineered heart tissue* (EHT) nennen. Hierbei handelte es sich um ringförmige Hydrogele aus extrazellulären Matrixproteinen, in die die Kardiomyozyten eingegossen wurden. Die Kontraktion der Ringe wurde entweder optisch aufgenommen und analysiert⁴⁷ oder durch isometrische Kraftmessung quantifiziert.⁴⁸ In nachfolgenden Studien wurden die ringförmigen Strukturen durch hantelförmige Konstrukte ersetzt.⁴⁹ Wie bei den Biohybriden ist

auch hier die Orientierung der Zellen von entscheidender Bedeutung für das Messergebnis. Da bei den dreidimensionalen Hydrogelen keine Mikrostrukturierung erfolgte, ist davon auszugehen, dass hier nicht alle Zellkräfte in das Messergebnis einfließen.

Neben der direkten – aber komplizierten – Messung von Kraft bzw. Spannung wurden weitere Technologien entwickelt, die indirekte Rückschlüsse auf die Mechanik von Zellen zulassen, gleichzeitig jedoch auch in Hochdurchsatz-Verfahren eingesetzt werden können.

2.3.2 Optische Calcium-Assays

Da Calciumionen bei der Kontraktion von Muskelzellen eine zentrale Rolle spielen, werden sie als indirekter Indikator für Muskelkontraktion eingesetzt. Durch die Anwendung von Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen ist es möglich, den zeitlichen Verlauf der Calcium-Konzentration im Cytosol optisch zu bestimmen und so in indirekter Weise Rückschlüsse auf den kontraktile Zustand von Herzmuskelzellen zu ziehen.⁵⁰ Die Nutzung hochauflösender CCD-Sensoren ermöglicht die gleichzeitige Messung von bis zu 384 Wells.⁵¹ Hierbei sind Aufnahmeraten von bis zu 120 Hz möglich.

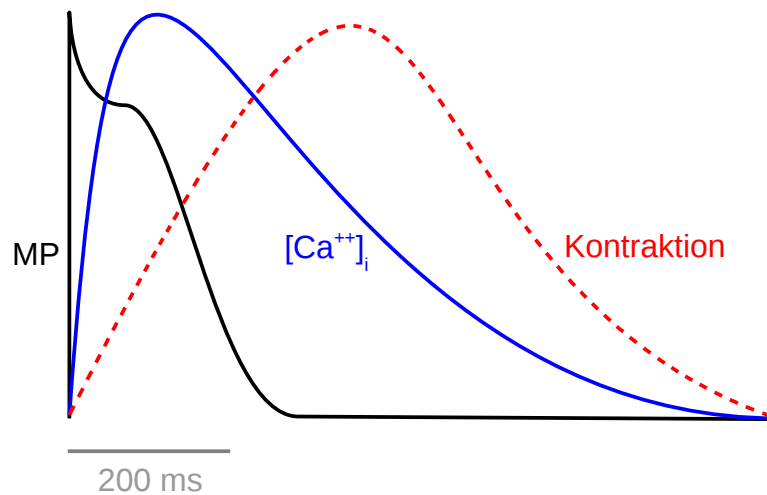


Abbildung 8: Zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Membranpotential, der zytosolischen Calciumkonzentration und der Kontraktion von Kardiomyozyten (nach Bers)¹³⁹

Gängige Calcium-sensitive Farbstoffe wie z.B. *Fura-2* und *Fluo-4* besitzen eine auf *BAPTA* (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) basierende Grundstruktur, die in der Lage ist, Chelatkomplexe mit Calciumionen zu bilden.⁵² Sobald die Farbstoffe mit Calcium komplexieren, erhöht sich ihre Fluoreszenz drastisch, was mithilfe optischer Systeme erfasst werden kann.⁵³ Um Hintergrundfluoreszenz zu minimieren, sind die Carboxylgruppen kommerziell erhältlicher Calcium-sensitiver Farbstoffe durch Acetoxymethylester-Schutzgruppen blockiert.⁵⁴ Diese Schutzgruppen ermöglichen zum einen ein schnelleres Eindringen in die Zelle, da sie die Hydrophobie des Moleküls erhöhen. Zum anderen werden sie in der Zelle durch Esterasen abgespalten, wodurch die Komplexbildung erst ermöglicht wird.⁵⁵ Somit ist der Farbstoff nur im Zytosol wirksam. Durch die Abspaltung der Schutzgruppen wird die weitere Diffusion in Zellorganellen wie das sarkoplasmatische Retikulum verhindert. Entscheidender Nachteil dieser Methode ist die Tatsache, dass durch die komplexbildende Eigenschaft der Farbstoffe die Homöostase der zytosolischen Calcium-Konzentration beeinträchtigt werden kann.⁵⁶ Somit ist ein Einfluss der Messmethode auf das Messergebnis nicht auszuschließen. Darüber hinaus ist die zytosolische Calcium-Konzentration nicht in jedem Fall ein direktes Maß für die Kontraktilität der Zelle. Durch sogenanntes Excitation-Contraction-Decoupling kommt es sowohl unter pathologischen Bedingungen als auch durch den gezielten Einsatz von Pharmaka zu einer Entkopplung von zytosolischer Calciumkonzentration und Kontraktion.

2.3.3 Impedanz-Messung

Dieses Verfahren basiert auf der Messung des Wechselstrom-Widerstandes hochfrequenter Wechselströme ($f = 40 \text{ kHz}$) zwischen einer Goldelektrode und dem Zellkulturmedium. Werden Zellen auf der Goldelektrode kultiviert, so ändert sich die Impedanz durch die Kapazität der Zellen. Die Impedanz hängt maßgeblich von der Geometrie und der Anzahl der kultivierten Zellen ab. Erstmals wurde die Technologie von *Giaever et al.* im Jahr 1986 zur Untersuchung des Anwachs-Kinetik von Epithelzellen benutzt.⁵⁷ Später wurde sie zur Quantifizierung der Zellteilung eingesetzt.⁵⁸ Durch die Kombination beider Parameter wurde es möglich, das Verfahren als semi-quantitativen Zytotoxizitätstest⁵⁹ einzusetzen. Mit der fortschreitenden Entwicklung in der Digitaltechnik ist es in den letzten Jahren möglich geworden, im 96-Well-Format mit einer Aufnahmerate von 0,1 bis 1 kHz zu messen. Dadurch lässt sich auch die Kontraktion von Herzmuskelzellen untersuchen. Da die Impedanz nicht direkt in ein Maß der mechanischen Kraft oder Spannung übertragen werden kann, wird als Messgröße der sogenannte *Cell Index* benutzt.⁶⁰ Hierbei handelt es sich um den Quotienten des aktuellen Messsignals und der Basislinien-Messung, also um eine dimensionslose Größe.

Ein zentraler Nachteil der Impedanz-Messung ist die Notwendigkeit der Zellkultur auf einer starren Oberfläche. Dadurch ist es nicht möglich, die Zellen in einer physiologischen Umgebung zu untersuchen.^{39,40} Ein weiterer Nachteil ist die Inhomogenität des Messsignals. Abhängig von der Kulturdauer und dem verwendeten Kulturmedium weichen die Messsignale stark voneinander ab und erschweren so eine Interpretation (Abbildung 9).

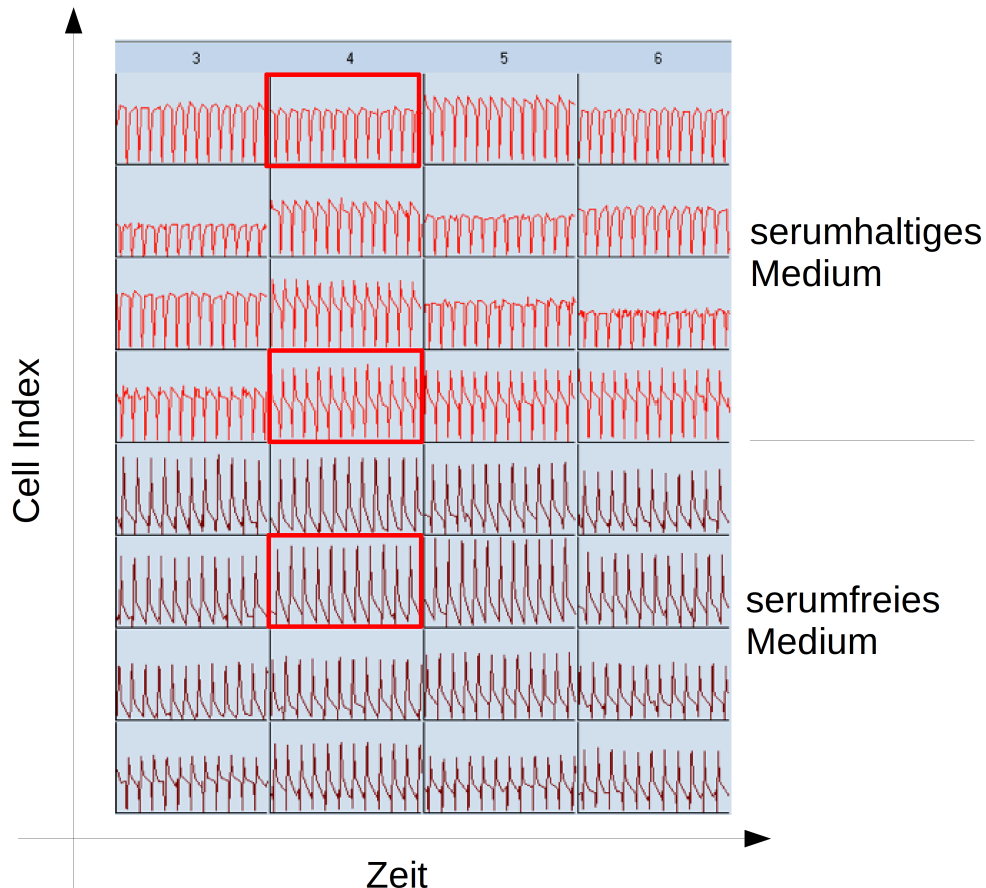


Abbildung 9: Messsignale des xCELLigence-Systems mit hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten. Vergleich: Kulturmedien mit und ohne Serum-Zusatz. Kästen: Unterschiedliche Messsignale der gleichen Zellen zum selben Zeitpunkt

2.4 Die CellDrum-Technologie

Bei der CellDrum handelt es sich um ein Zellkulturgefäß, das sich aus einem Polycarbonat-Ring und einer Membran aus Polydimethylsiloxan (PDMS, Silikon) zusammensetzt. Die Silikonmembran bildet den Boden des Kulturgefäßes, auf dem die Zellen kultiviert werden (siehe Abbildung 10). Durch den inneren Durchmesser des Rings von 16 mm ergibt sich eine Nenn-Kulturoberfläche von 2,01 cm². Damit entspricht die CellDrum einem einzelnen Well einer 24-well-Platte. Durch die Gewichtskraft des Kulturmediums wird die Membran um ca. 1,5 bis 1,6 mm

ausgelenkt. Die Auslenkung hängt maßgeblich von der Dicke der Membran ab. Darüber hinaus hängt sie in geringerem Maße von Kapillareffekten an der Innenseite des Polycarbonat-Rings ab. Durch die Tatsache, dass die Auslenkung der Membran im Gegensatz zu ihrer tatsächlichen Dicke erheblich schneller und einfacher bestimmt werden kann, wurde die Auslenkung als Qualitätskriterium bei der manuellen Herstellung der CellDrums vorgezogen.

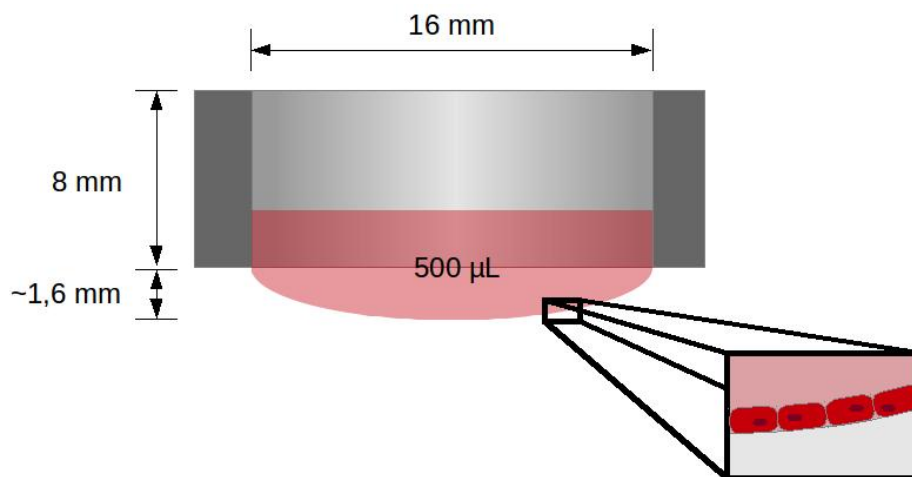


Abbildung 10: Querschnitt einer CellDrum. Abbildung nicht maßstabsgetreu.

Die CellDrum-Technologie wird seit dem Jahr 2001 am Institut für Bioengineering der FH Aachen kontinuierlich weiterentwickelt.⁶¹ Zu Beginn der Entwicklung basierte die Methode auf der Analyse von Druck-Dehnungs-Kurven zur Bestimmung der Grundspannung des Zell-Silikon-Komposits.⁶² So konnten die Effekte von Thrombin und Cytochalasin auf 3T3-Fibroblasten quantifiziert werden. In der Folge wurden Finite-Elemente-Analysen durchgeführt und erste Ergebnisse mit dreidimensionalen Gewebekonstrukten auf der Basis von Collagen erzielt.⁶³ Darüber hinaus wurde mithilfe des CellDrum-Systems der Einfluss von Lipopolysacchariden auf Endothelzellen untersucht.⁶⁴ Im Jahr 2010 wurden erste Versuche unternommen, die periodische Kontraktion von Kardiomyozyten zu untersuchen. Hierzu wurden neonatale Kardiomyozyten der Ratte eingesetzt.⁶⁵ Ein entscheidendes Ergebnis der Untersuchungen war, dass aktiv kontrahierende Zellen im Gegensatz zu Fibroblasten und Endothelzellen nur für kurze Zeit auf den CellDrum-Membranen kultiviert werden

konnten. Darüber hinaus konnte bei dynamischen Prozessen wie der rhythmischen Kontraktion nicht das Verfahren der Druck-Dehnungs-Analyse angewandt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Variation der *Barlow*- bzw. *Laplace*-Formel entwickelt, die es erlaubt, die Spannung der CellDrum-Membran präzise und mit geringem instrumentellem Aufwand zu ermitteln:

Die Laplace-Formel ist definiert für eine Halbkugel und ermöglicht die Berechnung der Spannung σ innerhalb einer Membran anhand der Druckdifferenz p , dem Radius R und der Schichtdicke s .

$$\sigma = \frac{p \cdot R}{2 \cdot s} \quad (2.1)$$

In ihrer abgewandelten Form ist sie für jede Kugelkalotte eines Radius r und einer Höhe h anwendbar:

$$\sigma = \frac{p}{h} \cdot \frac{r^2}{4s} \cdot \left(1 + \frac{h^2}{r^2}\right) \quad (2.2)$$

Die Herleitung erfolgt in Kapitel 3.7.3 ab Seite 52. Die Formel hat den entscheidenden Vorteil, dass sie nicht von Materialparametern abhängt, sondern nur von geometrischen Faktoren. Die einzige Voraussetzung ist, dass die Dicke der Membran erheblich kleiner ist als der Radius der hypothetischen Kugel. Dies ist im Fall der CellDrum-Membran gegeben, da:

$$3,4 \mu\text{m} \ll 16.000 \mu\text{m}$$

2.4.1 PDMS als Zellkulturmaterial

Polydimethylsiloxan (PDMS) ist ein Polymer, bestehend aus $-\text{OSi}(\text{CH}_3)_2-$ Monomeren. Silicium und Sauerstoff bilden alterierend die Hauptkette, während zwei Methylgruppen am Silicium gebunden sind. Bei dem hier verwendeten Elastomer *Sylgard 184* (Dow Corning, Midland, MI, USA) handelt es sich um ein Vinyl-terminiertes PDMS (Abbildung 11 A).

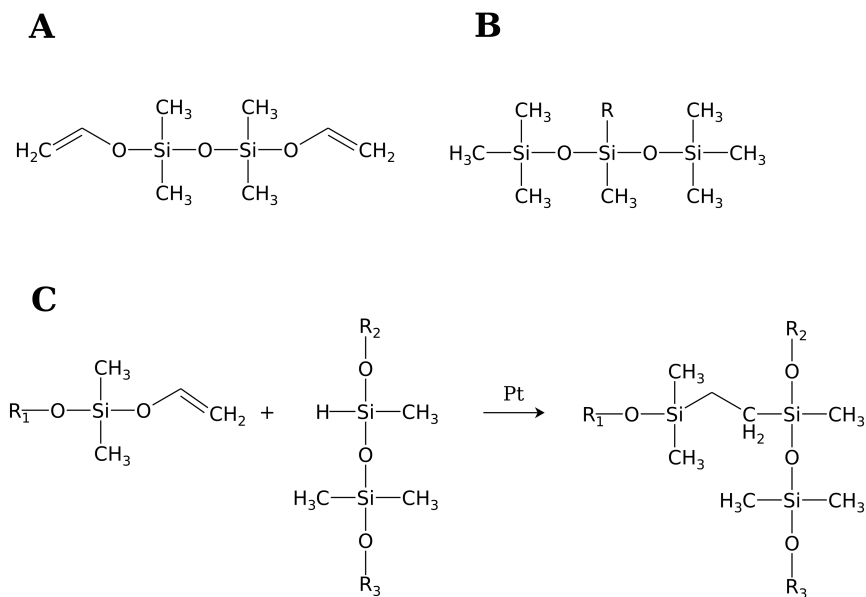


Abbildung 11: A: Vinyl-terminiertes PDMS. B: Cross-Linker. C: Polymerisation des Elastomers.

Die Vinyl-Funktion ermöglicht eine Platin-katalysierte Quervernetzung mit Cross-Linkern. Bei diesen handelt es sich um PDMS-Moleküle, bei denen ein geringer Prozentsatz der Methylgruppen durch Hydride substituiert ist (Abbildung 11 B). Unter Platin-Katalyse entsteht aus dem vinyl-terminierten PDMS und den Cross-Linkern ein Elastomer (Abbildung 11 C).

Polydimethylsiloxan-Elastomere finden vermehrt Anwendung in der Mikrofluidtechnik, insbesondere in so genannten „lab-on-a-chip“-Systemen. Die Gründe hierfür liegen in den vorteilhaften Materialeigenschaften, wie:

- Flexibilität:

PDMS-Elastomere reißen – abhängig von der exakten Zusammensetzung und den Verarbeitungsbedingungen – bei Dehnungen von 350 – 1200 %.⁶⁶ Dies überschreitet die physiologischen Dehnungen, denen natürliche Gewebe ausgesetzt sind, um Größenordnungen.

- einfache Verarbeitbarkeit:

Kommerziell erhältliche PDMS-Elastomere wie z.B. *Sylgard 184* werden als 2-Komponenten-Kits angeboten. Zur Herstellung von hoch standardisierten Zellkultur-Substraten ist lediglich eine präzise Einwaage der Komponenten auf

laborüblichen Feinwaagen ausreichend.

- optische Transparenz:

Diese ermöglicht die mikroskopische Untersuchung der Zellkulturen auf dem Substrat und somit die kontinuierliche Kontrolle von Vitalität und Morphologie.

- chemische Beständigkeit:

PDMS-Elastomere kommen ohne den Einsatz von Weichmachern und anderen Additiven aus. Bei vorschriftsmäßiger Herstellung des Elastomers unter Einhaltung der stöchiometrischen Verhältnisse von Polymer und Vernetzer ist das Endprodukt hoch inert und es kommt zu keiner Freisetzung eventuell zytotoxischer Edukte.⁶⁶

Ein grundlegender Nachteil von PDMS ist die ausgeprägte Hydrophobie, hervorgerufen durch den hohen Anteil an Methylgruppen. Diese erschwert die Verwendung in Zellkulturanwendungen, da sie die Zelladhäsion unterbindet.⁶⁷ Darüber hinaus ist PDMS nicht in der Lage, Matrixproteine wie z.B. Fibronectin über längere Zeit zu binden. Nach klassischer Deposition von Fibronectin aus wässriger Lösung und einer siebentägigen Inkubation ohne Zellen geht die Menge des adsorbierten Proteins um 95 % zurück.⁶⁸

2.4.2 Funktionalisierung von PDMS-Oberflächen

Zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit des Materials wurde in der Vergangenheit eine Reihe von chemischen und physikalischen Verfahren entwickelt. Eine experimentell einfache Methode zur Erhöhung der Benetzbarkeit von PDMS stellt die Behandlung mit Hydrophobinen dar.⁶⁹ Hierbei handelt es sich um eine Familie von Proteinen, die von Fadenpilzen zum Zwecke der Adhäsion neu gebildeter Hyphen auf dem Wachstumssubstrat sezerniert wird.⁷⁰ An Grenzflächen zwischen hydrophilen und hydrophoben Medien bilden sie spontan amphipathische Monolagen, die als Adhäsionssubstrat für weitere Proteine und Zellen dienen können.⁷¹ Die hierdurch erreichte Adhäsionskraft der Proteine zum PDMS durch hydrophobe Wechselwirkungen liegt jedoch im niedrigen Nanonewton-Bereich (~15 nN), wodurch

zwar die Adhäsion von weiteren Proteinen ermöglicht wird, aber die Kultur von adhären Zellen nicht ausreichend gefördert wird. Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit ist die Modifikation der Oberfläche durch Sol-Gel-Methoden, die jedoch die Benetzbarkeit nur unwesentlich erhöhen.⁷²

Zum Erreichen höherer Bindungskräfte werden bifunktionelle *Silane* eingesetzt, die eine kovalente Bindung von Proteinen mit dem PDMS ermöglichen.⁷³ Um dies zu erreichen, ist eine Aktivierung der Oberfläche des PDMS durch Substitution von Methylgruppen durch Hydroxylgruppen nötig. Gängige physikalische Verfahren sind die Behandlung mit einem Sauerstoff-Plasma^{74,75} oder mit ultravioletter Strahlung unter Bildung von Ozon.^{76,77} Neben den physikalischen Verfahren zur Oberflächenaktivierung existieren auch nasschemische Verfahren, die auf säure- oder basenkatalysierter Oxidation der PDMS-Oberfläche basieren.^{67,73,78} Diese sind mit einem vergleichsweise geringen experimentellen Aufwand verbunden somit unter Einsatz laborüblicher Geräte möglich.

Allen beschriebenen Verfahren ist gemein, dass die Aktivierung der PDMS-Oberfläche nicht persistent ist. Aufgrund der niedrigen Glasübergangstemperatur von PDMS (-115°C)⁷⁹ und der damit einhergehenden Migration der Polymerketten bei Raumtemperatur werden die oxidierten Ketten mit der Zeit durch unmodifizierte Ketten aus dem Inneren des Elastomers ersetzt. Dieser Vorgang findet im Zeitraum von wenigen Stunden⁷⁷ bis wenigen Tagen⁷⁵ statt.

Vor der Migration der oxidierten Polymerketten in das Innere des Elastomers ermöglicht die Aktivierung der PDMS-Oberfläche die kovalente Bindung einer Schicht von Organosilanen. Hierbei handelt es sich um bifunktionelle Moleküle, die sowohl eine anorganische Domäne als auch eine organische Domäne besitzen (Abbildung 12).

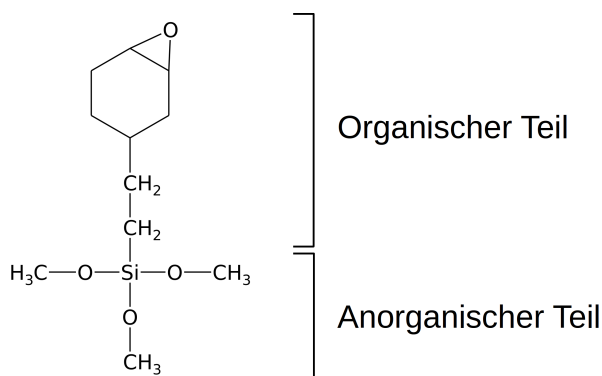


Abbildung 12: Trimethoxy[2-(7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-yl)ethyl]silan

Nach Aktivierung der Oberfläche bildet sich unter Hydrolyse eine kovalente Bindung der anorganischen Domäne des Siloxans mit der durch Oxidation erzeugten Hydroxylgruppe der Hauptkette des PDMS aus. Darüber hinaus kommt es zur Polymerisation der Organosilan-Monomere auf der Oberfläche des PDMS. Die Reaktion läuft in folgenden Schritten ab:

1. Hydrolyse des Silans:

In wässrigen Systemen kommt es unter Hydrolyse zur Abspaltung der drei Alkohole von der anorganischen Domäne des Silans (Abbildung 13).⁸⁰

2. Polymerisation:

Das entstandene Trihydroxy-Organosilan polymerisiert nun spontan sowohl an den Hydroxyl-Gruppen auf der Oberfläche des PDMS als auch mit weiteren Silan-Monomeren. Die Polymerisation wird durch ein saures Milieu begünstigt.⁸¹

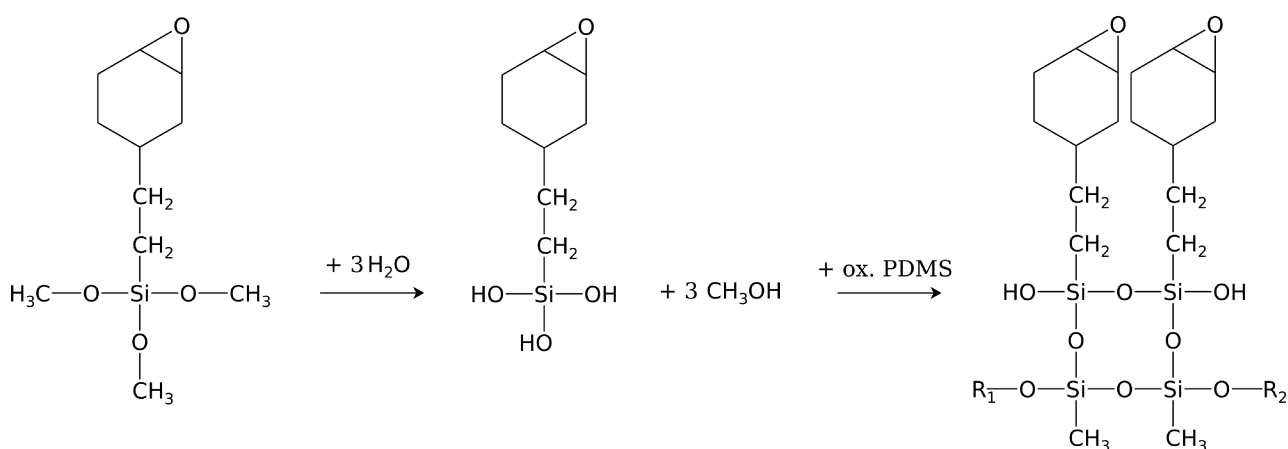


Abbildung 13: Funktionalisierung der oxidierten PDMS-Oberfläche

Nach der Konjugation des Silans an der PDMS-Oberfläche erfolgt die kovalente Bindung von Matrixproteinen an seiner organischen Domäne. Hierfür bieten sich speziell Epoxy-Gruppen an, da diese in der Lage sind, mit Protein-Seitenketten wie Thiol-, Hydroxyl- und primären Aminogruppen zu reagieren.⁸² Bei der säurekatalysierten nucleophilen Addition kommt es im ersten Schritt zu einer Protonierung des Sauerstoff-Atoms des Epoxy-Rings. In der Folge kommt es zum nucleophilen Angriff der Amino-Seitenkette der Proteins auf ein benachbartes Kohlenstoff-Atom.⁸³

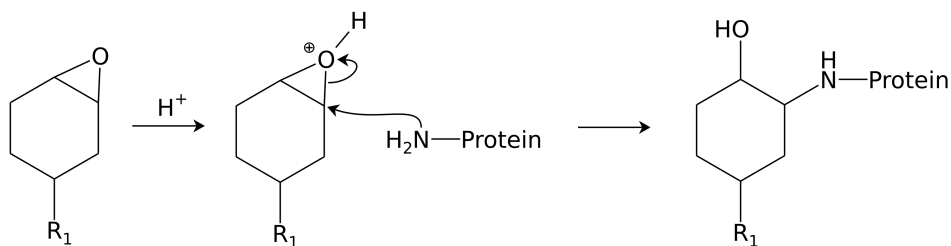


Abbildung 14: Nucleophile Addition von Matrix-Proteinen an Epoxy-Silane unter saurer Katalyse

2.5 Induzierte pluripotente Stammzellen

Stammzellen unterscheiden sich durch zwei wesentliche Merkmale von adulten Körperzellen: Zum einen sind sie in der Lage, sich unendlich oft unter Erhalt ihrer Eigenschaften zu teilen. Zum anderen können sie zu funktionalen, somatischen Körperzellen differenzieren. Dabei werden Stammzellen nach ihren Differenzierungsfähigkeiten (Fähigkeit = *Potenz*) eingeteilt in:

- totipotent: Aus diesen Zellen kann sich ein neuer Organismus entwickeln
- pluripotent: Können zu jeder Art Körperzelle differenzieren
- multipotent: Differenzierung innerhalb einer der drei Keimbahnen möglich
- adult: Nur noch gewebespezifische Differenzierung möglich (z.B. Herz-Kreislauf- System, Nervensystem)

Zur Entwicklung induzierter pluripotenter Stammzellen haben im Wesentlichen drei wissenschaftliche Strömungen beigetragen:⁸⁴

Im Jahr 1962 transplantierten *John Gurdon et al.* somatische Zellkerne aus dem Darm-Epithel des afrikanischen Krallenfroschs (*Xenopus laevis*) in unbefruchtete Eizellen des Spender-Organismus.⁸⁵ Dadurch ist es ihnen gelungen, exakte Abbilder (Klone) des Spender-Organismus zu erzeugen. Es dauerte weitere 35 Jahre, bis dies auch bei Säugetieren gelang („Klonschaf“ Dolly). Aus diesen Versuchen leiten sich zwei fundamentale Erkenntnisse zur Embryonalentwicklung ab: Erstens beinhaltet der Zellkern jeder Körperzelle alle genetischen Informationen, die zur Entwicklung eines neuen Organismus benötigt werden. Zweitens ist die Empfänger-Eizelle in der Lage, den somatischen Zellkern dahingehend zu „reprogrammieren“, dass er statt seiner gewebespezifischen Aufgabe die Entwicklung eines neuen Organismus steuert. Gurdon folgerte, dass die Eizelle Faktoren besitzen müsse, die dies bewerkstelligen können. Retrospektiv betrachtet handelt es sich bei diesen Faktoren entweder um regulatorische Proteine oder um so genannte *small molecules*. Letztere sind definiert als Moleküle, deren Molekülmasse unter ca. 800 g mol^{-1} liegen. Beiden gemein ist ihre regulatorische Funktion auf die Genexpression. Aufbauend auf diese Erkenntnis entwickelte sich der zweite Wissenschafts-Zweig, der maßgeblich zur Entwicklung von iPS-Zellen beitrug:

Rund 25 Jahre nach den Entdeckungen von Gurdon und Kollegen wurden die ersten Faktoren identifiziert, die eine gerichtete Differenzierung von Stammzellen *in-vitro* ermöglichen: Der Transkriptionsfaktor *Antennapedia* der Taufliege *Drosophila melanogaster* wurde erstmals im Jahr 1987 beschrieben und bewirkt das Wachstum von Beinen anstelle von Fühlern, wenn der Embryo dem Faktor ausgesetzt wird. Im gleichen Jahr wurde auch der erste humane Transkriptionsfaktor entdeckt: MyoD bewirkt die Differenzierung von Fibroblasten zu Muskelzellen, wodurch er von entscheidender Bedeutung für die Regeneration verletzten Muskelgewebes ist.

Neben der Transplantation von Zellkernen in Eizellen und der Entdeckung von Transkriptionsfaktoren trug eine weitere wissenschaftliche Strömung maßgeblich zur Entwicklung induzierter pluripotenter Stammzellen bei: Die Forschung an embryonalen Stammzellen brachte essentielle Erkenntnisse über die *in-vitro* Kultivierung von Stammzellen aller Art. Zuerst wurden Experimente an embryonalen Stammzellen der Maus durchgeführt, seit der Jahrtausendwende auch an humanen. Aufgrund der Tatsache, dass Stammzellen in Kultur zur spontanen und ungerichteten

Differenzierung neigen und somit ihre zentrale gewünschte Eigenschaft verlieren, wurden seit den frühen 1980'er Jahren große Anstrengungen unternommen, die Differenzierung gezielt zu unterdrücken. Eine Schlüsselrolle hierbei spielt der leukämiehemmende Faktor (LIF), der es ermöglicht, die Differenzierung zu unterdrücken und somit die Stammzellen im proliferierenden Zustand zu erhalten.

Inspiziert durch die Möglichkeit, die Differenzierung von Stammzellen sowohl zu steuern als auch zu verhindern, suchte Shin'ya Yamanaka nach den Faktoren, durch die die unbefruchtete Eizelle in Gurdons Experimenten in der Lage war, einen somatischen Zellkern in den Zustand der Pluripotenz zurückzusetzen. Aus 24 Kandidaten identifizierte er die vier Transkriptionsfaktoren *c-Myc*, *Klf-4*, *Oct-4* und *Sox-2*, welche es in dieser Kombination ermöglichten, aus terminal differenzierten Zellen pluripotente Stammzellen zu generieren. Diese Zellen nannte er induzierte pluripotente Stammzellen. Aus ihnen ist es möglich, jeden Zelltyp des Körpers zu erzeugen.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Vorkultur der verschiedenen Zelltypen

Sowohl hiPS-abgeleitete Kardiomyozyten als auch H9c2-Zellen wurden bei 37 °C in feuchter Atmosphäre (relative Feuchtigkeit > 90 %) mit 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert.

HiPS-abgeleitete Kardiomyozyten (Cor.4U, Axiogenesis AG, Köln) wurden in *Cor.4U-Kulturmedium* kultiviert. Während der ersten drei Wochen in Kultur wurden die Zellkulturen einmal pro Woche für 24 Stunden mit 5 µg mL⁻¹ Puromycin behandelt um undifferenzierte, proliferierende Zellen selektiv zu entfernen.

H9c2-Zellen wurden in einem Medium aus 90 % DMEM (high glucose) und 10 % fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70-80 % wurden die Zellen dissoziiert (siehe nächster Abschnitt) und in einer Konfluenz von 20-30 % neu ausplattiert.

Kardiale Fibroblasten (Fibro.Cor, Axiogenesis AG, Köln) wurden in *Cor.4U-Kulturmedium* kultiviert. Nach Erreichen einer Dichte von 70-80 % Konfluenz wurden sie dissoziiert und mit 40-50 % Konfluenz replattiert. Sobald eine ausreichende Anzahl an Zellen zur Verfügung stand, wurden die Zellen mit *Mitomycin C* (MMC) inaktiviert, um die weitere Proliferation zu verhindern. Hierzu wurden die Zellen mit *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) gespült und nachfolgend mit MMC (10 mg mL⁻¹) in Kulturmedium für 2 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und für mindestens 24 Stunden zur Erholung in Kulturmedium inkubiert. Zur Aussaat wurden sie wie folgt dissoziiert:

3.1.2 Dissoziation

Das Ablösen der Zellen erfolgte durch enzymatische Dissoziation. Hierzu wurden die Zellen mit DPBS ohne Calcium und Magnesium gespült, um überschüssiges Protein, Calcium und Magnesium auszuwaschen. Danach erfolgte die Dissoziation mit Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 % in PBS) für 5 min bei 37 °C. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium wurde die Reaktion nach 4 min gestoppt. Nach Zentrifugation mit 100 g für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Zell-Pellet in 1 mL Medium resuspendiert. Nachfolgend wurde die Zellzahl mit Hilfe eines Neubauer-Hämozytometers bestimmt.

3.1.3 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie im vorherigen Abschnitt dissoziiert. Das Zell-Pellet wurde in einem Kryo-Medium aus 90 % FCS und 10 % DMSO aufgenommen und in Kryoröhrchen zu je 1 mL verteilt. Diese wurden in Kryocontainern mit Isopropanol-Füllung („*Mr. Frosty*“, Nalge Nunc Inc., Penfield, NY, USA) platziert und über Nacht auf -80 °C abgekühlt. Daraufhin wurden die Kryoröhrchen zur Dauerlagerung in die Gasphase eines Flüssigstickstoff-Tanks überführt.

3.2 CellDrum-Herstellung

Als Basismaterial der CellDrum-Membranen diente das PDMS-Elastomer *Sylgard 184* (Dow Corning, Midland, MI, USA). Hierbei handelt es sich um ein Zwei-Komponenten-System, bestehend aus einer Basis und einem Vernetzer, die in einem Verhältnis von 10:1 vermischt wurden. Nach einer Rührzeit von zwei Minuten wurde die viskose Flüssigkeit für weitere 2 min in einem Exsikkator bei <100 mbar entgast. Nach einer Ruhezeit von 5 min waren alle Blasen verschwunden und das noch flüssige Silikon zur Herstellung der Membranen bereit.

Hierzu wurden die Wells von 6-Well-Multiwell-Schalen mit 10,5 mL entionisiertem Wasser befüllt. Auf die Wasseroberflächen wurden je 3,4 μL flüssiges PDMS pipettiert. Die applizierten PDMS-Tropfen bildeten nach einer Ruhezeit von 5 min einen homogenen Film auf der Wasseroberfläche. Danach wurden die Membranen mittels Infrarotstrahlung (150 W IR-Leuchte, 23 cm Abstand) für 20 min vorvernetzt (siehe Abbildung 15 A). Im Anschluss wurden die Membranen mithilfe einer speziell angefertigten Apparatur (Abbildung 15 B) durch Adhäsionskraft von der Wasseroberfläche aufgenommen und auf Polycarbonat-Ringe übertragen (Abbildung 15 C und D). Die finale Vernetzung erfolgte durch Autoklavieren (121 °C, 2 bar, 20 min).

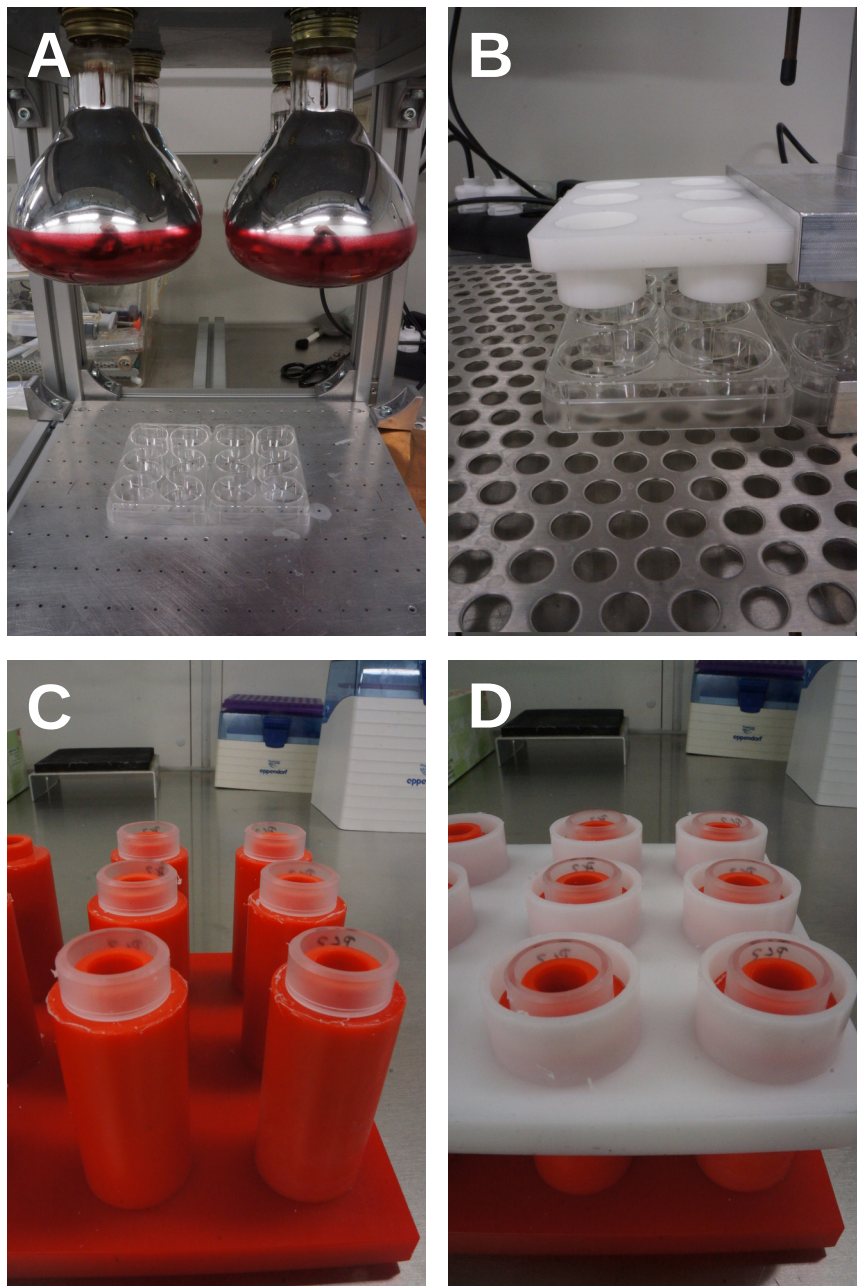


Abbildung 15: Apparaturen zur CellDrum-Herstellung. A: Infrarot-Leuchten zur Voraushärtung. B: Vorrichtung zur Abnahme der Membranen von der Wasseroberfläche. C: CellDrum-Ringe auf Zentrier-Station. D: Übertragung der Membranen auf CellDrum-Ringe.

3.3 CellDrum-Funktionalisierung

Die Funktionalisierung erfolgte in einem Vier-Schritt-Verfahren. Alle Gebrauchslösungen wurden unmittelbar vor der Funktionalisierung hergestellt.

Oxidation:

Hierzu wurden die CellDrums mit 500 μL einer Lösung aus entionisiertem Wasser, Salzsäure (36-38 %) und Wasserstoffperoxid (30 %) im Verhältnis⁶⁷ 5:1:1 für 30 Minuten behandelt. Danach wurden die CellDrums dreimal mit je 500 μL entionisiertem Wasser gespült.

Silanisierung:

Die Silanisierung erfolgte in einem Puffer aus 95 % Isopropanol und 5 % entionisiertem Wasser, der mithilfe von Essigsäure auf einen pH-Wert von 5 eingestellt wurde.⁸¹ Die CellDrums wurden mit 200 μL einer zwei-prozentigen Silan-Lösung (Trimethoxy[2-(7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-yl)ethyl]silane, 3MOBS) in Silanisierungs-Puffer für 5 min inkubiert. Danach wurden sie mit 200 μL reinem Isopropanol gewaschen, um überschüssiges Silan zu entfernen.

Stabilisierung:

Zur Stabilisierung der Silanschicht und zur endgültigen Sterilisation wurden die CellDrums autoklaviert (1 bar Überdruck, 121 °C, 20 min).

Bindung des Matrix-Proteins:

Die Abscheidung des Matrix-Proteins (Fibronectin) erfolgte in MES-Puffer (50 mM MES in entionisiertem Wasser), der mithilfe einer Natriumhydroxid-Lösung (1 M) auf einen pH-wert von 6 eingestellt wurde. Die Fibronectin-Lösung (1 mg mL⁻¹) wurde in einem Verhältnis von 1:100 im Matrix-Puffer verdünnt. Die CellDrums wurden mit je 500 μL der Lösung für 18 bis 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

3.4 Charakterisierung der Funktionalisierung

3.4.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Bei der Rasterelektronenmikroskopie handelt es sich um ein topografisches Mikroskopieverfahren, bei dem die Probe von einem feinen Elektronenstrahl abgerastert wird. Bei diesem Prozess entsteht eine Vielzahl verschiedener Signale, die für verschiedene Analysemethoden eingesetzt werden können. Am häufigsten analysiert werden Sekundärelektronen und die Röntgenfluoreszenz.

Als Elektronenquelle dient in der Regel ein LaB₆-Kristall. Diese Art der Elektronenstrahlerzeugung zeichnet sich durch einen kleineren Kreuzungspunktdurchmesser (10 µm) als bei älteren Modellen mit einem Wolfram-Draht (50 µm) aus.⁸⁶ Noch erheblich bessere Ergebnisse liefern sogenannte Feldemissionsquellen, bei denen es sich um ultrafeine (100 nm und weniger) Wolfram- oder Kohlenstoffkathoden handelt, die Kreuzungspunktdurchmesser um 10 nm liefern. Ihr Nachteil ist, dass ein höheres Vakuum erzeugt werden muss.

Durch Anlegen einer hohen Spannung (bis 50 kV) an die Elektronenquelle werden Elektronen aus dem Material herausgelöst und durchqueren die ringförmige Anode der Elektronenquelle. Hinter der Anode befindet sich ein Spulensystem (magnetische Kondensorlinse), das der Verengung des Elektronenstrahls dient (Abbildung 16). Bevor der Elektronenstrahl auf die Probe trifft, wird er durch ein weiteres Spulensystem, die magnetische Objektivlinse, auf die abzutastende Vergrößerung eingestellt. Gleichzeitig wird er durch zwei Paare von Abtastspulen in x- und y-Richtung abgelenkt, wodurch das Abrastern der Probe erreicht wird.

Da es bei nichtleitenden Proben zu Artefakten durch statische Aufladung kommt, werden solche Proben in der Regel durch Vakuumbedampfen – sogenanntes *Sputtern* – mit Metallen wie Silber oder Gold bzw. deren Legierungen oberflächlich leitfähig gemacht.

Wie zuvor erwähnt kann es zu vielseitigen Wechselwirkungen des Elektronenstrahls mit der Probe kommen. Die am häufigsten zur Visualisierung eingesetzte Methode ist

die Detektion der Sekundärelektronen. Diese entstehen durch eine Wechselwirkung beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Oberfläche der Probe. Grund hierfür ist die Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit schwach gebundenen Elektronen des Leitungsbandes der leitenden Oberfläche der Probe. Die resultierenden Sekundärelektronen besitzen Energien im Bereich von 3-5 eV.⁸⁶ Die topografische Darstellung ist durch die Positionierung des Detektors begründet. Flächen, die zum Detektor hin gerichtet sind, erscheinen im Bild heller, da die Anzahl der Sekundärelektronen, die von dort aus den Detektor erreichen, höher ist als bei Flächen, die dem Detektor abgewandt sind.

Darüber hinaus können über die Röntgenfluoreszenz auch Aussagen über die Zusammensetzung der untersuchten Probe gemacht werden. Hierzu wird das Verfahren der *energiedispersiven Röntgenspektroskopie* (EDX) verwendet. Trifft der Elektronenstrahl auf die Atome der Probe, so werden kernnahe Elektronen aus ihrem Orbital herausgeschlagen. Diese werden durch Elektronen aus höheren Orbitalen ersetzt. Bei diesem Prozess wird Röntgenstrahlung frei, die mittels eines EDX-Detektors detektiert wird. Die Energie der freigesetzten Röntgenquanten ist charakteristisch für jedes Element. Durch Auftragung der Häufigkeitsverteilung der Energieniveaus lässt sich die Zusammensetzung der Probe qualitativ anhand der Peaks bestimmen.

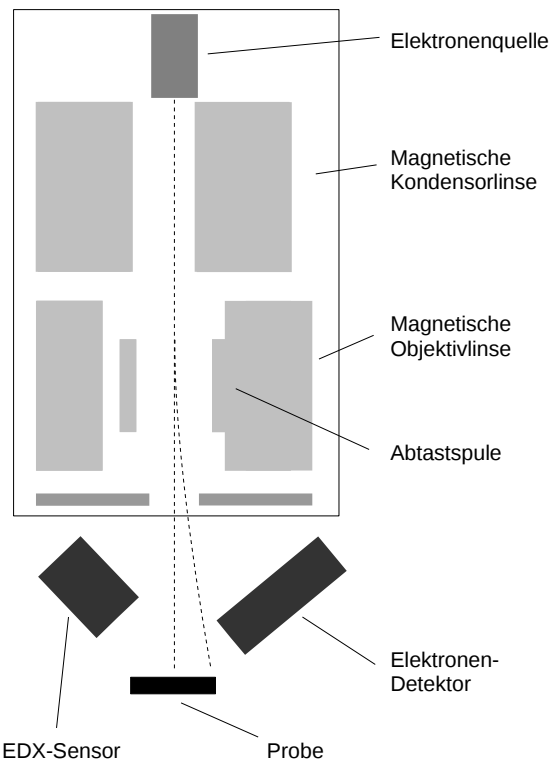


Abbildung 16: Skizzierter Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops

3.4.2 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie basiert auf der Messung der Absorption elektromagnetischer Strahlung im ultravioletten (200-400 nm) und sichtbaren Spektralbereich (400-800 nm). Die gemessene Absorption ist hier die Aufnahme von Lichtquanten durch Valenzelektronen, die in nicht- oder antibindende Orbitale übergehen ($n \rightarrow \pi^*$ oder $\pi \rightarrow \pi^*$). Das resultierende Bandenmuster aus absorbierten und nicht-absorbierten Spektralbereichen ist charakteristisch für die in der Probe vorkommenden chemischen Bindungen.

Ein Photometer besteht aus einer polychromatischen Lichtquelle, einem Monochromator und einem Detektor (z.B. Photozelle). Der Monochromator ermöglicht die Bestimmung der Absorption in variablen, engen Wellenlängenbereichen. Es wird grundsätzlich gegen eine Nullprobe gemessen, z.B.

durch eine Küvette mit Lösungsmittel für flüssige Proben oder durch umgebendes Gas für feste Proben. Dies kann sequentiell geschehen (Ein-Strahl-Photometer) oder gleichzeitig mittels eines Strahlteilers (Zwei-Strahl-Photometer). Der Grund hierfür ist, dass sowohl die Intensität der eintreffenden Strahlung I_0 als auch die Intensität der durchtretenden Strahlung I (abzüglich aller nicht-probenbezogener Effekte wie Küvettenmaterial, Lösungsmittel und umgebendes Gas) bekannt sein müssen. Mit diesen zwei Messwerten lässt sich die wellenlängenspezifische Absorption durch das *Lambert-Beersche Gesetz* ermitteln:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (3.1)$$

A = Absorption

I_0 = Intensität eintreffender Strahlung

I = Intensität durchtretender Strahlung

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

c = Konzentration der Probe

d = Schichtdicke der Probe

Wie in Kapitel 3.2 erläutert, wurden die CellDrum-Membranen durch die Vernetzung eines Films von 3,4 μL PDMS auf den Wasseroberflächen der Wells von 6-Well-Platten hergestellt. Mit der Oberfläche von 1000 mm^2 eines einzelnen Wells ergibt sich eine theoretische mittlere Membrandicke von:

$$h = \frac{V}{A} = \frac{3,4 \text{ mm}^3}{1000 \text{ mm}^2} = 3,4 \cdot 10^{-3} \text{ mm} = 3,4 \mu\text{m} \quad (3.2)$$

Zur Bestimmung der tatsächlichen Dicke der CellDrum-Membranen wurde ein Interferenz-basiertes spektroskopisches Verfahren eingesetzt.

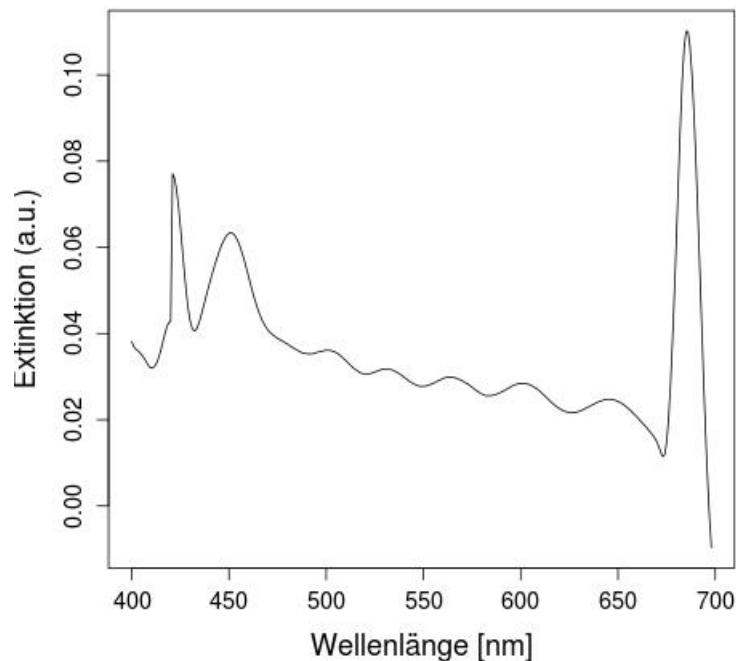


Abbildung 17: UV/Vis-Spektrum einer PDMS-Membran mit Interferenz-Mustern zwischen 500 und 650 nm.

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den Membranen um transparente dünne Schichten handelt, deren Brechungsindex von Luft abweicht, kommt es beim Durchtritt von polychromatischem Licht zu charakteristischen Interferenz-Mustern, deren Frequenz von der Schichtdicke abhängt (siehe Abbildung 17). Im Falle von konstruktiver Interferenz beträgt die Schichtdicke ein Vielfaches der Wellenlänge. Somit durchläuft das Messsignal ein Minimum der Extinktion, da sich hier Wellen mit gleicher Phase überlagern und somit addieren. An diesen Extrema gilt:

$$\lambda = \frac{2 \cdot n \cdot d}{m} \quad (3.3)$$

wobei λ die Wellenlänge bezeichnet, n den Brechungsindex von *Sylgard 184* PDMS (1,4118, Dow Corning Product information Sheet), d die Schichtdicke und m die Interferenz-Ordnung. Da bei der Betrachtung nur eines Extinktions-Minimums theoretisch unendlich viele (diskrete) Schichtdicken infrage kommen, werden zwei benachbarte Extrema untersucht:

$$\lambda_1 = \frac{2 \cdot n \cdot d}{m_1} \quad \wedge \quad \lambda_2 = \frac{2 \cdot n \cdot d}{m_2} \quad (3.4)$$

Da es sich um zwei benachbarte Minima handelt, gilt für die Interferenz-Ordnungen:

$$m_2 = m_1 + 1 \quad (3.5)$$

Einsetzen von Formel (3.5) in (3.4) ergibt:

$$\lambda_1 = \frac{2 \cdot n \cdot d}{m_1} \quad \wedge \quad \lambda_2 = \frac{2 \cdot n \cdot d}{m_1 + 1} \quad (3.6)$$

Durch Gleichsetzen und Auflösen ergibt sich:

$$m_1 = \frac{\lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2} \quad (3.7)$$

Durch Einsetzen in Formel (3.6) und Umstellen ergibt sich:

$$d = \frac{\lambda_1 \cdot \lambda_2}{2 \cdot n \cdot (\lambda_1 - \lambda_2)} \quad (3.8)$$

Zur Bestimmung der Membran-Dicken von Stichproben der hergestellten CellDrums wurden die Membranen durch Adhäsion auf Probenhalter (Abbildung 18) eines UV-Vis-Spektralphotometers (Jasco V-550, Jasco Deutschland GmbH, Groß-Umstadt, Deutschland) übertragen. Daraufhin wurden die Spektren der Membranen im Wellenlängenbereich von 400 bis 700 nm aufgenommen.

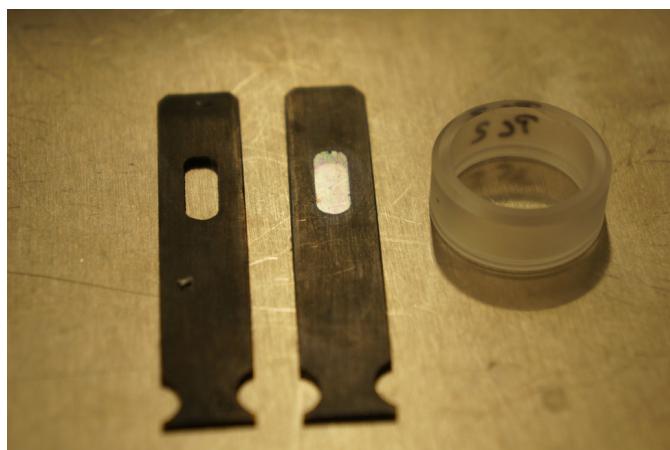


Abbildung 18: Probenhalter ohne (links) und mit CellDrum-Membran (mitte). Rechts: CellDrum-Ring zum Größenvergleich.

Zur Auswertung wurde eine Software in der Programmiersprache *R* entwickelt (siehe Anhang 7.1.1). Diese liest die .csv-Datei des Spektrums ein und extrahiert den zu untersuchenden Spektralbereich ohne materialspezifische Absorptionsmaxima (520 bis 660 nm). Daraufhin wurden die Minima mittels *Automated Multi-Scale-Based Peak Detection* (AMPD, siehe 3.7.4) ermittelt und die Schichtdicke anhand der ersten zwei ermittelten Peaks berechnet.

3.4.3 Infrarot-Spektroskopie

Der instrumentelle Aufbau eines Infrarot-Spektrometers gleicht grundsätzlich dem eines UV/Vis-Spektrometers mit der Ausnahme, dass der Detektor aufgrund des eingesetzten Wellenlängenbereichs gekühlt werden muss, um thermisches Hintergrundrauschen zu verhindern. Die Absorption beruht auf der Aufnahme von weniger energetischer Photonen im Wellenlängenbereich von 2,5-25 μm . Die aufgenommene Energie wird vor allem in Vibrationsschwingungen der chemischen Bindungen in der Probe umgewandelt. Da diese Schwingungen für funktionelle Gruppen spezifisch sind, lassen sich diese nachweisen und quantifizieren.

3.5 Messdatenerfassung mittels Tissue-Tension-Analyzer

Zur Erfassung der Messdaten wurden die CellDrums in den Messkopf des Tissue-Tension-Analyzer eingesetzt (Abbildung 19). Dieser ist durch ein Ring-Heizelement (2) umgeben, das es ermöglicht, die CellDrums während der Messung bei der physiologischen Temperatur von 37 °C zu halten. Die Kammer unterhalb der CellDrum ist durch ein Sichtfenster abgeschlossen und mit einem pneumatischen System (3) verbunden, das aus einer Spritzenpumpe und einem Magnetventil besteht. Hierdurch ist es möglich, die Deflektion der CellDrum-Membran einzustellen und gleichzeitig den Druck zu erfassen. Ebenfalls unterhalb der Messkammer ist ein

Lasertriangulationssensor (4) angebracht, der durch das Sichtfenster hindurch die Deflektion der CellDrum-Membranen erfasst.

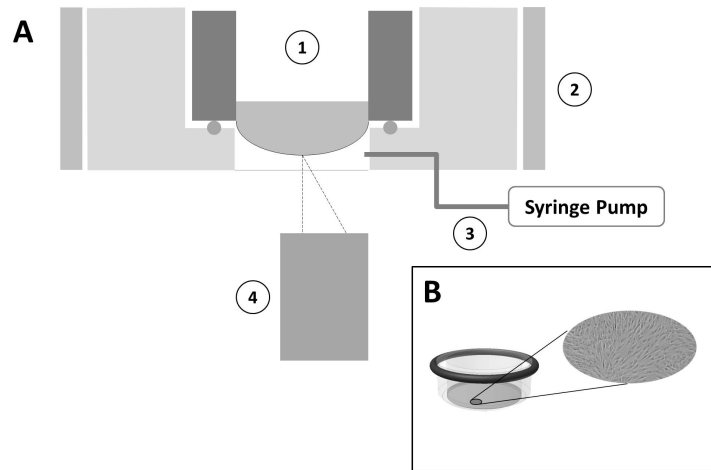


Abbildung 19: Skizzierter Querschnitt des Messkopfes.
1: CellDrum. 2: Ring-Heizelement. 3: Pneumatisches System. 4: Lasertriangulationssensor

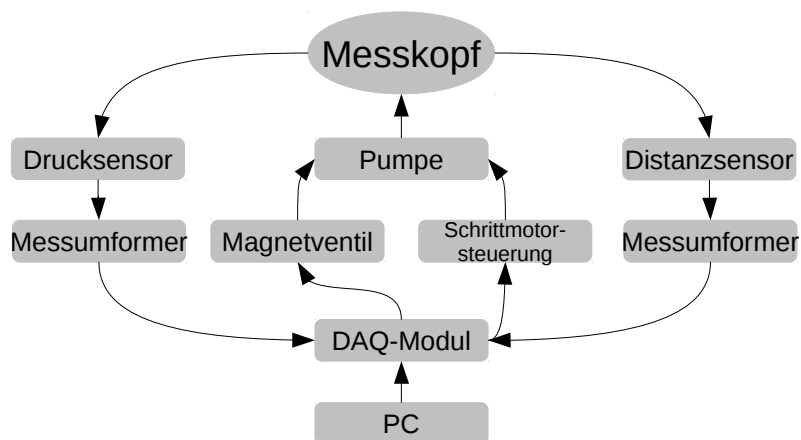


Abbildung 20: Informationsflussdiagramm des Tissue-Tension-Analyzers

Mit Ausnahme der Temperatur werden alle Parameter über ein Datenerfassungsmodul (DAQ-Modul) erfasst und gesteuert. Abbildung 20 gibt einen Überblick über den Informationsfluss zwischen den einzelnen Komponenten des Systems.

Die Hardware-Version des Tissue-Tension-Analyzers, mit der die pharmakologischen

Studien durchgeführt wurden, wurde mit Unterstützung von Peter Linder und Stephan Neumann erstellt.

3.5.1 Lasertriangulation

Die Position der CellDrum-Membran und somit die Deflektion wurde mithilfe eines Lasertriangulationssensors (LK-031, Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) ermittelt. Das Verfahren der Lasertriangulation besitzt ein potentiell hohes Auflösungsvermögen, das in umgekehrter Proportionalität zum Messbereich steht. So ist durch die Reduzierung des Messbereichs eine sehr hohe Auflösung von $1\ \mu\text{m}$ möglich.

Bei diesem Messverfahren wird durch eine Laser-Diode ein sichtbarer Punkt auf die Oberfläche eines Objekts – in diesem Fall auf die Mitte der CellDrum-Membran – projiziert. Die Position des Reflexpunkts in z-Richtung wird durch einen CCD-Sensor, der sich neben der Laser-Diode befindet, kontinuierlich erfasst.

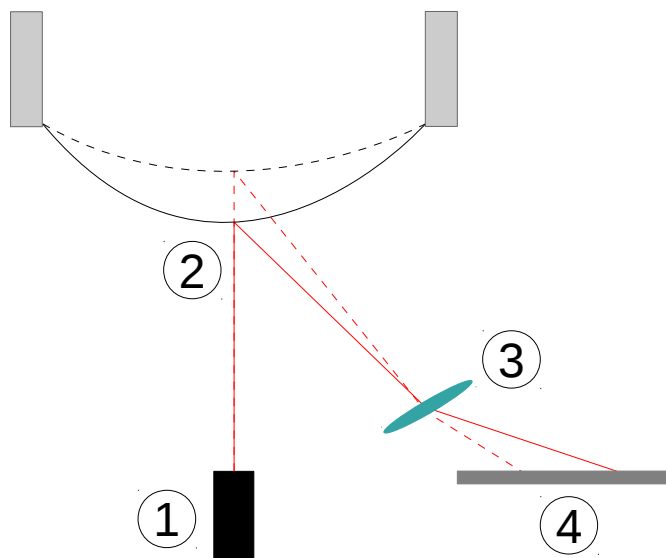


Abbildung 21: Prinzipskizze der Lasertriangulation. 1: Laser-Emitter. 2: CellDrum-Membran. 3: Optik. 4: CCD-Sensor

Der verwendete Sensor hatte eine Auflösung von $1\ \mu\text{m}$ bei einem Messbereich von $\pm 5\ \text{mm}$. Bei Verwendung des kompletten Messbereichs von $10\ \text{mm}$ und der Auslenkung der Membran in eine Richtung aus Nulllage ergab sich nach Formel

(3.12) eine maximal erfassbare Dehnung ($\epsilon = \Delta L / L_0$) von 83,7 %.

$$b = \frac{\arctan\left(\frac{2 \cdot h}{s}\right) \cdot (4 \cdot h^2 + s^2)}{2 \cdot h} \quad (3.9)$$

b: Bogenlänge

h: Auslenkung (0 mm bzw. 10 mm)

s: CellDrum-Druchmesser (16 mm)

3.5.2 Druckmessung

Die Druckmessung erfolgte mithilfe eines piezoelektrischen Drucksensors (AP-47, Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland). Dieser Sensor besitzt einen Messbereich von 0-2000 Pa.

Piezoelektrische Sensoren beruhen auf der Umwandlung von mechanischer Kraft in elektrische Energie.⁸⁷ Durch die mechanische Deformation eines Kristallgitters kommt es zur Entstehung von Dipolmomenten und somit zur Polarisierung des Materials. Die resultierende Aufladung der Oberflächen des Materials ist proportional zum aufgetragenen Druck und wird als Spannung gemessen. In modernen Drucksensoren werden vor allem Keramiken wie z.B. Blei-Zirkonium-Titanat eingesetzt, die eine höhere Polarisierbarkeit besitzen als natürliche Materialien wie Quarz oder Galliumphosphat.

3.5.3 LabView-Software

Die Software zur Aufnahme der Messsignale wurde in LabView (LabView 10, National Instruments Corporation, Austin, TX, USA) geschrieben. Sie umfasst die grafische Darstellung der Messergebnisse und die Steuerung des pneumatischen Systems. Die grafische Benutzeroberfläche umfasst die Darstellung des aktuellen Zeitfensters der Deflektion (1a) sowie des gesamten Verlaufs seit Programmstart (1b). Gleiches gilt für den gemessenen Druck (2a,b). Darüber hinaus wird die

aktuelle Dehnung der Membran als prozentualer Anteil der Startdeflektion angezeigt (3). Der Zustand des Ventils wird mithilfe eines virtuellen Kippschalters geändert (offen/geschlossen) und durch ein virtuelles Anzeigeelement wiedergegeben (4). Durch zwei virtuelle Knöpfe wird die Spritzenpumpe des pneumatischen Systems aktiviert und ihre Hubrichtung (Überdruck/Unterdruck) bestimmt (5). Durch Betätigen des Tasters „Neue CellDrum“ (6) wird die Startdeflektion gleich 0 gesetzt. Der virtuelle Schalter „Aufnahme“ (7) speichert bei Betätigung den aktuellen Zeitstempel für den Beginn der Aufnahme. Bei erneuter Betätigung wird der Zeitstempel für die Beendigung der Aufnahme gespeichert. Dieser Vorgang kann beliebig oft wiederholt werden, um mehrere Messungen durchzuführen. Beim Beenden des Programms wird zum einen der gesamte Datenstrom gespeichert, zum anderen werden die durch Zeitstempel definierten Bereiche des Signals als einzelne Dateien zur späteren Analyse abgespeichert.

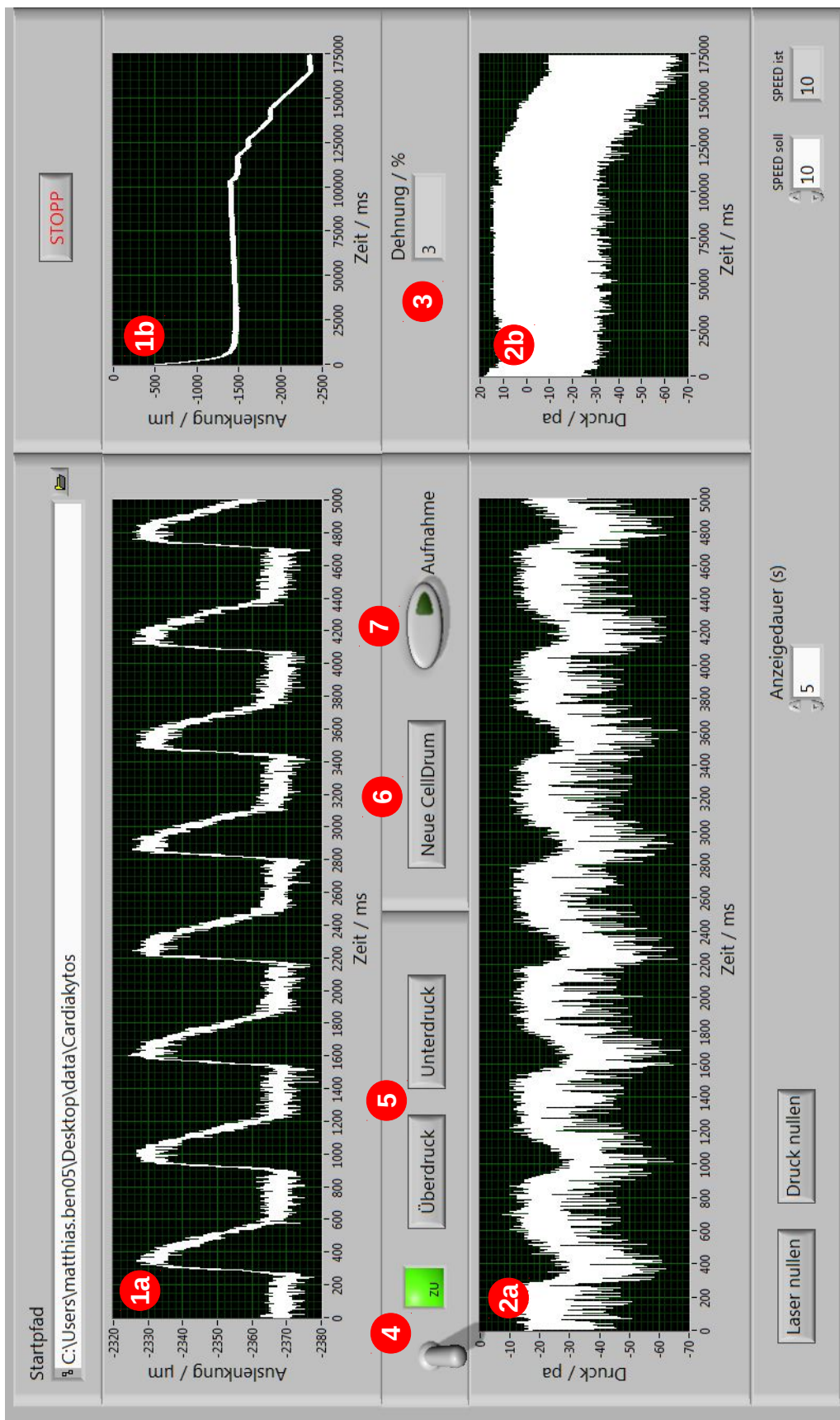


Abbildung 22: Grafische Benutzeroberfläche der Aufnahme-Software

3.6 Durchführung der Messungen

3.6.1 Mechanische Charakterisierung ohne Zellen

Es wurden die D_{500} -Werte von 48 CellDrums bestimmt und sieben CellDrums mit Werten von 1,5-1,6 mm zur weiteren Analyse ausgewählt. Diese wurden wie in Kapitel 3.3 beschrieben funktionalisiert. Nach jedem Funktionalisierungs-Schritt wurden Druck-Deflektions-Kurven aufgenommen. Hierzu wurden die CellDrums mit 500 μ L DPBS befüllt und für 15 min im Inkubator aufgewärmt. Danach wurde eine CellDrum in den Tissue-Tension-Analyser eingesetzt und zum Druckausgleich für 30 sec ruhen gelassen. Danach wurde das Ventil zur Umgebung geschlossen und die Deflektion mittels Spritzenpumpe auf 0 μ m eingestellt. Im Anschluss wurde der aktuelle Druckwert auf 0 zurückgesetzt und die Aufnahme gestartet. Die CellDrum-Membran wurden durch einen konstanten Volumenstrom der Spritzenpumpe mit einer Dehnungsrate von ca. 4 % pro Minute ausgelenkt. Beim Erreichen einer Dehnung von 20 % wurde die Aufnahme beendet und die CellDrums durch umgekehrten Volumenstrom zurück auf eine Auslenkung von 0 μ m gebracht. Nach dem Öffnen des Ventils wurde die CellDrum entnommen und eine neue eingesetzt.

3.6.2 Kultur und pharmakologische Untersuchungen an hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten und Ko-Kulturen

Monokulturen von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten wurden wie in Kapitel 3.1 beschrieben vorkultiviert und dissoziiert. Daraufhin wurden sie mit einer Aussaatdichte von 300.000 Zellen pro CellDrum in einem Volumen von 300 μ L Medium in den CellDrums ausplattiert.

Im Falle der Ko-Kulturen mit kardialen Fibroblasten wurde eine konstante Anzahl von Kardiomyozyten (300.000 Zellen pro CellDrum) mit veränderlichen Anteilen von Fibroblasten gemischt und dann in 300 μ L Kulturmedium ausgesät (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Aussaat-Schema für Ko-Kulturen

Anteil Fibroblasten	Anzahl Kardiomyozyten	Anzahl Fibroblasten	Anzahl Gesamt
0%	300000	0	300000
10%	300000	33333	333333
25%	300000	100000	400000
50%	300000	300000	600000

In beiden Fällen wurde am ersten Tag nach der Aussaat (nach 18-24 h) das Medium gegen 400 μ L neues Kulturmedium ausgetauscht. Am zweiten Tag wurde das Medium gegen das Endvolumen von 500 μ L frischen Mediums ersetzt. Von diesem Zeitpunkt an wurde das Medium täglich vollständig gewechselt.

Nach einer fünftägigen Kultur der Zellen in CellDrums wurden mit den pharmakologischen Untersuchungen begonnen. Am Tag der Messung wurde morgens bei allen CellDrums das Medium gewechselt. Die ersten Messungen wurden zwei Stunden nach dem Medienwechsel durchgeführt, die letzte ca. 6 Stunden danach.

Hierzu wurde je eine CellDrum in den Tissue-Tension-Analyzer eingesetzt und für 500 s bei geöffnetem Ventil äquilibriert. Daraufhin wurde das Ventil geschlossen und die Dehnung der Membran zurückgesetzt, sodass der aktuelle Wert einer Dehnung von 0 % entsprach. Anschließend wurde die besiedelte Membran auf eine Auslenkung von 0,5 % gebracht.

Im Anschluss wurde mit der kumulativen Substanzzugabe begonnen. Hierzu wurden 20 % des Mediums (100 μ L) abgenommen und durch das gleiche Volumen von Medium inklusive Substanz ersetzt. Aufgrund der Tatsache, dass viele pharmakologisch wirksame Substanzen nur schlecht in Wasser löslich sind, wurde zum Ansetzen der Substanz-Stammlösungen Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel gewählt. Zum Ausschluss von Einflüssen sowohl von Medienwechseln als auch vom Lösungsmittel wurde der erste Medienwechsel nur mit dem Lösungsmittel, aber ohne die Testsubstanz durchgeführt. Hierbei wurde eine Endkonzentration des Lösungsmittels im Medium von 0,1 % nicht überschritten.

Nach 5 min Inkubation wurde die Messung gestartet und 16 Kontraktions-Relaxations-Zyklen aufgenommen. Im Anschluss folgte die erste Substanz-Zugabe, wiederum durch den Austausch von 20 % des Mediums. Die Zugabe der Testsubstanzen erfolgte kumulativ, d.h. die Endkonzentration errechnete sich aus der vorherigen Dosis und der hinzugegebenen Dosis durch 20 % Mediumwechsel. Jede Dosis wurde für 5 min inkubiert und im Anschluss eine Messung analog zur Lösungsmittel-Kontrolle aufgenommen.

3.7 Messdatenauswertung

Die Kontraktions-Relaxations-Zyklen der hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten wurden auf folgende Parameter hin untersucht (Abbildung 23):

- a) Amplitude
- b) Dauer
- c) Integral
- d) Frequenz

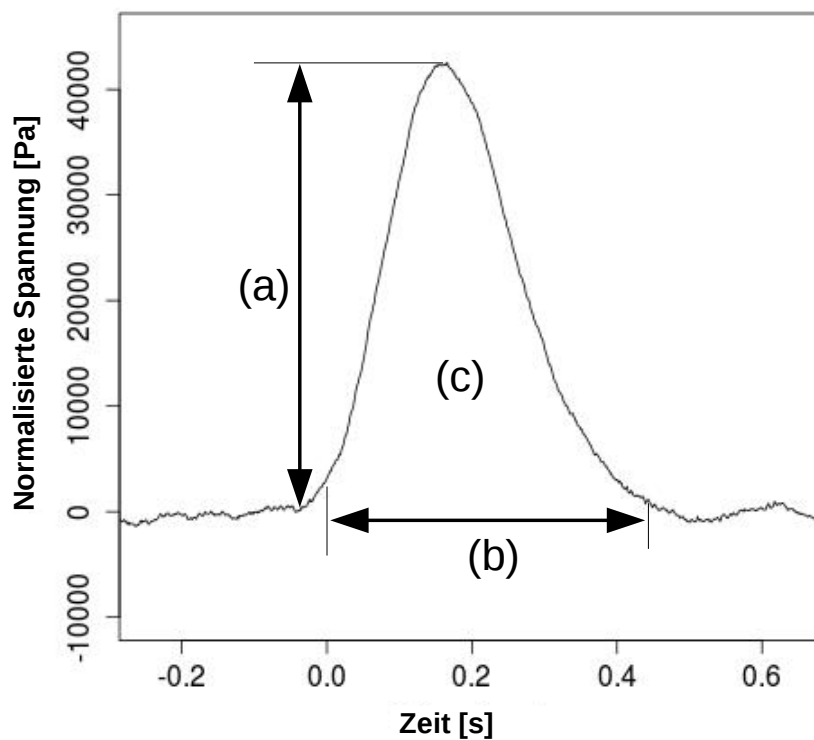


Abbildung 23: Analyse des Kontraktions-Relaxations-Zyklus.
(a): Amplitude. (b): Dauer. (c): Integral. Nicht abgebildet:
Frequenz

Zu diesem Zweck wurde eine Software in der Programmiersprache *GNU R* entwickelt, um die Rohsignale aufzuarbeiten und zu analysieren. Die grundsätzliche Verarbeitung erfolgte in folgenden Schritten:

1. Einlesen der Quelldatei
2. Glättung des Messsignals
3. Korrektur um den hydrostatischen Druck
4. Berechnung der Spannung σ
5. Detektion der Kontraktions-Maxima
6. Vereinigen der Einzelpeaks
7. Parameteranalyse

Zur Analyse der in LabView aufgenommenen Messreihen wurden diese im *lvm*-Format exportiert. Hierbei handelt es sich um ein ASCII-Tabellenformat, das direkt in GNU R eingelesen werden kann. Der Quellcode der Analysesoftware ist in Anhang 7.1.3 auf Seite 130 zu finden.

3.7.1 Glättung durch gleitenden Mittelwert

Zur Signalglättung wurde der sogenannte „gleitende Mittelwert“ angewandt. Bei diesem Verfahren wird jedes Element eines Datensatzes durch den Mittelwert der $\pm x$ benachbarten Elemente ersetzt. Dies ermöglicht eine symmetrische Glättung durch Unterdrückung hoher Frequenzanteile (Rauschen). Wird die Fensterbreite x zu klein gewählt, so wird das natürliche Hintergrundrauschen analoger Messsignale nicht ausreichend unterdrückt. Im umgekehrten Fall, wenn x zu groß gewählt wird, wird das Messsignal über Gebühr geglättet, was zu einer Verfälschung der Messergebnisse führt. Fehler: Referenz nicht gefunden zeigt repräsentative Aufnahmen eines schwachen Signals (links) und eines starken Signals (rechts), gefiltert mit verschiedenen Fensterbreiten. In einem iterativen Erosionsverfahren

wurde die optimale Fensterbreite bestimmt, bei der das Rauschen maximal unterdrückt wurde, ohne das Messsignal zu „überglätten“ (Abbildung 25).

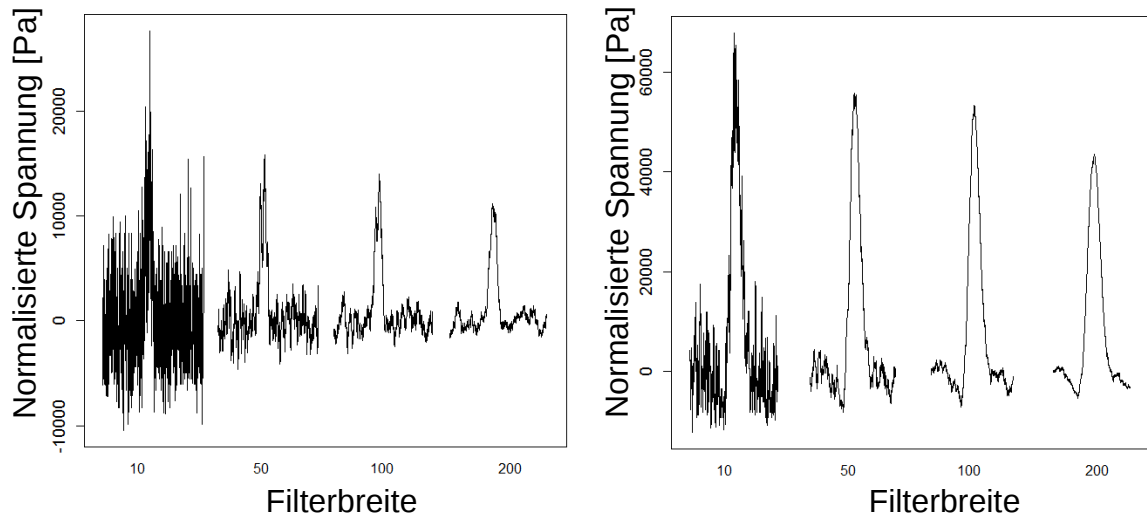


Abbildung 24: Repräsentative Messsignale in Abhängigkeit der Filterbreite. Links: Schwaches Signal. Rechts: Starkes Signal

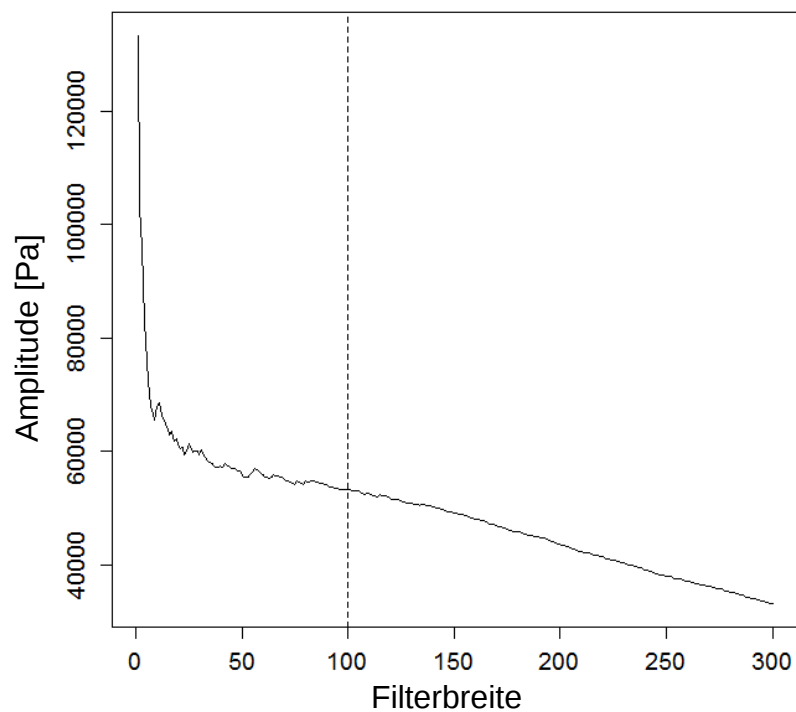


Abbildung 25: Abhängigkeit der Amplitude von der gewählten Fensterbreite

3.7.2 Korrektur des Messsignals um den hydrostatischen Druck

Aufgrund der Gewichtskraft des Kulturmediums wird die CellDrum-Membran negativ ausgelenkt. Für alle Versuche wurden Membranen verwendet, die eine Auslenkung von 1,5 - 1,6 mm aufwiesen. Der Betrag des hydrostatischen Drucks musste vom aufgenommenen Drucksignal subtrahiert werden, um die tatsächliche Spannung in der Membran zu bestimmen. Hierzu wurden Druck-Dehnungs-Kurven von leeren Membranen aufgenommen und das Verhältnis von Druck zu Dehnung mittels polynomischer Regression bestimmt:

$$y = a_1 + a_2 \cdot x + a_3 \cdot x^2 \quad (3.10)$$

Als Basiswert zur Substraktion des hydrostatischen Drucks diente der Median aller Druck-Messwerte der untersuchten Messreihe (12-16 Schläge), da dieser Wert der Basislinie – d.h. dem relaxierten Zustand der Zellen – entspricht.

3.7.3 Berechnung der Spannung σ

Die als Barlow-, Laplace-, bzw. Kesselformel bekannte Gleichung setzt die Spannung in einer rotationssymmetrischen Membran ins Verhältnis zur Druckdifferenz, dem Radius und der Membrandicke. Der hier angewandte Spezialfall beschreibt die Verhältnisse in einer Kugel-Geometrie.⁸⁸

$$\sigma = \frac{p \cdot R}{2 \cdot s} \quad (3.11)$$

wobei p den Differenzdruck zwischen Innen- und Außenseite der Kugel beschreibt, R den Radius der Kugel und s die Membrandicke.

Um die Formel für jede Kugelkalotte anwenden zu können, wird der Satz des Pythagoras angewendet (siehe Abbildung 26):

$$R^2 = (R-h)^2 + r^2 \quad (3.12)$$

Hier beschreibt R den Radius des gesamten Kugel, r den maximalen Radius der Kalotte und h die Tiefe der Kalotte. Im Falle der CellDrum beschreibt r den Radius der CellDrum (= const.) und h die gemessene Deflektion.

Durch Anwendung der Binomischen Formel lassen sich die Klammern auflösen.

$$R^2 = R^2 - 2Rh + h^2 + r^2 \quad (3.13)$$

Kürzen von R^2 ergibt:

$$2Rh = h^2 + r^2 \quad (3.14)$$

Division durch $2h$ ergibt:

$$R = \frac{1}{2h} \cdot (h^2 + r^2) \quad (3.15)$$

In einem letzten Transformationsschritt wird r^2 ausgeklammert:

$$R = \frac{1}{2h} \cdot r^2 \cdot \left(1 + \frac{h^2}{r^2}\right) \quad (3.16)$$

Durch Zusammenführen von (3.11) und (3.16) ergibt sich der Zusammenhang von Spannung, Druck und Auslenkung für eine Kugelkalotte:

$$\sigma = \frac{p}{h} \cdot \frac{r^2}{4s} \cdot \left(1 + \frac{h^2}{r^2}\right) \quad (3.17)$$

Durch Multiplikation der Spannung mit der Membrandicke s ergibt sich die resultierende Kraft:

$$F = \sigma \cdot A = \sigma \cdot d \cdot s = \sigma \cdot 16.000 \mu\text{m} \cdot 3,0 \mu\text{m} = \sigma \cdot 4,80 \cdot 10^{-8} \text{m}^2 \quad (3.18)$$

$s = \text{Membrandicke}$
 $d = \text{Membrandurchmesser}$

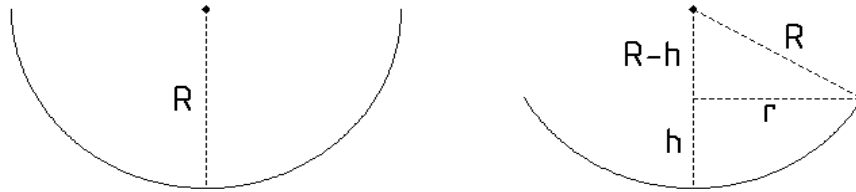


Abbildung 26: Geometrische Zusammenhänge bei der Kesselformel. Links: Für die Halbkugel. Rechts: Für eine Kugelkalotte.

3.7.4 Detektion der Kontraktions-Maxima

Nach der Berechnung der mechanischen Spannung aus Druck und Deflektion wurde eine Identifizierung der lokalen Kontraktions-Maxima (Peaks) durchgeführt. Hierzu wurde der AMPD-Algorithmus von *Scholkmann et al.*⁸⁹ angewandt und im Rahmen dieser Arbeit erstmals in die Programmiersprache GNU R implementiert.

Dieser Algorithmus wurde speziell zur Erkennung von Peaks in periodischen und quasi-periodischen verrauschten Signalen entwickelt. Er ermöglicht die Detektion von Peaks ohne vorherige Definition von Parametern. Grundlage hierfür ist die Tatsache, dass sich lokale Maxima in einem periodischen Signal dadurch auszeichnen, dass sie sowohl größer sind als die direkt benachbarten Messwerte ($\pm n = 1$), als auch als weiter entfernte Messwerte ($\pm n = \{2,3,\dots\}$). Zur Identifizierung der Peaks wird eine Matrix erstellt, in der jede Spalte für einen Messwert der Zeitreihe (Index) steht und jede Zeile für eine sogenannte Skala (n). Nun wird jeder Messwert mit den $\pm n = \{1,\dots,N\}$ entfernten Messwerten verglichen. Ist der untersuchte Wert größer als beide Vergleichswerte, dann wird der korrespondierende Index in der betreffenden Skala gleich 0 gesetzt. Trifft dies nicht zu, so wird dem Index ein zufälliger Wert zwischen 0 und 1 zugewiesen. Die resultierende Matrix wird als *local maximum scalogram* (LMS) bezeichnet. Abbildung 27 zeigt eine Darstellung eines einzelnen Peaks mit zugehörigem Skalogramm.

Zur Identifizierung der Peaks in einem periodischen Signal werden die Reihensummen des Skalogramms gebildet. Da den lokalen Maxima im Skalogramm

der Wert 0 zugewiesen wird, sind diese in der Skala zu finden, die die niedrigste Reihensumme aufweist. In Abbildung 27 handelt es sich hierbei um die dritte Skala. Bei den identifizierten Peaks handelt es sich um jene Messwerte, die in allen Skalen als lokales Maximum erkannt wurden.

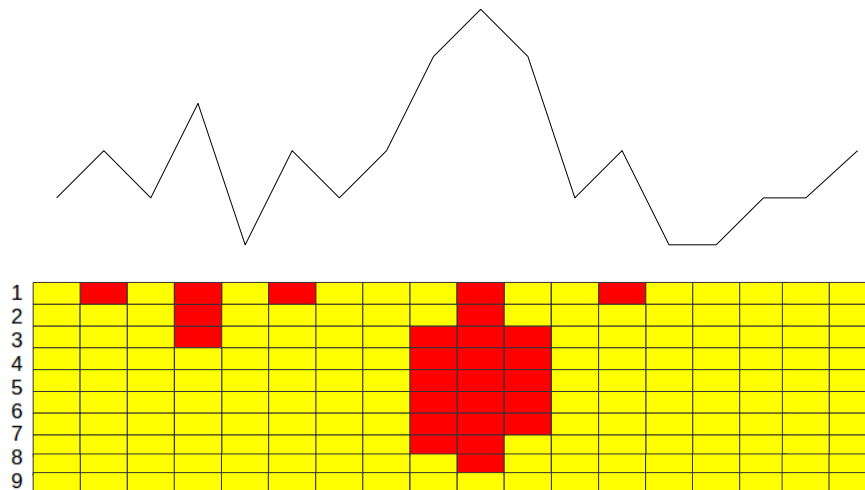


Abbildung 27: Skizze des AMPD-Algorithmus. Oben: Einzelner Peak in einem verrauschten Signal. Unten: Local maximum scalogram des Signals. Rot dargestellt sind Messwerte, die ein lokales Maximum in ihrer Skala darstellen.

3.7.5 Vereinigen der Einzelpeaks

Zur Erhöhung der Präzision der Messung wurden die 12-16 aufgenommen Peaks einer Messung vereinigt (übereinandergelegt). Hierzu wurde nach der Detektion der Kontraktions-Maxima das Messsignal zur weiteren Verarbeitung in Einzelpeaks zerlegt, indem die Zeitreihe genau in der Mitte zwischen den erkannten Peaks getrennt wurde. Die Schnittpunkte wurden jeweils zwischen den ermittelten Maxima gesetzt. Die einzelnen Peaks wurden durch ein System aus drei linearen Regressionsgleichungen ($y_i = m_i \cdot x_i + n_i \mid i \in [1,2,3]$) approximiert (Abbildung 28).

Da nicht zwingend davon ausgegangen werden konnte, dass die Basislinie absolut horizontal verläuft, wurden zur Ermittlung der Grundspannung die Mittelwerte zweier Stützbereiche ermittelt, die jeweils aus den ersten und letzten 10 % des Einzelpeaks

bestanden. Die Grundspannung (Basislinie) wurde durch eine Ausgleichsgerade durch diese Punkte definiert.

Zur linearen Approximation von Kontraktion und Relaxation wurden Stützstellen bestimmt. Hierzu dienten diejenigen Punkte, bei denen das Signal erstmals 20 % der Gesamtamplitude über- bzw. unterschritt (Abbildung 28, Punkt 3). Die Ausgleichsgeraden wurden durch die Maxima und die 20 %-Stützstellen gelegt.

Als „Klebspunkt“ zur Vereinigung der Peaks wurde der Beginn des Kontraktions-Relaxations-Zyklus definiert. Hierbei handelt es sich um den Schnittpunkt der Regressionsgeraden von Basislinie und Kontraktion (Abbildung 28, Punkt 6). Dieser wurde durch Gleichsetzen der betreffenden Geradengleichungen bestimmt:

$$m_{BL} \cdot x_{BL} + n_{BL} = m_{Kontr.} \cdot x_{Kontr.} + n_{Kontr.} \quad (3.19)$$

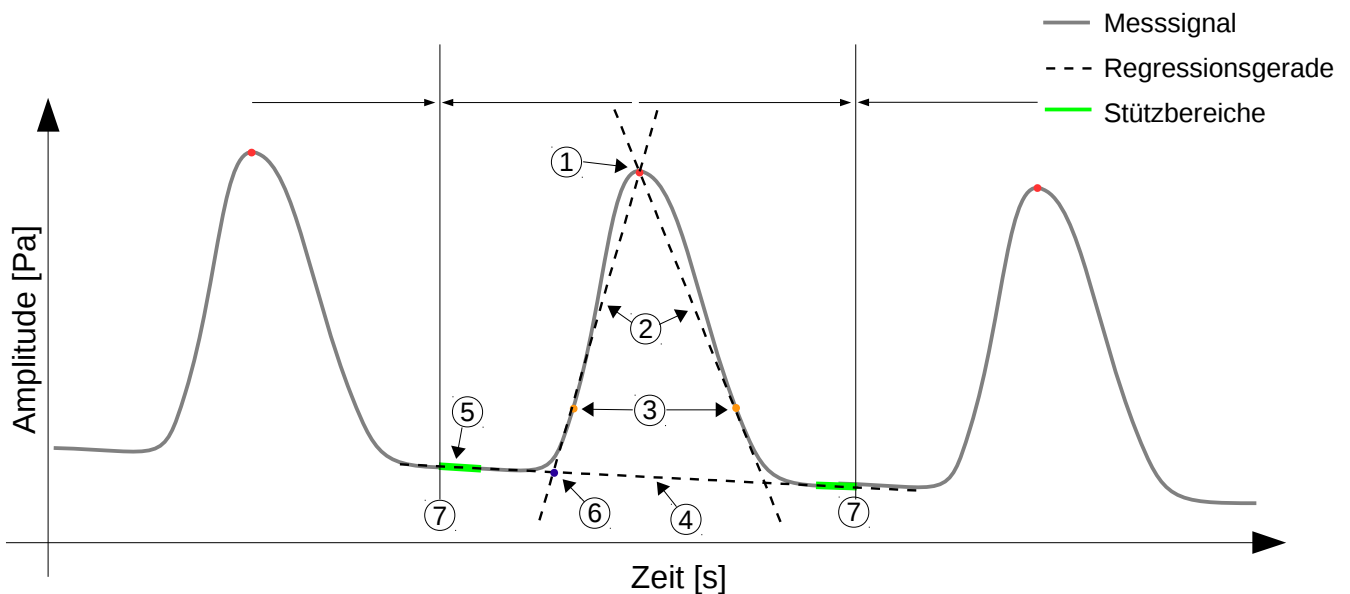


Abbildung 28: Lineare Regression. 1: Maximum. 2: Regression von Kontraktion/Relaxation. 3: 20 %-Stützstellen. 4: Regression der Basislinie. 5: Stützbereich. 6: Klebspunkt. 7: Schnittpunkte

3.7.6 Parameteranalyse

Nach erfolgter Vereinigung der Einzelpeaks wurde die endgültige Parameteranalyse durchgeführt. Analog zum vorherigen Kapitel wurden Amplitude, Dauern und Steigungen bestimmt.

Die Integrale unter den Kurven wurden nach der zusammengesetzten Sehnentrapezformel bestimmt. Hierzu wurde die Summe der Funktionswerte des Messsignals $f(x)$ mit der Intervalllänge Δx (Kehrwert der Abtastrate) zwischen den diskreten Messpunkte multipliziert:

$$I(f) = \int f(x) dx = \sum f(x) \cdot \Delta x \quad (3.20)$$

Auf Grundlage der absoluten Zeitwerte der erkannten Peaks wurde die Schlagfrequenz ermittelt. Hierzu wurden die Periodendauern $\Delta t_{max,i}$ zwischen den einzelnen Peaks arithmetisch gemittelt und der Kehrwert gebildet:

$$f = \left(\frac{1}{n} \cdot \left(\sum \Delta t_{max,i} \right) \right)^{-1} \quad (3.21)$$

3.8 Statistische Methoden

3.8.1 Wilcoxon Rangsummen-Test

Die im Rahmen der pharmakologischen Untersuchungen durchgeführten Experimente wurde für jede Substanz vier- bis sechsmal wiederholt. Zur Untersuchung der Signifikanz der Dosis-Wirkungs-Kurven wurde der sogenannte „Wilcoxon Rangsummen-Test“ durchgeführt. Dieser wurde erstmals durch Wilcoxon⁹⁰ im Jahr 1945 beschrieben und später durch Mann und Whitney verallgemeinert.⁹¹

Hierbei handelt es sich um einen nicht-parametrischen Test. Dies bedeutet, dass die Verteilungen der Messgrößen im Gegensatz zu parametrischen Tests nicht bekannt sein müssen, wodurch er bei kleinen Stichprobenumfängen vorzuziehen ist.⁹²

Zur Durchführung des Tests wird aus den zwei zu untersuchenden Stichproben eine Gesamtstichprobe gebildet, die der Größe nach sortiert und durchnummeriert wird. So erhält jeder Messwert einen Rang. Nun werden die Ränge der zwei ursprünglichen Stichproben jeweils addiert. Das Ergebnis sind die sogenannten Rangsummen.⁹³ Mit diesen lässt sich anhand von Tabellenwerken der p -Wert des statistischen Tests ermitteln.⁹⁴

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Bestimmung der Dicke der CellDrum-Membranen

Zur Beurteilung der Dicke der eingesetzten Membranen wurde für jede produzierte CellDrum der sogenannte D_{500} -Wert bestimmt. Hierbei handelt es sich um die Deflektion der CellDrum-Membran (in mm) durch die Gewichtskraft von 500 μL vollentsalztem Wasser. Bei Losgrößen von 48-96 CellDrum pro Los stellte dieses Charakterisierungsverfahren eine schnelle und gleichzeitig präzise Einordnung der Qualität der einzelnen CellDrums dar. Für die pharmakologischen Untersuchungen wurden CellDrums mit D_{500} -Werten von 1,5-1,6 mm verwendet. Die tatsächlichen Schichtdicken der Membranen dieser Spezifikation wurden wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben bei 17 CellDrums mithilfe eines Interferenz-basierten spektroskopischen Verfahrens ermittelt.

D_{500} -Wert [mm]:	$1,55 \pm 0,03$
Dicke [μm]:	$2,96 \pm 0,33$

Der Versuch zum Zusammenhang von D_{500} -Wert und Dicke wurde von Corinna Meeßen durchgeführt.

4.2 Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der CellDrum-Membranen

4.2.1 Spannungs-Dehnungs-Kurven

Zur Ermittlung der grundlegenden mechanischen Parameter wurden Druck-Deflektions-Kurven von CellDrums mit D_{500} -Werten von 1,5-1,6 mm aufgenommen. Die resultierende Spannung σ wurde nach der Laplace-Gleichung (3.17) aus dem gemessenen Druck und der Deflektion ermittelt, während die Dehnung aus der Deflektion nach $\epsilon = \Delta L / L_0$ bestimmt wurde. Abbildung 29 zeigt die resultierende Spannungs-Dehnungs-Kurve.

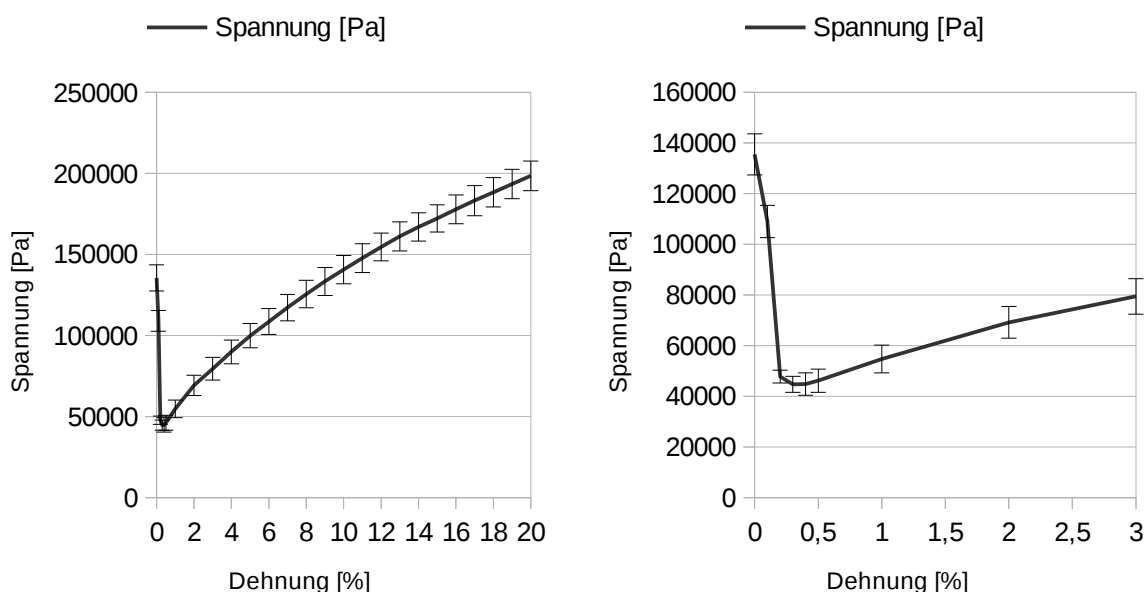


Abbildung 29: Spannungs-Dehnungs-Kurve von CellDrum-Membranen. Links: Gesamter Bereich. Rechts: Ausschnitt 0-3 %. $n=6$

Die Membranen zeigen ein für hyperelastische Materialien charakteristisches nicht-lineares Verhalten.⁹⁵ Im Bereich oberhalb von 0,5 % Dehnung stimmen die gemessenen Werte mit den Literaturdaten überein.⁹⁶⁻⁹⁸ Bei sehr kleinen Dehnungen unterhalb von 0,5 % steigt die ermittelte Spannung jedoch stark an, und das

mechanische Verhalten weicht scheinbar vom Normverhalten ab. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass die angewandte *Laplace-Gleichung* maßgeblich durch den Quotienten aus Druck und Deflektion bestimmt wird. Sehr kleine Deflektionen können hier aufgrund von leichten Messungenauigkeiten zu einem sehr großen Quotienten führen, da der theoretische Radius R der Kugel, deren Kalotte durch die CellDrum-Membran gebildet wird, unendlich groß wird (siehe hierzu Formel 3.12 auf Seite 52). Aufgrund der Tatsache, dass die Membranen durch die Gewichtskraft des Zellkulturmediums 1,5-1,6 mm ausgelenkt sind, was einer Grunddehnung von 2,3 - 2,6 % entspricht, spielt dieser Effekt bei den realen Messungen keine Rolle.

4.2.2 Effekt der Funktionalisierung auf die mechanischen Eigenschaften

Die Integrität der PDMS-Membranen nach erfolgter Funktionalisierung ist von entscheidender Bedeutung für die Erhaltung der mechanischen Eigenschaften des PDMS, vor allem seiner Flexibilität. *Kim et al.* berichteten, dass die oxidative Behandlung mittels Atmosphärendruckplasma zu einer brüchigen PDMS-Oberfläche führt,⁷⁵ während die Behandlung mit UV/Ozon die Mikrorauigkeit drastisch erhöht.⁹⁹

Zur Einschätzung des Einflusses der Funktionalisierung auf die mechanischen Eigenschaften der PDMS-Membranen wurden Druck-Deflektion-Kurven der Membranen ohne Behandlung, nach Oxidation mit HCl/H₂O₂ und nach Silanisierung mit 3MOBS aufgezeichnet (Abbildung 30). Im Bereich über 1 mm Deflektion zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen im Vergleich zur Variabilität innerhalb der Gruppen.

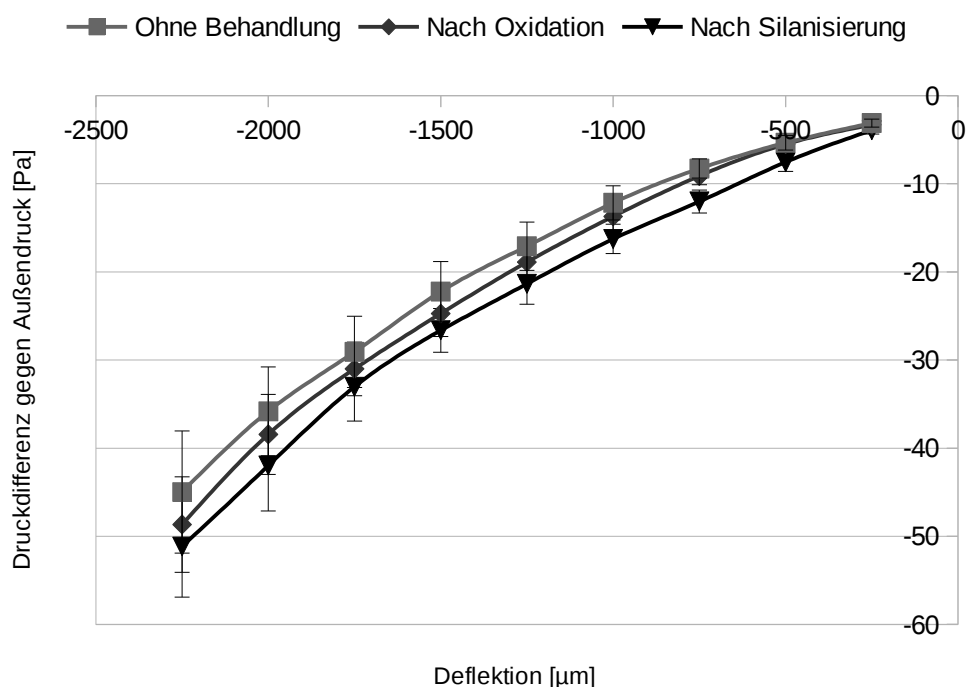


Abbildung 30: Druck-Deflektions-Kurven von Membranen in unterschiedlichen Prozessstufen. $n=6$

Anhand des Datensatzes der vollständig funktionalisierten CellDrum-Membranen (nach Silanisierung) wurde eine Anpassung (Fit) durchgeführt, um den hydrostatischen Druck des Zellkulturmediums in die Berechnung der Membranspannung mit eingehen zu lassen (siehe Abschnitt 3.7.2 auf Seite 52). Die Anpassung wurde durch ein Polynom zweiten Grades vorgenommen:

$$y = a_1 + a_2 \cdot x + a_3 \cdot x^2 \quad (4.1)$$

Abbildung 31 zeigt die Messwerte der Druck-Deflektionskurven und die ermittelte Anpassung. Es wurden folgende Parameter ermittelt:

$$\begin{aligned} a_1 &= -2,434 \text{ Pa} \\ a_2 &= +6,868 \cdot 10^{-3} \text{ Pa } \mu\text{m}^{-1} \\ a_3 &= -6,443 \cdot 10^{-6} \text{ Pa } \mu\text{m}^{-2} \end{aligned}$$

Durch die polynomische Anpassung konnte die Anhängigkeit von Druck und Deflektion bei Membranen mit D_{500} -Werten von 1,5-1,6 mm mit hoher Präzision bestimmt werden.

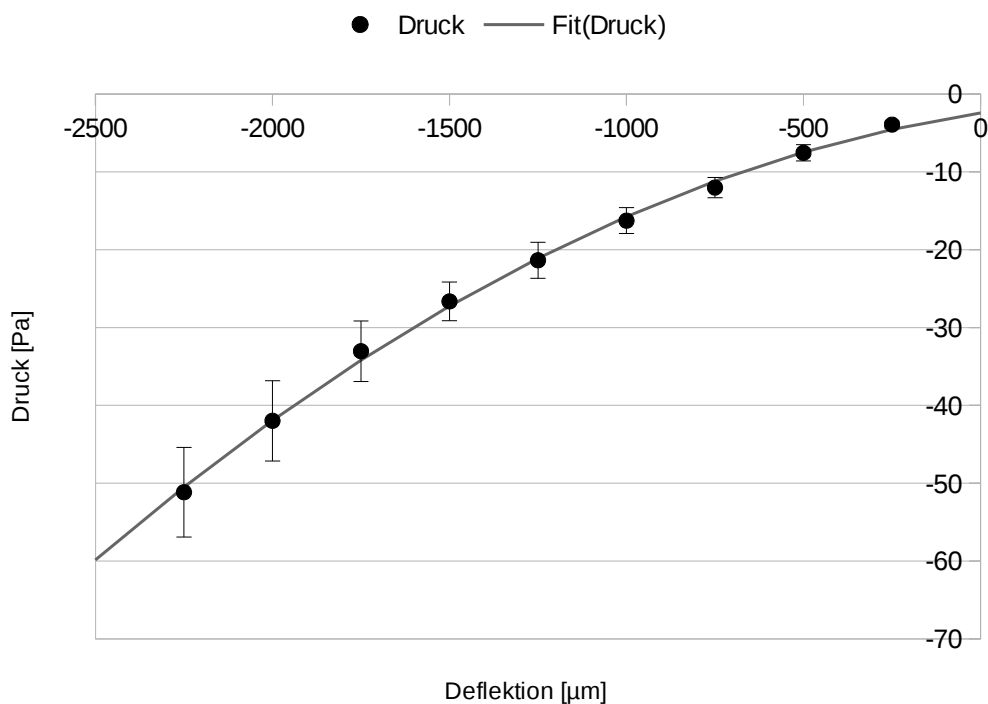


Abbildung 31: Polynomische Anpassung des des hydrostatischen Drucks in Relation zur Deflektion. Es wurde ein Polynom zweiten Grades angewandt. $n=6$

4.3 Charakterisierung der Funktionalisierung

4.3.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zur näheren Untersuchung der Materialveränderung durch die nasschemische Oxidation wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Proben verschiedener Prozessstufen der Funktionalisierung angefertigt. Die Oxidation mittels HCl/H₂O₂ für 45 min verursachte keine sichtbare Veränderung der Membranoberfläche (Abbildung 32). In Übereinstimmung mit den mechanischen Tests (Kapitel 4.2.2) deutet dies darauf hin, dass die Eigenschaften der PDMS-Membranen durch die Funktionalisierung nicht beeinträchtigt wurden.

Durch die anschließende Silanisierung mittels 3MOBS kam es zur Ausbildung von pyramidalen Erhebungen mit einem Durchmesser von 20-50 μm (Abbildung 33). Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um Eintrocknungs-Artefakte der Silan-Lösung. Diese wirkten sich jedoch nicht auf die mechanischen Eigenschaften aus. Die signifikant erhöhte Biokompatibilität^{100,101} nach der Silanisierung (siehe Abschnitt 4.5.1) deutet darauf hin, dass die Silanisierung erfolgreich war.

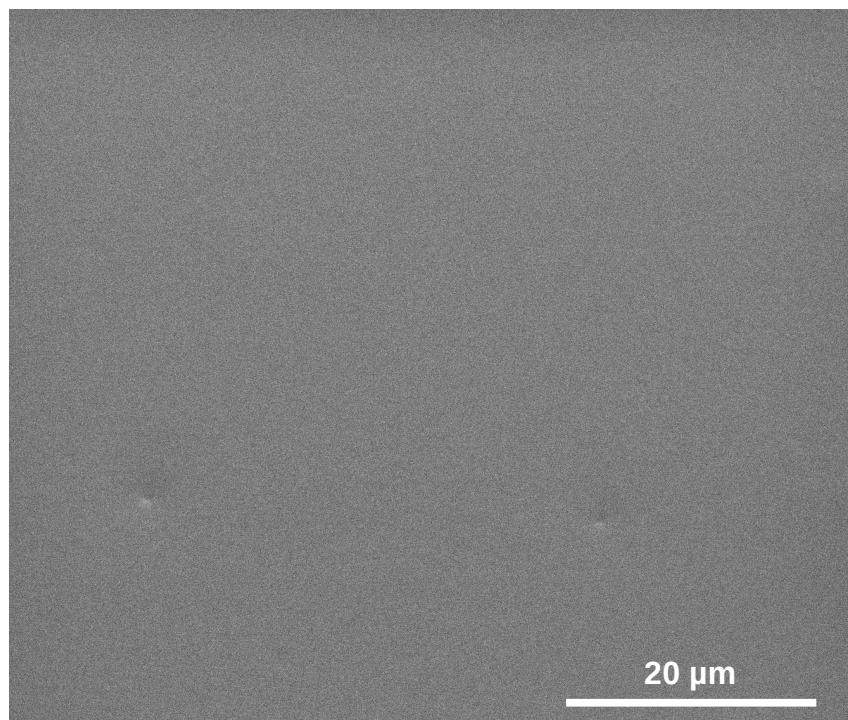


Abbildung 32: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der CellDrum-Membran nach Oxidation

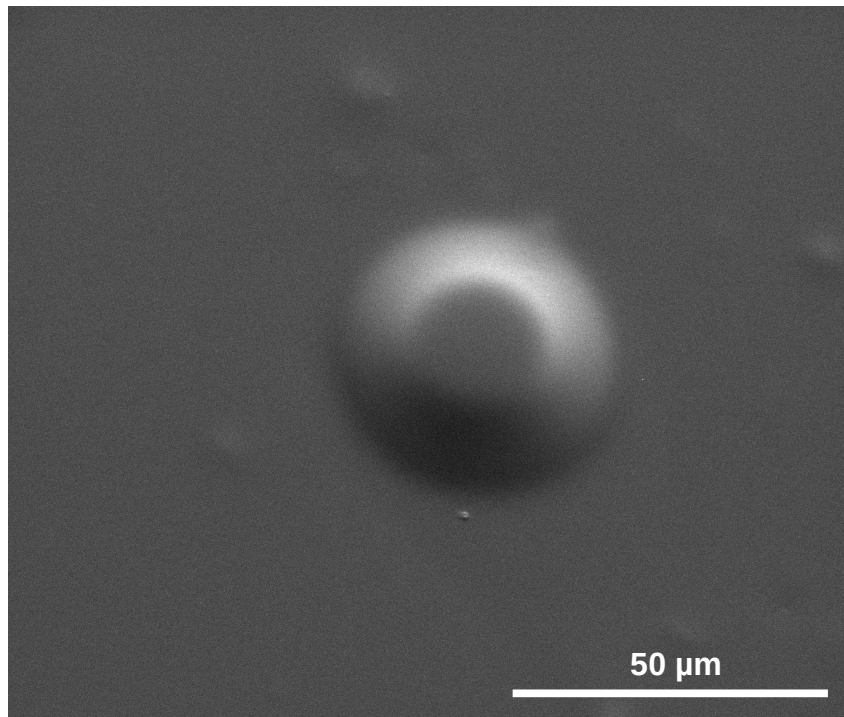


Abbildung 33: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der CellDrum-Membran nach Silanisierung. Bildmitte: Eintrocknungs-Artefakt der Silan-Lösung

4.3.2 Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Zur Untersuchung der Oxidation durch $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}_2$ wurden Proben mit unterschiedlicher Inkubationszeit (0, 15, 30, 45 min) mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie auf den Gehalt an Sauerstoff hin untersucht. Hierbei wurden Spektren mit Elektronenstrahlen unterschiedlicher Eindringtiefe (5 kV und 10 kV) aufgenommen, um den Sauerstoff-Anteil an der Oberfläche mit dem Anteil in der Tiefe der Membran zu vergleichen.

Die Ergebnisse zeigen einen leichten Anstieg des Sauerstoff-Anteils mit fortschreitender Oxidation (Abbildung 34). Hierbei war der Anstieg an der Oberfläche

(5 kV) stärker als weiter innerhalb des Materials (10 kV). Dies deutet auf eine - zumindest partielle - Oxidation der PDMS-Oberfläche hin. Allerdings waren die Abweichungen der einzelnen Messwerte von der Regressionsgeraden im Verhältnis zur Steigung sehr groß. Darüber hinaus lagen die Unterschiede zwischen der Kontrolle (unbehandeltes PDMS) und der maximalen Oxidationsdauer von 45 min bei nur 1-2% und somit nah an der Nachweisgrenze der Methode.

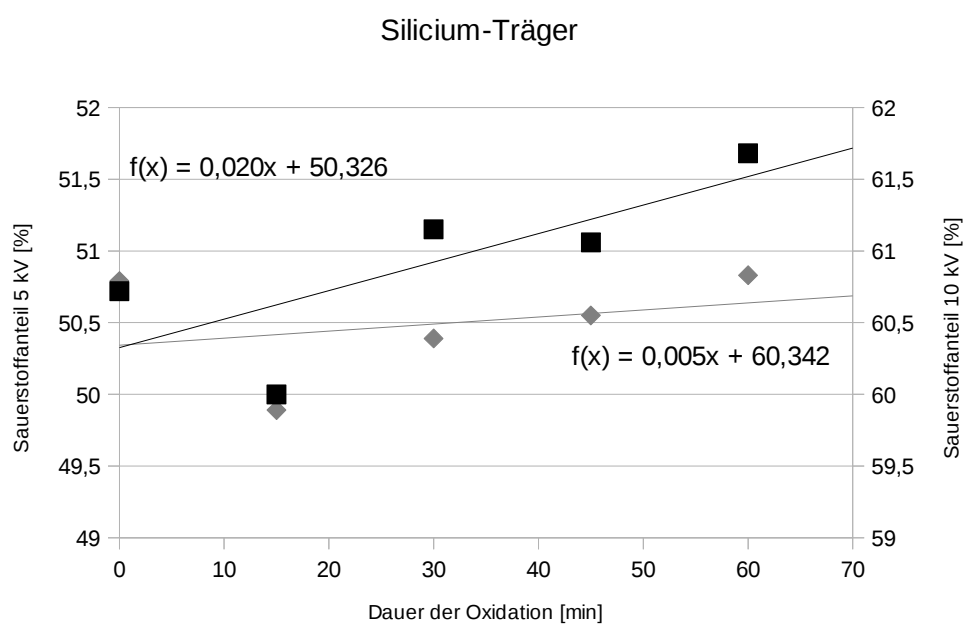


Abbildung 34: Abhängigkeit des Sauerstoff-Anteils von der Oxidationsdauer, gemessen auf Silicium-Trägern

4.3.3 Infrarot-Spektroskopie

Durch die Oxidation der PDMS-Membran kommt es sowohl durch physikalische als auch durch nasschemische Verfahren zur Hydroxylierung der Membran-Oberfläche. Dies wurde bei PDMS-Materialien von größerer Dicke infrarotspektroskopisch nachgewiesen.⁴⁷ Hierbei wurde der spektrale Bereich zwischen $3050\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$ integriert.⁷⁸

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgenommenen Spektren wiesen – bedingt durch die geringe Dicke der Membranen – stark ausgeprägte Interferenzmuster auf (Abbildung 35). Insbesondere die Quantifizierung von Hydroxylgruppen durch Integration der breiten IR-Bande zwischen $3050\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$ wurde durch die Oszillation unmöglich gemacht.

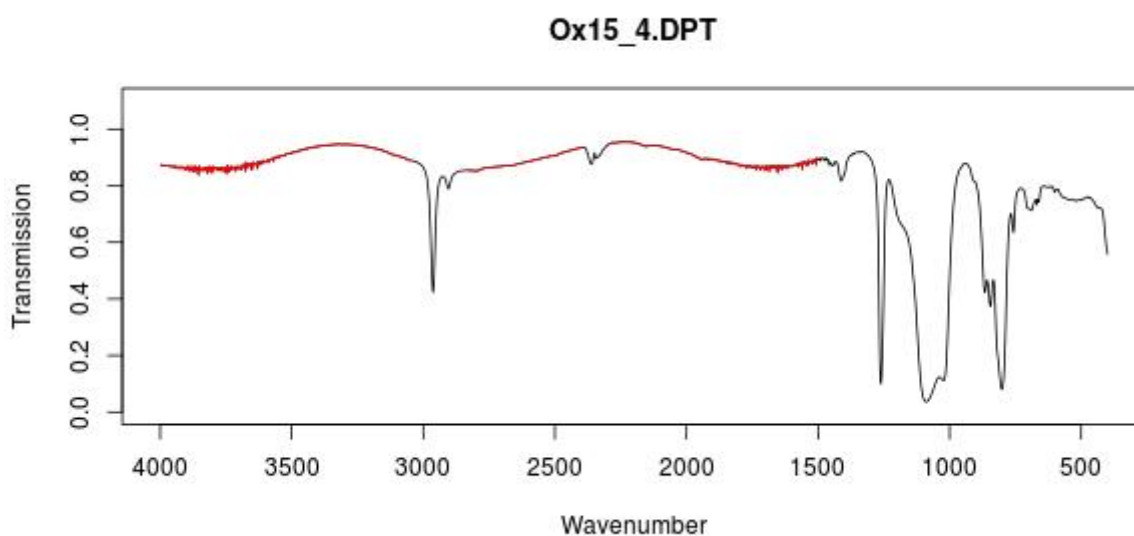


Abbildung 35: Infrarot-Spektrum einer PDMS-Membran. Rote Linie: Interferenz-Muster.

4.4 Messdatenerfassung und -auswertung

4.4.1 Gleitender Mittelwert

Grundsätzlich ist jede Messung fehlerbehaftet. In der analogen Messtechnik wird das Verhältnis der Messgröße zum stochastischen Rauschen als „Signal-to-noise ratio“ (SNR) bezeichnet. Im Fall der hier durchgeführten Messungen handelt es sich um das Verhältnis der Schlagamplitude der Kardiomyozyten zum Hintergrundrauschen. Insbesondere die Messung des Drucks ist im Messaufbau mit stochastischem Rauschen behaftet. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass der gemessene Druck sehr klein ist (ca. 1-10 Pa = 10^{-5} - 10^{-4} bar), zum anderen mit einer hohen Abtastrate von 1000 Hz aufgenommen wird.

Es existiert eine große Anzahl an Filteralgorithmen, die dazu dienen, die gesuchte Information einer Messung mit größtmöglicher Treffsicherheit vom Hintergrundrauschen zu trennen. Allen gemein ist, dass sie ein grundlegendes Wissen über die Beschaffenheit des Messsignals voraussetzen. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit der hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten während der Durchführung dieser Arbeit war eine umfassende Untersuchung des SNR nicht möglich.

Trotz seiner mathematischen Einfachheit ist der gleitende Mittelwert in vielen Anwendungen die Methode der Wahl, da er das Hintergrundrauschen effizient reduziert und es gleichzeitig ermöglicht, das Grundsignal durch Optimierung der Filterbreite in seiner ursprünglichen Morphologie weitestgehend zu erhalten.¹⁰² Um eine Überglättung durch zu starke Filterung zu verhindern, wurde in einem iterativen Erosionsverfahren die optimale Filterbreite bestimmt.

4.4.2 Erosionsverfahren zur Bestimmung der optimalen Glättung

Hierzu wurden die Amplituden von Messsignalen unterschiedlicher Stärke in Abhängigkeit von der Fensterbreite des Filters aufgetragen und analysiert (Abbildung 36). Insbesondere beim schwachen Signal, bei dem das Signal-Rausch-Verhältnis klein ist, hat das Rauschen einen großen Einfluss auf die gemessene Amplitude. So halbierte sich diese, wenn die Fensterbreite des Filters von 10 auf 50 Messwerte erhöht wurde. Eine effiziente Glättung setzte in beiden Fällen ab einer Filterbreite von ca. 50 Samples ein, gekennzeichnet durch ein Abflachen der Kurve. In diesem Bereich war das Signal jedoch noch instabil. Dies zeigte sich vor allem in der

Schwaches Signal

Starkes Signal

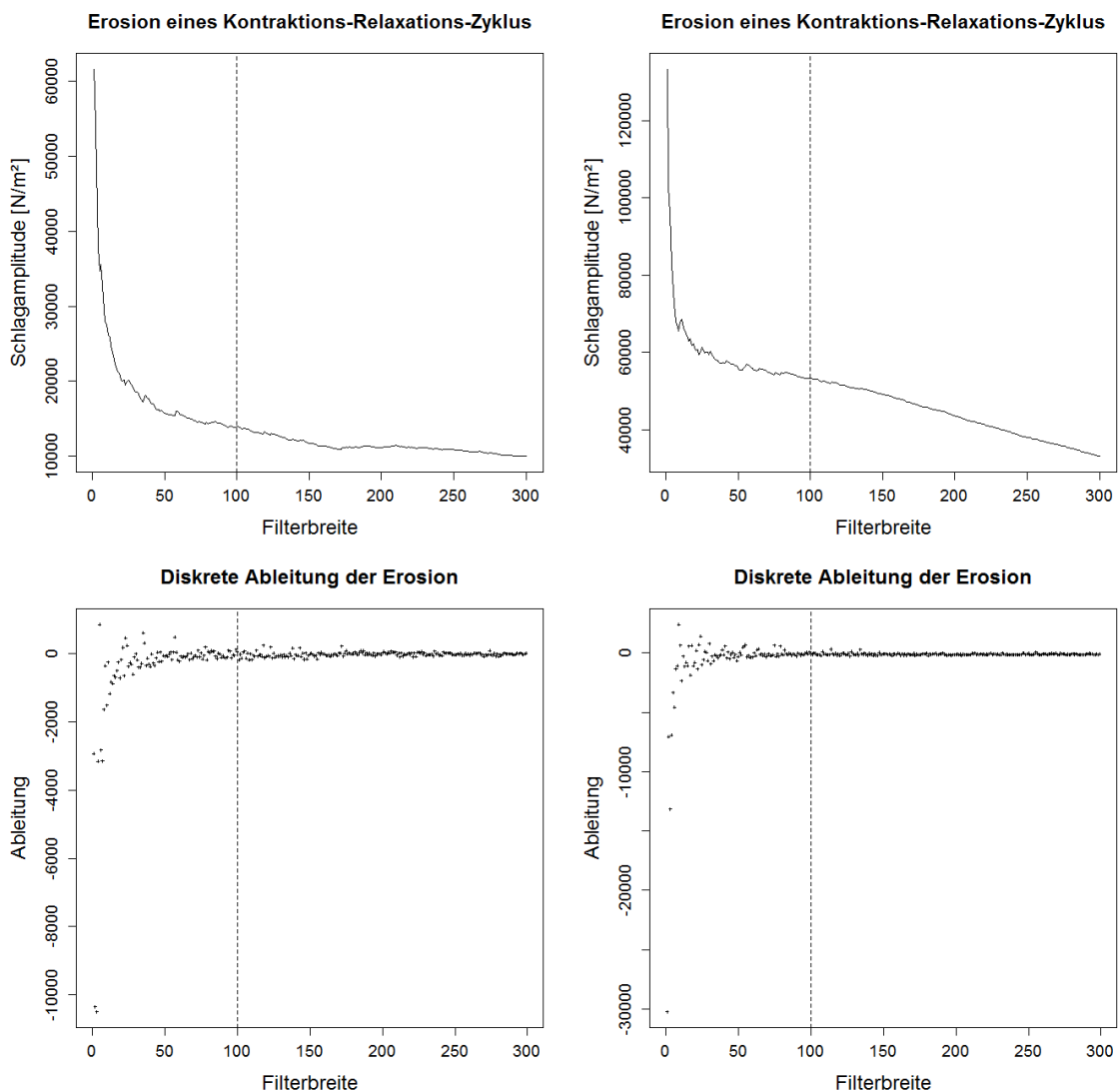


Abbildung 36: Ergebnisse des Erosionsverfahrens. Oben: Abhängigkeit der Amplitude von der Fensterbreite. Unten: Ableitung der Erosion.

Ableitung der iterativen Erosion (untere Reihe). Bei einer Filterbreite von 50 Samples traten in beiden Fällen noch große Abweichungen von der (horizontalen) Idealkurve auf, gekennzeichnet durch die Streuung in diesem Bereich. Ab einer Filterbreite von 100 Samples waren die Abweichungen vernachlässigbar klein. Eine weitere Erhöhung auf 100 bzw. 200 Samples führte zu einer weiteren, wenn auch erheblich geringeren Reduzierung der Amplitude.

Im Falle eines starken Signals war die Verringerung der Amplitude durch Erweiterung der Fensterbreite aufgrund des besseren Signal-Rausch-Verhältnisses weniger ausgeprägt. Während hier die Amplituden der Messsignale bei Fensterbreiten von 50 und 100 Samples nahezu identisch waren, führte eine Filterung mit 200 Samples zu einer merklichen Reduzierung der Amplitude. Die optimale Filterbreite wurde durch das Erosionsverfahren zu 100 Samples bestimmt. Abbildung 37 zeigt den Einfluss der Signalglättung auf einzelne Peaks.

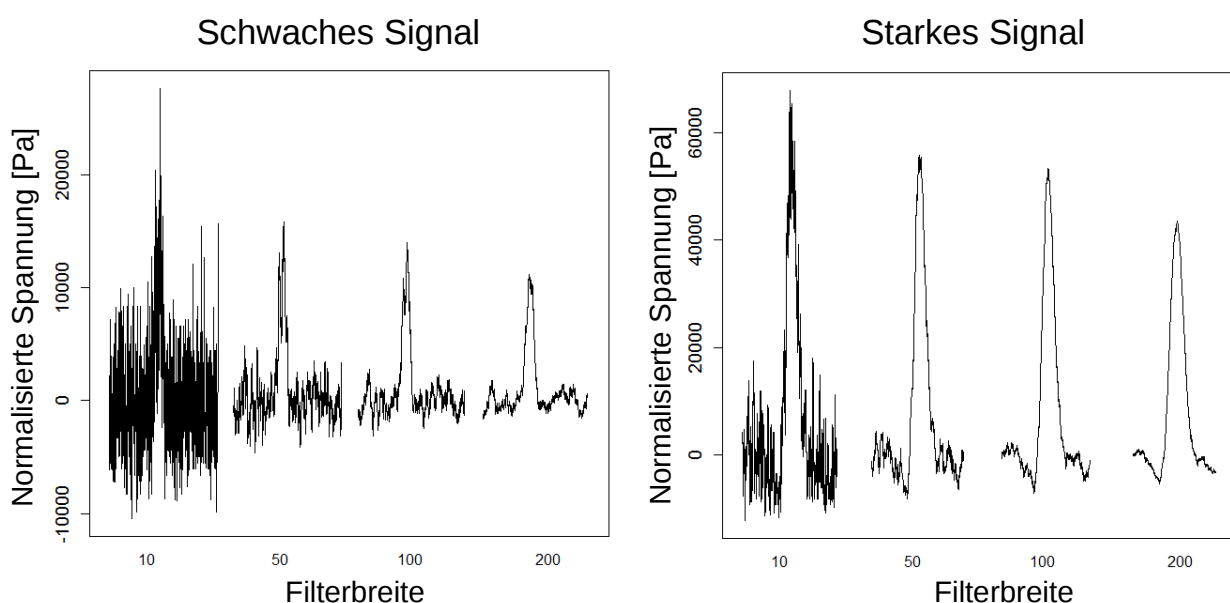


Abbildung 37: Einfluss der Signalglättung auf die Schlagamplitude

4.4.3 Detektion der Kontraktions-Maxima

Klassische Algorithmen der Peak-Detektion bedürfen der Festlegung von Parametern zu Beginn der Analyse, um den zu erkennenden Peak von stochastischen Ereignissen unterscheiden zu können. Dies kann im einfachsten Fall die Festlegung eines Schwellenwerts sein, dessen Über- bzw. Unterschreitung die aufsteigend bzw. abfallende Flanke eines Peaks anzeigt. Da im Falle der CellDrum-Messung die Grundspannung und somit die Basislinie der Messung variiert werden kann, ist diese Methode nur schwer anwendbar. Weitere Algorithmen verlangen die Spezifikation der Steilheit der Flanken eines Peaks. Da die Anwendung von Pharmaka gravierende Auswirkungen auf die Amplitude und somit auf die Steilheit der Flanken der Peaks haben können, ist davon auszugehen, dass eine Festlegung der erwarteten Steilheit *a priori* die Gefahr birgt, dass von der Norm abweichende Peaks nicht erkannt werden. Ebenso verhält es sich mit weiteren Parametern wie z.B. der erwarteten Peak-Breite.

In Anbetracht der möglichen Variabilität des Messsignals ist der grundlegende und somit zuverlässigste Parameter zur Peak-Detektion die Periodizität der Kontraktion. Zur Erkennung von Peaks in periodischen Signalen wird im allgemeinen ein Frequenzbereich definiert, in dem sich das periodische Signal befindet. Aufgrund der Tatsache, dass auch dieser Parameter durch die möglichen chronotropen Effekte der Testsubstanzen einer großen Variabilität unterliegt, wurde der AMPD-Algorithmus von *Scholkmann et al.*⁸⁹ in die Programmiersprache GNU R implementiert und angewandt. Dieser ist in der Lage, periodische rauschbehaftete Signale sicher zu analysieren, ohne dass im Voraus ein Frequenzbereich definiert werden muss.

In den aufgenommenen Messreihen wurden nach einer Signalglättung die Maxima der Kontraktions-Relaxations-Zyklen mit 100-prozentiger Treffsicherheit erkannt. Dies galt sowohl für starke als auch für sehr schwache Signale.

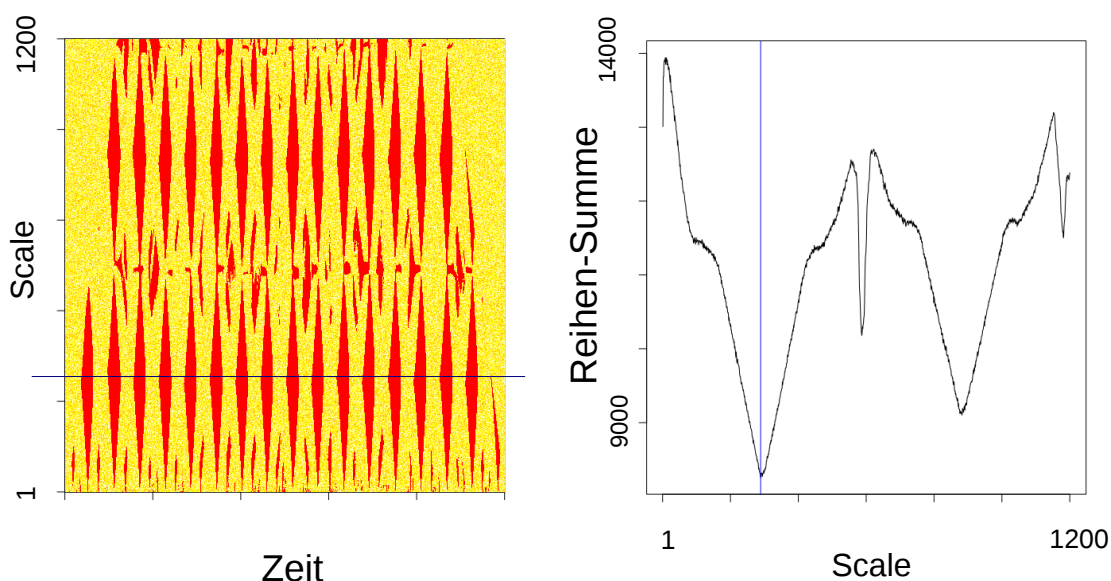


Abbildung 38: Peak-Detektion mit AMPD-Algorithmus. Links: Skalogramm einer Messung von 16 CR-Zyklen. Horizontale Linie: Minimum der Reihensummen. Rechts: Reihen-Summen. Vertikale Linie: Minimum der Reihensummen.

4.5 Biologische Charakterisierung

4.5.1 Vergleich der Bioverfügbarkeit mit/ohne Funktionalisierung

Sowohl nach klassischer Fibronectin-Deposition als auch nach Deposition auf die funktionalisierte Membranoberfläche waren mehr als 95 % der ausplattierten H9c2 Cardiomyoblasten nach einem Tag auf den PDMS-Membranen angewachsen.

Während sich am dritten Tag nach der Aussaat bei den Membranen ohne Funktionalisierung erste Bereiche bildeten, auf denen keine Adhäsion der Zellen mehr möglich war (Abbildung 39), waren die Zellen bei den funktionalisierten Membranen noch immer fest adhärirt und proliferierten (Abbildung 40).

An Tag 5 nach Aussaat waren auf den unbehandelten Membranen nur noch vereinzelte Zellcluster zu sehen, während die Zellen auf den funktionalisierten Membranen noch immer einen konfluenten Monolayer bildeten. Dieser Trend setzte

sich in den folgenden Tagen fort, sodass am siebten Tag nach Aussaat keine vitalen Zellen mehr auf den Membranen ohne Funktionalisierung zu finden waren.

Der Versuch zeigte, dass die Biokompatibilität der PDMS-Membranen durch die oxidative Behandlung, gefolgt von der Funktionalisierung mit einem Epoxysilan, signifikant gesteigert werden konnte.

Klassische Fibronectin-Deposition

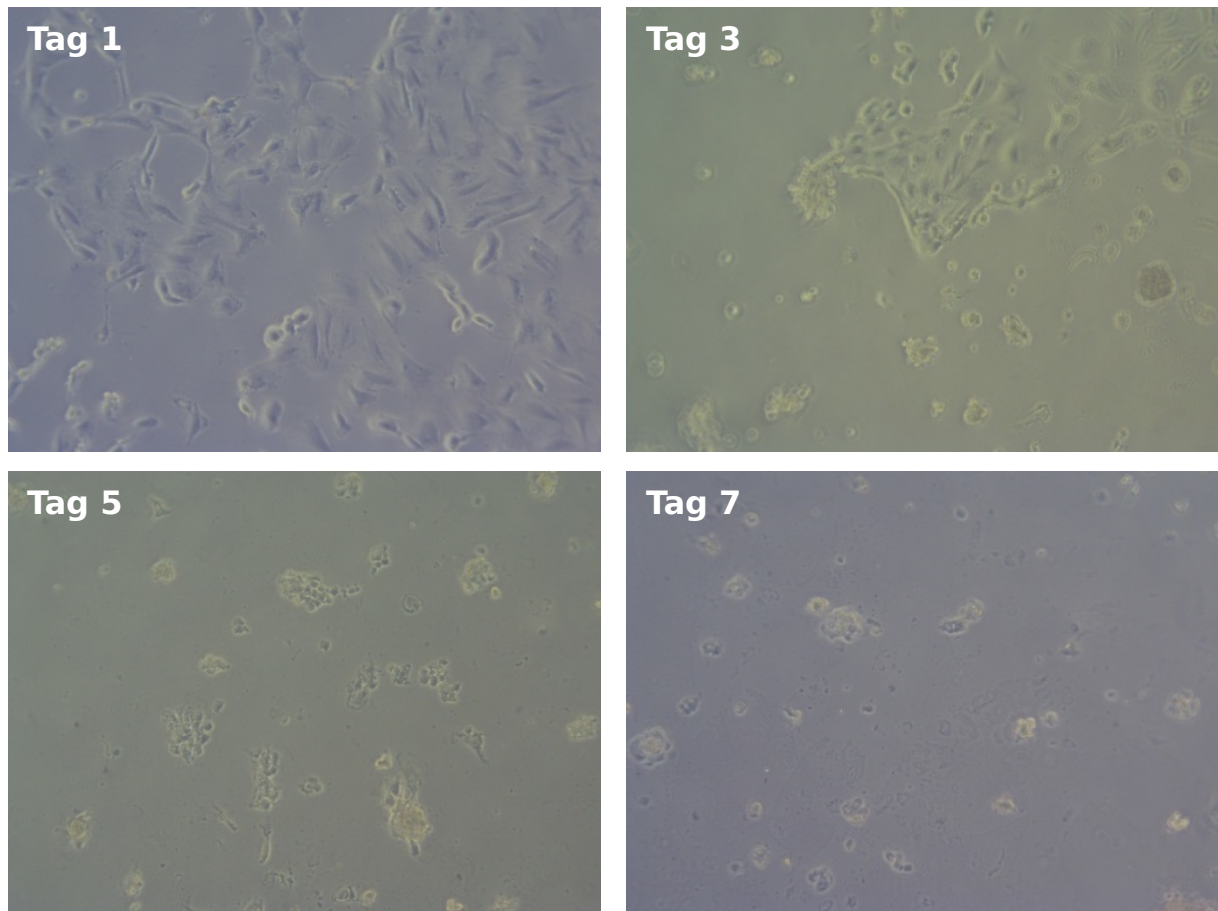


Abbildung 39: Kultur von H9c2-Kardiomyoblasten auf CellDrum-Membranen nach klassischer Fbronectin-Deposition. Vergrößerung: 200x

Oxidation + Silanisierung + Fibronectin-Deposition

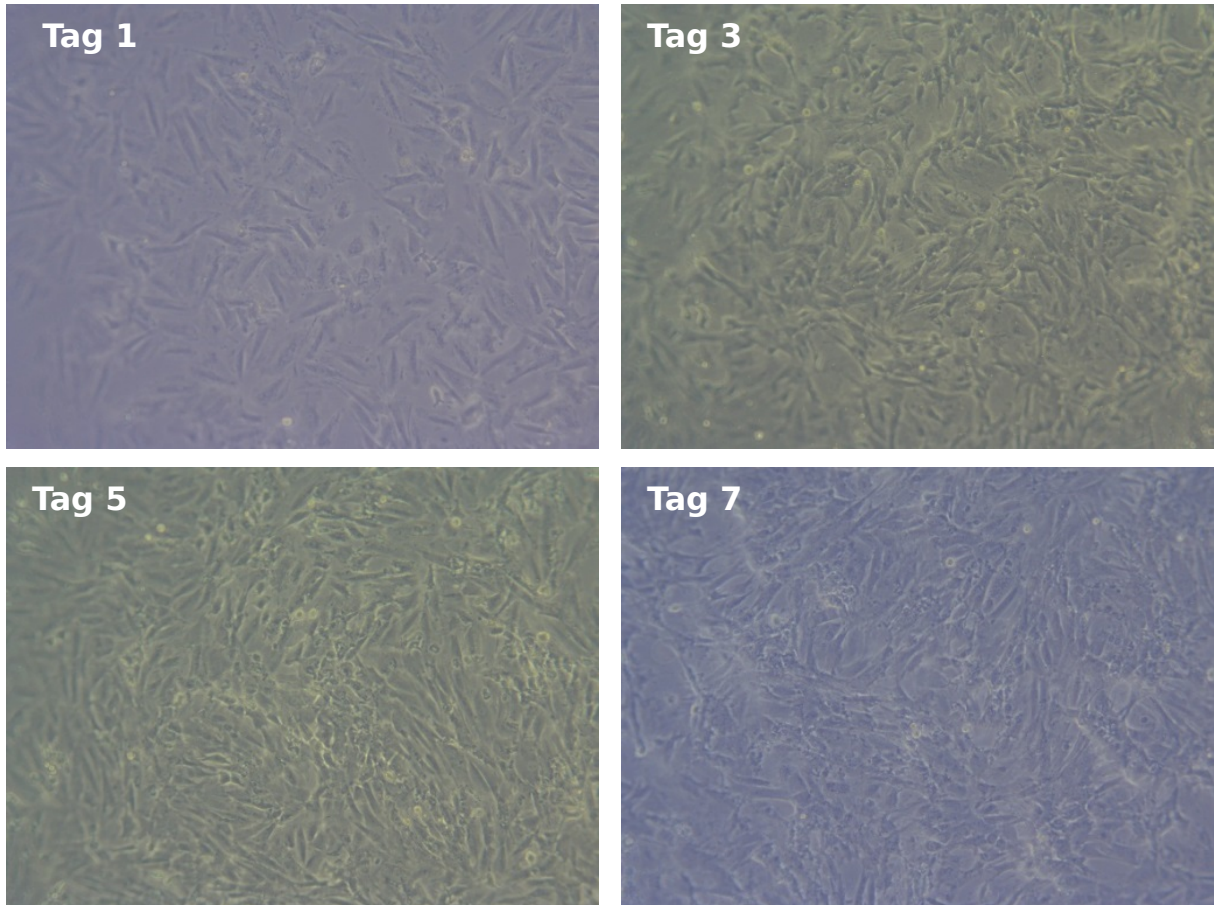


Abbildung 40: Kultur von H9c2-Kardiomyoblasten auf CellDrum-Membranen nach vollständiger Funktionalisierung. Vergrößerung: 200x

4.5.2 Adhäsionskinetik von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten

Neben reinen Kardiomyozyten-Kulturen wurden auch Ko-Kulturen von Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten untersucht. Hierzu wurden beide Zelltypen dissoziiert, in variierenden Verhältnissen vermischt und zusammen in CellDrums ausgesät. Die Anzahl an Kardiomyozyten betrug konstant 300.000 Zellen pro CellDrum, was einer Dichte von 150.000 Zellen pro cm^2 entsprach. Hierzu wurden veränderliche Anteile von kardialen Fibroblasten hinzugegeben.

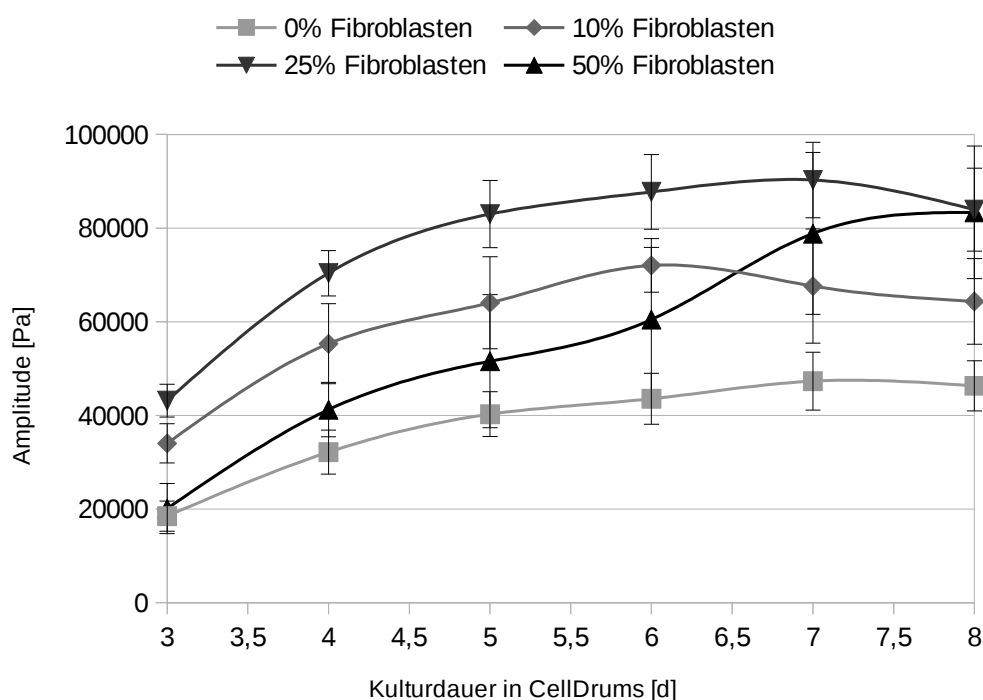


Abbildung 41: Anwachskurve von Ko-Kulturen aus Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten. $n=7$

Nach ca. 24 Stunden begannen die ersten Zellen einen synchron schlagenden Monolayer auszubilden. Nach drei Tagen war in allen CellDrums synchrones Schlagen der Zellen messbar. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Kulturen für insgesamt eine Woche untersucht. Bis Tag 5 folgte ein nahezu linearer Anstieg in der

Schlagamplitude (Abbildung 41). In der Folge verlangsamte sich der Anstieg und erreichte eine Plateau-Phase zwischen Tag 6 und 8. Während der gesamten Kulturzeit zeigten die reinen Kardiomyozyten-Kulturen die geringste Amplitude. Die höchste Schlagamplitude wurde mit einem Fibroblasten-Anteil von 25 % erreicht. Mit Anteilen von 10 % bzw. 50 % Fibroblasten lagen die Amplituden dazwischen. Gegen Ende des untersuchten Zeitraums erreichten die Proben mit 50% Fibroblasten ähnliche Amplituden wie mit 25 %, jedoch mit zunehmender Standardabweichung (Abbildung 42).

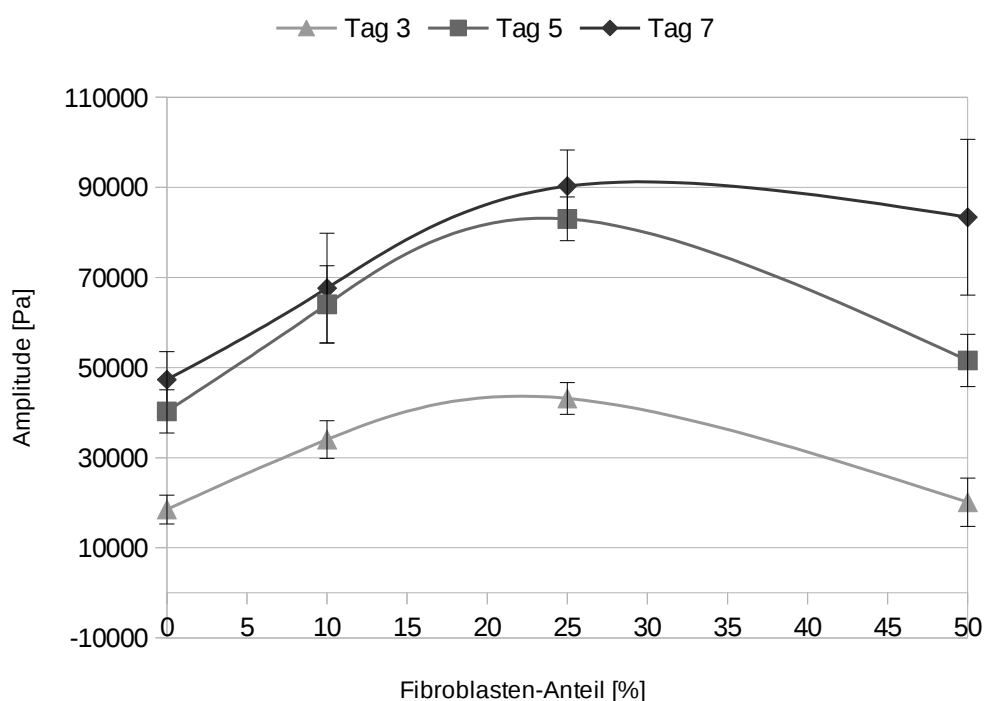


Abbildung 42: Auswirkung des Fibroblasten-Anteils auf die Schlagamplitude zu verschiedenen Zeitpunkten. $n=7$

Seit die kardialen Fibroblasten zunehmend in den Fokus der entwicklungsbiologischen und pharmakologischen Forschung treten, wurden eine Reihe von Mechanismen entdeckt, die der Einflussnahme von Fibroblasten auf die Herztätigkeit dienen. Eine zentrale Rolle spielen die Fibroblasten bei der Synthese der extrazellulären Matrix. Diese bietet den Zellen des Gewebes *in-vivo* ein dreidimensionales Netzwerk, das unter anderem der Transduktion der Kontraktionskraft von Kardiomyozyten dient.¹¹ Darüber hinaus dienen die Komponenten der extrazellulären Matrix der Vermittlung mechanischer Signale über

spezielle Oberflächenrezeptoren. In Anbetracht dieser Tatsachen ist die Erhöhung der Schlagamplitude durch die Anwesenheit von kardialen Fibroblasten zu erwarten. Darüber hinaus ist ein Optimum zu erwarten, da mit zunehmendem Anteil an Fibroblasten die Anzahl der kontraktilen Myozyten im Gewebekonstrukt sinkt. Im Falle der Amplitude wurde dieses Optimum bei einem Fibroblasten-Anteil von 25 % während der ersten Woche erreicht.

Naito et al. untersuchten mithilfe sogenannter *engineered heart tissues* (Abschnitt 2.3.1) den Einfluss der Zusammensetzung von kardialen Zellpopulationen auf die Kraftentwicklung.¹⁰³ In ihren Versuchen wurden Mischpopulationen isolierter Herzzellen der Ratte (Kardiomyozyten, Fibroblasten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen) anhand ihrer unterschiedlichen Adhäsionskinetiken auf verschiedenen Kulturoberflächen selektiert und darauf folgend in dreidimensionale Hydrogele gegossen. Durch dieses Verfahren konnten sie den Kardiomyozyten-Anteil von 47 % auf 63 % erhöhen, während der Fibroblasten-Anteil von 49 % auf 33 % reduziert wurde. In diesen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die native Population mit hohem Fibroblasten-Anteil eine größere Kraftentwicklung ermöglichte als die Population mit erhöhtem Kardiomyozyten-Anteil. Dies deckt sich mit Ergebnissen dieser Arbeit, ist jedoch durch den Einsatz von Versuchstieren, das angewendete Selektionsverfahren und die schwer kontrollierbare Geometrie des Gewebekonstruktes für eine Standardisierung stark limitiert.

Neben der Amplitude wurde auch die Abhängigkeit des Integrals vom Fibroblasten-Anteil und der Zeit untersucht (Abbildung 43). Sie verhält sich analog zur Amplitude.

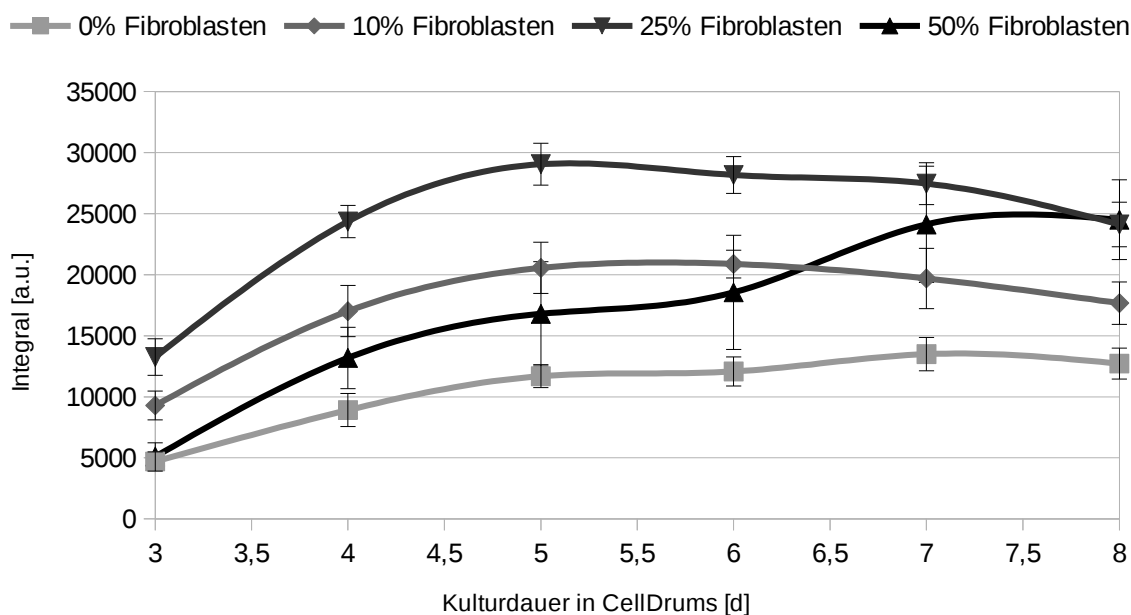


Abbildung 43: Integrale der Kontraktions-Relaxations-Zyklen mit verschiedenen Fibroblasten-Anteilen in Abhängigkeit der Kulturdauer. $n=7$

Bei den Dauern der Kontraktions-Relaxations-Zyklen zeigte sich ein Anstieg bei allen Proben bis Tag 4 bzw. Tag 5. Auch hier war der kleinste Wert mit 0,52 s bei den Proben ohne Fibroblasten zu verzeichnen, während die Proben mit 25 % Fibroblasten die längste Dauer des CR-Zyklus aufwiesen (0,6 s). Im Verlauf der weiteren Kultur verringerte sich dieser Wert wieder, sodass an Tag 8 alle Proben bei Werten von ca. 0,5 s lagen.

Die Dauer des Kontraktions-Relaxations-Zyklus wird maßgeblich durch die Elektrophysiologie der Zellen bestimmt. Bei der enzymatischen Dissoziation kommt es zur Degradation der extrazellulären Domäne vieler Ionenkanäle. Es ist bekannt, dass kardiale Fibroblasten ähnlich wie Myozyten eine Vielzahl von Ionenkanälen besitzen und somit an der elektrischen Kopplung des Herzwebes teilnehmen.¹⁰⁴ Hierbei können sie Einfluss auf die Geschwindigkeit der Reizweiterleitungsgeschwindigkeit nehmen und sowohl zur Sensibilisierung als auch zur Desensibilisierung der Kardiomyozyten für benachbarte Aktionspotentiale führen. Auf Grundlage der erhobenen Daten scheint der Einfluss der Fibroblasten auf die Dauer des Kontraktions-Relaxations-Zyklus nur sehr gering ausgeprägt zu sein.

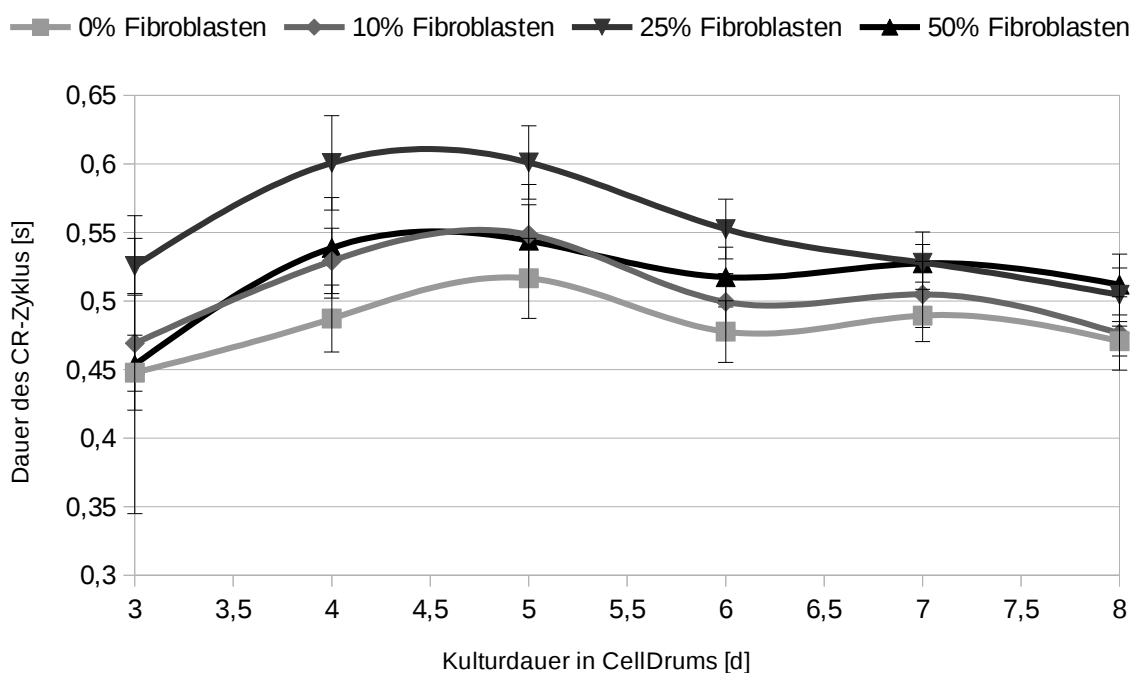


Abbildung 44: Dauer der Kontraktions-Relaxations-Zyklen mit verschiedenen Fibroblasten-Anteilen in Abhängigkeit der Kulturdauer. $n=7$

Auch bei der Schlagfrequenz zeigte sich zu Beginn eine breite Streuung, die im Verlauf der Kultur abnahm. Während an Tag 4 die Frequenzen zwischen 0,8 Hz (50 % Fibroblasten) und 1,4 Hz (0 % Fibroblasten) lagen, wurde die Streuung bis Tag 8 kleiner (1,2-1,4 Hz). Zu beachten ist, dass sich im Falle der Frequenz kein Optimum ausbildete, sondern ein weitgehend proportionaler Zusammenhang zwischen Frequenz und Fibroblasten-Anteil bestand.

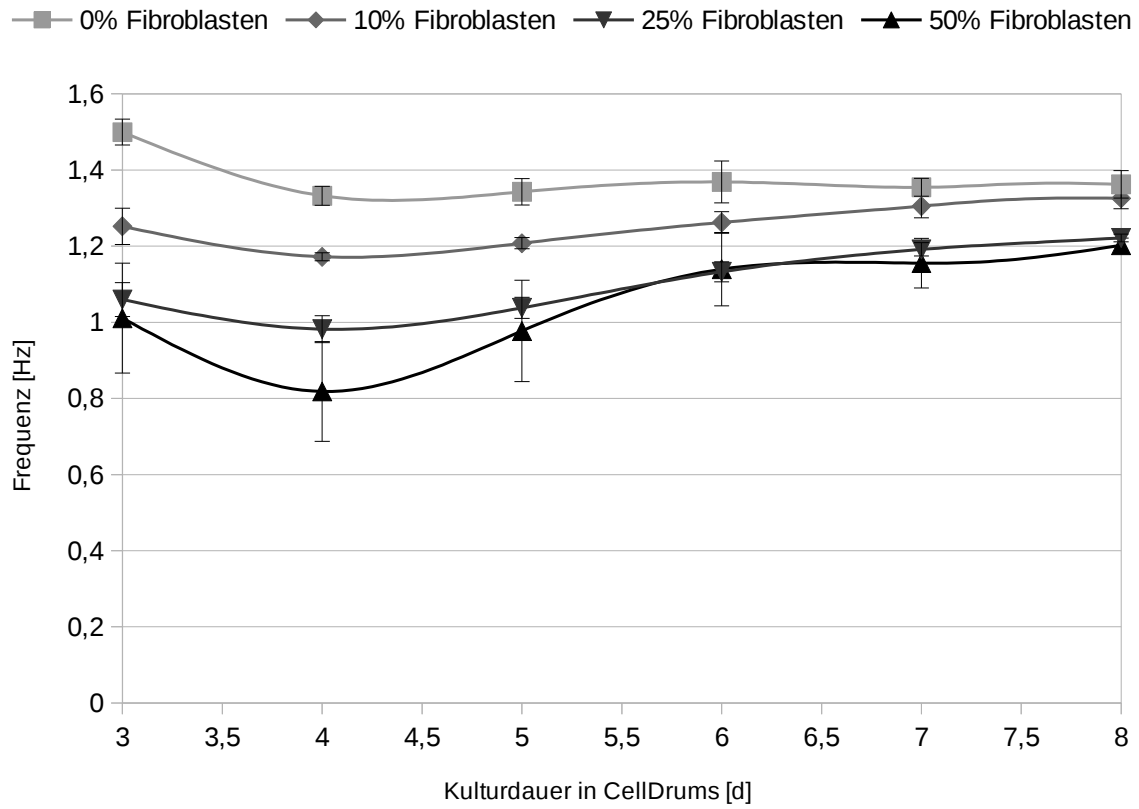


Abbildung 45: Schlagfrequenz in Abhängigkeit vom Fibroblasten-Anteil und von der Kulturdauer. $n=7$

4.6 Gewebebilidungsverm6gen von Ko-Kulturen mit kardialen Fibroblasten

Vor Beginn der biologischen Untersuchungen wurde die minimal ben6tigte Anzahl von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten zur Ausbildung eines Monolayers empirisch bestimmt. Es zeigte sich, dass ab einer Zellzahl von ca. 250.000 Zellen pro CellDrum keine L6cher im Zellrasen mehr auftraten. In der Folge wurden die Experimente mit einer Zellzahl von 300.000 Zellen pro CellDrum durchgef6hrt. Im Rahmen der Ko-Kultur von Kardiomyozyten mit kardialen Fibroblasten wurde dar6ber hinaus die Hypothese untersucht, ob die Fibroblasten die Ausbildung von dreidimensionalen Strukturen erm6glichen. Hierzu wurden reine Kardiomyozyten-Kulturen und Ko-Kulturen mit 25 % Fibroblasten-Anteil in Zelldichten zwischen 300.000 und 900.000 Zellen pro CellDrum ausges6t und an Tag 3 nach Aussaat untersucht.

Im Fall reiner Kardiomyozyten-Kulturen f6hrte eine 6berkonfluente Aussaat nur zu einer sehr schwachen Steigerung der Amplitude (Abbildung 47). Dies deutet darauf hin, dass die Kardiomyozyten nach vollst6ndiger Besiedelung der Kulturoberfl6che nicht in der Lage sind, ein dreidimensionales Gewebe auszubilden.

Im Gegensatz hierzu stieg die Amplitude bei Ko-Kulturen stark und proportional mit der Anzahl ausges6ter Zellen. Dies ist ein Zeichen daf6r, dass durch die Zugabe von Fibroblasten die Ausbildung einer Gewebestruktur 6ber einen Monolayer hinaus in die dritte Dimension erm6glicht wird.

Der Versuch wurde aufgrund des hohen Kostenaufwands f6r die eingesetzten Zellen mit $n=1$ durchgef6hrt. F6r eine abschlie6ende Beurteilung der Ergebnisse sind weitere und n6here Untersuchungen notwendig.

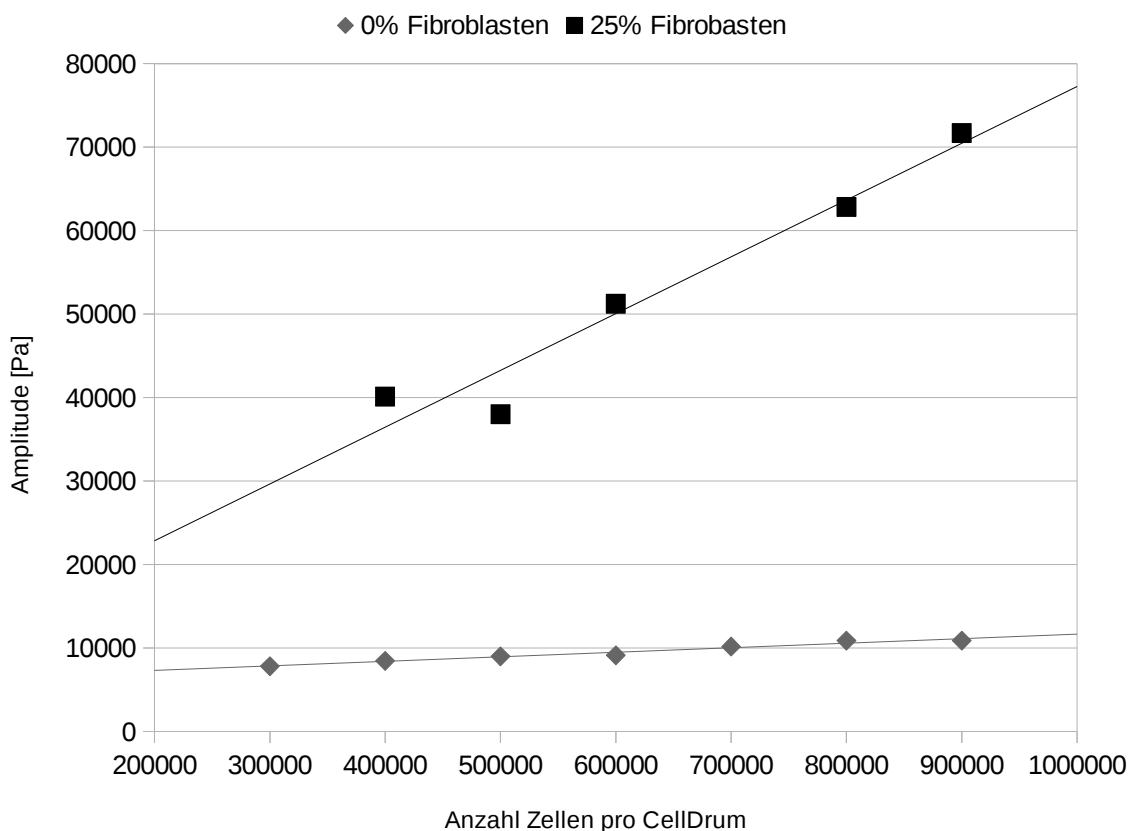


Abbildung 47: Abhängigkeit der Amplitude vom Fibroblasten-Anteil bei überkonfluent besiedelten CellDrums. $n=1$

Die Ergebnisse decken sich mit Versuchen zur Ko-Kultur der gleichen Zellen in dreidimensionalen Hydrogelen aus *Engelbreth-Holm-Swarm-Martix* (Matrigel). Hierzu wurden sowohl Monokulturen von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten als auch Ko-Kulturen mit kardialen Fibroblasten in geringer Aussaatdichte kultiviert und mikroskopsich untersucht (Abbildung 48). In diesen Versuchen zeigten die reinen Kardiomyozyten keine Tendenz zur Ausbildung eines Gewebes, wohingegen die Ko-Kulturen nach 24 h netzartige Strukturen ausbildeten. Dieses Verhalten zeigen auch Monokulturen von kardialen Fibroblasten.

Die Versuche zur Gewebebildung von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten und Fibroblasten in Hydrogelen wurden von Dr. Eugen Kolossov durchgeführt.

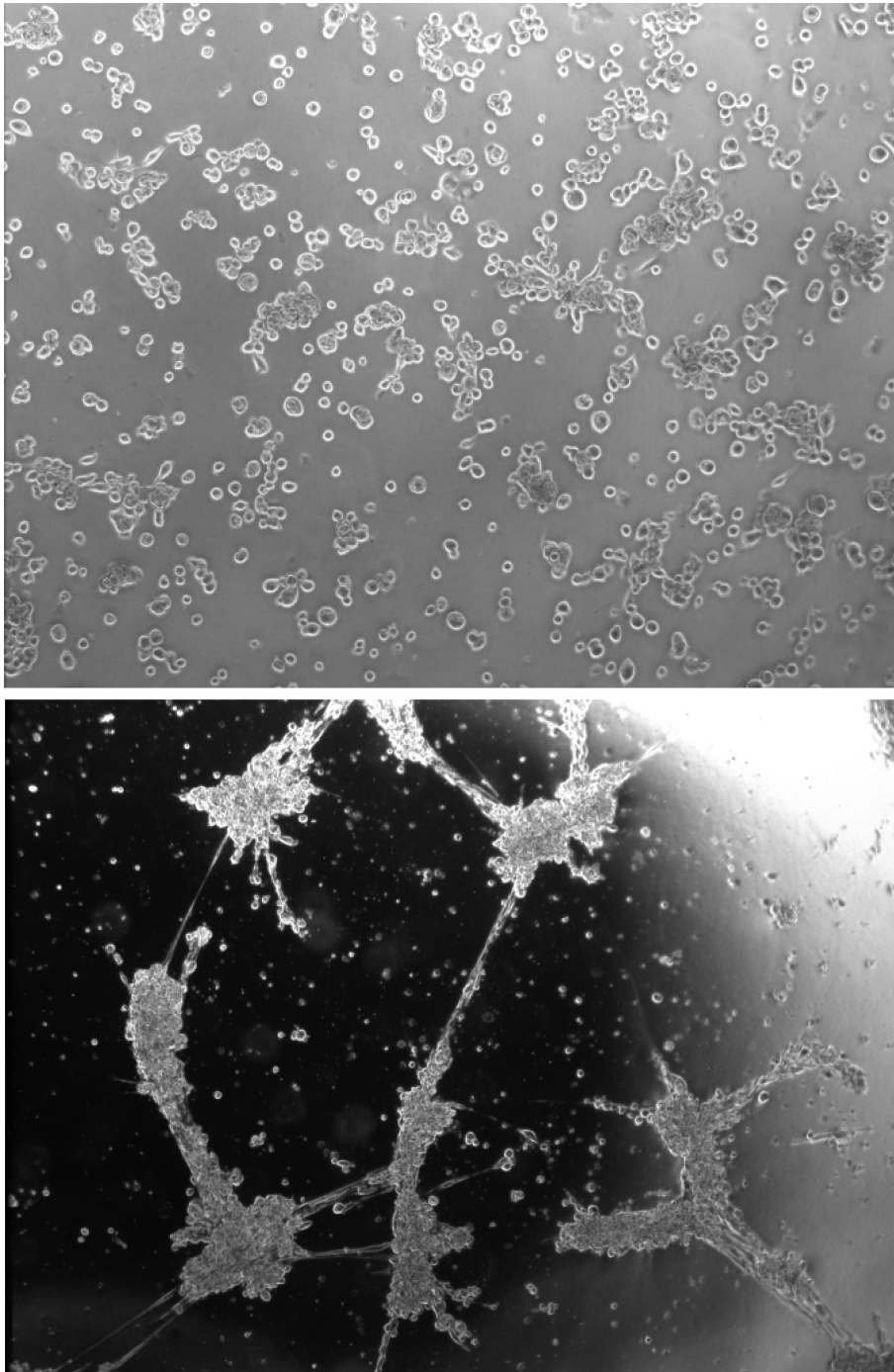


Abbildung 48: Untersuchung der Gewebbildung von Monokulturen hiPS-abgeleiteter Kardiomyozyten (oben) und von Ko-Kulturen mit kardialen Fibroblasten (unten) nach 24 h Kultur. Vergrößerung: 50x (Dr. Eugen Kolossov)

4.7 Histologische Untersuchung

Abbildung 49 zeigt den histologischen Schnitt einer Monokultur von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten auf einer CellDrum-Membran bei einer Aussaatdichte von 300.000 Zellen pro CellDrum. Das Gewebe in der Bildmitte ist während des Schnitts gerissen, während die CellDrum-Membran intakt geblieben ist. Hierdurch ist das Dickenverhältnis von Gewebe und Membran erkennbar.

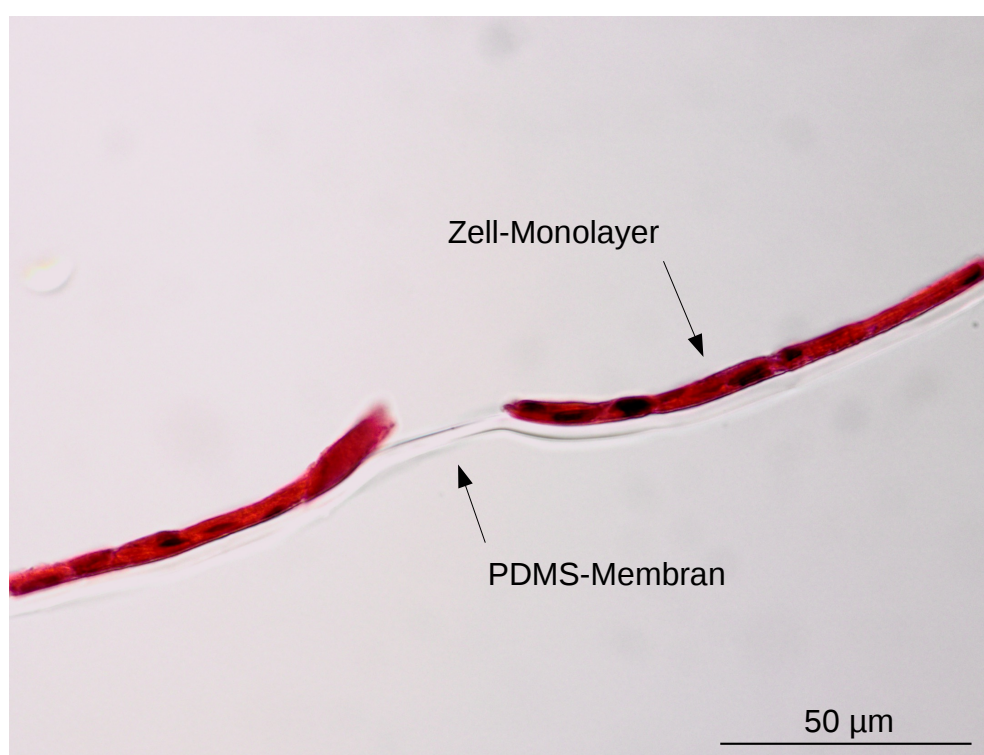


Abbildung 49: Histologischer Schnitt einer besiedelten CellDrum-Membran.
Bildmitte: Riss im Gewebe durch die Präparation

Abbildung 50A zeigt einen größeren Ausschnitt einer Monokultur der Kardiomyozyten. Es wird ersichtlich, dass die Zellen mit der Aussaat-Dichte von 300.000 Zellen pro CellDrum einen geschlossenen Monolayer bilden. Die Dicke der Zellschicht beträgt etwa 7 µm. Die Zellen zeigen keine Tendenz zur Ausbildung einer mehrschichtigen Struktur. Dies zeigt sich vor allem in der Tatsache, dass die Zellen nicht dicker als ihre Zellkerne sind, welche direkt auf dem Substrat aufsitzen.

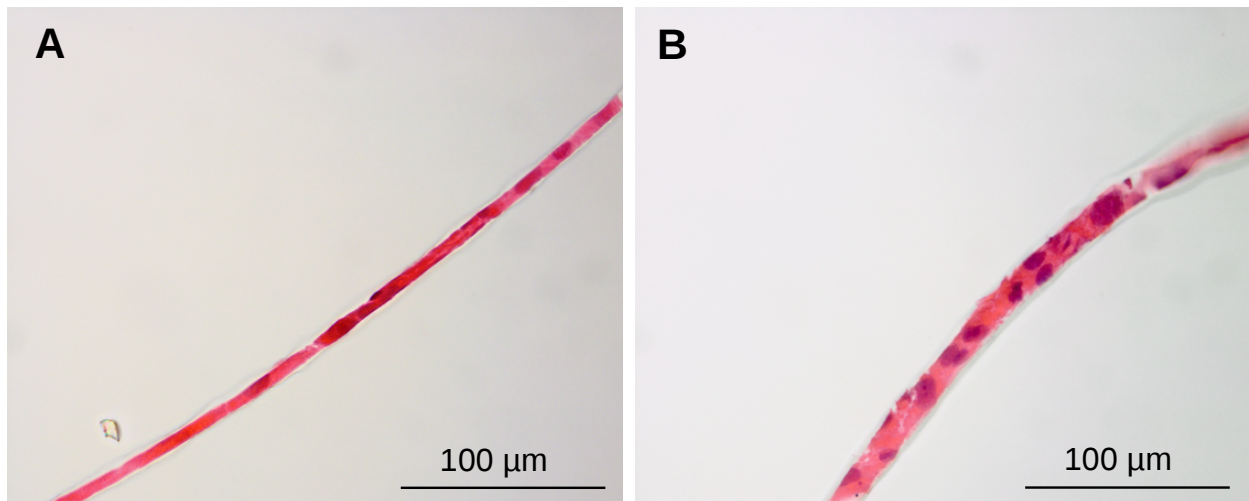


Abbildung 50: Histologische Schnitte an Tag 5 in Kultur. A: Monokultur von Kardiomyozyten. B: Ko-Kultur mit 25 % Fibroblasten

Eine Ko-Kultur von 75 % Kardiomyozyten und 25 % kardialen Fibroblasten (Gesamtzellzahl: 400.000 Zellen pro CellDrum) ist in Abbildung 50B dargestellt. Die Dicke der Zellschicht beträgt etwa 16 µm. In diesem Fall liegen die Zellkerne nicht dicht auf dem Substrat auf, sondern teilweise in der Höhe versetzt.

Die histologischen Untersuchungen unterstützen die Hypothese, dass durch die Zugabe von kardialen Fibroblasten die Ausbildung einer dreidimensionalen Gewebestruktur ermöglicht wird.

Die histologischen Schnitte wurden im Arbeitskreis von Prof. Rudolf Wiesner am Institut für vegetative Physiologie der Universität Köln durchgeführt.

4.8 Vergleich der gemessenen kontraktile Eigenschaften von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten mit Literaturdaten

Tabelle 3 zeigt eine Zusammenstellung der Literaturdaten zu den kontraktile Eigenschaften von Kardiomyozyten. In der letzten Reihe sind die Ergebnisse dieser Arbeit dargestellt.

Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von gesundem humanem Spendermaterial liegen hierzu nur wenige Daten in der Literatur vor. Der größte Teil der Messungen wurde am Modellorganismus Ratte durchgeführt. Hier wurden vor allem ventrikuläre Zellpräparationen von juvenilen Spendertieren eingesetzt, aber auch Zellen von embryonalen und adulten Tieren.

Es zeigen sich große Unterschiede in den gemessenen Zellkräften. Dies ist zum einen auf die Unterschiede in den Messaufbauten zurückzuführen, zum anderen auf die Präparation. So ist die gemessene Zellkraft bei dreidimensionalen Matrizes, in die eine große Anzahl von Zellen eingebettet wurde, erwartungsgemäß größer als bei Einzelzellen. Doch auch zwischen den Einzelzellpräparationen, die im gleichen Messaufbau untersucht wurden, bestehen große Unterschiede. Ob diese Unterschiede auf die unterschiedlichen Spezies zurückzuführen sind oder den Reifegrad der Zellen, kann hier nicht abschließend geklärt werden. Ein wichtiger Faktor bei der Kraftmessung ist jedoch die Geometrie der Präparation, da es sich bei der Kraft um eine vektorielle Größe handelt. Schon bei der Vermessung von Einzelzellen mittels isometrischer Kraftmessung hängt das Messergebnis stark von der Geometrie der Probe ab. Werden Zell-Cluster oder dreidimensionale Matrizes verwendet, bei denen die tatsächliche Orientierung der Zellen noch schwieriger zu bestimmen und kontrollieren ist, sind die Messergebnisse nicht mehr vergleichbar mit Einzelzellmessungen.

Die Ergebnisse der Messmethoden, deren Messwert eine mechanische Spannung ist, zeigen erheblich kleinere Unterschiede in den Resultaten. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass hier die Geometrie der Probe als Faktor schon in das Messergebnis einfließt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3: Literaturdaten zu Kraft und Spannung von Kardiomyozyten im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit. * A: Atrium. V: Ventrikel. N: Nodus. ** IFT: Isometrische Kraftmessung, AFM: Rasterkraftmikroskopie, BH: Biohybrid ,EM: Elastische Mikropfosten. *** Abhängig von der Elastizität des Substrats

Spezies	Gewebe*	Reifegrad	Präparation	Setup**	Kraft [μ N]	Spannung [kPa]	Quelle
Frosch	A	adult	Einzelzelle	Optisch	0,2	-/-	30
Meerschweinchen	V	adult	Einzelzelle	Optisch	1,23 \pm 0,44	5,3 \pm 2,6	134
Maus	A/V/N	iPS	Zell-Cluster	IFT	2,7	-/-	33
Ratte	-/-	juvenil	Einzelzelle	IFT	20 - 40	9,05	104
Ratte	V	adult	Einzelzelle	IFT	-/-	41,1	34
Ratte	V	adult	Einzelzelle	IFT	-/-	17,7 \pm 1,7	32
Ratte	V	embryonal	Einzelzelle	AFM	0,012	-/-	41
Ratte	-/-	embryonal	Einzelzelle	EM	0,01 – 0,8***	-/-	37
Ratte	V	juvenil	3D-Matrix	IFT	340 \pm 30	-/-	48
Ratte	V	juvenil	3D-Matrix	Optisch	110 - 220	-/-	49
Ratte	V	juvenil	Monolayer	BH	-/-	15,4 \pm 1,4	47
Ratte	V	juvenil	Monolayer	BH	-/-	9,2 \pm 3,5	42
Ratte	V	juvenil	Monolayer	BH	-/-	20,7 \pm 5,6	43
Mensch	V	adult	Einzelzelle	IFT	-/-	51 \pm 8	32
Mensch	V	adult	Einzelzelle	IFT	-/-	29,6 \pm 4,5	31
Mensch	A/V/N	iPS	Monolayer	CD	2,3 \pm 0,4	43,1 \pm 7,5	

4.9 Pharmakologische Validierung

4.9.1 Kontrollmessungen

Um den Einfluss des kumulativen Messverfahrens auf das Ergebnis zu untersuchen, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven aufgenommen, bei denen die zugesetzten Lösungen lediglich das Substanz-Lösungsmittel (DMSO) in der jeweiligen Konzentration enthalten war (maximal 0,1 %). Es wurden in Abständen von 5 min jeweils 20 % des Mediums gegen lösungsmittelhaltiges Medium ausgetauscht. Es zeigte sich, dass sowohl die Amplitude als auch das Integral während der ersten beiden Zugaben um ca. 10 % niedriger lagen als zu Beginn der Messreihe. Bei der dritten Konzentration entsprach der gemessene Wert wieder dem Startwert. Bei der vierten und fünften Messung stiegen sowohl Amplitude als auch Integral weiter bis auf ca. 110 % an. Die Dauer der CR-Zyklen wurde nur unwesentlich verändert, während die Frequenz ab der zweiten Messung bei 90 % konstant blieb. Die Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchungen wurden um die Beträge der Abweichungen korrigiert.

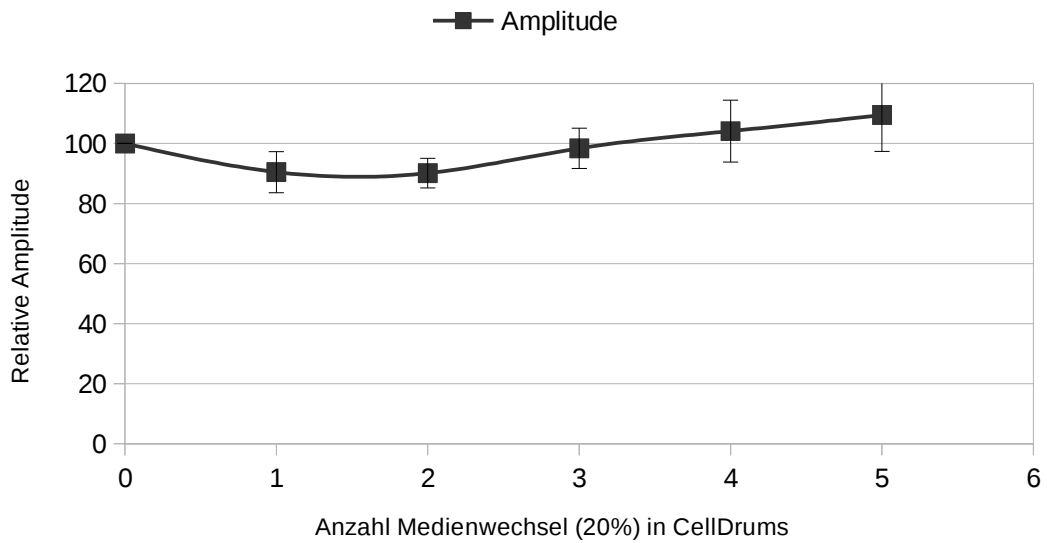


Abbildung 51: Kontrollmessung: Abhängigkeit der Amplitude von der Anzahl der durchgeführten Medienwechsel ohne Substanz. $n=6$

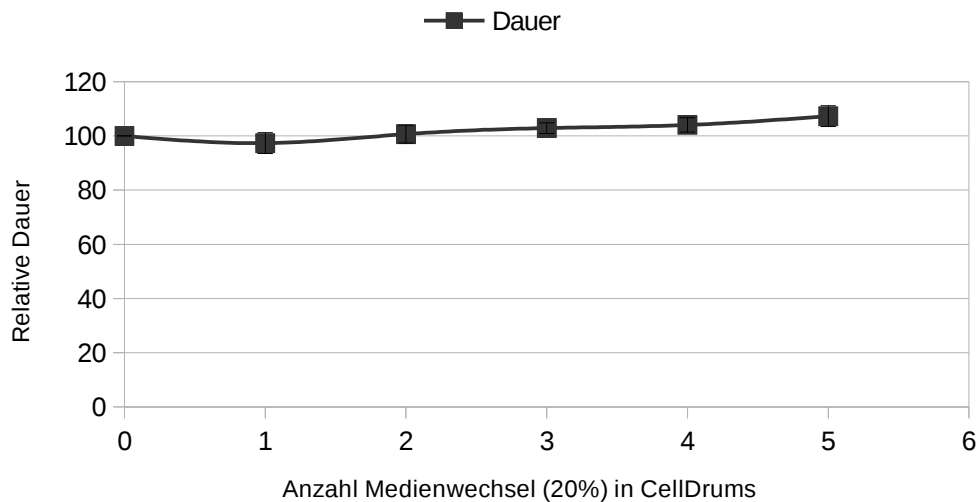


Abbildung 52: Kontrollmessung: Abhängigkeit der Dauer von der Anzahl der durchgeführten Medienwechsel ohne Substanz. $n=6$

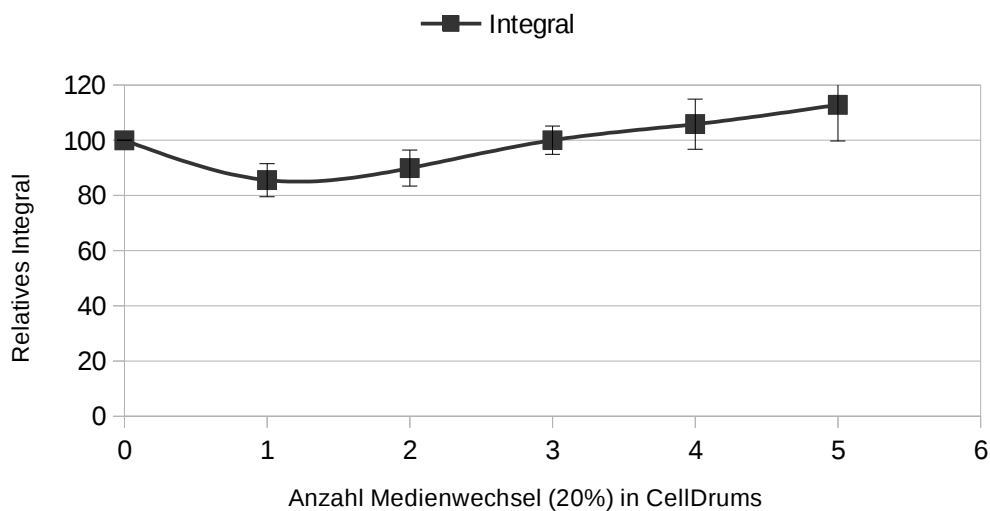


Abbildung 53: Kontrollmessung: Abhängigkeit des Integrals von der Anzahl der durchgeführten Medienwechsel ohne Substanz. $n=6$

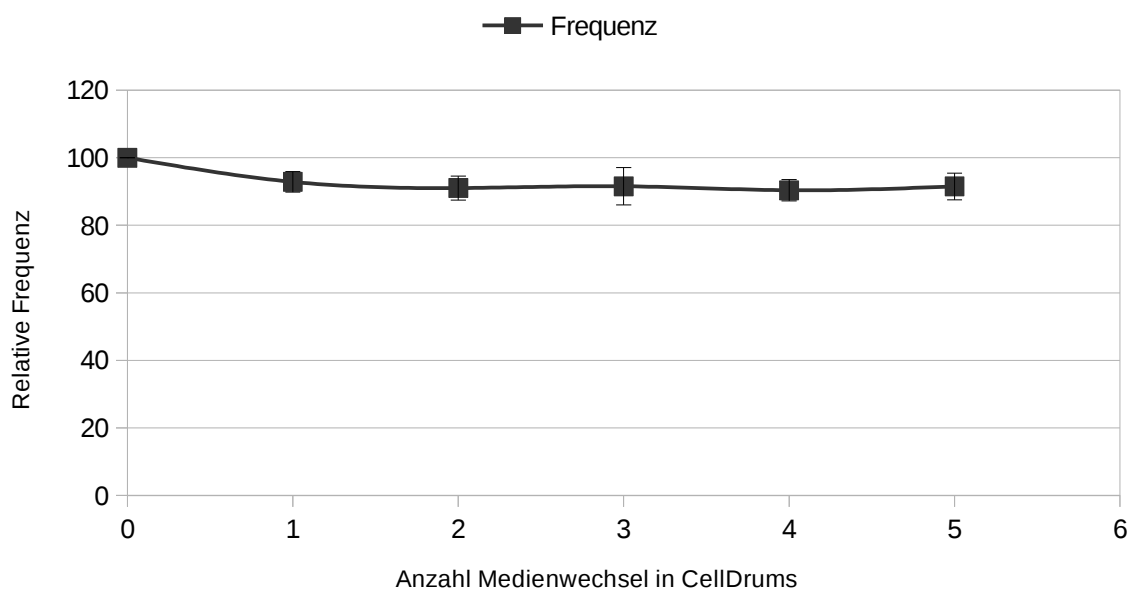


Abbildung 54: Kontrollmessung: Abhängigkeit der Frequenz von der Anzahl der durchgeführten Medienwechsel ohne Substanz. $n=6$

4.9.2 Untersuchungen an Monokulturen von Kardiomyozyten

Tabelle 4 fasst die gemessenen Wirkungen von Calcium- und Natrium-Modulatoren auf Monokulturen von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten zusammen.

Tabelle 4: Wirkung ausgewählter Agonisten und Antagonisten auf Monokulturen von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten

		Amplitude	Dauer	Integral	Frequenz
Calcium-Modulatoren	S-Bay K8644	↑	↑	↑	↓
	Verapamil	↓	→	↓	↑
Natrium-Modulatoren	Veratridin	↑	→	↑	↓
	Lidocain	↓	→	↓	↓

S-Bay K8644:

Der selektive Calciumkanal-Öffner *S-Bay K8644* (Abbildung 55) aus der 1,4-Dihydropyridin-Klasse erhöhte die Schlagamplitude bis zu einer Konzentration von 90 nM um 60 % bei gleichzeitiger Verlängerung der Dauer auf 150 %. Als Resultat der Erhöhung von Amplitude und Verlängerung des CR-Zyklus stieg das Integral auf 250 %. Durch die Verlängerung des CR-Zyklus sank die Frequenz um 20 %. Alle Veränderungen stehen in Einklang mit dem Wirkmechanismus von *S-Bay K8644*.¹⁰⁵ Dieser beruht auf dem erhöhten Einstrom von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum. Die hierdurch erhöhte Calciumkonzentration im Zytoplasma verstärkt das sogenannte *Calcium-induced Calcium-Release* (CICR) aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma, in dessen Folge mehr Calciumionen für die Kontraktion zur Verfügung stehen. Durch den vermehrten Einstrom ohne Modulation des Ausstroms während der Repolarisierung dauert das Einstellen des Gleichgewichts länger im Vergleich zum unstimulierten Zustand der Zelle. Hieraus resultiert die Verlängerung des Aktionspotentials und somit auch die Verringerung der Frequenz.

Bezogen auf die Kontraktionsamplitude liegt der ermittelte EC_{50} -Wert (halbmaximale effektive Konzentration) von ca. 80 nM im gleichen Bereich, wie er sowohl bei Atrien-Präparationen¹⁰⁵ und ventrikulären Gewebestreifen¹⁰⁶ von *Cavia porcellus*

(Meerschweinchen) als auch bei Arterien-Ringen¹⁰⁷ des Schweins ermittelt wurde.

Verapamil:

Der selektive Calciumkanal-Blocker *Verapamil* (Abbildung 56) verringerte die Amplitude bis auf 40 %. Das Integral wurde um den gleichen Betrag verringert. Während die Dauer bis zu einer Konzentration von 180 nM unbeeinflusst blieb, wurde die Frequenz um 30 % erhöht. Der geringe und inkonsistente Einfluss von Verapamil auf die Dauer des CR-Zyklus scheint auf den ersten Blick nicht nachvollziehbar, da die Substanz den gegenteiligen Effekt von S-Bay K8644 zeigen sollte. Die gemessenen Daten stimmen jedoch mit elektrophysiologischen Messungen überein, die an Purkinje-Fasern von Kaninchen durchgeführt wurden.¹⁰⁸

Im quantitativen Vergleich mit Literaturdaten ist der ermittelte IC₅₀-Wert (halbmaximale inhibitorische Konzentration) von ca. 150 nM bezogen auf die Schlagamplitude etwa eine Größenordnung kleiner als die Messergebnisse an Papillarmuskel-Präparationen Kaninchen,¹⁰⁹ Katze¹¹⁰ oder Hund.¹¹¹ Lediglich in den Versuchen von *Singh und Vaughan Williams* an Atrium-Präparationen des Kaninchens wurden mit einem IC₅₀-Wert von 300 nM vergleichbare Ergebnisse erzielt.¹¹²

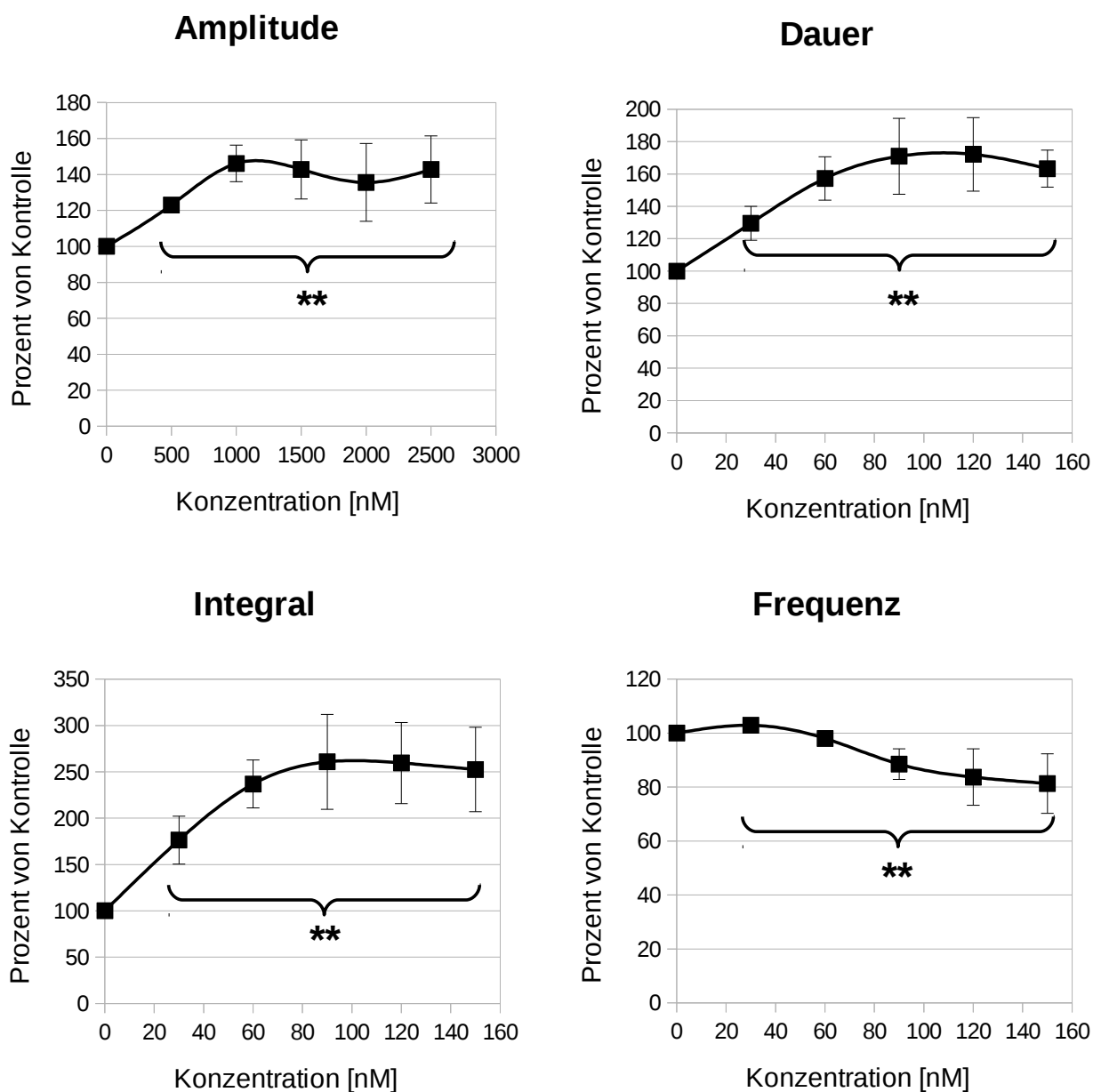


Abbildung 55: Pharmakologische Wirkung von S-Bay K8644 auf Monokulturen von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten. $n=6$. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$

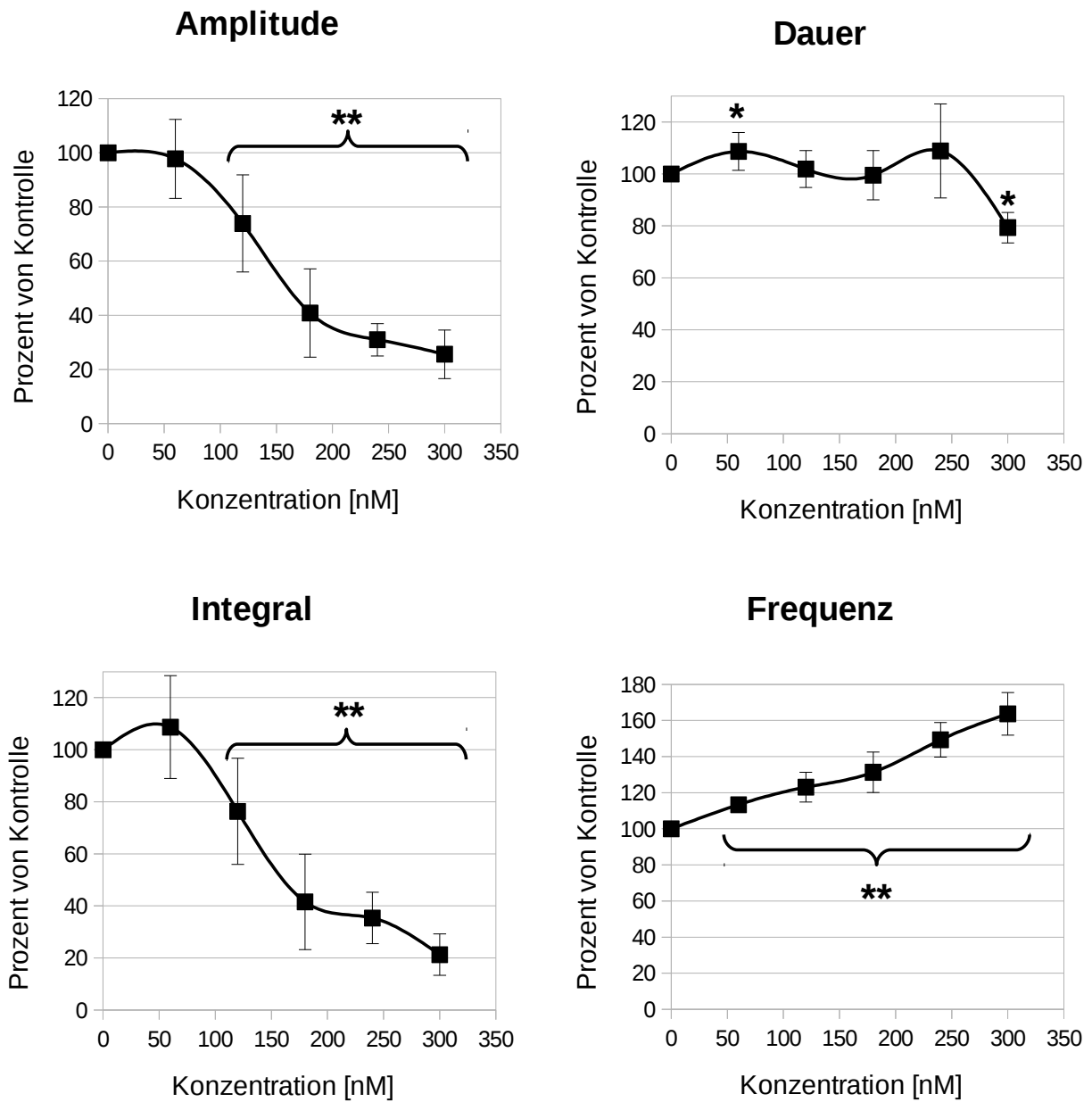


Abbildung 56: Pharmakologische Wirkung von Verapamil auf Monokulturen von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten. $n=6$. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$

Veratridin:

Der Natriumkanal-Agonist *Veratridin* (Abbildung 57) erhöhte die Amplitude um 40 %. Aufgrund des vermehrten Einstroms von Natriumionen und der damit einhergehenden verstärkten Depolarisation der Zelle werden mehr Calciumkanäle pro Zeiteinheit geöffnet. Hieraus resultiert ein vermehrter Einstrom von Calciumionen, wodurch wiederum die Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum gefördert wird. Im Gegensatz zu tierexperimentellen Daten, die mit dem Langendorff-Herz erhoben wurden, führte Veratridin zu keiner Verlängerung des CR-Zyklus.¹¹³ Dies kann auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass die Verlängerung des Aktionspotentials ein langsamer Prozess ist, der innerhalb von Stunden eintritt.¹¹⁴ Aufgrund der Tatsache, dass die Dauer der CR-Zyklen im untersuchten Zeitraum weitestgehend unverändert blieb, vergrößerte sich das Integral mit der gleichen Kinetik wie die Amplitude. Trotz der konstanten Dauer der CR-Zyklen nahm die Frequenz um 40 % ab. Der gleiche Effekt wurde im Tierexperiment nachgewiesen.¹¹⁵

Bezogen auf die Amplitude lag der ermittelte EC_{50} -Wert bei ca. 700 nM und somit etwas etwas höher als bei Papillarmuskel-Präparationen des Meerschweinchens (400 nM).¹¹⁶

Lidocain:

Lidocain, ein Natriumkanal-Antagonist, senkte die Schlagamplitude um 60 % bei einer Konzentration von 2,5 μ M (Abbildung 58). Wie beim Agonisten Veratridin wurde die Dauer des CR-Zyklus nicht verändert. Dementsprechend veränderte sich das Integral in gleicher Weise wie die Amplitude. Die Frequenz wurde wie beim Agonisten gesenkt (-40 %). Der Grund hierfür liegt in der Verlängerung der totalen Refraktärzeit, wodurch eine erneute Depolarisation verzögert wird.¹¹⁷

Der ermittelte IC_{50} -Wert von ca. 1,5 μ M liegt etwa zwei Größenordnungen niedriger als Literaturdaten, erhoben an Papillarmuskel-Präparationen des Meerschweinchens¹¹⁸ oder im Langendorff-Aufbau am Kaninchen-Herz (100 μ M).¹¹⁹

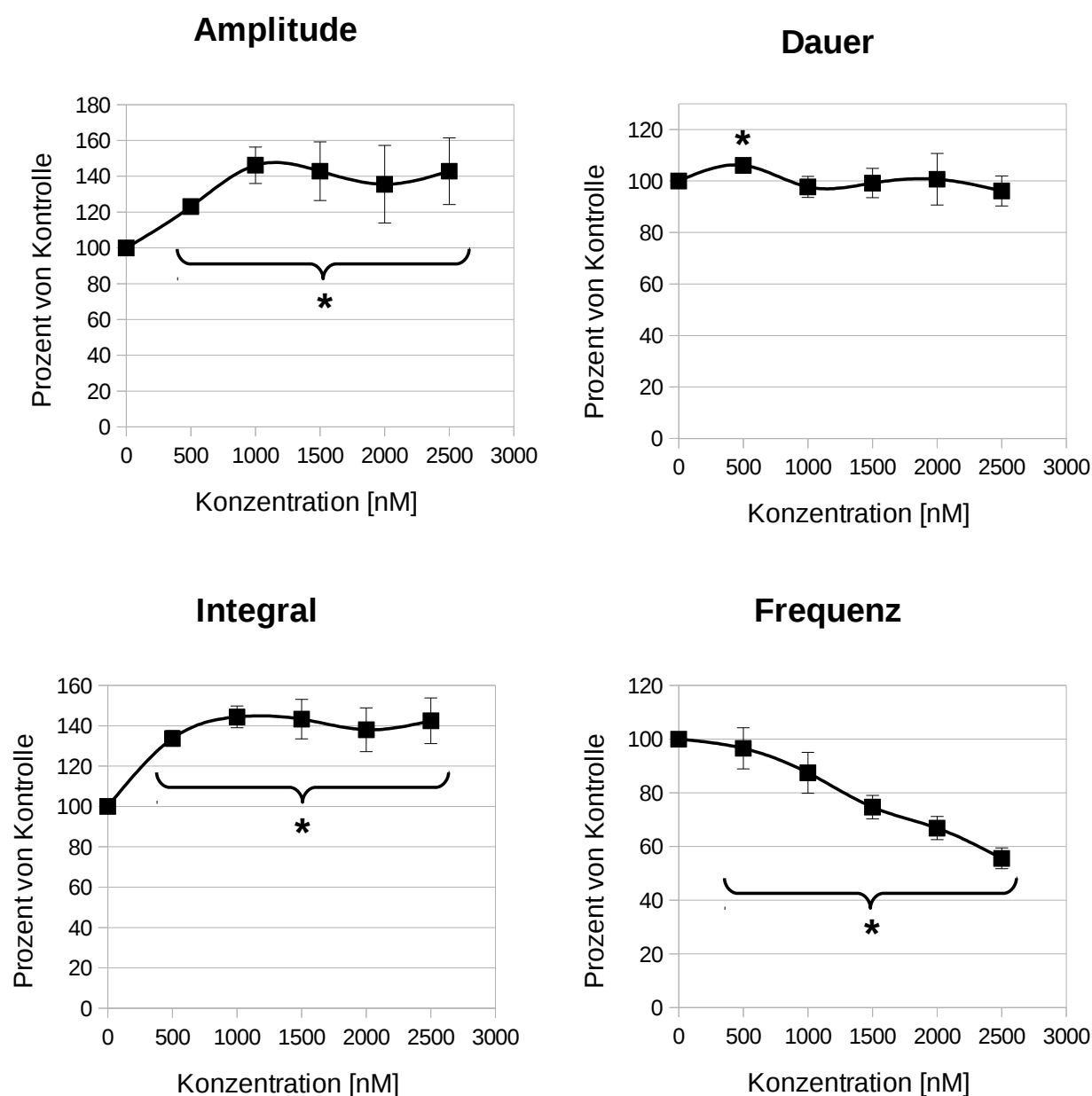


Abbildung 57: Pharmakologische Wirkung von Veratridin auf Monokulturen von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten. n=4. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$

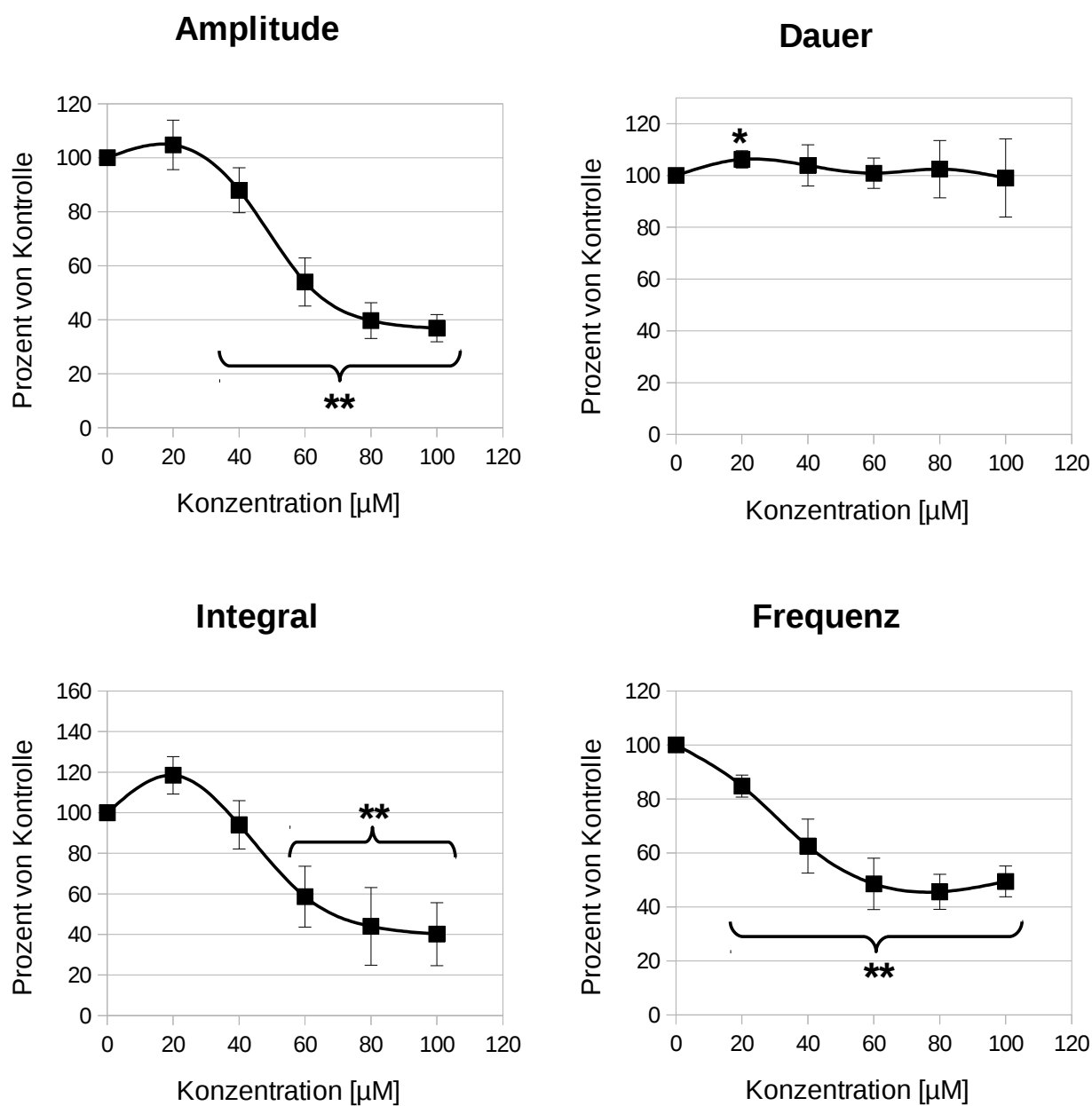


Abbildung 58: Pharmakologische Wirkung von Lidocain auf Monokulturen von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten. $n=6$. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$

4.9.3 Untersuchungen an Ko-Kulturen von Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten

Tabelle 5 fasst die gemessenen Wirkungen von Myosin-Modulatoren und inotrop wirkenden Hormonen auf Ko-Kulturen von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten zusammen.

Tabelle 5: Wirkung von Myosin-Modulatoren und inotropen Hormonen auf Ko-Kulturen von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten

		Amplitude	Dauer	Integral	Frequenz
Myosin-Modulatoren	Omecamitv	→ ↓	↑	↑ ↓	↓
	Blebbistatin	↓	↓	↓	↓
Inotrope Hormone	IGF-I	↑	↑	↑	→
	Endothelin	→	↑	→	→

Omecamitv Mecarbil:

Omecamitv mecarbil (Abbildung 59) ist ein selektiver kardialer Myosin-Aktivator. Es wirkt durch Erhöhung der ATPase-Aktivität des Myosin-Kopfes durch Beschleunigung der Dissoziationsraten der Spaltprodukte ADP und P_i (siehe Abschnitt 2.1.3 auf Seite 10). Hierdurch kommt es weder zu Veränderungen der Ionenströme über die Zellmembran noch zu veränderten Ionenkonzentrationen innerhalb des Zytoplasmas. Die Hauptwirkung von Omecamitv auf die Inotropie des Herzens ist die Vergrößerung der Auswurfleistung durch Verlängerung der diastolischen Auswurfzeit und Erhöhung des *Fractional Shortening*.¹²⁰ Bei letzterem handelt es sich um die prozentuale Verkürzung des Gewebes während der Kontraktion. Das Maß für die Verkürzung des Gewebes im CellDrum-Modell ist die Amplitude. Hier konnte an hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten im Konzentrationsbereich zwischen 100 nM und 100 μ M keine stärkere Verkürzung nachgewiesen werden. Im Gegenteil nahm die Amplitude bei der höchsten Konzentration ab. Ein möglicher Grund hierfür kann eine „Verkrampfung“ des Gewebes bei sehr hohen Konzentrationen von Omecamitv durch die gesteigerte Myosin-Aktivität sein. Die Verlängerung der diastolischen Auswurfzeit wurde im Modell jedoch klar aufgezeigt. So verlängerte sich die Dauer des CR-

Zyklus um 40 %. In der Folge stieg auch das Integral bis zu einer Konzentration von 10 μM an. Bei der höchsten Konzentration wurde der positive Effekt der Verlängerung auf das Integral durch die Verminderung der Amplitude überlagert. Die Frequenz sank bis zur Konzentration von 10 μM auf 80 % ab.

Blebbistatin:

Der Myosin-ATPase-Inhibitor *Blebbistatin* (Abbildung 60) bindet spezifisch an den Myosin-ADP- P_i -Komplex und verhindert so die Dissoziation von ADP und P_i .¹²¹ Hierdurch wird das Myosin in einem Zustand geringer Aktin-Affinität blockiert. Der negativ-inotrope Effekt von Blebbistatin lässt sich nicht durch elektrophysiologie Untersuchungen nachweisen, da es keinen Einfluss auf die Ionenströme oder -konzentrationen hat. Dieses Phänomen wird als *Excitation-Contraction-Decoupling* bezeichnet, da es die Elektrophysiologie von der mechanischen Arbeit trennt. Die Wirkung von Blebbistatin auf hiPS-abgeleitete Kardiomyozyten konnte mit der CellDrum-Technologie klar demonstriert und quantifiziert werden. Bei einer Konzentration von 1 μM wurden die Amplitude und das Integral um ca. 50 % reduziert. Auf die Dauer und die Frequenz hatte die Substanz in dieser Konzentration keinen Einfluss. Bei einer Konzentration von 10 μM wurde die Kontraktion komplett unterbunden.

In biochemischen Untersuchungen des Einflusses von Blebbistatin auf die ATPase-Aktivität von kardialem Myosin wurden IC_{50} -Werte von 400 bzw. 500 nM ermittelt.^{122,123} Mithilfe optischer Erfassung der Kontraktilität von ventrikulären Einzelzellen der Ratte wurden vergleichbare Ergebnisse ermittelt.¹²⁴ Im Vergleich hierzu lagen die IC_{50} -Werte bei Papillarmuskel-Präparationen von Maus, Ratte und Meerschwein im Bereich von 2-12,5 μM .^{121,125,126} Somit liegen die ermittelten Ergebnisse dieser Arbeit ($\text{IC}_{50} = 1 \mu\text{M}$) zwischen den biochemischen ATPase-Assays und den ex-vivo-Experimenten.

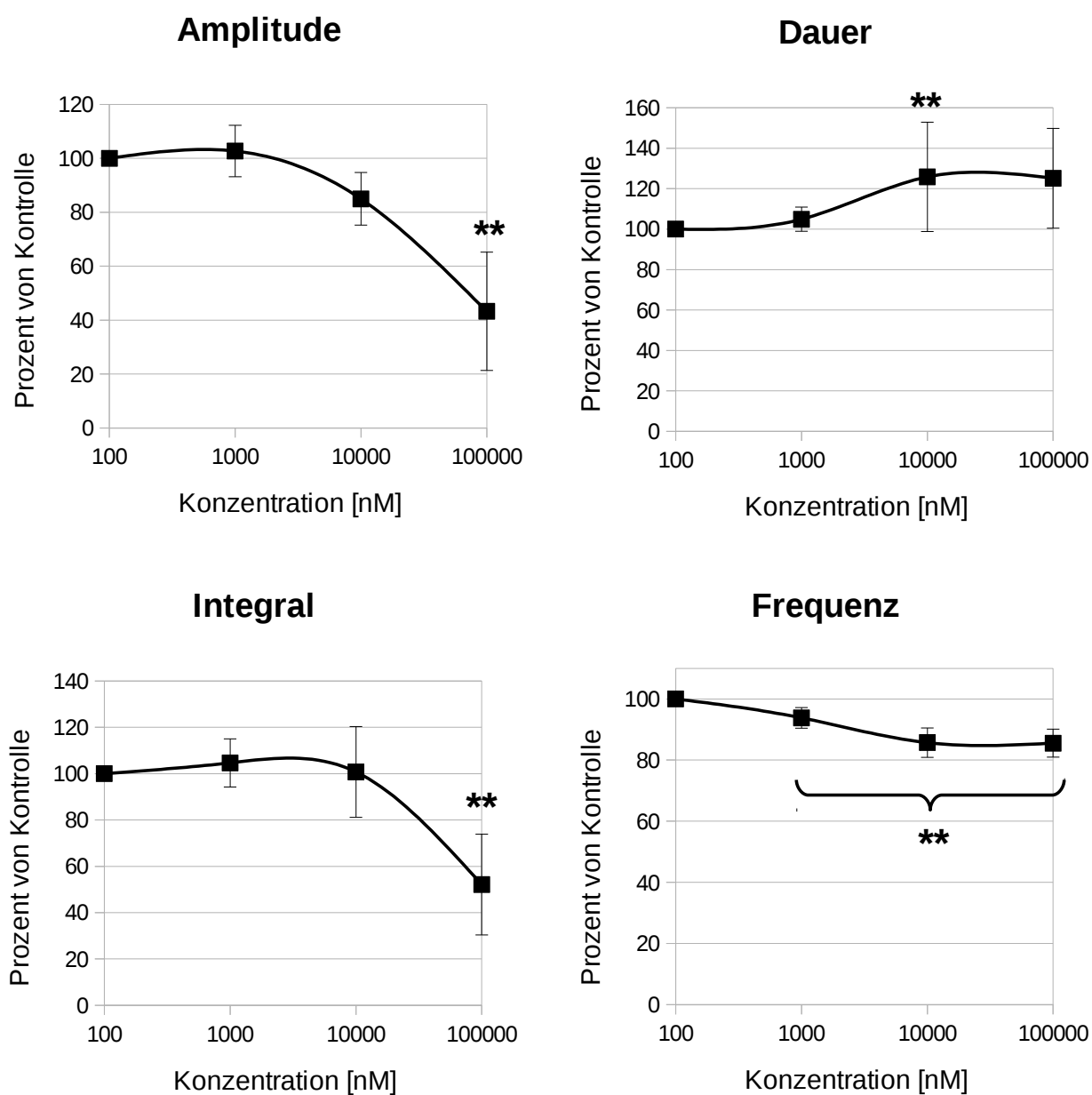


Abbildung 59: Pharmakologische Wirkung von Omecamtiv Mecarbil auf Ko-Kulturen von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten. $n=6$. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$

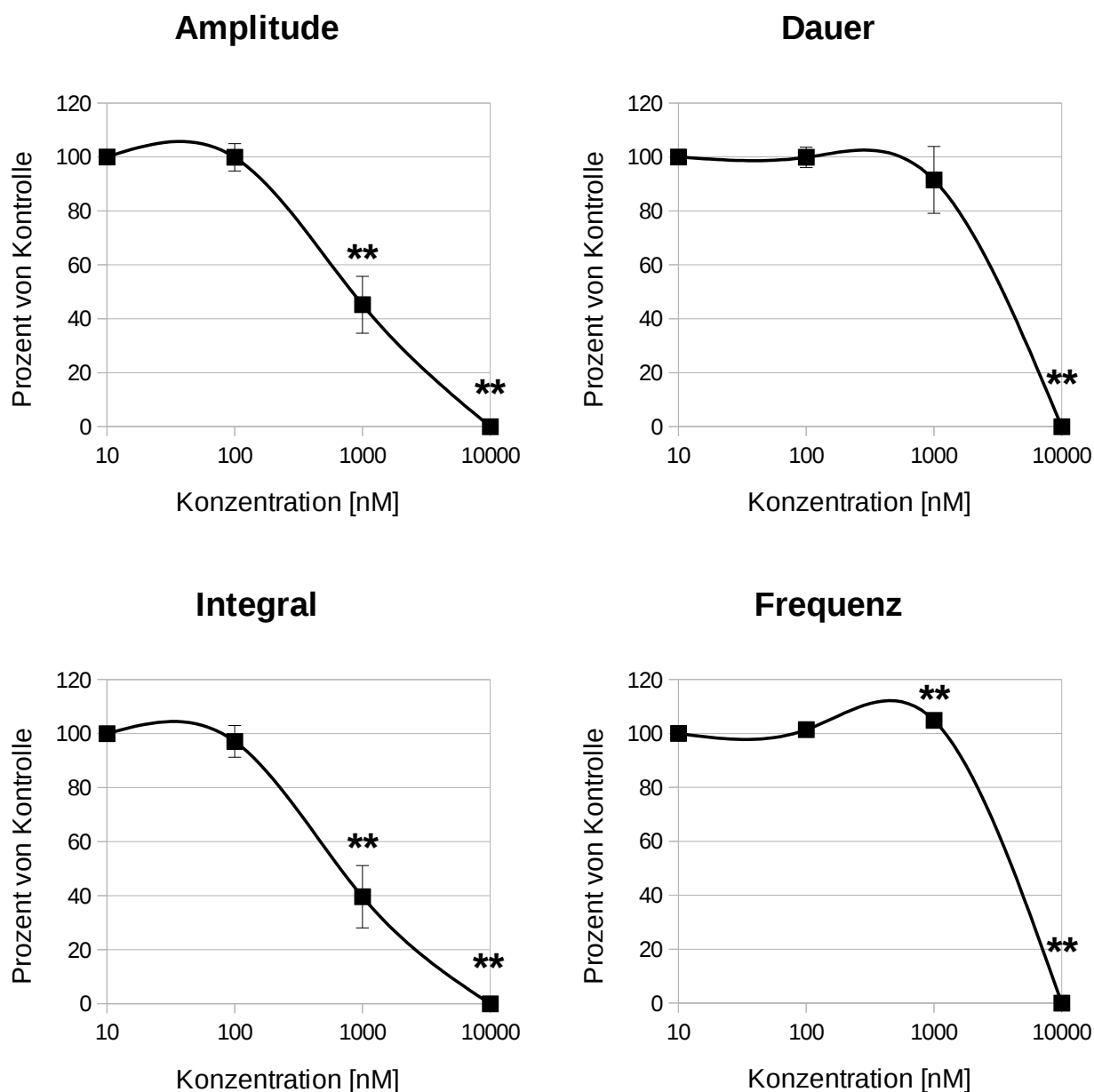


Abbildung 60: Pharmakologische Wirkung von Blebbistatin auf Ko-Kulturen von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten. $n=6$. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$

IGF-1:

Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor I (*insulin-like growth factor I, IGF-I*) nimmt eine zentrale Rolle im Metabolismus – vor allem im Anabolismus – des Herzwebes ein.¹²⁷ Neben dieser Funktion nimmt der Faktor auch direkten Einfluss auf die Herztätigkeit. Dieser positiv-inotrope Effekt wird maßgeblich durch die Aktivierung von Calciumkanälen hervorgerufen.¹²⁸ Die Reaktion der Kardiomyozyten auf IGF-1 zeigte dementsprechend eine weitgehende Homologie zum Effekt des Calcium-Agonisten S-Bay K8644 (siehe Abschnitt 4.9.2). Die Amplitude stieg kontinuierlich auf 150 % bei einer Konzentration von 100 nM (Abbildung 61). Gleichzeitig stieg die Dauer auf 115 %. Durch die kombinierte Erhöhung von Amplitude und Dauer stieg das Integral bis auf 180 %. Lediglich die Frequenz wurde nicht durch IGF-1 moduliert. Dies deutet darauf hin, dass der Faktor neben den Calciumkanälen noch auf weitere Elemente des elektrischen oder kontraktiles Apparates Einfluss nimmt.

Kinugawa und Kollegen fanden mittels optischer Kontraktionsanalyse von ventrikulären Kardiomyozyten des Hundes einen EC_{50} -Wert von ca. 7 nM.¹²⁸ An Papillarmuskel-Präparationen der Ratte wurde der maximale Effekt bei 10 nM erreicht, während bei 100 nM der positiv inotrope Effekt wieder abnahm.¹²⁹ In Langendorff-Experimenten am Frettchen-Herzen wurde ein EC_{50} -Wert von ca. 70 nM ermittelt.¹³⁰

Endothelin:

Endothelin ist ein G-Protein-gekoppeltes Peptid-Hormon, das vor allem in der Gefäßauskleidenden Zellschicht, dem Endothel gebildet wird. Es wird vermehrt bei pathologischen Veränderungen des kardiovaskulären Systems ausgeschüttet und dient in der Medizin als Marker für chronische Herzerkrankungen. Elektrophysiologische Experimente an Maus-Kardiomyozyten zeigten, dass sich Endothelin über den G-Protein-Signalfad sowohl positiv als auch negativ auf spannungsabhängige Calciumströme auswirken kann.¹³¹ Während *James* einen negativ inotropen Effekt von Endothelin auf Maus-Kardiomyozyten beschreibt und dies auf die Spezies zurückführt,¹³² fanden *Nagasaka und Kollegen* einen positiv inotropen Effekt auf Maus-Kardiomyozyten.¹³³

Die Heterogenität der Ergebnisse wurde auch mittels optischer Calcium-Assays und mikroskopischer Analyse der Längenänderung an isolierten Kardiomyozyten der Ratte bestätigt.¹³⁴ Sie spiegelte sich auch in den durchgeführten CellDrum-Experimenten wider (Abbildung 62). Schon bei der Zugabe der niedrigsten Dosis von 1 nM zeigten sich in einigen Proben starke Effekte auf alle gemessenen Parameter, während in den restlichen Proben kein Effekt zu erkennen war. Zwischen den kumulativen Zugaben kam es insbesondere in der Frequenz zu spontanen und drastischen Veränderungen, die teilweise reversibel waren, teilweise erhalten blieben. Die Amplitude änderte sich über den gesamten Konzentrationsbereich nicht. Zu beachten sind die Großen Standardabweichungen bei allen Konzentrationen. Die Dauer der CR-Zyklen schien sich ab einer Endothelin-Konzentration von 10 nM bei einem Wert von 120 % zu stabilisieren. Auch das Integral zeigte in der Folge eine steigende Tendenz, jedoch mit starken Standardabweichungen, bedingt durch die Amplitude. Bei der Frequenz ließ sich, auch bedingt durch die großen Abweichungen, keine Tendenz feststellen.

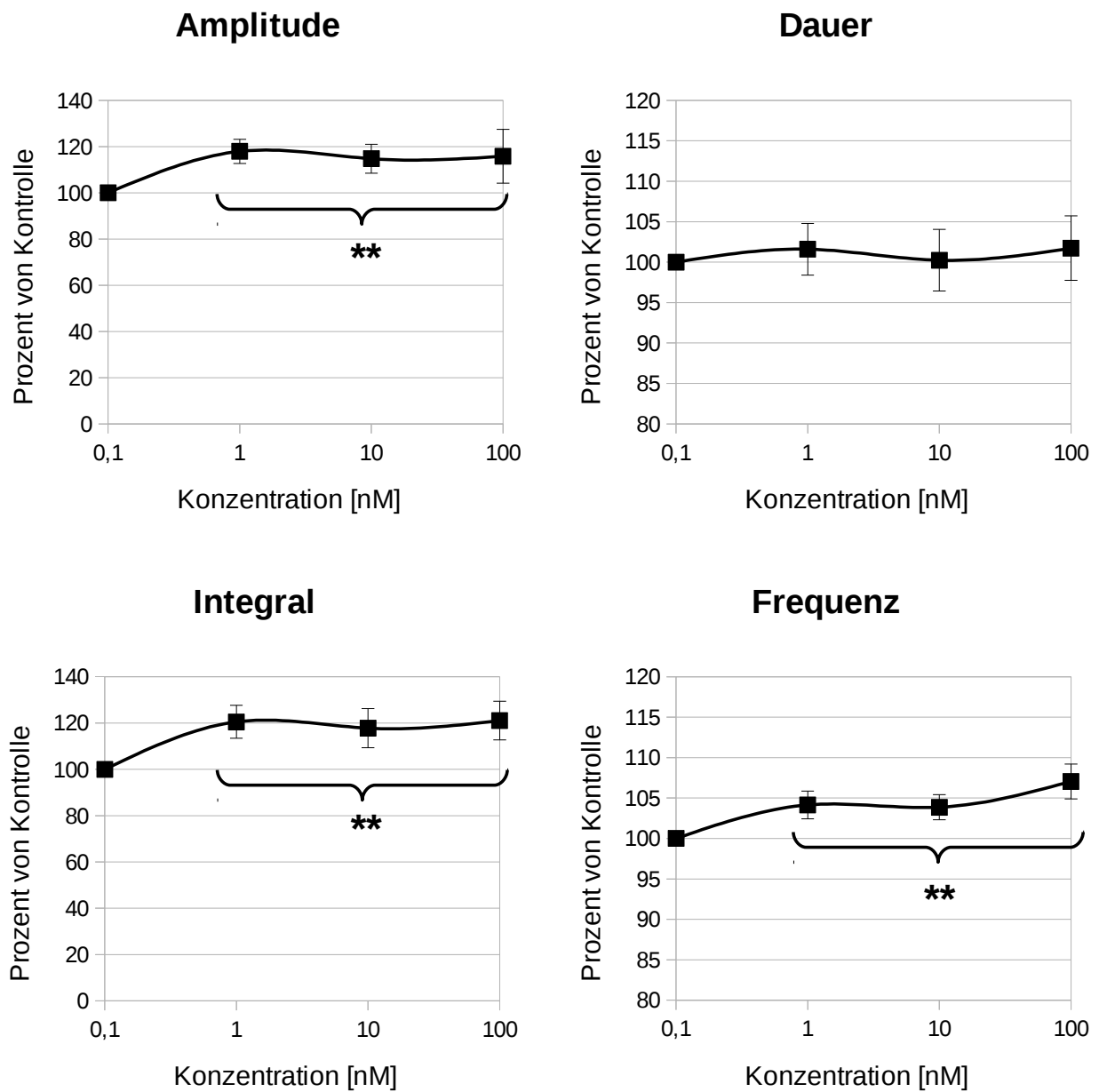


Abbildung 61: Pharmakologische Wirkung von IGF-1 auf Ko-Kulturen von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten. $n=6$. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$

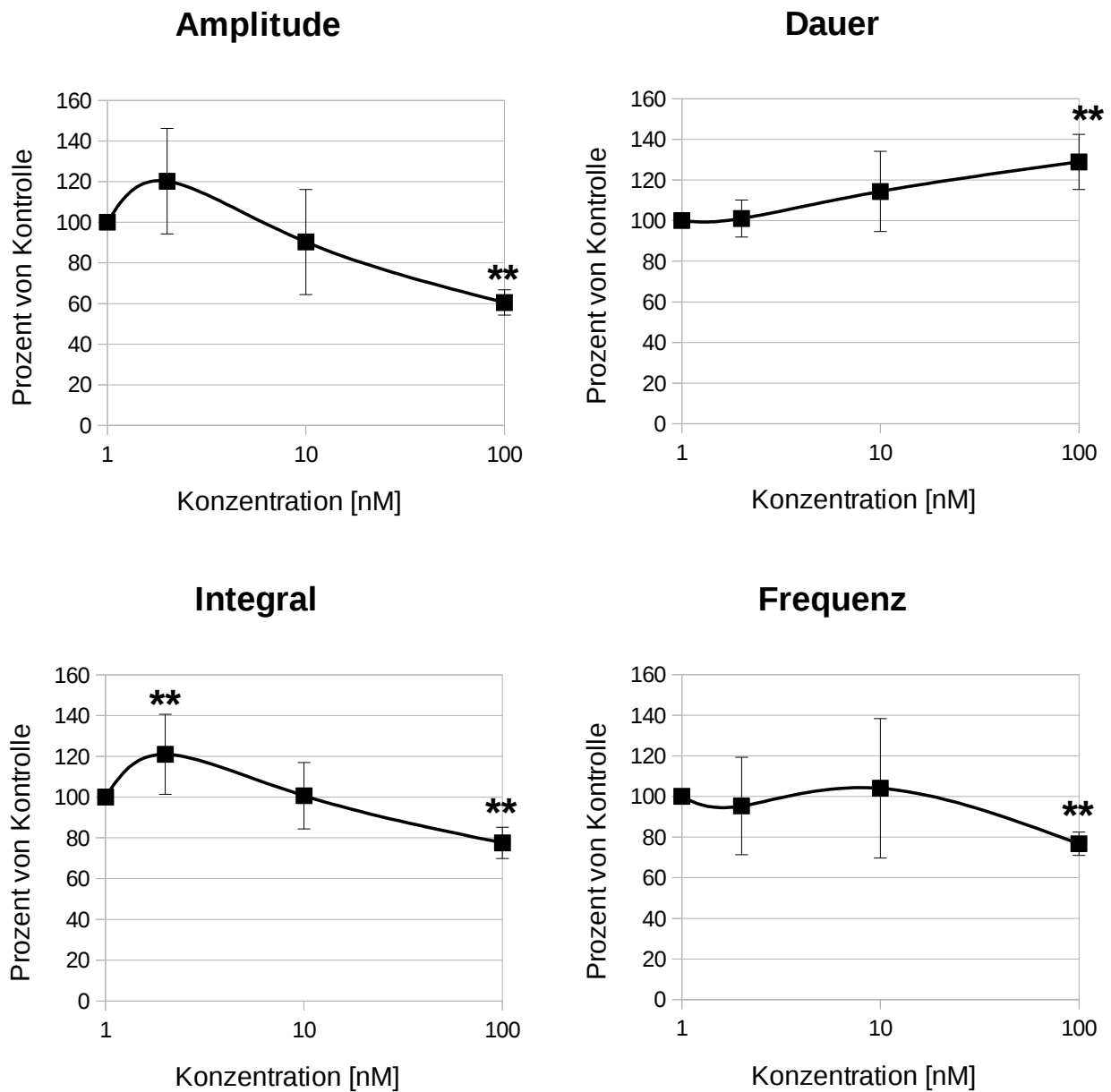


Abbildung 62: Pharmakologische Wirkung von Endothelin auf Ko-Kulturen von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten. $n=6$. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$

4.10 Einordnung der pharmakologischen Ergebnisse

Der Bedarf der pharmakologischen Forschung nach einer standardisierten Messmethode zur Quantifizierung von inotropen Effekten auf das Herz spiegelt sich in der Vielzahl an Kombinationen von Modellorganismen und Messaufbauten wider. In der Regel werden Nagetiere und andere Kleinsäuger als Modellorganismen eingesetzt. Zum einen besitzen die verwendeten Spezies hohe Reproduktionsraten und kurze Lebenszyklen, wodurch sie schnell maturieren und früh für Experimente zur Verfügung stehen. Zum anderen ist ihre Haltung mit vergleichsweise geringem Aufwand verbunden. Hierdurch haben sich diese Spezies im Verlaufe der Jahrzehnte als Modellorganismen in der pharmakologischen Forschung etabliert, obwohl die Übertragbarkeit der erhobenen Daten auf den Zielorganismus Mensch Gegenstand ständiger Diskussion ist.²⁹

Die eingesetzten Methoden in der Literatur basieren weitgehend auf *ex-vivo*-Experimenten an Organteilen oder isolierten Zellen mittels isometrischer Kraftmessung.^{30,32-34,135} Jedoch sind essentielle Parameter wie die Form und Ausrichtung des Gewebes nur schwer kontrollierbar und die Skalierbarkeit stark eingeschränkt (siehe hierzu Abschnitt 2.3.1).

In diesem Kontext ist festzustellen, dass ein Vergleich der pharmakologischen Literaturdaten mit den in dieser Arbeit erhobenen *in-vitro*-Daten nur schwer möglich ist. Im Falle von Blebbistatin ist durch die Korrelation der inotropen Wirkung mit der ATPase-Aktivität des Myosins eine biochemische Quantifizierung der Substanzeffekte möglich.^{122,123} Es ist davon auszugehen, dass biochemische Analysen die höchste Sensitivität besitzen, da hier biologische Parameter wie die Transportkinetik über die Zytoplasmamembran keine Rolle spielen. Im Vergleich der erhobenen Daten dieser Arbeit mit den biochemischen Untersuchungen zeigte sich, dass letztere etwa um den Faktor 2 sensitiver waren als die durchgeführten *in-vitro*-Experimente. Gleichzeitig waren die mit der CellDrum durchgeführten Experimente bis zu einem Faktor 10 sensitiver als Muskelpräparationen.^{121,125,126} Die gleiche Tendenz zeigte sich auch bei den meisten anderen Substanzen dieser Studie.

Der Hauptgrund hierfür liegt in der Tatsache begründet, dass es sich bei den

Explantaten um vergleichsweise dicke Gewebe ($>500\ \mu\text{m}$) handelt, bei denen Transportprozesse der Substanzen zum Zielort eine Rolle bei der pharmakologischen Kinetik spielen. Da die Explantate nicht mehr aktiv vaskularisiert sind, basiert der Stofftransport im wesentlichen auf Diffusion der Substanzen durch das Gewebe. Dies führt dazu, dass im zeitlichen Verlauf der Experimente nur Teile der Präparationen mit der Substanz in Kontakt kommen.

Eine Möglichkeit zum Erlangen besserer Vergleichbarkeit wäre der Einsatz von Kardiomyozyten der Tiermodelle in CellDrums. Durch die strikte Regulation von Tierexperimenten wird dieser Ansatz jedoch stark erschwert.

4.11 Ausblick

Die Untersuchung der kontraktile Eigenschaften von Kardiomyozyten stellt nur einen Teil der Möglichkeiten der CellDrum-Technologie dar. So können auch andere kontraktile Zellen wie glatte Muskelzellen und Skelettmuskelzellen in ähnlicher Weise mit dieser Methode untersucht werden. Auch bei diesen Zellen herrscht ein Mangel an technologischen Lösungen zur einfachen und reproduzierbaren Quantifizierung ihrer mechanischen Eigenschaften. Hier kann die Technologie zum einen für die Erforschung der Ursachen von Krankheiten wie arterieller Hypertonie bei glatten Muskelzellen und Muskeldystrophie bei Skelettmuskelzellen eingesetzt werden. Zum anderen kann sie auch zur Entwicklung neuer Medikamente gegen diese Krankheiten dienen. In diesem Zusammenhang ist die Erweiterung des bestehenden Systems vom Einkanal- zum Mehrkanal-Gerät von großer Bedeutung. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten kumulativen pharmakologischen Untersuchungen dauerten mit Vor- und Nachbereitung ca. eine Stunde pro Messreihe. Bei vier- bis sechsfacher Wiederholung pro Substanz ermöglicht das System so nur die Untersuchung von maximal zwei Substanzen pro Arbeitstag. Dadurch gehört es in seiner bestehenden Einkanal-Form zu den Low-Throughput-Systemen, die nur sehr eingeschränkt für pharmakologische Screenings eingesetzt werden können.

Darüber hinaus wurde eine wichtige Grundeigenschaft der CellDrum-Technologie in den bisherigen Arbeiten noch nicht ausgenutzt, die einen Schlüsselfaktor der Methode darstellt: Durch die Möglichkeit, mittels pneumatischem Druck die Grunddehnung der Membran und der darauf wachsenden Zellen sowohl statisch als auch dynamisch vorzugeben, könnten langfristige physiologische wie auch pathologische Bedingungen simuliert werden, was unter anderem bei der Untersuchung arterieller Hypertonie von großer Bedeutung ist. Darüber hinaus ist die Differenzierung von Stamm- und Vorläuferzellen durch mechanisches Training Gegenstand aktueller Forschung.¹³⁶⁻¹³⁸ Hier könnte die CellDrum-Technologie entscheidende Fortschritte erzielen. Einzige Grundvoraussetzung hierfür wäre die technische Adaption des Gerätes zur Langzeitkultur der Zellen. Diese Adaption

beträfe im Wesentlichen die Gasphase über dem Zellkulturmedium, welche mit CO₂ angereichert werden müsste, um den pH-Wert des Mediums zu stabilisieren und mit Luftfeuchtigkeit gesättigt werden, um ein Eintrocknen der Zellkulturen zu verhindern.

Neben der technischen Adaption bietet auch der zellbiologische Aspekt ein starkes Entwicklungspotential. In der bisherigen Entwicklung wurden Monolayer und besiedelte Hydrogele untersucht.⁶¹⁻⁶⁵ Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Gewebe aus Muskelzellen und Fibroblasten erzeugt und charakterisiert. Hierbei wurden die Zelltypen gleichzeitig ausgesät, was zu einer stochastischen Verteilung der Zellen auf der Membran führte. In zukünftigen Experimenten könnte durch eine sequenzielle Aussaat und/oder Mikrostrukturierung der Membran eine physiologischere Umgebung für die Zellen geschaffen werden, um das Modell weiter an die Realität heranzuführen.

5 Zusammenfassung / Summary

Bis dato ist die pharmakologische Forschung bei der Quantifizierung der inotropen Wirkungen von Substanzen auf Tierexperimente angewiesen. Da der Einsatz von Tierexperimenten zunehmend auf Widerstand in der Gesellschaft stößt, wird seit den 1980'er Jahren intensiv an *in-vitro*-Verfahren zur Messung von Kraft und Spannung von Geweben geforscht. Die bisher entwickelten Verfahren sind entweder indirekte Messverfahren oder benötigen komplexe Messaufbauten, die eine standardisierte Anwendung in der Pharmaforschung verhindern. Darüber hinaus sind diese Verfahren noch immer auf den Einsatz von Geweben oder Teilen davon angewiesen, sodass auch sie nicht ohne den Einsatz von Versuchstieren auskommen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines autokontraktiven Herzmuskelmodells auf der Basis des CellDrum-Systems unter Einsatz von humanen Stammzell-abgeleiteten Kardiomyozyten. Während das CellDrum-System eine standardisierte mechanische Charakterisierung von Zell-Monolayern und dünnen Gewebekonstrukten ermöglicht, kann durch den Einsatz von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten auf den Einsatz von Versuchstieren verzichtet werden.

Ein kritischer Punkt der Arbeit war die Langzeit-Kultur der Muskelzellen auf den PDMS-Membranen. Im Gegensatz zu anderen im Vorfeld untersuchten Zelltypen wie Endothelzellen oder Fibroblasten stellte die Kultur von Kardiomyozyten über einen längeren Zeitraum ein Problem dar, da diese Zellen sich durch ihre mechanische Aktivität von den Membranen ablösten. Aufgrund dieser Tatsache wurde eine Oberflächenmodifikation der CellDrum-Membranen etabliert. Diese Modifikation wurde charakterisiert um sicherzustellen, dass sie keinen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des Systems hat. Die Modifikation der Oberfläche wurde im Hinblick auf die Biokompatibilität und die Adhäsionskinetik der Zellen hin untersucht.

Es wurde eine Software zur Aufnahme der Messsignale und zur Steuerung des Tissue-Tension-Analyzers entwickelt, die auf die Spezifikationen für Signale von autokontraktiven Kardiomyozyten zugeschnitten ist. Darüber hinaus wurde eine Software zur Prozessierung der Messsignale entwickelt. Diese umfasste die auf die

kardio-spezifischen Signale angepasste Signalverarbeitung und Analyse.

Es wurden sowohl Monokulturen von hiPS-abgeleiteten Kardiomyozyten als auch Ko-Kulturen mit kardialen Fibroblasten auf die Wirkungen von Pharmaka hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das System in hohem Maße prädiktiv ist und die Wirkungen der Substanzen weitgehend mit den Literaturdaten aus Tierexperimenten übereinstimmen.

Summary:

To date, the mechanical properties of cardiac myocytes are exclusively quantifiable by animal-based models. Due to the fact that the application of animal experiments is increasingly subjected to ethical concerns, a number of in-vitro methods for the measurement of contractile force and tension has been developed in the past 30 years. These methods share the restrictions of indirect quantification or complex experimental setups. This impedes their routine application in pharmacological research. Additionally, due to the lack of human myocardial material, they rely on the examination of animal tissue.

The aim of this study was the development of an auto-contractile heart tissue model based on the CellDrum system by application of human stem cell-derived cardiac myocytes. The CellDrum system enables a standardised and scalable mechanical characterisation of cellular monolayers and thin tissue constructs, while the use of hiPS-derived cardiac myocytes avoids test animal sacrifice.

A critical point of this study was the long-term culture of myocytes on the PDMS membranes of the CellDrum system. In contrast to previously examined cell types like endothelial cells and fibroblasts, a myocyte culture on PDMS was impaired by their mechanical activity. As a consequence, a long term culture without chemical modification of the PDMS surface was not possible. In order to overcome this issue, a surface modification method was established. In order to ensure that the modification does not alter the mechanical properties of the PDMS membranes, the modification was analyzed. Subsequently, the biocompatibility was investigated and

the adhesion kinetics were recorded.

A data-acquisition software including process control for the Tissue-Tension-Analyser was developed with respect to the specific properties of auto-contractile cardiac myocytes. Additionally, a software package for processing and analysis of the acquired signals was developed.

Pharmacological characterisations were performed on monocultures of cardiac myocytes as well as on co-cultures with cardiac fibroblasts. It could be demonstrated that the system showed a high degree of predictability and that the results compare to animal experiments to a considerable extent.

6 Literaturverzeichnis

1. Gößwald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA. Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: Results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2013;**56**:650–655.
2. Nowossadeck S, Nowossadeck E. Krankheitsspektrum und Sterblichkeit im Alter. *Rep Altersdaten 1-2*. 2011;1–72.
3. Buzek J, Chastel O. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010. *Off J Eur Union*. 2010
4. Buzek J, Ask B. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009. *Off J Eur Union*. 2009
5. Borrell Fontelles J, Vanhanen M. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006. *Off J Eur Union*. 2006
6. Schleidgen S, Klingler C, Bertram T, Rogowski WH, Marckmann G. What is personalized medicine: sharpening a vague term based on a systematic literature review. *BMC Med Ethics*. 2013;**14**:55.
7. Ferreira LMR, Mostajo-Radji MA. How induced pluripotent stem cells are redefining personalized medicine. *Gene*. 2013;**520**:1–6.
8. Inoue H, Yamanaka S. The use of induced pluripotent stem cells in drug development. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;**89**:655–661.
9. Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Zwi-Dantsis L, Caspi O, Winterstern A, Feldman O, Gepstein A, Arbel G, Hammerman H, Boulos M, Gepstein L. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;**471**:225–229.
10. Gekle M, Wischmeyer E, Gründer S, Petersen M, Schwab A, Markwardt F, Klöcker N, Baumann R, Marti H. Taschenlehrbuch Physiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2010.
11. Souders CA, Bowers SLK, Baudino TA. Cardiac fibroblast: the renaissance cell.

- Circ Res.* 2009;**105**:1164–1176.
12. Lajiness J, Conway S. The dynamic role of cardiac fibroblasts in development and disease. *J Cardiovasc Transl Res.* 2012;**5**:739–748.
 13. Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 2005;**65**:40–51.
 14. Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. The origin of fibroblast and mechanism of cardiac fibrosis. *J cell Physiol.* 2010;**225**:631–637.
 15. Kakkar R, Lee RT. Intramyocardial fibroblast myocyte communication. *Circ Res.* 2010;**106**:47–57.
 16. Granzier HL, Labeit S. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res.* 2004;**94**:284–295.
 17. Schwartz A, Triggle DJ. Cellular action of calcium channel blocking drugs. *Annu Rev Med.* 1984;**35**:325–339.
 18. Grant AO. Cardiac ion channels. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2009;**2**:185–194.
 19. Levick JR. An Introduction to Cardiovascular Physiology. New York: Arnold; 2000.
 20. Tusscher KHWJ ten, Noble D, Noble PJ, Panfilov AV. A model for human ventricular tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;**286**:H1573–H1589.
 21. Luo CH, Rudy Y. A model of the ventricular cardiac action potential. depolarization, repolarization, and their interaction. *Circ Res.* 1991;**68**:1501–1526.
 22. Luo CH, Rudy Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. *Circ Res.* 1994;**74**:1071–1096.
 23. Carmeliet E. Cardiac transmembrane potentials and metabolism. *Circ Res.* 1978;**42**:577–587.
 24. Hille B. Ion Channels of Excitable Membranes. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates; 2001.
 25. Schmidt R, Lang F. Physiologie des Menschen. Heidelberg: Springer Medizin

- Verlag; 2005.
26. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch.* 1895;**61**:291–332.
27. Guo L, Dong Z, Guthrie H. Validation of a guinea pig Langendorff heart model for assessing potential cardiovascular liability of drug candidates. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2009;**60**:130–151.
28. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;**50**:940–950.
29. Wendler A, Wehling M. The translatability of animal models for clinical development: biomarkers and disease models. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;**10**:601–606.
30. Shepherd N, Kavalier F. Direct control of contraction force of single frog atrial cells by extracellular ions. *Am J Physiol Physiol.* 1986;**251**:653–661.
31. Velden J van der, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, Jong JW de, Owen VJ, Burton PBJ, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJM. Increased Ca²⁺-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res.* 2003;**57**:37–47.
32. Verduyn SC, Zaremba R, Velden J van der, Stienen GJM. Effects of contractile protein phosphorylation on force development in permeabilized rat cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol.* 2007;**102**:476–487.
33. Xi J, Khalil M, Shishechian N, Hannes T, Pfannkuche K, Liang H, Fatima A, Haustein M, Suhr F, Bloch W, Reppel M, Sarić T, Wernig M, Jänisch R, Brockmeier K, Hescheler J, Pillekamp F. Comparison of contractile behavior of native murine ventricular tissue and cardiomyocytes derived from embryonic or induced pluripotent stem cells. *FASEB J.* 2010;**24**:2739–2751.
34. Papp Z, Szabo A, Barends JP, Stienen GJM. The mechanism of the force enhancement by MgADP under simulated ischaemic conditions in rat cardiac myocytes. *J Physiol.* 2002;**543**:177–189.
35. Harris A, Wild P, Stopak D. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study

- of cell locomotion. *Science*. 1980;**208**:177–179.
36. Kim K, Taylor R, Sim JY, Park SJ, Norman J, Fajardo G, Bernstein D, Pruitt BL. Calibrated micropost arrays for biomechanical characterisation of cardiomyocytes. *Micro Nano Lett*. 2011;**6**:317–322.
37. Hersch N, Wolters B, Dreissen G, Springer R, Kirchgeßner N, Merkel R, Hoffmann B. The constant beat: cardiomyocytes adapt their forces by equal contraction upon environmental stiffening. *Biol Open*. 2013;**2**:351–361.
38. Yin S, Zhang X, Zhan C, Wu J, Xu J, Cheung J. Measuring single cardiac myocyte contractile force via moving a magnetic bead. *Biophys J*. 2005;**88**:1489–1495.
39. Galbraith C. Forces on adhesive contacts affect cell function. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;**10**:566–571.
40. Chicurel ME, Chen CS, Ingber DE. Cellular control lies in the balance of forces. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;**10**:232–239.
41. Saenz Cogollo JF, Tedesco M, Martinoia S, Raiteri R. A new integrated system combining atomic force microscopy and micro-electrode array for measuring the mechanical properties of living cardiac myocytes. *Biomed Microdevices*. 2011;**13**:613–621.
42. Alford PW, Feinberg AW, Sheehy SP, Parker KK. Biohybrid thin films for measuring contractility in engineered cardiovascular muscle. *Biomaterials*. 2010;**31**:3613–3621.
43. Grosberg A, Alford PW, McCain ML, Parker KK. Ensembles of engineered cardiac tissues for physiological and pharmacological study: heart on a chip. *Lab Chip*. 2011;**11**:4165.
44. Agarwal A, Goss JA, Cho A, McCain ML, Parker KK. Microfluidic heart on a chip for higher throughput pharmacological studies. *Lab Chip*. 2013;**13**:3599–3608.
45. Shim J, Grosberg A, Nawroth JC, Kit Parker K, Bertoldi K. Modeling of cardiac muscle thin films: pre-stretch, passive and active behavior. *J Biomech*. 2012;**45**:832–841.

46. McCain ML, Yuan H, Pasqualini FS, Campbell PH, Parker KK. Matrix elasticity regulates the optimal cardiac myocyte shape for contractility. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;**306**:H1525–H1539.
47. Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattchow J, Weil J, Zimmermann W, Dohmen HH, Schäfer H, Bishopric N, Wakatsuki T, Elson EL. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J*. 1997;**11**:683–694.
48. Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T. Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng*. 2000;**68**:106–114.
49. Hansen A, Eder A, Bönstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, Aksehirlioglu B, Schwörer A, Uebeler J, Eschenhagen T. Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circ Res*. 2010;**107**:35–44.
50. Herron TJ, Lee P, Jalife J. Optical imaging of voltage and calcium in cardiac cells and tissues. *Circ Res*. 2012;**110**:609–623.
51. Lee P, Klos M, Bollensdorff C, Hou L, Ewart P, Kamp TJ, Zhang J, Bizy A, Guerrero-Serna G, Kohl P, Jalife J, Herron TJ. Simultaneous voltage and calcium mapping of genetically purified human induced pluripotent stem cell-derived cardiac myocyte monolayers. *Circ Res*. 2012;**110**:1556–1563.
52. Pethig R, Kuhn M, Payne R, Adler E, Chen TH, Jaffe LF. On the dissociation constants of BAPTA-type calcium buffers. *Cell Calcium*. 1989;**10**:491–498.
53. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985;**260**:3440–3450.
54. Tsien RY. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*. 1981;**290**:527–528.
55. Lavis LD, Chao TY, Raines RT. Synthesis and utility of fluorogenic acetoxymethyl ethers. *Chem Sci*. 2011;**2**:521.
56. Tatsumi H, Katayama Y. Calcium homeostasis in the presence of fura-2 in neurons dissociated from rat nucleus basalis: Theoretical and experimental

- analysis of chelating action of fura-2. *J Neurosci Methods*. 1994;**53**:209–215.
57. Giaever I, Keese C. Use of electric fields to monitor the dynamical aspect of cell behavior in tissue culture. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1986;**BME-22**:242–247.
58. Wegener J, Keese CR, Giaever I. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Exp Cell Res*. 2000;**259**:158–166.
59. Xiao C, Luong JHT. On-line monitoring of cell growth and cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing (ECIS). *Biotechnol Prog*. 2003;**19**:1000–1005.
60. Solly K, Wang X, Xu X, Strulovici B, Zheng W. Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay Drug Dev Technol*. 2004;**2**:363–372.
61. Trzewik J. Experimental analysis of biaxial mechanical tension in cell monolayers and cultured three-dimensional tissues: the celldrum technology. Dissertation TU Ilmenau; 2008.
62. Trzewik J, Ates M, Artmann GM. A novel method to quantify mechanical tension in cell monolayers. *Biomed Tech*. 2002;**47 Suppl 1**:379–381.
63. Trzewik J, Temiz Artmann A, Linder PT, Demirci T, Digel I, Artmann GM. Evaluation of lateral mechanical tension in thin-film tissue constructs. *Ann Biomed Eng*. 2004;**32**:1243–1251.
64. Kurulgan Demirci E, Demirci T, Linder P, Trzewik J, Gierkowski JR, Gossmann M, Kayser P, Porst D, Digel I, Artmann GM, Temiz Artmann A. RhAPC reduces the endothelial cell permeability via a decrease of contractile tensions induced by endothelial cells. *J Biosci Bioeng*. 2012;**114**:212–219.
65. Linder P, Trzewik J, Ruffer M, Artmann GM, Digel I, Rothermel A, Robitzki A, Temiz Artmann A. Contractile tension and beating rates of self-exciting monolayers and 3D-tissue constructs of neonatal rat cardiomyocytes. *Med Biol Eng Comput*. 2010;**48**:59–65.
66. Wintermantel E. Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen: Implantate für

- Medizin und Umwelt. Berlin: Springer; 1998.
67. Sui G, Wang J, Lee CC, Lu W, Lee SP, Leyton JV, Wu AM, Tseng HR. Solution-phase surface modification in intact poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels. *Anal Chem*. 2006;**78**:5543–5551.
68. Cunningham J, Nikolovski J. Quantification of fibronectin adsorption to silicone-rubber cell culture substrates. *Biotechniques*. 2002;**32**:876–887.
69. Wang R, Yang YL, Qin M, Wang LK, Yu L, Shao B, Qiao M-Q, Wang C, Feng XZ. Biocompatible hydrophilic modifications of poly(dimethylsiloxane) using self-assembled hydrophobins. *Chem Mater*. 2007;**19**:3227–3231.
70. Qin M, Wang LK, Feng XZ, Yang YL, Wang R, Wang C, Yu L, Shao B, Qiao MQ. Bioactive surface modification of mica and poly(dimethylsiloxane) with hydrophobins for protein immobilization. *Langmuir*. 2007;**23**:4465–4471.
71. Bayry J, Amanianda V, Guijarro JI, Sunde M, Latgé JP. Hydrophobins-unique fungal proteins. *PLoS Pathog*. 2012;**8**:6–9.
72. Roman GT, Hlaus T, Bass KJ, Seelhammer TG, Culbertson CT. Sol-gel modified poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices with high electroosmotic mobilities and hydrophilic channel wall characteristics. *Anal Chem*. 2005;**77**:1414–1422.
73. Zhang J, Chen Y, Brook MA. Facile functionalization of PDMS elastomer surfaces using thiol-ene click chemistry. *Langmuir*. 2013;**29**:12432–12442.
74. Wang K, Ouyang G, Chen X. Surface modification and wettability of silicone PDMS film. *3rd Electron Syst Integr Technol Conf ESTC*. IEEE; 2010;1–3.
75. Kim HT, Jeong OC. PDMS surface modification using atmospheric pressure plasma. *Microelectron Eng*. 2011;**88**:2281–2285.
76. Efimenko K. Surface Modification of Sylgard-184 poly(dimethyl siloxane) networks by ultraviolet and ultraviolet/ozone treatment. *J Colloid Interface Sci*. 2002;**254**:306–315.
77. Berdichevsky Y. UV/ozone modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels. *Sensors Actuators B Chem*. 2004;**97**:402–408.
78. Maji D, Lahiri SK, Das S. Study of hydrophilicity and stability of chemically

- modified PDMS surface using piranha and KOH solution. *Surf Interface Anal.* 2012;**44**:62–69.
79. Fragiadakis D, Pissis P, Bokobza L. Glass transition and molecular dynamics in poly(dimethylsiloxane)/silica nanocomposites. *Polymer.* 2005;**46**:6001–6008.
80. Harding PH, Berg JC. The adhesion promotion mechanism of organofunctional silanes. *J Appl Polym Sci.* 1998;**67**:1025–1033.
81. Witucki GL. A silane primer: chemistry and applications of alkoxy silanes. *J Coatings Technol.* 1993;**65**:57–60.
82. Hermanson GT. *Bioconjugate Techniques*. London, Waltham, San Diego: Academic Press; 2013.
83. Wong CP. A Novel environmentally friendly and biocompatible curing agent for lead-free electronics. *56th Electron Components Technol Conf 2006*. IEEE; 2006;1639–1644.
84. Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell.* 2012;**10**:678–684.
85. Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol.* 1962;**10**:622–640.
86. Skoog D, Leary J. *Instrumentelle Analytik*. Heidelberg: Springer Verlag; 1996.
87. Leute U. *Physik und ihre Anwendung in Technik und Umwelt*. 2. Auflage. München: Carl Hanser Verlag; 2004.
88. Gross D, Hauger W, Schröder J, Wall WA. *Technische Mechanik*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2012.
89. Scholkmann F, Boss J, Wolf M. An efficient algorithm for automatic peak detection in noisy periodic and quasi-periodic signals. *Algorithms.* 2012;**5**:588–603.
90. Wilcoxon F. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bull.* 1945;**1**:80–83.
91. Mann HB, Whitney DR. On a test of whether one of two random variables is

- stochastically larger than the other. *Ann Math Stat.* JSTOR; 1947;**18**:50–60.
92. Sachs L, Hedderich J. *Angewandte Statistik*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 2009.
93. Rudolf M, Kuhlisch W. *Biostatistik*. München: Pearson Studium; 2008.
94. Milton R. An extended table of critical values for the mann-whitney (wilcoxon) two-sample statistic. *J Am Stat Assoc.* 1964;**59**:925–934.
95. Kim TK, Kim JK, Jeong OC. Measurement of nonlinear mechanical properties of PDMS elastomer. *Microelectron Eng.* 2011;**88**:1982–1985.
96. Johnston ID, McCluskey DK, Tan CKL, Tracey MC. Mechanical characterization of bulk Sylgard 184 for microfluidics and microengineering. *J Micromechanics Microengineering.* 2014;**24**:035017.
97. Schneider F, Fellner T, Wilde J, Wallrabe U. Mechanical properties of silicones for MEMS. *J Micromechanics Microengineering.* 2008;**18**:065008.
98. Huang RC, Anand L. Non-linear mechanical behavior of the elastomer polydimethylsiloxane (PDMS) used in the manufacture of microfluidic devices. *Innov Manuf Syst Technol.* 2005
99. Toworfe GK, Composto RJ, Adams CS, Shapiro IM, Ducheyne P. Fibronectin adsorption on surface-activated poly(dimethylsiloxane) and its effect on cellular function. *J Biomed Mater Res A.* 2004;**71**:449–461.
100. Lee JN, Jiang X, Ryan D, Whitesides GM. Compatibility of mammalian cells on surfaces of poly(dimethylsiloxane). *Langmuir.* 2004;**20**:11684–11691.
101. Ratner BD. Surface modification of polymers: chemical, biological and surface analytical challenges. *Biosens Bioelectron.* 1995;**10**:797–804.
102. Smith SW. *Digital Signal Processing: A Practical Guide for Engineers and Scientists*. Burlington, MA: Elsevier Science; 2003.
103. Naito H, Melnychenko I, Didié M, Schneiderbanger K, Schubert P, Rosenkranz S, Eschenhagen T, Zimmermann W-H. Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation.* 2006;**114**:I72–I78.

104. Li GR, Sun HY, Chen JB, Zhou Y, Tse HF, Lau CP. Characterization of multiple ion channels in cultured human cardiac fibroblasts. *PLoS One*. 2009;**4**:e7307.
105. Thomas G, Chung M, Cohen CJ. A dihydropyridine (Bay k 8644) that enhances calcium currents in guinea pig and calf myocardial cells. A new type of positive inotropic agent. *Circ Res*. 1985;**56**:87–96.
106. Finet M, Godfraind T, Khoury G. The positive inotropic action of the nifedipine analogue, Bay K 8644, in guinea-pig and rat isolated cardiac preparations. *Br J Pharmacol*. 1985;**86**:27–32.
107. Dubé GP, Baik YH, Schwartz A. Effects of a novel calcium channel agonist dihydropyridine analogue, Bay k 8644, on pig coronary artery: biphasic mechanical response and paradoxical potentiation of contraction by diltiazem and nimodipine. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. p. 377–389.
108. Dumotier BM, Adamantidis MM, Puisieux FL, Bastide MM, Dupuis BA. Repercussions of pharmacologic reduction in ionic currents on action potential configuration in rabbit Purkinje fibers: Are they indicative of proarrhythmic potential? *Drug Dev Res*. 1999;**47**:63–76.
109. Harada S, Sada H, Kojima M, Ban T. Negative inotropic effects of tiapamil (Ro11-1781) and verapamil in rabbit myocardium. *Eur J Pharmacol*. 1982;**78**:7–14.
110. Bayer R, Hennekes R, Kaufmann R, Mannhold R. Inotropic and electrophysiological actions of verapamil and D600 in mammalian myocardium - I. Pattern of inotropic effects of the racemic compounds. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1975;**290**:49–68.
111. Nayler WG, Szeto J, Berry D. Effect of verapamil on contractility, oxygen utilization, and calcium exchangeability in mammalian heart muscle. *Cardiovasc Res*. 1972;**6**:120–128.
112. Singh BN, Vaughan Williams EM. A fourth class of anti-dysrhythmic action? Effect of verapamil on ouabain toxicity, on atrial and ventricular intracellular potentials, and on other features of cardiac function. *Cardiovasc Res*. 1972;**6**:109–119.

113. Gerhardy A, Scholtysik G, Schaad A, Haltiner R, Hess T. Generating and influencing Torsades de Pointes-like polymorphic ventricular tachycardia in isolated guinea pig hearts. *Basic Res Cardiol.* 1998;**93**:285–294.
114. Scholtysik G, Quast U, Schaad A. Evidence for different receptor sites for the novel cardiotoxic S-DPI 201-106, ATX II and veratridine on the cardiac sodium channel. *Eur J Pharmacol.* 1986;**125**:111–118.
115. Barron K, Bishop V. Reflex cardiovascular changes with veratridine in the conscious dog. *Am J Physiol.* 1982;**242**:H810–H817.
116. Honerjäger P, Reiter M. The relation between the effects of veratridine on action potential and contraction in mammalian ventricular myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1975;**289**:1–28.
117. Collinsworth K. The Clinical pharmacology of lidocaine as an antiarrhythmic drug. *Circulation.* 1974;**50**:1217–1230.
118. Lynch C. Depression of myocardial contractility in vitro by bupivacaine, etidocaine, and lidocaine. *Anesth Analg.* 1986;**65**:551–559.
119. Clarkson CW, Follmer CH, Eick RE ten, Hondeghem LM, Yeh JZ. Evidence for two components of sodium channel block by lidocaine in isolated cardiac myocytes. *Circ Res.* 1988;**63**:869–878.
120. Tamargo J, Amorós I, Barana A, Caballero R, Delpón E. New investigational drugs for the management of acute heart failure syndromes. *Curr Med Chem.* 2010;**17**:363–390.
121. Dou Y, Arlock P, Arner A. Blebbistatin specifically inhibits actin-myosin interaction in mouse cardiac muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;**293**:C1148–C1153.
122. Kovács M, Tóth J, Hetényi C, Málnási-Csizmadia A, Seller JR. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem.* 2004;**279**:35557–35563.
123. Limouze J, Straight AF, Mitchison T, Sellers JR. Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. *J Muscle Res Cell Motil.* 2004;**25**:337–341.
124. Fedorov V, Lozinsky IT, Sosunov EA, Anyukhovskiy EP, Rosen MR, Balke CW,

- Efimov IR. Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts. *Heart Rhythm*. 2007;**4**:619–626.
125. Farman GP, Tachampa K, Mateja R, Cazorla O, Lacampagne A, Tombe PP. Blebbistatin: use as inhibitor of muscle contraction. *Pflugers Arch*. 2008;**455**:995–1005.
126. Watanabe M, Yumoto M, Tanaka H, Wang HH, Katayama T, Yoshiyama S, Black J, Thatcher SE, Kohama K. Blebbistatin, a myosin II inhibitor, suppresses contraction and disrupts contractile filaments organization of skinned taenia cecum from guinea pig. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;**298**:C1118–C1126.
127. Lewinski D von. Insulin-like growth factor-1 exerts Ca²⁺-dependent positive inotropic effects in failing human myocardium. *Circ Res*. 2003;**92**:169–176.
128. Tsutsui H, Kinugawa S, Ide T, Hayashidani S, Suematsu N, Satoh S, Nakamura R, Egashira K, Takeshita A. Positive inotropic effects of calcium sensitizers on normal and failing cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001;**37**:16–24.
129. Freestone NS, Ribaric S, Mason WT. The effect of insulin-like growth factor-1 on adult rat cardiac contractility. *Mol Cell Biochem*. 1996;**163-164**:223–229.
130. Cittadini A, Ishiguro Y, Strömer H, Spindler M, Moses AC, Clark R, Douglas PS, Ingwall JS, Morgan JP. Insulin-like growth factor-1 but not growth hormone augments mammalian myocardial contractility by sensitizing the myofilament to Ca²⁺ through a wortmannin-sensitive pathway: studies in rat and ferret isolated muscles. *Circ Res*. 1998;**83**:50–59.
131. Lauer MR, Gunn MD, Clusin WT. Endothelin activates voltage-dependent Ca²⁺ current by a G protein-dependent mechanism in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol*. 1992;**448**:729–747.
132. James AF. Negative inotropic effects of endothelin-1 in mouse cardiomyocytes: evidence of a role for Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Br J Pharmacol*. 2007;**152**:417–419.
133. Nagasaka T, Izumi M, Hori M, Ozaki H, Karaki H. Positive inotropic effect of endothelin-1 in the neonatal mouse right ventricle. *Eur J Pharmacol*. 2003;**472**:197–204.

134. Katoh H, Terada H, Imuro M, Sugiyama S, Qing K, Satoh H, Hayashi H. Heterogeneity and underlying mechanism for inotropic action of endothelin-1 in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol*. 1998;**123**:1343–1350.
135. Shepherd N. Force measurements from voltage-clamped guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol Circ Physiol*. 1990;**258**:452–459.
136. Subramony SD, Dargis BR, Castillo M, Azeloglu EU, Tracey MS, Su A, Lu HH. The guidance of stem cell differentiation by substrate alignment and mechanical stimulation. *Biomaterials*. 2013;**34**:1942–1953.
137. Sarraf CE, Otto WR, Eastwood M. In vitro mesenchymal stem cell differentiation after mechanical stimulation. *Cell Prolif*. 2011;**44**:99–108.
138. Shah N, Morsi Y, Manasseh R. From mechanical stimulation to biological pathways in the regulation of stem cell fate. 2014;**32**:1–25.
139. Bers D. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*. 2002;**415**:198–205.

7 Anhang

7.1 Quellcodes

7.1.1 Schichtdickenbestimmung

```
schichtdicke <- function(datei){  
  
    n <- 1.4118    # Brechungsindex  
  
    spek <- read.csv(datei, sep=";", dec=",", skip=20,  
nrow=299)  
  
    colnames(spek) <- c("wl", "abso")  
  
    bereich <- spek[spek$wl>521 & spek$wl < 660,]  
  
    bereich.revers <- bereich[order(bereich$wl),]    ##  
umdrehen  
  
    peaks <- ampd(bereich.revers$wl, bereich.revers$abso)  
  
    zwei.peaks <- peaks[1:2]  
  
    dicke <- abs((zwei.peaks[1]*zwei.peaks[2])/  
(2*n*(zwei.peaks[1]-zwei.peaks[2])))  
  
    print(dicke)  
  
}  
  
#-----
```

Anhang

Diese Funktion gibt nur gültige x-Werte (Zeit) aus, da die y-Werte (z.B. Spannung) zu Beginn basislinienkorrigiert werden.

```
ampd <- function(x.werte, y.werte){

  y.werte <- y.werte - lm(y.werte ~ x.werte)$fitted.values

  plot(y.werte~x.werte, type="l")
  readline("Enter zum fortfahren")

  N <- length(y.werte)
  L <- ceiling(N/2)-1
  k <- 1:68

  y.list <- rep(list(y.werte), L)
  lms.matrix <- mapply(ampd.kernel, y.list, k)

  dimnames(lms.matrix) <- list(x.werte, k)

  image(lms.matrix)
  readline("Enter zum fortfahren")

  gamma.k <- colSums(lms.matrix)
  lamda.k <- which.min(gamma.k)

  plot(gamma.k, type="l")
```

```
abline(v=lamda.k, col="red")
readline("Enter zum fortfahren")

lms.matrix.rescaled <- lms.matrix[,1:lamda.k]

image(lms.matrix.rescaled)
readline("Enter zum fortfahren")

erg <- apply(lms.matrix.rescaled, sd, MARGIN=1)

minima <- data.frame(x.werte[erg == 0], y.werte[erg == 0])
colnames(minima) <- c("t", "s")

#plot(y.werte~x.werte, type="l")
#lines(maxima, type="p", col="red")

return(minima$t)
}

#-----

ampd.kernel <- function(y, scale){

  k <- scale

  N <- length(y)
```

```
L <- ceiling(N/2)-1
i <- (k+2):(N-k+1)

center <- i-1
lower <- i-k-1
upper <- i+k-1

i.min <- i[y[center] < y[lower] & y[center] < y[upper]]

y[i.min] <- 0
y[y != 0] <- runif(length(y[y != 0])) + 1

#plot(y)
return(y)

}
```

7.1.2 Erosionsverfahren

```
erosion <- function(datensatz, max.glaett.faktor=300){  
  amp.vek <- numeric()  
  for (i in 1:max.glaett.faktor){  
    s.glaett <- filter(datensatz[,2], rep(1,i)/i)  
    neu.datensatz <- data.frame(datensatz[,1], s.glaett)  
    bl <- median(s.glaett, na.rm=T)  
    peak <- max(s.glaett, na.rm=T)  
    amp <- peak-bl  
    amp.vek[i] <- amp  
  }  
  plot(amp.vek, type="l", xlab="Filterbreite",  
ylab="Schlagamplitude [N/m²]", main="Erosion eines  
Kontraktions-Relaxations-Zyklus", cex.lab=1.5, cex.axis=1.2,  
cex.main=1.4)  
  abline(v=100, lty=2)  
  readline()  
  ableitung <- diff(amp.vek)  
  plot(ableitung, pch=3, cex=0.3, xlab="Filterbreite",  
ylab="Ableitung", main="Diskrete Ableitung der Erosion",  
cex.lab=1.5, cex.axis=1.2, cex.main=1.5)  
  abline(v=100, lty=2)  
}
```

7.1.3 Peak-Analyse

```
lvm.analyse02.15 <- function(lvm.obj, glaett.faktor=100,
scale=600, plot.option=T){

  lvm.intern <- read.table(lvm.obj, dec="," , skip=23)
  colnames(lvm.intern) <- c("t", "d", "p")

# Bestimmung des hydrostatischen Drucks
  hd <- hydro.druck(median(lvm.intern$d))
  #print(paste("Hydrostatischer Druck:", round(hd,2),
"N/m^2"))

# Korrektur des Messsignals um den hydrostatischen Druck
  lvm.intern.corr <- lvm.intern
  lvm.intern.corr$p <- lvm.intern.corr$p - hd

# Berechnung der Spannung in der Membran
  sigma <- ((-lvm.intern.corr$p)/abs(lvm.intern.corr$d)) *
(8000^2/(4*3.0)) * (1 + ((abs(lvm.intern.corr$d)^2)/(8000^2)))

  sigma.filt <- filter(sigma, rep(1,
glaett.faktor)/glaett.faktor)

  zeitreihe <- data.frame(lvm.intern$t, sigma.filt)
  zeitreihe <- na.omit(zeitreihe)
  colnames(zeitreihe) <- c("t", "s")
```

```
# Bestimmung der Peaks
  maxima <- ampd(zeitreihe$t, zeitreihe$s, scale=scale)

# Zerlegen des Messsignals in einzelne Peaks
  einzelpeaks <- zerlegen(zeitreihe, maxima) # Liste

# Funktion "apply" führt eine Typkonversion zu "Matrix" aus,
# deshalb muss ggf. zurückkonvertiert werden (as.vector,
as.data.frame)

# Basislinien-Werte der einzelnen Peaks
  bls <- as.vector(sapply(einzelpeaks, basislinie))
  b.linie <- mean(bls)

# Basislinie auf 0 ziehen
  for (i in 1:length(bls)){
    element.i <- einzelpeaks[[i]]
    element.i[,2] <- element.i[,2] - bls[i]
    einzelpeaks[[i]] <- element.i
  }

# Detektion der Maxima der einzelnen Peaks (Datenframe mit x-
und y-Werten)
  maxim <- as.data.frame(matrix(unlist(sapply(einzelpeaks,
spitze)), ncol=2, byrow=T))
  colnames(maxim) <- c("t", "s")
  #print(maxim)
```

```
# Frequenz bestimmen

freq <- 1/mean(diff(maxim$t))

# Bestimmung der 20%-Stützpunkte der einzelnen Peaks
(Datenframe mit x- und y-Werten)

stuetz.kontr <-
as.data.frame(matrix(unlist(sapply(einzelpeaks, stuetzpunkte,
welcher="kontr")), ncol=2, byrow=T))

stuetz.relax <-
as.data.frame(matrix(unlist(sapply(einzelpeaks, stuetzpunkte,
welcher="relax")), ncol=2, byrow=T))

#print(stuetz)

# Schnittpunkte mit der x-Ache berechnen (=Beginn des
Kontraktionszyklus) -> Vektor

spe <- schnittpunkte(maxim, stuetz.kontr)

#print(spe)

# Schnittpunkte mit der x-Achse der einzelnen Peaks 0 setzten

for (i in 1:length(spe)){
  element.i <- einzelpeaks[[i]]
  element.i[,1] <- element.i[,1] - spe[i]
  einzelpeaks[[i]] <- element.i
}
```

```
# Zeitsignalauf drei Stellen runden

  for (i in 1:length(einzelpeaks)){
    element.i <- einzelpeaks[[i]]
    element.i[,1] <- round(element.i[,1], digits=3)
    einzelpeaks[[i]] <- element.i
  }

# Signale der Einzelpeaks übereinanderlegen
# Das ist das Endergebnis: merged.sig

  merged.sig.plus.t <- merge(einzelpeaks[[1]],
einzelpeaks[[2]], by=1)

  for (i in 3:length(einzelpeaks)){

    colnames(merged.sig.plus.t) <- c("t", letters[1:
(ncol(merged.sig.plus.t)-1)])

    merged.sig.plus.t <- merge(merged.sig.plus.t,
einzelpeaks[[i]], by=1, all=T)

  }

t <- merged.sig.plus.t[,1]
merged.sig <- merged.sig.plus.t[,-1]
```


Anhang

```
merged.sig <- rowMeans(merged.sig, na.rm=T)
merged.sig <- data.frame(t, merged.sig)
colnames(merged.sig) <- c("t", "s")

# Peak mittels mpp detektieren -----

peak.punkt <- merged.sig[mpp(merged.sig),]

# Amplitude

amplitude <- as.numeric(peak.punkt[2])

# Stützpunkte bestimmen

stp.kontr <- stuetzpunkte(merged.sig, welcher="kontr")
stp.relax <- stuetzpunkte(merged.sig, welcher="relax")

# Schnittpunkte mit der x-Achse berechnen (Start-und
Endzeitpunkt des Kontraktionszyklus)

sp.kontr <- schnittpunkte(peak.punkt, stp.kontr)
sp.kontr <- c(sp.kontr, 0)
sp.relax <- schnittpunkte(peak.punkt, stp.relax)
sp.relax <- c(sp.relax, 0)
```

```
# Dauer von Kontraktion und Relaxation bestimmen

t.kontr <- as.numeric(peak.punkt[1]) - sp.kontr[1]
t.relax <- sp.relax[1] - as.numeric(peak.punkt[1])
t.gesamt <- sp.relax[1] - sp.kontr[1]

# Steigung berechnen

steig.kontr.x <- as.numeric(c(stp.kontr[1],
peak.punkt[1]))
steig.kontr.y <- as.numeric(c(stp.kontr[2],
peak.punkt[2]))
steig.kontr.mod <- lm(steig.kontr.y~steig.kontr.x)
# Modell zum Einzeichnen
steig.kontr <- as.numeric(steig.kontr.mod$coefficients[2])
# Wert für die Auswertung

steig.relax.x <- as.numeric(c(peak.punkt[1],
stp.relax[1]))
steig.relax.y <- as.numeric(c(peak.punkt[2],
stp.relax[2]))
steig.relax.mod <- lm(steig.relax.y~steig.relax.x)
# Modell zum Einzeichnen
steig.relax <- as.numeric(steig.relax.mod$coefficients[2])
# Wert für die Auswertung
```

Anhang

```
# Integrale berechnen
# Nach "Zusammengesetzter Sehnentrapezformel"
# Formel:  $Q(f) = \sum(f(x)) * \text{Intervalllänge}$  (der EINZELNEN
# Intervalle, nicht des Gesamtintervalls)
# D.h. in diesem Fall die Samplerate von 1 ms

interval.length <- 0.001      # = 1 ms

int.kontr.s <- merged.sig[merged.sig$t >= sp.kontr[1] &
merged.sig$t <= as.numeric(peak.punkt[1]), 2]
int.kontr <- sum(int.kontr.s) * interval.length

int.relax.s <- merged.sig[merged.sig$t >=
as.numeric(peak.punkt[1]) & merged.sig$t <= sp.relax[1], 2]
int.relax <- sum(int.relax.s) * interval.length

int.total.s <- merged.sig[merged.sig$t >= sp.kontr[1] &
merged.sig$t <= sp.relax[1], 2]
int.total <- sum(int.total.s) * interval.length

# Plotten Gesamtsignal -----

# Zeitreihe anzeigen

plot(zeitreihe$s ~ zeitreihe$t, type="l")
abline(v=maxima, col="green")
```

```
readline("Beliebige Taste")

# Plotten Einzelpeak -----

# merged.sig anzeigen

plot(merged.sig, xlab="Time [s]", ylab="Normalized Tension
[N/m2]", type="l")

if (plot.option==T){

    # Basislinie anzeigen
    abline(h=0)

    # Maximum anzeigen
    lines(peak.punkt, type="p")

    # Stützpunkte anzeigen
    lines(stp.kontr, type="p")
    lines(stp.relax, type="p")

    # Steigungen anzeigen
    abline(steig.kontr.mod)
```

```
abline(steig.relax.mod)

# Integral anzeigen

plot.int.kontr <- merged.sig[merged.sig$t <=
as.numeric(peak.punkt[1]) & merged.sig$t >
as.numeric(sp.kontr[1]),]

polygon(c(plot.int.kontr[1,1], plot.int.kontr[,1],
tail(plot.int.kontr[,1], 1)), c(0, plot.int.kontr[,2], 0),
density=10, angle=45)

plot.int.relax <- merged.sig[merged.sig$t >=
as.numeric(peak.punkt[1]) & merged.sig$t <
as.numeric(sp.relax[1]),]

polygon(c(plot.int.relax[1,1], plot.int.relax[,1],
tail(plot.int.relax[,1], 1)), c(0, plot.int.relax[,2], 0),
density=10, angle=-45)

}

erg <- data.frame(hd, b.linie, amplitude, steig.kontr,
steig.relax, t.kontr, t.relax, t.gesamt, int.kontr, int.relax,
int.total, freq)

erg <- t(erg)

print(erg)

return(merged.sig)
```

```
}

#-----

# mpp = most probable peak
#
# Problem: Durch Rauschen an der Sitze des Signals kann das
# ermittelte Maximum vom tatsächlichen Maximum abweichen
#
# Das Signal wird mit Kernen der Längen 1:anz gefiltert und
# die Indizes der Maxima gespeichert.
# Der Index, der am häufigsten vorkommt wird ausgegeben.

mpp <- function(sig, anz=30){

  i <- 1
  max.punkt <- 0

  for(i in 1:anz){
    sig.filt <- sig
    sig.filt[,2] <- filter(sig[,2], rep(1,i)/i)

    max.punkt[i] <- which.max(sig.filt[,2])
  }
}
```

```
#plot(max.punkt, type="l")
erg <- as.numeric(names(which.max(table(max.punkt))))
return(erg)
}

#-----
# y = m*x + n      | mit y=0
# -n = m*x        | :m
# x = -n/m

schnittpunkte <- function(maxima, stuetzpunkte){

  lin.mod.n <- 0
  lin.mod.m <- 0
  erg <- 0

  for(i in 1:nrow(maxima)){

    punkt1 <- as.numeric(maxima[i,]) # x- und y-
Koordinaten
    punkt2 <- as.numeric(stuetzpunkte[i,]) # x- und y-
Koordinaten

# Umstellen, damit x- und y-Koordinaten in je einem Vektor
stehen
```

```
xe <- c(punkt1[1], punkt2[1])
ys <- c(punkt1[2], punkt2[2])

lin.mod.n[i] <- lm(ys~xe)$coefficients[1]
lin.mod.m[i] <- lm(ys~xe)$coefficients[2]
erg[i] <- -lin.mod.n[i]/lin.mod.m[i]
#print(erg[i])
}

return(erg)

}

#-----
stuetzpunkte <- function(zr, prozentlevel=20,
welcher=c("kontr", "relax")){

# Stuetzpunkte für Kontraktion bei Prozentlevel X
  if(welcher=="kontr"){
    stp <- tail(zr[zr$t < zr$t[which.max(zr$s)] & zr$s <
(prozentlevel/100)*max(zr$s),], 1)
  }

# Stuetzpunkte für Relaxation bei Prozentlevel X
  if(welcher=="relax"){
    stp <- head(zr[zr$t > zr$t[which.max(zr$s)] & zr$s <
(prozentlevel/100)*max(zr$s),], 1)
  }
}
```



```
}
```

```
return(stp)
```

```
}
```

```
#-----
```

```
spitze <- function(zr){
```

```
  sp <- zr[zr$s == max(zr$s),]
```

```
  return(sp)
```

```
}
```

```
#-----
```

```
basislinie <- function(zr, prozent=10){
```

```
  vorne <- mean(head(zr$s, (nrow(zr)*prozent/100)))
```

```
  hinten <- mean(tail(zr$s, (nrow(zr)*prozent/100)))
```

```
  bl <- mean(vorne, hinten)
```

```
  return(bl)
```

```
}
```

```
#-----
```

```
zerlegen <- function(zr=zeitreihe, max.x=maxima){

  cuts <- max.x[-length(max.x)]+diff(max.x)/2
  #abline(v=cuts)
  cut.intervals <- cut(zr$t, cuts)
  einzelpeaks <- split(zr, cut.intervals)
}

#-----

# Diese Funktion gibt nur gültige x-Werte (Zeit) aus, da die
# y-Werte (z.B. Spannung) zu Beginn basislinienkorrigiert
# werden.

ampd <- function(x.werte, y.werte, scale=1200){

  y.werte <- y.werte - lm(y.werte ~ x.werte)$fitted.values

  #plot(y.werte~x.werte, type="l")
  #readline("Enter zum fortfahren")

  N <- length(y.werte)
  L <- ceiling(N/2)-1
  k <- 1:scale

  y.list <- rep(list(y.werte), scale)
```

```
lms.matrix <- mapply(ampd.kernel, y.list, k)

dimnames(lms.matrix) <- list(x.werte, k)

#image(lms.matrix)
#readline("Enter zum fortfahren")

gamma.k <- colSums(lms.matrix)
lamda.k <- which.min(gamma.k)

#plot(gamma.k, type="l")
#abline(v=lamda.k, col="red")
#readline("Enter zum fortfahren")

lms.matrix.rescaled <- lms.matrix[,1:lamda.k]

#image(lms.matrix.rescaled)
#readline("Enter zum fortfahren")

erg <- apply(lms.matrix.rescaled, sd, MARGIN=1)

maxima <- data.frame(x.werte[erg == 0], y.werte[erg == 0])
colnames(maxima) <- c("t", "s")

#plot(y.werte~x.werte, type="l")
#lines(maxima, type="p", col="red")
```

```
    return(maxima$t)
}

# -----

ampd.kernel <- function(y, scale){

  k <- scale

  N <- length(y)
  L <- ceiling(N/2)-1
  i <- (k+2):(N-k+1)

  center <- i-1
  lower <- i-k-1
  upper <- i+k-1

  i.max <- i[y[center] > y[lower] & y[center] > y[upper]]

  y[i.max] <- 0
  y[y != 0] <- runif(length(y[y != 0])) + 1

  #plot(y)

  return(y)
}
```

```
}
```

```
#-----
```

```
hydro.druck <- function(deflektion, a1=-2,434, a2=6.868*10^-3,  
a3=6.443*10^-6) {
```

```
  p <- a1 + (a2*deflektion) + (a3*deflektion^2)
```

```
  return(p)
```

```
}
```

7.2 Abkürzungsverzeichnis

3MOBS	Trimethoxy[2-(7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-yl)ethyl]silane
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraessigsäure
CR-Zyklus	Kontraktions-Relaxations-Zyklus
D ₅₀₀	Deflektion der Membran durch 500 µL Flüssigkeit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EC ₅₀	Halbmaximale effektive Dosis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum
HCl	Salzsäure
IC ₅₀	Halbmaximale inhibitorische Dosis
LN ₂	Flüssiger Stickstoff
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MMC	Mitomycin C
PDMS	Polydimethylsiloxan
VE-H ₂ O	Vollentsalztes Wasser

7.3 Chemikalienverzeichnis

Chemikalie:	Firma:
HCl	Sigma Aldrich
H ₂ O ₂	Sigma Aldrich
3MOBS	Sigma Aldrich
Isopropanol	Carl Roth
Essigsäure	Sigma Aldrich
Natriumhydroxid	Carl Roth
Fibronectin	Sigma Aldrich
Puromycin	Axiogenesis AG
DPBS	Sigma Aldrich
Trypsin/EDTA	Sigma Aldrich
S-Bay K8644	Sigma Aldrich
Verapamil	Sigma Aldrich
Veratridin	Sigma Aldrich
Lidocain	Sigma Aldrich
Omecamtiv Mecarbil	Selleck Chemicals
Blebbistatin	Sigma Aldrich
IGF-1	Sigma Aldrich
Endothelin	Sigma Aldrich
Trypan Blau	Sigma Aldrich
FCS	Sigma Aldrich
DMSO	Sigma Aldrich

7.4 Verzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Referierte Publikationen:

1. Kurulgan Demirci E, Demirci T, Linder P, Trzewik J, Gierkowski JR, Gossmann M, Kayser P, Porst D, Digel I, Artmann G, Temiz Artmann A. RhAPC reduces the endothelial cell permeability via a decrease of contractile tensions induced by endothelial cells. *J Biosci Bioeng.* 2012;114:212–219.
2. Akimbekov N, Mansurov Z, Jandosov J, Digel I, Gossmann M, Artmann G, Temiz Artmann A, Zhubanova A. Wound healing activity of carbonized rice husk. *Advanced Materials Research.* 2013;602:1196-1199.
3. Seifarth V, Gossmann M, Janke P, Grosse J, Becker C, Heschel I, Artmann G, Temiz Artmann A. Development of a bioreactor to culture tissue engineered ureters based on the application of tubular OPTIMAIX 3D scaffolds. *Urologia Internationalis.* Online First/Epub ahead of print 01/2015

Buchkapitel:

1. Frotscher R, Gossmann M, Staat M. Simulation of cardiac cell-seeded membranes using the edge based smoothed FEM. In: Altenbach H, Mikhasev GI: Shell and membrane theories in mechanics and biology: from macro- to nanoscale structures. Springer; 2014. S. 187–212.

Poster und Vorträge:

1. Goßmann M, Linder P, Artmann GM, Temiz Artmann A. The mechanical properties of human dermal fibroblasts from young and aged donors. *8th International Conference on cell and Stem Cell Engineering, Dublin, Irland, 11.-12.06.2010 (V)*

2. Linder P, Goßmann M, Brown R, Temiz Artmann A, Artmann GM. HPBioforce: A device for quantification of forces in cell monolayers and thin tissue constructs. *8th International Conference on cell and Stem Cell Engineering, Dublin, Irland, 11.-12.06.2010* (P)
3. Kurulgan Demirci E, Linder P, Demirci T, Gierkowski J, Digel I, Goßmann M, Temiz Artmann A. RhAPC reduces the endothelial cell permeability via a decrease of cellular mechanical contractile Tensions, *8th International Conference on cell and Stem Cell Engineering, Dublin, Irland, 11.-12.06.2010* (P)
4. Goßmann M, Seifarth V, Linder P, Digel I, Kettenhofen R, Epple M, Artmann GM, Temiz Artmann A, Simultaneous control and measurement of mechanical properties of ultra-thin tissue equivalents. *5th International Symposium Interface Biology of Implants, Rostock-Warnemünde, 9.-11.05.2012, Warnemünde* (P)
5. Goßmann M, Linder P, Seifarth V, Artmann GM, Epple M, Temiz Artmann A. Measurement of the contractile forces of autonomously beating cardiomyocytes. *5. Graduiertentagung der FH Aachen, 15.11.2012, Jülich* (P)
6. Frotscher R, Goßmann M, Temiz Artmann A, Staat M. Simulation of cardiac cell-seeded membranes using the edge-based smoothed FEM. *1st International Conference "Shell and Membrane Theories in Mechanics and Biology: From Macro- to Nanoscale Structures" (SMT in MB), Minsk, Belarus, 16.-20.09.2013* (P)
7. Gossmann M, Linder P, Seifarth V, Artmann GM, Epple M, Temiz Artmann A. Measurement of the contractile forces of autonomously beating cardiomyocytes. *6. Graduiertentagung der FH Aachen, 12.11.2013, Aachen* (P)
8. Goßmann M, Frotscher R, Bayer R, Linder P, Staat M, Temiz Artmann A. CardiacDrums: The art of heart creation. *9th International Conference on cell and Stem Cell Engineering, Aachen, 11.-13.-09.2014* (V)

9. Goßmann M, Kettenhofen R, Palm T, Duenbostell A, Luerman G, Torvinen M, Artmann GM, Temiz Artmann A, Bohlen H. Cardiac fibroblast co-cultures enhance cardiomyocyte force of contraction without increasing mitochondrial metabolism. *14th World Preclinical Congress, Boston, MA, USA, 10.-12.06.2015* (P)

7.5 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

7.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Entwicklung eines autokontraktilen Herzmuskelmodells zur funktionalen
Medikamenten- und Toxinforschung“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet zu haben. Zudem erkläre ich, dass ich die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Matthias Goßmann

Jülich, 11.06.2015

7.7 Danksagung

Ich danke...

Herrn Prof. Dr. Matthias Epple für alle „aufschlussreichen Fragen“, die im Laufe der Jahre zum Fortschritt der Arbeit beigetragen haben. Darüber hinaus danke ich für das entgegengebrachte Verständnis in Anbetracht veränderlicher Lebenssituationen und die Bereitschaft, weiterhin durch Fordern zu fördern.

Frau Prof. Dr. Dr. Artmann für die fortwährende und intensive Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Artmann für die langjährige Zusammenarbeit.

Peter Linder für die enge und zutiefst freundschaftliche Zusammenarbeit, die nie Arbeit war, sondern Bereicherung, Inspiration und eben Freundschaft.

Dr. Volker Seifarth für die Unterstützung bei der Anfertigung technischer Zeichnungen, vor allem aber für alle aufregenden, müden, lustigen und ruhigen Stunden, Tage, Wochen und Monate zwischen Jülich und Essen.

Robin Bayer für die tatkräftige Hilfe im Labor zu allen Zeiten und Unzeiten.

Stephan Neumann für die Unterstützung bei der Konstruktion des Tissue-Tension-Analyzers.

Dariusz Porst und Peter Kayser für die unermüdliche Unterstützung des gesamten

Teams und die unzähligen kreativen Stunden im Proberaum.

Dr. Ilya Digel für anregende fachliche Gespräche und Denkanstöße weit über jedes Fachgebiet hinaus (und die unzähligen kreativen Stunden im Proberaum).

Ralf Frotscher für die vielen anregenden Diskussionen, die uns zusammen weitergebracht haben.

Kateryna Loza für die Anfertigung der REM-Aufnahmen.

Prof. Dr. Peter Öhlschläger und Prof. Dr. Edeltraut Ruttkowski für die unbürokratische Hilfe beim bürokratischen Betrieb der S1-Anlage.

Prof. Dr. Rudolf Wiesner und Daniela Weiland vom Institut für vegetative Physiologie der Universität Köln für die Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Schnitte.

Dr. Heribert Bohlen und Dr. Bernd Fronhoff für die Unterstützung meines Promotionsvorhabens und dem damit verbundenen Entgegenkommen.

Dr. Ralf Kettenhofen für viele interessante Gespräche und persönliche Tutorien über Elektrophysiologie.

Anika Duenbostell für das geteilte Leid und die fortwährende und tatkräftige Hilfe im Labor.

Dr. Bettina Bertram für die moralische Unterstützung und RTM's.

Als letztes - aber nicht zuletzt - möchte ich meiner Familie danken:

Meinen Eltern für die Unterstützung des Studiums und aller anderen Vorhaben.

Meinem Bruder, der die Begeisterung für die Biologie in mir geweckt hat.

Und meiner Frau, ohne deren unendliche Geduld und Güte diese Arbeit nicht geschrieben worden wäre.

Danke.