

Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Kardiale Gewebeersatztherapie mittels künstlichem Herzgewebe aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Kaja Breckwoldt

Hamburg, 2014

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Thomas Eschenhagen
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Elke Oetjen

Datum der Disputation: 27.03.2015

Diese Arbeit wurde von Prof. Dr. Arne Hansen und Dr. Florian Weinberger praktisch betreut.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das humane Herz	1
1.1.1	Sarkomerstruktur	2
1.1.2	Herzzyklus	3
1.1.3	Elektromechanische Kopplung und Kontraktionsmechanismus	4
1.2	Myokardinfarkt.....	7
1.3	Regenerative Medizin	10
1.3.1	Engineered Heart Tissue – Künstliche Herzgewebe	12
1.4	Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs).....	15
1.4.1	Embryoidkörperchen (EBs)	18
1.5	Kardiomyozyten aus Stammzellen	19
1.6	Endothelzellen aus Stammzellen	23
2	Zielsetzung	25
3	Material und Methoden	26
3.1	Zellkulturmedien	26
3.1.1	Konditioniertes Medium (CM)	29
3.2	Virusvektoren	30
3.2.1	Lentiviren	30
3.2.2	Adeno-assoziierte Viren (AAV).....	30
3.3	Kultivierung von humanen vaskulären Endothelzellen (HUVECs)	31
3.4	Humane induzierte pluripotente Zelllinien	31
3.5	Zellkultur humaner induzierter pluripotenter Zellen (hiPSCs).....	32
3.5.1	Einfrieren und Auftauen von hiPSCs	32
3.5.2	Mykoplasmentest	32
3.5.3	Behandlung von Mykoplasmeninfektionen	33

Inhaltsverzeichnis

3.5.4	Karyotypisierung	33
3.6	Teratomassay	34
3.7	Embryoidkörperchen (EBs).....	35
3.8	Differenzierung von hiPSCs zu Kardiomyozyten	36
3.8.1	Anreicherung von Kardiomyozyten	36
3.8.2	Einfrieren und Auftauen von hiPS-Kardiomyozyten	36
3.8.3	Proliferation von Kardiomyozyten	36
3.9	Differenzierung von hiPSCs zu Endothelzellen.....	38
3.9.1	Anreicherung von CD31-positiven Zellen – MACS	38
3.9.2	Gefäßbildung.....	38
3.10	Dissoziation der EBs.....	39
3.11	Engineered Heart Tissue (EHT)	39
3.12	Durchflusszytometrie	41
3.13	RNA Präparation und quantitative real-time PCR	41
3.14	DNA Präparation und PCR	42
3.15	Transduktion von HUVECs und hiPS-Endothelzellen.....	44
3.16	Transduktion humaner iPS-Kardiomyozyten.....	44
3.17	<i>In vivo</i> Transplantationsstudie.....	45
3.17.1	Induktion der Myokardinfarkte	45
3.17.2	Bestimmung der Infarktgröße	46
3.17.3	EHT Implantation	47
3.17.4	Echokardiografie	48
3.17.5	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	52
3.17.6	Röntgen-Mikrocomputertomografie	52
3.17.7	Zwei-Photon Laser-Scanning Mikroskopie.....	53
3.18	Histologie	55

Inhaltsverzeichnis

3.18.1	Histologie von EHTs	55
3.18.2	Histologie von Meerschweinchenherzen und Teratomen	55
4	Ergebnisse	58
4.1	Zellkultur humaner induzierter pluripotenter Zellen (hiPSCs).....	58
4.2	Bildung von Embryoidkörperchen durch <i>forced aggregation</i>	59
4.3	Bildung von Embryoidkörperchen in Spinnerflaschen.....	61
4.4	Differenzierung von hiPSCs zu Kardiomyozyten	62
4.4.1	Induktion mesodermaler Progenitoren.....	63
4.4.2	Kardiale Differenzierung	66
4.4.3	Anreicherung von Kardiomyozyten	74
4.4.4	Analyse der differenzierten Kardiomyozyten – Genexpression	74
4.4.5	Reife der differenzierten Kardiomyozyten	79
4.4.6	Proliferation von Kardiomyozyten.....	80
4.5	Teratomassay	81
4.6	Differenzierung von hiPSCs zu Endothelzellen.....	83
4.6.1	Anreicherung von CD31-positiven Zellen – MACS.....	84
4.6.2	Kultivierung von hiPS-Endothelzellen.....	84
4.6.3	Genexpression der hiPS-Endothelzellen.....	85
4.6.4	Gefäßbildung.....	86
4.7	Engineered Heart Tissue (EHT).....	87
4.8	Transduktion von HUVECs und hiPS-Endothelzellen	90
4.9	Transduktion humaner iPS-Kardiomyozyten	90
4.10	<i>In vivo</i> Transplantationsstudie.....	93
4.10.1	Induktion der Myokardinfarkte und EHT Implantation	93
4.10.2	Histologie	95
4.10.3	Distribution humaner Zellen im Empfängerorganismus	105

Inhaltsverzeichnis

4.10.4	Echokardiografie	106
4.10.5	Röntgen-Mikrocomputertomografie	109
4.10.6	2-Photon Laser-Scanning Mikroskopie	110
5	Diskussion	111
5.1	Zellkultur humaner induzierter pluripotenter Zellen.....	111
5.2	Bildung von Embryoidkörperchen.....	115
5.3	Differenzierung von hiPSCs zu Kardiomyozyten	116
5.3.1	Induktion mesodermaler Progenitoren.....	117
5.3.2	Kardiale Differenzierung	119
5.3.3	Analyse der differenzierten Kardiomyozyten	120
5.3.4	Anreicherung von Kardiomyozyten	122
5.4	Teratomassay	124
5.5	Differenzierung von hiPSCs zu Endothelzellen.....	125
5.6	Engineered Heart Tissue (EHT).....	127
5.7	Transduktion humaner iPS-Kardiomyozyten	130
5.8	<i>In vivo</i> Transplantationsstudie	131
6	Ausblick	144
7	Zusammenfassung	147
8	Summary	149
9	Literatur	151
10	Bildnachweis	165
11	Anhang	166
11.1	Geräte, Materialien und Substanzen	166
11.1.1	Geräte	166
11.1.2	Materialien.....	167
11.1.3	Proteine.....	168

Inhaltsverzeichnis

11.1.4	Lösungen, Puffer	169
11.1.5	Antikörper	170
11.1.6	Substanzen	171
11.1.7	Small molecules	172
11.1.8	Pharmakologische Wirkstoffe	172
11.1.9	Kits	173
11.1.10	Primer für quantitative real-time PCR	173
11.1.11	Primer für PCR	174
11.2	Sicherheitsinformationen	175
11.2.1	H-Sätze	176
11.2.2	P-Sätze	178
11.3	Abkürzungen	181
11.4	Finanzielle Förderung	184
11.5	Veröffentlichungen	184
11.5.1	Kongressteilnahmen	184
12	Danksagung	185
13	Lebenslauf	186
14	Eidesstattliche Erklärung	187

Mitralklappe (Valva mitralis), Trikuspidalklappe (Valva atrioventricularis dextra), Aortenklappe (Valva aortae) und Pulmonalklappe (Valva trunci pulmonalis) (Lüllmann-Rauch, 2009). Zwischen diesen beiden Schichten liegt das Myokard, welches den größten Teil der Herzwand bildet und aus Myozyten, anderen Zellen, Blutgefäßen und Bindegewebe besteht. Obwohl Kardiomyozyten die größte Masse des Myokards ausmachen, sind etwa 70% andere Zelltypen, wie vaskuläre glatte Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten (Katz, 2011). Im humanen Herz gibt es unterschiedliche Typen von Kardiomyozyten: Arbeits-Kardiomyozyten, Zellen der Purkinje Fasern, des Sinusknotens und des Atrioventrikularknotens und Überleitungszellen. Arbeits-Kardiomyozyten, welche auf Kontraktion spezialisiert sind, bestehen etwa zur Hälfte aus kontraktile Proteinen, die in quergestreiften Myofibrillen organisiert sind. Um den großen Energieverbrauch der Kontraktionen zu decken, enthalten funktionelle Kardiomyozyten sehr viele Mitochondrien, welche durch oxidative Metabolisierung Adenosintriphosphat generieren.

1.1.1 Sarkomerstruktur

Das quergestreifte Erscheinungsbild der atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten kommt durch die Organisation der Aktin- und Myosin-Filamente in den Sarkomeren zustande (Katz, 2011).

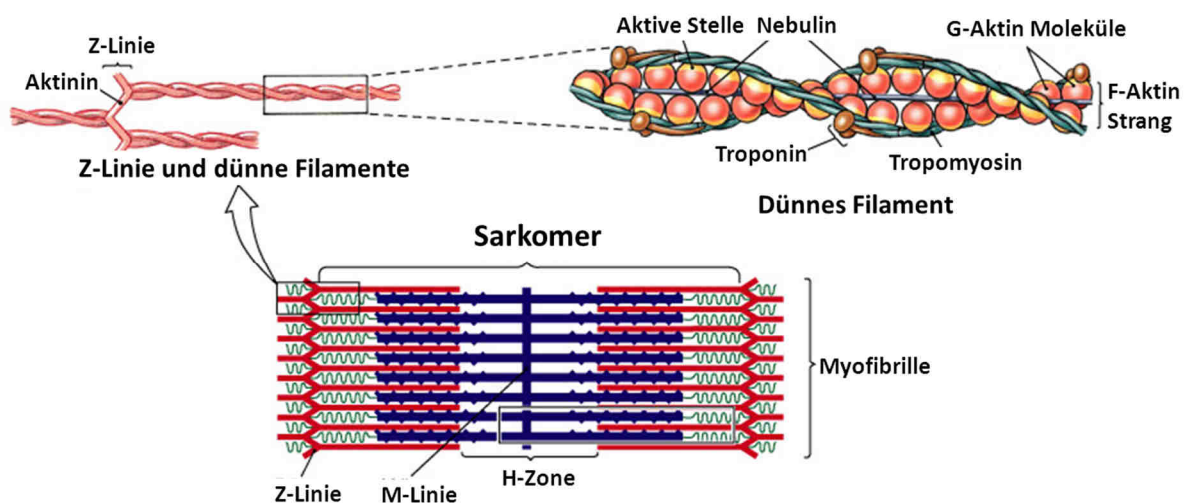


Abbildung 2: Organisation eines myokardialen Sarkomers (verändert nach einer Abbildung der Webseite <http://www.studyinukraine.eu/de/skeletal-muscle-tissue-with-figures/>).

Die Z-Streifen begrenzen das Sarkomer an seinen Enden. An den Z-Streifen hängen zu beiden Seiten Aktinfilamente, zwischen deren Enden die Myosinfilamente liegen. Das Myosinfilament ist an M- und Z-Streifen über das elastische Titinfilament verknüpft, welches das

Myosinfilament während der Kontraktion zwischen dem Z-Streifen zentriert (Berg et al., 2002). Myosine sind eine Familie von Motorproteinen, welche aus einer schweren Kette, sowie einer unterschiedlichen Anzahl von leichten Ketten bestehen. Die schwere Kette enthält eine konservierte Kopfdomäne, welche eine ATPase darstellt. Mit der durch ATP Hydrolyse gewonnenen Energie kann der Winkel des Köpfchens verändert werden und es kann sich somit durch Bindung an Aktinfilamente am Filament entlang bewegen. In der Mitte des Sarkomers befinden sich die M-Streifen, welche gemeinsam mit den Z-Streifen der mechanischen Querstabilisierung der Aktin- und Myosinfilamente dienen.

1.1.2 Herzzyklus

Zu Beginn eines Herzzyklus füllen sich zunächst die Atrien, während die Ventrikel gleichzeitig das Blut in die Arterien pumpen. Durch das Entspannen der Ventrikelmuskulatur (Diastole) kommt es zu einem Druckabfall in den Ventrikeln, wodurch sich die Segelklappen öffnen und das Blut aus den Atrien in die Ventrikel fließt. Dies wird zusätzlich durch Kontraktion der Atrien (Diastole/ Vorhofsystole) unterstützt. In der sich anschließenden Systole kontrahiert die Kammermuskulatur, die Segelklappen schließen sich und das Blut wird durch die Taschenklappen in die Arterien gepumpt. Dieser Zyklus setzt eine koordinierte Kontraktion des Myokards voraus, welche durch spezialisierte Kardiomyozyten ermöglicht wird.

Der im rechten Atrium im Bereich der Mündung der oberen Hohlvene liegende Sinusknoten ist der Taktgeber der Myokardkontraktion, welche zusätzlich durch Neurotransmitter des Sympathikus, Parasympathikus und die Hormone Adrenalin und Noradrenalin beeinflusst wird. Die elektrische Erregung breitet sich durch den Ionenfluss über Connexin-medierte *Gap junctions* von Zelle zu Zelle zunächst über das Vorhofmyokard aus und vermittelt eine Vorhofkontraktion (Diastole/ Vorhofsystole). Über den Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) in der Ventilebene und das His-Purkinje System wird die Kontraktion in die Ventrikel weitergeleitet. Im Ventrikel breitet sich die Erregung aus und verursacht eine Kontraktion (Systole). Durch die auf eine Depolarisation folgende Refraktärzeit, in der die Zellen elektrisch nicht erregbar sind, ist eine unidirektionale Ausbreitung der elektrischen Erregung gewährleistet.

1.1.3 Elektromechanische Kopplung und Kontraktionsmechanismus

Die physiologische Folge auf eine Verschiebung des Ruhepotentials von etwa -80 mV auf ein Schwellenpotential von etwa -50 mV in Kardiomyozyten ist das Aktionspotential. Dieses läuft in 5 Phasen ab, die durch unterschiedliche Ionenströme und Membranpotentiale gekennzeichnet sind (Katz, 2011). Dabei wird die initiale Depolarisation durch Überschreiten des Schwellenpotentials der spannungsabhängigen Natriumkanäle initiiert, es kommt zu einem schnellen Natriumeinstrom in die Zelle. Dadurch steigt das Membranpotential auf +30 mV an, was für die Depolarisation des Schwellenpotentials benachbarter Zellen und somit für die Erregungsweiterleitung essentiell ist. Anschließend öffnen sich L-Typ Calciumkanäle, und durch den langsamen Einwärtsstrom von Calcium wird die Plateauphase des Aktionspotentials erreicht. Nach dem Schließen der Calciumkanäle kommt es in der Repolarisationsphase zum Ausstrom von Kalium in den extrazellulären Bereich. Die Ruhephase ist durch ein konstantes Membranpotential gekennzeichnet. Ein Aktionspotential dauert etwa 300 ms. Die Aktionspotentiale der reizbildenden Kardiomyozyten aus Sinusknoten, AV-Knoten, HIS-Bündel und Purkinje-Fasern zeigen gegenüber denen des Arbeitsmyokards einige Besonderheiten. Da eine Erregungswelle vom Sinusknoten bis zu den Purkinje-Fasern etwa 100 ms benötigt, die Refraktärzeit hingegen etwa 200 – 400 ms beträgt, erreicht eine Erregung jede Zelle nur einmal.

Durch elektromechanische Kopplung führt ein Aktionspotential zur Kontraktion der Kardiomyozyten. Während der zweiten Phase des Aktionspotentials strömt Calcium durch im Sarcolemma lokalisierte L-Typ Calciumkanäle in die Zelle. Dieses Calcium löst die Freisetzung von im Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) gespeicherten Calcium durch Ryanodin-Rezeptoren aus. Das freie Calcium bindet an Troponin-C, welches ein Teil des regulatorischen Komplexes der dünnen Filamente ist. Dies führt zu einer Konformationsänderung des regulatorischen Komplexes, sodass Troponin-I die Myosin ATPase Bindungsstelle des Aktins freigibt. Diese Bindung führt zur ATP Hydrolyse, welche Energie für Konformationsänderungen im Aktin-Myosin-Komplex freisetzt. Dadurch bewegen sich Aktin und Myosin Filamente aneinander vorbei, es kommt zu einer Verkürzung der Sarkomere.

Mechanismen, die die zytosolische Calciumkonzentration erhöhen, erhöhen die Menge an hydrolysiertem ATP und die durch Aktin-Myosin Interaktionen generierte Kraft. Physiologisch wird die intrazelluläre Calciumkonzentration primär durch Beta-Adrenozeptor-gekoppelte Mechanismen beeinflusst (Abbildung 3). Beta-adrenerge Stimulation, wie nach Aktivierung sympathischer Nerven, führt über die Kopplung entsprechender Rezeptoren an G-Proteine zur Aktivierung der Adenylylcyclase und folglich zur Bildung von cAMP. Dieses Molekül aktiviert wiederum die Proteinkinase A (PKA), die verschiedene zelluläre Schlüsselproteine durch Phosphorylierung in ihrer Aktivität moduliert. So erhöht sich nach Phosphorylierung der L-Typ Calciumkanäle der Calcium Einstrom während der Plateauphase des Aktionspotentials und folglich die über Ca^{2+} vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Auch die Phosphorylierung des Ryanodin-Rezeptors 2 (RyR2) erhöht die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Zusätzlich kann über den IP3 Signaltransduktionsweg die Calciumfreisetzung aus dem SR erhöht werden. Bei Stimulation der kardialen β -Adrenozeptoren entsteht also ein stärkerer Anstieg des zytosolischen Calciums als bei einer normalen Erregung, was in einer stärkeren Kraftentwicklung resultiert (positive Inotropie).

Am Ende der zweiten Phase des Aktionspotentials wird Calcium durch die Sarko-endoplasmatische Reticulum ATPase (SERCA), einer ATP-abhängigen Calcium-Pumpe, in das SR sequestriert, was folglich zu einer Absenkung der zytosolischen Calcium Konzentration und zur Dissoziation von Calcium vom Troponin-C führt. In einem quantitativ geringeren Ausmaß wird zytosolisches Calcium durch Natrium-Calcium Austauschler aus der Zelle transportiert. Die resultierende reduzierte intrazelluläre Calciumkonzentration führt zu einer Konformationsänderung im Troponin-Komplex, welche zu einer erneuten Inhibition der Aktin Bindungsstelle durch Troponin-I führt. Am Ende des Zyklus ersetzt ein neues ATP Molekül ADP am Myosinkopf, die initiale Sarkomerlänge wird wieder hergestellt.

Die Aktivität der SERCA ist durch Phospholamban reguliert, welches normalerweise die Calciumaufnahme inhibiert und seinerseits durch Phosphorylierung inaktiviert wird. Kommt es unter β -Adrenozeptorstimulation zur Phosphorylierung des am SR lokalisierten Proteins Phospholamban durch die cAMP-abhängige PKA, wird die SERCA enthemmt und somit die

Calciumaufnahme in das SR und die mechanische Relaxation des Myokards erhöht (positive Lusitropie).

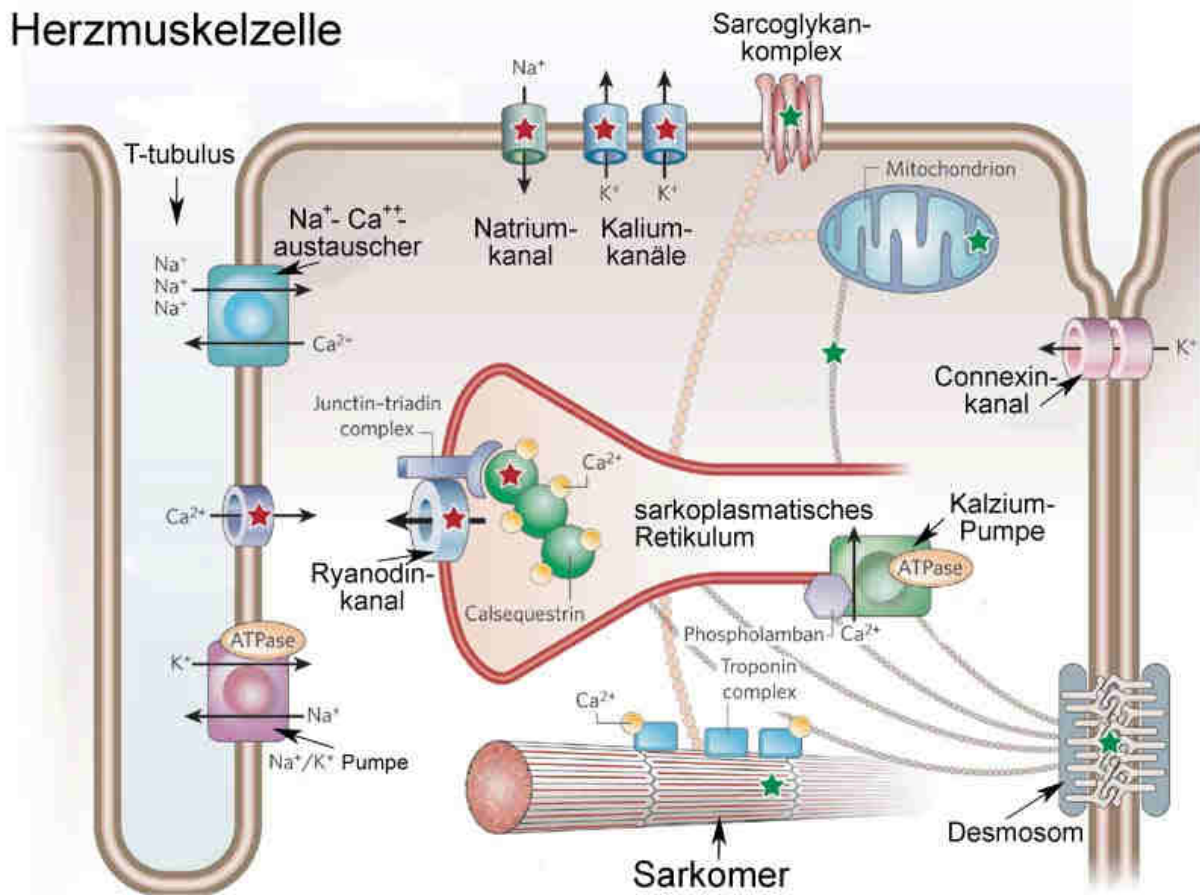


Abbildung 3: Elektromechanische Kopplung im Kardiomyozyt. Illustriert sind die Protein-Komplexe und intrazellulären Organellen, die an der elektromechanischen Kopplung beteiligt sind. Initiiert wird der kardiale Zyklus durch Membran Depolarisation, welche durch den Ionen Einstrom durch Connexin Kanäle von einer benachbarten Kardiomyozyte (rechts), gefolgt von der Öffnung spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle und Na⁺ Einstrom (oben), entsteht. Die Depolarisation der Membran inaktiviert die Na⁺-Kanäle und K⁺- und Ca²⁺- Kanäle werden geöffnet. Der Einstrom von Ca²⁺ löst die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem SR durch Ryanodinkanäle aus. Ca²⁺ bindet an den Troponin Komplex und aktiviert den kontraktilem Apparat (Sarkomer, unten). Durch die Aktivität der SERCA, einer ATP-abhängigen Calcium-Pumpe, und dem Na⁺/Ca²⁺ Austausch über die Zellmembran, sinkt die cytosolische Ca²⁺ Konzentration und es kommt zur Relaxation der Zelle. Die intrazelluläre Homöostase wird durch die Na⁺/K⁺-Pumpe wieder hergestellt. Rote Sterne markieren Proteine, die durch Gene kodiert werden, die häufig bei primären Arrhythmie Syndromen mutiert sind. Grüne Sterne markieren Protein-Komplexe, in denen durch Mutation mehrerer Gene Kardiomyopathien, welche häufig mit Arrhythmien assoziiert sind, auftreten. Verändert nach: (Knollmann und Roden, 2008).

1.2 Myokardinfarkt

Bei kritischer Herabsetzung der koronaren Perfusion kommt es zu Nekrose von Myokard, einem Myokardinfarkt. Ursache hierfür ist häufig der Verschluss einer Kranzarterie, z.B. durch Thrombusbildung an einer sklerotischen Plaque (Plaqueruptur). Bereits wenige Sekunden nach Abbruch der Sauerstoffversorgung verschlechtert sich die Kontraktilität. Die Systole ist verkürzt und da die ischämische Region den intraventrikulären Druck des normal perfundierten Myokards nicht erreichen kann, ist auch die Ejektionsfraktion verringert und damit die folgenden ventrikulären Füllungen gestört. Der Sauerstoffmangel führt außerdem zu metabolischen Abnormalitäten (gesteigerte anaerobe Energieproduktion, Freisetzung von Fettsäuren), da die oxidative Phosphorylierung zum Stillstand kommt. Durch vermehrte Laktatbildung und ATP-Hydrolyse entsteht eine Acidose, wodurch weitere wichtige intrazelluläre Reaktionen inhibiert werden. Die verringerte ATP-Konzentration führt zum einen dazu, dass die Aktin-Myosin-Fasern versteifen und die Relaxation stören, und zum anderen wird die Aktivität von Ionen-Pumpen, -Austauschern und Membrantransportern verlangsamt, sodass die für eine geregelte Reizweiterleitung notwendige Ionenverteilung durcheinander gerät. Die daraus resultierende Ruhedepolarisation des ischämischen Gewebes führt zu Potentialdifferenzen zwischen normal perfundierten und ischämischen Regionen, es kommt zu ST-Segment Verschiebungen und Arrhythmien. Bei einer transmuralen Ischämie können im EKG ST-Segment Erhebungen und bei einer subendokardialen Ischämie ST-Segment Depressionen beobachtet werden. Bereits 15 Minuten nach Trennung von der Blutzufuhr beginnt vom Endokard ausgehend die Nekrose, nach 6 Stunden sind in der betroffenen Region kaum lebende Zellen mehr vorhanden (Katz, 2011).

Die Mortalität aller Infarkte liegt in den ersten 30 Tagen zwischen 30 und 50%, wobei die Hälfte dieser Todesfälle bereits in den ersten 2 Stunden eintritt. Mit einer Prävalenz von 280 000 Myokardinfarkten pro Jahr war diese Erkrankung mit 55 425 Verstorbenen eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland (2012, Statistisches Bundesamt). Die Diagnose kann über die laborchemische Bestimmung von aus den geschädigten Kardiomyozyten freigesetzten Enzymen (z.B. Troponin T), Elektrokardiografie und Herzkatheter Untersuchungen erfolgen.

Neue Therapiestrategien auf dem Gebiet der konservativen, interventionellen und operativen Medizin erhöhen zwar die Zahl der Patienten, die einen Myokardinfarkt überleben. Gleichzeitig steigt dadurch jedoch die Anzahl an Patienten, welche an einer Herzinsuffizienz erkranken (Velagaleti et al., 2008), die die häufigste zur Hospitalisierung und zum Tode führende Erkrankung in den westlichen Gesellschaften ist.

Das Herz ist durch die terminale Differenzierung der Kardiomyozyten nicht in der Lage einen Gewebsverlust nach einem Herzinfarkt durch endogene Regenerationsmechanismen zu kompensieren. Es bildet sich eine nicht-kontraktile Narbe aus Fibroblasten und durch pathologisches kardiales Remodeling entwickelt sich hieraus eine Herzinsuffizienz, die mit einer Verminderung der Schlagkraft einhergeht.

Die leitliniengerechte Therapie besteht aktuell in der Gabe von β -Blockern, ACE-Hemmern, Diuretika und Aldosteronantagonisten (Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 2013). Zwar sind neue Therapieoptionen wie die ventrikuläre Unterstützungssystem-basierte Resynchronisationstherapie hinzugekommen, viele andere, zunächst erfolgsversprechende Therapieansätze - wie Phosphodiesterasehemmer, Endothelin-Rezeptorantagonisten, neutrale Endopeptidase-Hemmer, Vasozeptidase-Inhibitoren und Medikamente, die in die Signaltransduktion des Tumor-Nekrose-Faktors α eingreifen (Weber, 2001; Coletta et al., 2002; Packer et al., 2002) - blieben allerdings erfolglos. Die mittlere Überlebensdauer nach erstmaliger Hospitalisierung aufgrund von Herzinsuffizienz ist mit 2,3 Jahren bei Männern und 1,8 Jahren bei Frauen immer noch erschreckend niedrig (Jhund et al., 2009). Nach Ausschöpfung der medikamentösen Herzinsuffizienztherapie bleibt als finale Therapieoption häufig nur die Herztransplantation. Wegen des eklatanten Spendermangels und immunologischer Probleme kann diese jedoch nur sehr wenigen Patienten angeboten werden. Regenerative Therapieansätze könnten eine neue Behandlungsstrategie darstellen und verschiedene dieser Konzepte werden aktuell erforscht (Laflamme und Murry, 2011).

Lange Zeit wurde das adulte humane Herz als terminal differenziertes Organ angesehen, dem jegliche Kapazität zur intrinsischen Regeneration fehlt. Dieses Dogma wurde mittlerweile durch mehrere Studien in Frage gestellt, die einen geringen Anteil mitotischer

Kardiomyozyten nachwiesen. So konnten Bergmann et al. (2009) mit Hilfe von C14 Radiokarbondatierung humaner genomischer DNA zeigen, dass die Mitoserate von Kardiomyozyten im Alter von 25 Jahren bei etwa 1% pro Jahr liegt und trotz graduellem Verlust der Regenerationsfähigkeit etwa 50% der Kardiomyozyten im Laufe des Lebens ersetzt werden. Dies ist jedoch nicht ausreichend, um die Kardiomyozytenzahl während des Alterns aufrecht zu erhalten und den Kardiomyozytenverlust nach Verletzungen und/oder Krankheit zu ersetzen.

Bisher wurde das Vorhandensein einer Vielzahl von kardialen Stammzellen oder Progenitoren postuliert, die alle eine unterschiedliche molekulare Signatur aufweisen (Kuhn und Wu, 2010; Neri et al., 2010). Es ist sehr umstritten, ob kardiale Stammzellen oder Progenitoren existieren und welche Funktionen diese dann hätten. Ihre Existenz vorausgesetzt, ist noch völlig unbekannt, welche Faktoren für deren Expansion und Differenzierung in funktionale Kardiomyozyten notwendig sind. Da der immense Zellverlust nach einem Myokardinfarkt durch endogene Regeneration nicht ausgeglichen werden kann, wird an Verfahren geforscht, um abgestorbenes Myokard zu ersetzen.

1.3 Regenerative Medizin

Ziel der regenerativen Medizin ist der Ersatz von geschädigtem oder abgestorbenem Gewebe durch neues funktionierendes Gewebe. Es wird an unterschiedlichen Ansätzen geforscht:

1. Injektion/Infusion von Stammzellen, Progenitorzellen oder Kardiomyozyten aus embryonalen oder induzierten pluripotenten Stammzellen
2. Injektion/Implantation von extrazellulärer Matrix oder eines Trägermaterials
3. Transplantation von *in vitro* gezüchteten Herzmuskelgeweben mit Kardiomyozyten aus embryonalen oder induzierten pluripotenten Stammzellen

Im Jahr 2001 wurde publiziert, dass Knochenmarkzellen nach Injektion in infarziertes Myokard zu Kardiomyozyten transdifferenzieren und somit geschädigtes Gewebe regenerieren können (Orlic et al., 2001a; Orlic et al., 2001b; Orlic et al., 2001c). Daraufhin wurden auch Studien an Menschen durchgeführt (BOOST, ASTAMI, REPAIR-AMI, FINCELL, BONAMI, HEBE und SWISS-AMI), wobei hauptsächlich Knochenmarkstammzellen oder Endothel-Vorläuferzellen verwendet wurden (Pfister, 2013). Mittlerweile wurde aber widerlegt, dass hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark zu Kardiomyozyten transdifferenzieren können (Murry et al., 2004; Nygren et al., 2004). Dennoch konnte nach Injektion von Knochenmarkzellen eine leichte Verbesserung der Ejektionsfraktion, des enddiastolischen Volumens und der Infarktgröße beobachtet werden (Orlic et al., 2001a; Orlic et al., 2001b; Orlic et al., 2001c). Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind aber bisher unklar. Es wäre denkbar, dass parakrine Effekte der transplantierten Zellen für vermehrte Vaskularisierung, verminderte Fibrose und vermindertes Remodeling verantwortlich sind.

Auch zur Injektion von Kardiomyozyten wurden bereits viele Arbeiten veröffentlicht (Soonpaa et al., 1994). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass sich aus embryonalen Stammzellen Kardiomyozyten herstellen lassen, dass sich diese in geschädigte Herzen implantieren lassen (Klug et al., 1996) und in Folge der Transplantation neue Kardiomyozyten mit Zell-Zell-Kontakten, elektrischer Kopplung und verbesserter Funktion im geschädigten Gewebe nachweisbar waren (Behfar et al., 2007). Auch Kardiomyozyten aus humanen embryonalen Stammzellen zeigten im Infarkt-Modell in der Ratte und der Maus positive Effekte nach Transplantation, wie Verkleinerung des Infarktgebietes, Zunahme der Vaskularisierung und

verbesserter Herzfunktion (Laflamme et al., 2007; van Laake et al., 2007). Des Weiteren konnte im Meerschweinchen-Modell gezeigt werden, dass injizierte, aus humanen embryonalen Stammzellen generierte Kardiomyozyten zur Remuskularisierung der infarzierten Region führen und diese elektromechanisch an das Empfängerherz koppeln (Shiba et al., 2012). Dies konnte in einer Folgestudie an nicht-humanen Primaten bestätigt werden. Allerdings traten hierbei ventrikuläre Arrhythmien auf, die an Kleintiermodellen nicht beobachtet wurden (Chong et al., 2014).

Neben der Injektion von Kardiomyozyten in Suspension, wurden auch mehrere Studien mit an diesem Institut entwickelten *in vitro* gefertigten, künstlichen, dreidimensionalen Herzmuskel-Konstrukten (*engineered heart tissue – EHT*) durchgeführt. Dabei wird ein kontraktiles Gewebe gezüchtet (Eschenhagen et al., 1997) und dieses auf den geschädigten Teil des Herzens transplantiert. Im Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass EHTs am Herzen anwachsen und zu einer Verbesserung funktioneller Parameter von Ischämie geschädigten Herzen führen (Zimmermann et al., 2002; Zimmermann et al., 2004; Naito et al., 2006; Zimmermann et al., 2006). Dabei zeigte sich, dass die sich in Ratten-EHTs spontan entwickelnden Blutgefäßstrukturen nach der Transplantation auf das Herz an der Vaskularisierung teilhaben. Welche Bedeutung das für den Transplantationserfolg hat, ist zwar bislang unklar. Dennoch haben mehrere Arbeitsgruppen dieses Prinzip aufgenommen und systematisch Endothelzellen mit Kardiomyozyten zur Herstellung von dreidimensionalen Gewebekonstrukten genutzt und dabei die Entstehung einer Mikrovaskulatur *in vitro* beobachtet (Shimizu et al., 2002; Caspi et al., 2007; Sekine et al., 2008; Stevens et al., 2009; Lesman et al., 2010).

1.3.1 Engineered Heart Tissue – Künstliche Herzgewebe

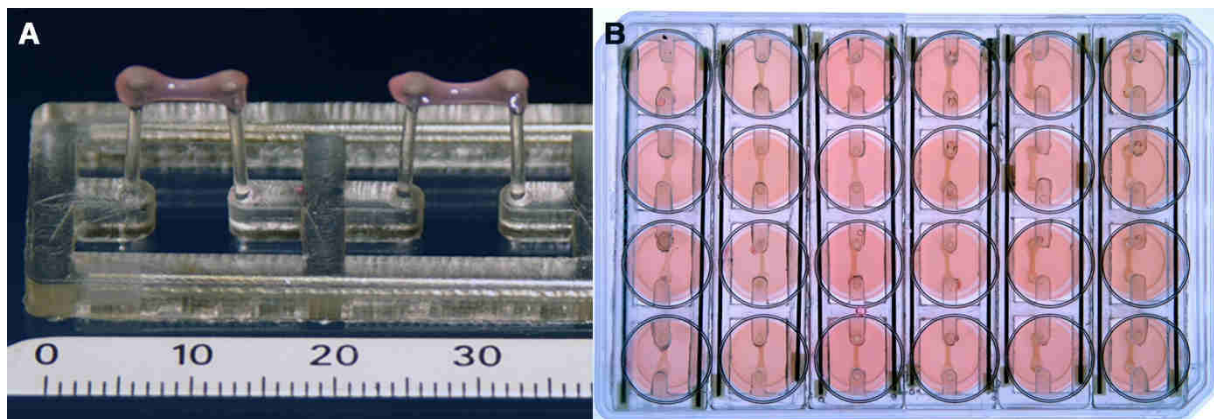


Abbildung 4: (A) Zwei künstliche Herzgewebe (EHTs) zwischen jeweils zwei Silikonstäbchen, (B) Zellkulturplatte mit 24 EHTs von oben (6 Silikonmatten mit jeweils 4 EHTs).

Künstliche Herzgewebe (*engineered heart tissue – EHT*) sind *in vitro* gezüchtete Gewebe aus Fibrin-Matrix und Kardiomyozyten mit myokardialen Eigenschaften.

Das erste dreidimensionale Herzmuskelmodell, mit Hilfe dessen die Auswirkungen einer pharmakologischen oder genetischen Manipulation auf Rhythmus und Kraft des Myokards *in vitro* dargestellt werden konnte (Eschenhagen et al., 1997), wurde 1994 im Department of Molecular Biophysics der Washington University Medical School in St. Louis, USA, entwickelt. In den folgenden Jahren wurde dieses Modell weiterentwickelt, sodass es durch die Verwendung von Kardiomyozyten der neonatalen Ratte, Kollagen I und Matrigel™, sowie ringförmigen Gussformen gelang, spontan kontrahierende, kraftentwickelnde EHTs zu generieren, die morphologisch und funktionell wichtige Eigenschaften nativer Herzmuskulatur aufweisen (Zimmermann et al., 2002). Weitere Modifikationen führten zu einer Reduktion der Arbeitsschritte und ermöglichen eine automatisierte Auswertung (Hansen et al., 2010; Schaaf et al., 2011). Die ursprüngliche Ringform wurde durch eine Streifenform ersetzt, in der sich die EHTs zwischen zwei flexiblen Silikonhaltern ausspannen und statt einer Kollagen- wird nun eine Fibrinmatrix eingesetzt.

EHTs werden in 24-Vertiefungen oder 6-Vertiefungen Zellkulturschalen hergestellt und kultiviert. Dafür wird die Matrix-Kardiomyozyten Mischung in Agarose-Gussformen pipettiert, in denen Silikonmatten hängen. Nach Reifung der EHTs kann die Kontraktilität automatisiert, in einer videooptischen Messapparatur bestimmt werden (Hansen et al., 2010).

EHTs zeigen spontane Kontraktion, Reaktivität auf sympathische (Isoprenalin) und parasympathische (Carbachol) Signale, Reaktion auf Veränderungen der extrazellulären Calcium-Konzentration und folgen dem Frank-Starling Mechanismus (erhöhte Kontraktionskraft nach erhöhter Vorspannung; Eschenhagen et al., 1997; Zimmermann et al., 2002b).

EHTs können perspektivisch *in vitro* in der prädiktiven Toxikologie und bei der Entwicklung von neuen Arzneimitteln, und des Weiteren in der Grundlagenforschung *in vivo* zum Gewebeersatz auf Infarkt-geschädigten Herzen eingesetzt werden.

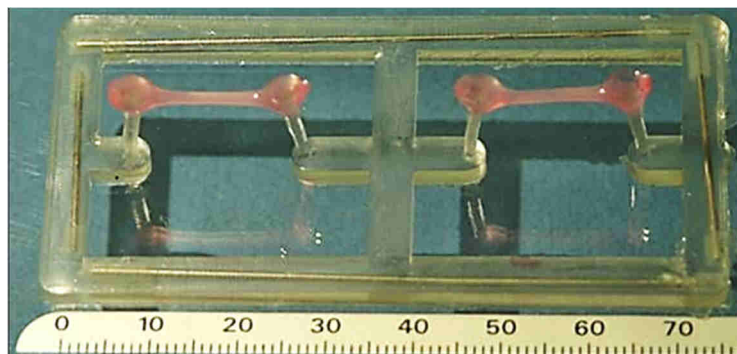


Abbildung 5: 2 6-well 2-Post-EHTs jeweils zwischen einem Paar aus Silikonhaltern.

Für eine Gewebeersatztherapie sind größere Gewebekonstrukte als für *in vitro* Versuche notwendig. Diese EHTs entwickeln sich zwischen einem Paar aus Silikonhaltern in Zellkulturschalen mit 6 Vertiefungen, was in einem größeren Gewebekonstrukt resultiert (6-well 2-post EHTs, Abbildung 5). Nach wenigen Kultivierungstagen zeigen die EHTs eine rhythmische Kontraktion, wodurch die Silikonhalterungen phasisch gegeneinander bewegt werden.

Transplantationsstudien mit EHTs aus neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigten, dass sich EHTs prinzipiell als kardialer Gewebeersatz eignen. Nach Transplantation auf gesundes Rattenmyokard kam es zu einer schnellen und ausgedehnten Vaskularisierung der EHTs (Zimmermann et al., 2002), und die Transplantation führte bei infarzierten Herzen zu einer Verbesserung der systolischen und diastolischen linksventrikulären Funktion (Zimmermann et al., 2006).

Für die Anwendung am Menschen ist es jedoch notwendig, eine alternative Zellquelle zu den bisher verwendeten neonatalen Kardiomyozyten der Ratte zur Generierung von EHTs zu finden. Hierfür kommen embryonale Stammzellen (ESC) oder induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) in Frage, da sie theoretisch über eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit verfügen und man diese zu Kardiomyozyten differenzieren kann (Kehat et al., 2001; Takahashi et al., 2007; Zwi et al., 2009). Aus einer unselektierten Population differenzierter humaner ESCs konnten bereits kontrahierende EHTs generiert werden (Schaaf et al., 2011). Die Verwendung von ESCs ist jedoch mit ethischen Problemen behaftet, weshalb die Differenzierung humaner iPSCs immer stärker fokussiert wird.

1.4 Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs)

Stammzellen sind nicht vollständig differenzierte Zellen, die theoretisch über eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit verfügen. Embryonale Stammzellen sind durch ihre Fähigkeit zur Differenzierung in Zellen aller drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm und Mesoderm) und der Keimbahn, der Ursprung der embryonalen Entwicklung. Adulte Stammzellen sind für die Regenerationsfähigkeit von Organen im adulten Organismus verantwortlich, weisen aber ein gegenüber den embryonalen Stammzellen eingeschränktes Differenzierungspotential auf. Je nach Differenzierungspotential der Stammzellen unterscheidet man uni-, multi- pluri- und totipotente Zellen.

Unipotente Stammzellen können sich in nur einen für die jeweilige Stammzelle spezifischen Zelltyp differenzieren. So ermöglichen organspezifische Stammzellen die Regeneration des jeweiligen Organs. Beispiele sind Spermatogonien, Stammzellen der Keratinozyten in der Haut und gastrointestinale Stammzellen in Schleimhautkrypten.

Multipotente Stammzellen können sich in mehr als einen Zelltyp einer Zelllinie differenzieren. So gehen Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten aus derselben CD34-positiven Zellpopulation hervor. Auch Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten entstehen aus multipotenten Stammzellen.

Totipotente Zellen existieren nur im Blastomerenstadium bis zur ersten Furchung. Aus ihnen kann ein vollständiger, lebensfähiger Organismus entstehen. Sie können zu Zellen des Entoderms, Ektoderms und Mesoderms, sowie extraembryonalen Gewebe in der Placenta differenzieren.

Pluripotente Stammzellen können wie totipotente Zellen in alle drei Keimblätter differenzieren, allerdings keine extraembryonalen Gewebe bilden. In humanen Embryonen kommen sie nur bis zum Blastozysten-Stadium vor.

Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) sind durch künstliche Reprogrammierung von somatischen Zellen entstandene pluripotente Zellen. Diese Zellen weisen ein großes Potential

für die medizinische Nutzung auf, da die Forschung mit weniger ethischen Problemen verbunden ist als an embryonalen Stammzellen, die aus der inneren Zellmasse von Blastozysten (Embryoblast) gewonnen werden. Außerdem besteht die Hoffnung für jeden Patienten individuelle Zelllinien züchten zu können und somit eine Immunsuppression umgehen zu können.

Auf genetischer Ebene ist Pluripotenz vor allem durch die Expression der drei Transkriptionsfaktoren Oct-4 (*octamer-binding transcription factor 4*, POU5F1), Sox-2 (*sex determining region Y-box 2*, SOX2) und Nanog (NANOG) gekennzeichnet. Sie sind Teil eines regulatorischen Netzwerkes, indem sie durch einen positiven Rückkopplungs-Mechanismus ihre eigene und die Expression der beiden anderen Gene hoch regulieren. Außerdem sorgen sie für eine vermehrte Expression anderer für die Pluripotenz wichtiger Gene, während die Expression von Genen, die für die Differenzierung in verschiedene Zelltypen essentiell sind, reprimiert wird.

Die iPSCs wurden erstmals 2006 durch die Retrovirus-medierte Transduktion der vier Transkriptionsfaktoren c-Myc, Oct3/4, Sox2 und Klf4 in Fibroblasten der Maus etabliert (Takahashi und Yamanaka, 2006). Die Selektion von reprogrammierten Zellen über die Expression der Pluripotenzmarker Nanog oder Oct3/4 führte zu iPSCs, welche nach Injektion in die Blastozyste eines Maus-Embryos lebende Chimäre erzeugten (Okita et al., 2007). Humane iPSCs wurden erstmals 2007 etabliert. Die Transduktion in humane Fibroblasten erfolgte entweder mit den schon zuvor verwendeten Transkriptionsfaktoren c-Myc, Oct3/4, Sox2 und Klf4, oder ohne das Proto-Onkogen c-Myc mit den Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, Nanog und Lin28 (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Diese humanen iPSCs können *in vitro* und *in vivo* in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren (Takahashi et al., 2007). Nach der erfolgreichen Reprogrammierung von Fibroblasten aus der Haut konnte gezeigt werden, dass sich humane iPSCs auch aus Keratinozyten (Aasen et al., 2008), mobilisierten CD34-positiven hämatopoetischen Stamm-/Vorläuferzellen (Loh et al., 2009) und differenzierten T-Zellen aus dem Blut (Loh et al., 2010) generieren lassen.

Einleitung - Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs)

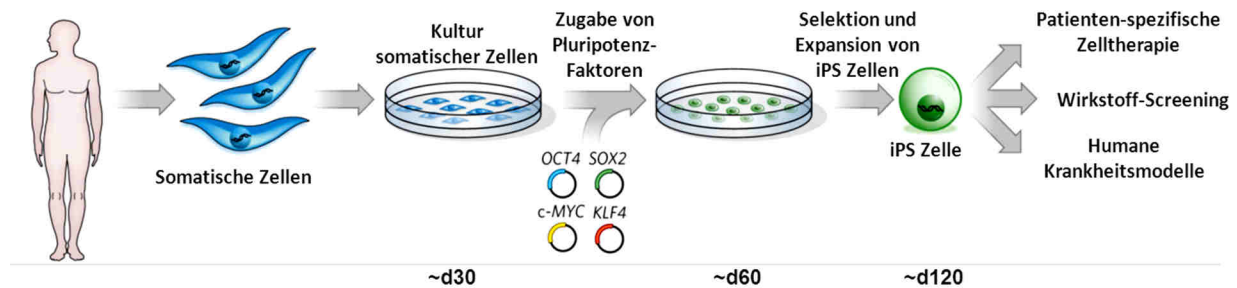


Abbildung 6: Reprogrammierung von somatischen Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs). Durch die Transduktion der somatischen Zellen mit den vier Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, c-Myc und Klf4 können iPSCs induziert werden, die gezielt selektiert und expandiert werden können. Verändert nach: (Yamanaka und Blau, 2010).

Humane iPSCs bieten die Chance zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien in der regenerativen Medizin und können zur *in vitro* Wirkstofftestung verwendet werden. Bis zur klinischen Anwendung müssen die Methoden zur Reprogrammierung jedoch verbessert werden.

Initial wurden iPSCs aus somatischen Zellen gewonnen, indem Transkriptionsfaktoren retro- oder lentiviral transduziert wurden und die Transgene zufällig in das Wirtsgenom integrierten, was das Risiko der Tumorigenität birgt. Aus diesem Grund wurden iPSCs ohne Insertion von c-Myc etabliert, allerdings mit einer niedrigen Reprogrammierungseffizienz (Nakagawa et al., 2008). Zudem wurden mehrere Methoden beschrieben, welche die Transgene ohne retro- oder lentivirale Transduktion in die Zellen bringen. Durch die Transduktion der Reprogrammierungsfaktoren mit Adenoviren, Sendaiviren, Plasmidvektoren und entfernbaren Transposon Systemen ist es ebenfalls möglich iPSCs zu gewinnen (Okita et al., 2008; Stadtfeld et al., 2008; Fusaki et al., 2009; Kaji et al., 2009; Woltjen et al., 2009). Außerdem konnten murine und humane iPSCs durch direkte Zurverfügungstellung rekombinanter Reprogrammierungsproteine etabliert werden (Kim et al., 2009). Auch die wiederholte Anwendung von synthetischer modifizierter messenger RNA führt zur Reprogrammierung humaner somatischer Zellen zu iPSCs (Warren et al., 2010). In dem Wissen, dass auch epigenetische Modifikationen eine große Rolle spielen, konnte die Reprogrammierungseffizienz durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Chemikalien wie DNA-Methyltransferaseinhibitoren, Histon-Deacetylaseinhibitoren, Histon-Methyltransferaseinhibitoren, Wnt3a und ALK5 Inhibitor weiter verbessert werden (Huangfu et al., 2008a; Huangfu et al., 2008b; Shi et al., 2008; Maherali und Hochedlinger, 2009). Zudem

wurde gezeigt, dass einige microRNAs die Effizienz der iPSC-Generierung erhöhen können (Judson et al., 2009).

1.4.1 Embryoidkörperchen (EBs)

Embryoidkörperchen (*embryoid bodies* – EBs) sind multizelluläre dreidimensionale Aggregate aus pluripotenten Stammzellen (PSCs). Als Differenzierungsformat von PSCs sind EBs von großer Bedeutung, da PSC Differenzierungsprotokolle von den Mechanismen der frühen Embryonalentwicklung abgeleitet sind und im EB Format wichtige Stadien der zellulären Differenzierung der frühen mammalischen Embryogenese rekapituliert werden (Desbaillets et al., 2000; Itskovitz-Eldor et al., 2000). Es gibt verschiedene Methoden EBs herzustellen: Kultur in Suspension, in Methylcellulose, im hängenden Tropfen, im Bioreaktor und in Kulturplatten mit 96-Vertiefungen und rundem Boden (Kurosawa, 2007). Die Differenzierung der PSCs in EBs kann zum einen spontan in Abwesenheit von Antidifferenzierungsfaktoren erfolgen, oder gezielt durch Zugabe von Wachstumsfaktoren beeinflusst werden. Dadurch ist es möglich, Zellen aller drei Keimblätter, Entoderm, Ektoderm und Mesoderm, zu differenzieren (Itskovitz-Eldor et al., 2000).

1.5 Kardiomyozyten aus Stammzellen

Eine Möglichkeit um die Auswirkungen des immensen Zellverlustes nach einem Myokardinfarkt, der durch endogene Regeneration nicht ausgeglichen werden kann, abzumildern, besteht in der Transplantation von EHTs mit aus hiPSCs differenzierten Kardiomyozyten. Die reproduzierbarsten und effizientesten Methoden, um iPSCs zu Kardiomyozyten zu differenzieren, beinhalten die Phasen-spezifische Aktivierung und Inhibierung verschiedener Signalwege unter definierten Kulturbedingungen, um Schlüsselschritte der embryonalen kardialen Entwicklung zu rekapitulieren.

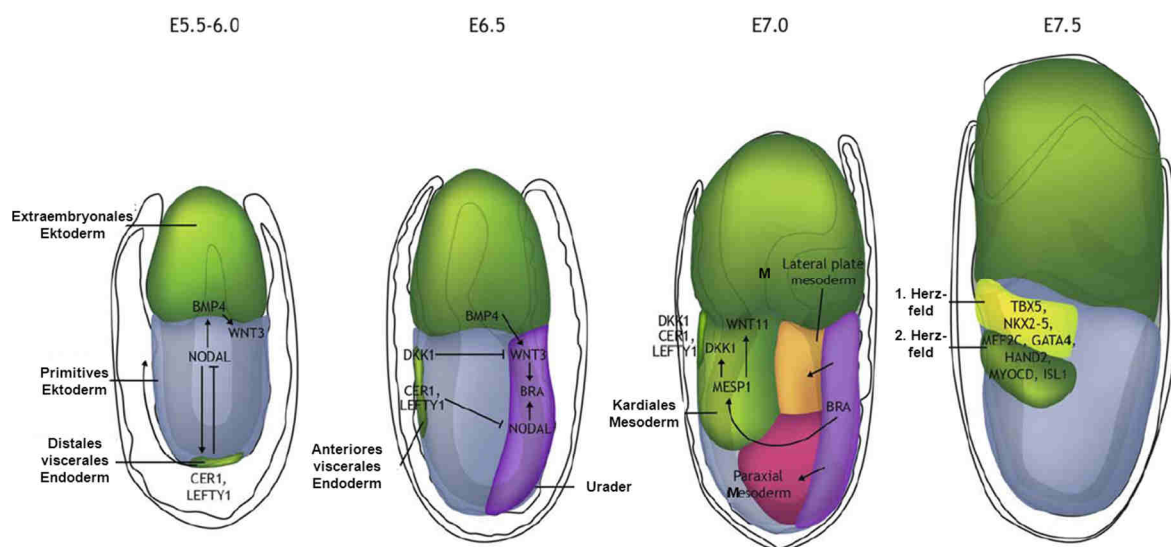


Abbildung 7: Die Maus als Model der humanen Kardiogenese

(E5.5-6.0) Die Gastrulation beginnt mit der Entstehung der primitiven Ader. Anteriore primitive Zellen des Ektoderms machen eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT), wandern durch die primitive Ader und bewegen sich lateral zwischen dem primitiven Ektoderm und dem viszeralem Entoderm. (E6.5) Die proximalsten Zellen der primitiven Ader bilden das extraembryonale Gewebe, Zellen aus dessen Mitte bilden embryonales Gewebe wie Herz und Blut und aus distalen Zellen der primitiven Ader entsteht das Entoderm.

(E7.0) Bei kardialen Progenitoren breitet sich das Mesoderm aus der Mitte der primitiven Ader lateral und später ventral um beide Seiten des Embryos aus und wird zum Mesoderm der lateralen Platte aus welchem das erste Herzfeld (FHF) entsteht. Anschließend delaminiert das Mesoderm der lateralen Platte um das viszerale Mesoderm, aus welchem das zweite Herzfeld (SHF) entsteht, um an der dorsalen Seite das somatische Mesoderm zu bilden.

(E7.5) Aus den FHF Progenitoren entsteht die kardiale Sichel, während SHF Progenitoren medial zur Sichel zu finden sind. Die Zellen beider Herzfelder wandern in die Mitte, wo aus den FHF Progenitoren ein linearer Herzschlauch entsteht, welcher später zum linken Ventrikel beiträgt. Die Zellen des SHF proliferieren, migrieren und bilden einen Verbund mit den Kardiomyozyten des FHF, was zur Schleifenbildung des Herzschlauches führt und letztendlich in einer segmentierten Struktur und der Entstehung der Herzkammern endet (verändert nach Burridge et al., 2012).

Die Kardiomyogenese beginnt mit der Entstehung des Mesoderms während der Gastrulation, was in der Maus detailliert untersucht wurde (Buckingham et al., 2005; Tam und Loebel, 2007; Arnold und Robertson, 2009). Die mesodermale Induktion wird durch den NODAL Signalweg im proximalen Epiblasten an Tag 5 der murinen Embryonalentwicklung (E5.0) ausgelöst, wodurch die BMP4-Expression im extraembryonalen Ektoderm, welches sich an den Epiblasten anschließt, aufrechterhalten wird. BMP4 induziert im proximalen Epiblasten die WNT3 Expression. Etwa an E5.5 diffundieren der WNT Antagonist *Dkk1* und die NODAL Antagonisten *Lefty1* und *Cer1* in das anteriore viszerale Entoderm, wodurch die NODAL und WNT Signalgebung auf den posterioren Epiblasten beschränkt wird. An E5.75 induziert WNT die Expression von mesodermalen Markern wie T (*brachyury*) und *Eomes*. Anschließend werden im sich entwickelnden Gewebe Gene wie *Fgf4* und *Fgf8* exprimiert, welche an der mesodermalen Strukturierung und der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) beteiligt sind.

T und EOMES induzieren dann die Expression von MESP1 (Costello et al., 2011; David et al., 2011), welches als Hauptregulator der kardialen Progenitor Spezifizierung beschrieben wurde (Bondue et al., 2008). MESP1 ist in der Lage, die kardiale Differenzierung über die DKK1-medierte Inhibierung des WNT Signalweges voranzutreiben (David et al., 2008).

Der kanonische WNT/ β -Catenin Signalweg hat also einen biphasischen Effekt auf die Kardiogenese. Durch MESP1 wird ein komplexes Netzwerk an interagierenden Faktoren und Genen wie *Tbx5*, *Nkx2-5*, *Mef2c*, *Gata4*, *Hand2*, *Myocd* und *Foxh1* induziert (Bondue und Blanpain, 2010). Nach der Spezifizierung des kardialen Mesoderms regulieren der kanonische WNT und der NOTCH Signalweg Erhaltung und Differenzierung der kardialen Progenitorzellen (Qyang et al., 2007; Kwon et al., 2009).

Aus dem kardialen Mesoderm entwickeln sich das Endokard, das erste Herzfeld (first heart field, FHF) - aus welchem die Atrien und der linke Ventrikel entstehen - das zweite Herzfeld (second heart field, SHF) - aus welchem der rechte Ventrikel, der Ausflusstrakt und das Reizleitungssystem des Sinusknotens entstehen - und das proepikardiale Mesenchym (Buckingham et al., 2005). Während das FHF bereits im kardialen Sichelstadium weiter

differenziert, bewirken inhibitorische WNT Signale bis zur Inkorporation in das Herz das Verbleiben des SHFs in einem undifferenzierten Vorläuferstadium (Kwon et al., 2007).

Nach Entstehung der kardialen Sichel wirken BMP, FGF, antikanonisches WNT und nicht-kanonisches WNT Signalkaskaden auf dieses ein (Solloway und Harvey, 2003). Etwa an E8.0 bilden Zellen des anterioren Ektoderms und Entoderms einen primitiven Herzschauch, welcher aus einer inneren Schicht endokardialer Zellen und einer äußeren Schicht myokardialer Zellen besteht. Nach Inkorporation in das Herz regen endokardiale Signale wie Neuregulin1 (Grego-Bessa et al., 2007) und epikardiale Signale wie Retinoidsäure (Lavine et al., 2005) das FHF und das SHF zur Proliferation an.

Grundsätzlich können zwei unterschiedliche Strategien verfolgt werden, um iPSCs in Kardiomyozyten zu differenzieren: die Bildung von Embryoidkörperchen und die Kultivierung der iPSCs als Einzelschicht. Beide Methoden beruhen auf progressiven induktiven Bedingungen durch Nutzung von Wachstumsfaktoren, die auch bei der embryonalen Kardiogenese involviert sind, und/oder *small molecules*.

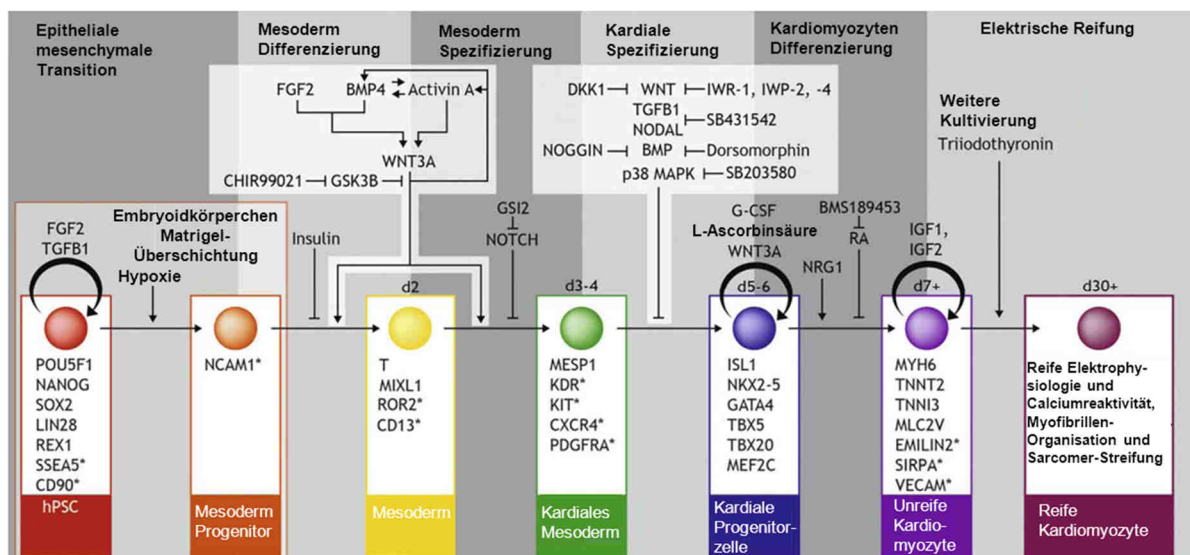


Abbildung 8: Schematische Darstellung der an der kardialen Differenzierung von hPSC beteiligten Faktoren, die die Progression durch jeden der sechs Schritte der hPSC Kardiomyogenese beeinflussen: epitheliale-mesenchymale Transition, Mesoderm Differenzierung, Mesoderm Spezifizierung, kardiale Spezifizierung, Kardiomyozyten Differenzierung und elektrische Reifung. Unten sind die Marker angegeben, die mit den verschiedenen Zelltypen während der Differenzierung assoziiert sind, Oberflächenmarker sind mit einem Stern gekennzeichnet (verändert nach Burridge et al., 2012).

In der Vergangenheit wurden viele verschiedene Differenzierungsprotokolle publiziert, denen allen sechs Differenzierungsstufen zugrunde liegen: epitheliale-mesenchymale Transition, Mesoderm Differenzierung, Mesoderm Spezifizierung, kardiale Spezifizierung, Kardiomyozyten Differenzierung und elektrische Reifung (Burridge et al., 2012). Entscheidende Fortschritte wurden durch Protokolle erzielt, die im EB Format phasenspezifisch in drei Stufen mit den Wachstumsfaktoren BMP4, Activin A, bFGF, DKK-1 und VEGF die embryonale kardiale Entwicklung nachvollziehen (Yang et al., 2008; Kattman et al., 2011). Auf diese Weise konnten Zellpopulationen mit 40-50% Kardiomyozyten differenziert werden. Neuere Differenzierungsprotokolle verzichten auf den Einsatz von Protein-Wachstumsfaktoren und nutzen stattdessen kleinmolekulare Wnt-Signalweg Aktivatoren (CHIR99021) und –Inhibitoren (IWP2), um mesodermale Progenitoren zu induzieren und anschließend kardiale Zellen zu differenzieren (Lian et al., 2013)

Die aus hiPSC generierten Kardiomyozyten weisen in ihrer Unreife Analogien zu fetalen Entwicklungsstadien auf. Sie zeigen spontane Kontraktion, Expression fetal-typischer Ionenkanäle (Beqqali et al., 2006), fetal-typische elektrophysiologische Signale (Davis et al., 2011), fetal-typische Genexpressionsprofile und fetal-typische physische Phänotypen (Cao et al., 2008). Die elektrophysiologische Analyse von Aktionspotentialen zeigte, dass bei der hiPSC Differenzierung drei Kardiomyozyten Subtypen entstehen, die atrial-, ventrikulär-, oder Sinusknoten-ähnliche Phänotypen aufweisen (Burridge et al., 2012).

1.6 Endothelzellen aus Stammzellen

Das Endothel ist eine Monoschicht, welche die luminalen Oberfläche aller Blut- und Lymphgefäße auskleidet. Die Endothelzellen, aus denen diese durchlässige Gewebeschicht besteht, modulieren das Wachstum und die Reaktivität der darunter liegenden glatten Muskulatur, kontrollieren die Interaktion der Gefäßwand mit zirkulierenden Blutbestandteilen und regulieren die vaskuläre Reaktion auf hämodynamische Kräfte (Cooke, 2003).

Es wurden bereits verschiedene Methoden publiziert, um Endothelzellen aus humanen embryonalen Stammzellen zu generieren. Die ersten auf EB Differenzierung beruhenden Methoden nutzten hohe VEGF Konzentrationen und führten nach zwei Wochen in Kultur zu 5-8% CD31-positiven Zellen (Nourse et al., 2010; Kane et al., 2011). Durch neuere Fortschritte wurden Effizienzen von 15-57% CD31-positiver Zellen an Tag 14 erreicht. Allerdings konnten diese Ergebnisse nicht an mehreren pluripotenten Stammzelllinien repliziert werden.

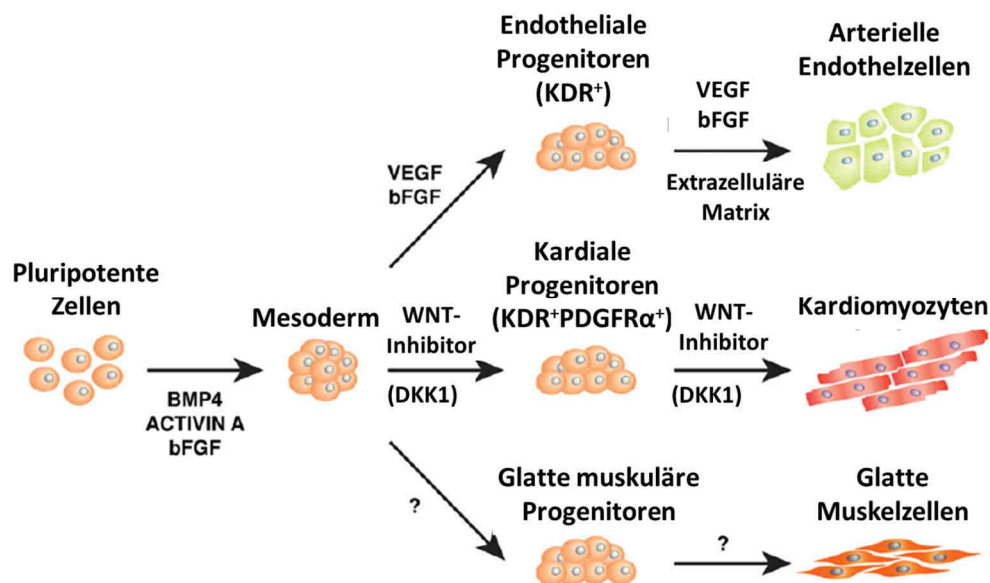


Abbildung 9: Modelhafte Darstellung der gerichteten Differenzierung von pluripotenten Stammzellen in drei aus dem Mesoderm entstehenden somatischen Zelltypen, welche für die kardiovaskuläre Funktion wichtig sind (verändert nach White et al., 2013).

Wie bei der kardialen Differenzierung scheinen Differenzierungsprotokolle, die die embryonale Entwicklung rekapitulieren, beständig und aus mehreren unabhängigen humanen ESC oder iPSC Linien zu einer hohen Zahl von relativ reinen Endothelzellen zu führen (White et al., 2013). Dabei wird in einem mehrstufigen Prozess zunächst analog zur kardialen Differenzierung Mesoderm induziert. Anschließend werden durch hohe Konzentrationen von bFGF und VEGF Endothelzellen differenziert.

Allerdings ist es bei fast allen bisher veröffentlichten Methoden notwendig, endotheliale Progenitoren oder reifende Endothelzellen mittels fluoreszenz-aktivierter oder magnetisch-aktivierter Zellsortierung anzureichern. Einige Gruppen realisierten dies durch die Isolierung von Hämangioblasten, Vorläufern von hämatopoetischen und vaskulären Zelllinien (Wang et al., 2004; Kennedy et al., 2007). Die Isolierung von KDR-positiven Zellen an Tag 6 der Differenzierung ist ebenfalls eine Methode, mit der trotz der Variabilität dieser Population zwischen verschiedenen hESC und hiPSC Linien durch selektives Passagieren der differenzierenden KDR-positiven Vorläufer über 90% reine Endothelzellen gewonnen werden können (White et al., 2013). Alternativ können Endothelzellen im EB Format mit VEGF und bFGF differenziert und durch CD31 und/oder VE-Cadherin angereichert werden (Li et al., 2009; Nourse et al., 2010).

Vor einiger Zeit gelang es Endothelzellen in definiertem Wachstumsmedium, angereichert mit Hydrocortison, humanem epidermalem Wachstumsfaktor, bFGF und Heparin zu differenzieren (Kane et al., 2010). Mit diesem Monolayer Differenzierungsprotokoll konnten ohne Sortierung 85% CD31- und VE-Cadherin-positive Endothelzellen generiert werden. Des Weiteren hat dieses Protokoll den Vorteil chemisch definierte Medien zu nutzen, die frei von tierischen Zusätzen sind, was für eine klinische Anwendung notwendig ist.

Die aus hiPSC generierten Endothelzellen entwickeln eine typische Morphologie, exprimieren die endothelialen Marker PECAM-1 (CD31), VE-Cadherin (CD144) und von Willebrand Faktor (vWF) und produzieren endotheliales Stickstoffmonoxid (eNOS). Um die Funktionalität der Endothelzellen *in vitro* zu validieren, wurden die Inkorporation von Dil-Ac-LDL (1,1'-diocradecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat-acetyliertes Lipoprotein niedriger Dichte), die Bildung vaskulärer Netzwerk-ähnlicher Strukturen in Matrigel™, die Migration entlang eines VEGF Gradienten und das Einwachsen in Kollagen Gele untersucht.

2 Zielsetzung

Regenerative Therapieverfahren stellen eine neue Therapiestrategie zur Behandlung der aus einem Myokardinfarkt resultierenden Herzinsuffizienz dar. Eine in unserem Institut etablierte Methode besteht in der Konstruktion von künstlichem Herzgewebe (*engineered heart tissue*, EHT). Ursprünglich wurde diese Methode an neonatalen Rattenkardiomyozyten entwickelt und in einem Infarktmodell der Ratte erfolgreich therapeutisch eingesetzt. Eine wesentliche Hürde für den klinischen Einsatz war bisher die Verfügbarkeit von humanen Zellen.

Hauptziel dieser Arbeit war die Etablierung effizienter Protokolle zur Differenzierung humaner iPSCs zu Kardiomyozyten und Endothelzellen, um anschließend aus diesen EHTs für die Transplantation zu generieren und in einem Infarktmodell des immunsupprimierten Meerschweinchens zu testen. In der Studie sollten insbesondere drei Fragestellungen untersucht werden:

1. Können humane EHTs die Transplantation auf das infarzierte Myokard überleben?
2. Verbessert die Transplantation von humanen EHTs die linksventrikuläre Funktion?
3. Können humane EHTs elektrisch an das Empfängermyokard koppeln?

Dafür wurde das linksventrikuläre Myokard verletzt. In einer Zweitoperation wurden dann EHTs durch Annähen auf das Infarktareal implantiert. Als Kontrolle dienten zellfreie nicht-kontraktile Fibrin-Konstrukte. Die Herzfunktion wurde mittels transthorakaler Echokardiographie vor Verletzung des Myokards, eine Woche nach Verletzung und 28 Tage nach Transplantation dokumentiert. Die Herzen wurden nach Explantation histologisch aufgearbeitet.

3 Material und Methoden

Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Geräte, Materialien und Substanzen ist im Anhang zu finden.

3.1 Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
2x DMEM	1 ml 10x DMEM 1 ml Pferdeserum 0,2 ml Hühnerembryo Extrakt 0,1 ml Penicillin/ Streptomycin 2,7 ml Wasser für Injektionszwecke
Basales B27-Differenzierungsmedium	RPMI 1640 4 mg/ml Polyvinylalkohol 500 µM 1-Thioglycerol 10 mM HEPES, pH 7.4 0,5% Penicillin/ Streptomycin 1 µM Y-27632 2% B27 mit Insulin
EB Formations-Medium	250 ml RPMI 1640 250 ml MEF-konditioniertes Medium 4 mg/ml Polyvinylalkohol 250 µM 1-Thioglycerol 5 mM HEPES, pH 7.4 0,25% Penicillin/ Streptomycin 1 µM Y-27632
EHT-Medium	DMEM 10% HS 1% Penicillin/ Streptomycin 10 µg/ml Insulin 33 µg/ml Aprotinin
Einfriermedium	60% FCS 20% DMSO 20% Wachstumsmedium

Medium	Zusammensetzung
FTDA	DMEM/F12 mit Glutamin 1% Transferrin-Selenium Stocklsg. 10 µg/ml Insulin 0,1% humanes rekombinantes Serumalbumin 1% Lipidmix 1% Penicillin/ Streptomycin 10 ng/ml bFGF 2,5 ng/ml Activin A 50 nM Dorsomorphin 0,5 ng/ml TGFβ1
hiPS-Endothelzellmedium	hEC-SFM 1% platelet-poor plasma 30 ng/ml VEGF 20 ng/ml bFGF
HUVEC-Medium	Endothelzell-Wachstumsmedium (PromoCell) 1% Penicillin/ Streptomycin
Kardiomyozytenmedium	MEM 10% FCS
Laktatmedium	DMEM ohne Glukose 4 mM Laktat 10 mM HEPES, pH 7.4 0,5% Penicillin/ Streptomycin
Phase 1 B27-Differenzierungsmedium	RPMI 1640 4 mg/ml Polyvinylalkohol 500 µM 1-Thioglycerol 10 mM HEPES, pH 7.4 0,5% Penicillin/ Streptomycin 10 µM Y-27632 2% B27 ohne Insulin 5 ng/ml FGF2 10 ng/ml BMP4 3 ng/ml Activin A

Medium	Zusammensetzung
Phase 1 Endothel-Differenzierungsmedium	StemPro®-34 + Supplement 4 mg/ml Polyvinylalkohol 400 µM 1-Thioglycerol 0,5% Penicillin/ Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1 mM Magnesium Ascorbyl-Phosphat 75 mg/l Transferrin 1 µM Y-27632 5 ng/ml FGF2 12 ng/ml BMP4 6 ng/ml Activin A
Phase 1 FDM-Differenzierungsmedium	RPMI 1640 1% Penicillin/ Streptomycin 4 mg/ml Polyvinylalkohol 1/1000 Lipidmix (Sigma-Aldrich) 250 µM Phosphoascorbat 1/100 Transferrin-Selenium 10 µM Y-27632 5 ng/ml FGF2 10 ng/ml BMP4 3 ng/ml Activin A
Phase 2 Endothel-Differenzierungsmedium	StemPro®-34 + Supplement 4 mg/ml Polyvinylalkohol 400 µM 1-Thioglycerol 0,5% Penicillin/ Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1 mM Magnesium Ascorbyl-Phosphat 75 mg/l Transferrin 1 µM Y-27632 10 ng/ml FGF2 100 ng/ml VEGF
Phase 2 FDM-Differenzierungsmedium	RPMI 1640 1% Penicillin/ Streptomycin 1/1000 Lipidmix (Sigma-Aldrich) 250 µM Phosphoascorbat 1/100 Transferrin-Selenium 1 µM Y-27632 100 nM DS-I-7

Medium	Zusammensetzung
SF-EB Medium CM-basiert	500 ml MEF-konditioniertes Medium
	4 mg/ml Polyvinylalkohol
	0,25% Penicillin/ Streptomycin
	10 µM Y-27632
	30 ng/ml bFGF
SF-EB Medium FTDA-basiert	500 ml FTDA
	4 mg/ml Polyvinylalkohol
	0,25% Penicillin/ Streptomycin
	10 µM Y-27632
	30 ng/ml bFGF
Stammzell-Kulturmedium	DMEM/F12
	20% KnockOut Serum Replacement
	1% L-Glutamin
	1% NEAA
	0,5% Penicillin/ Streptomycin
	β-Mercaptoethanol
	5 ng/ml basic FGF zur Konditionierung
	30 ng/ml basic FGF zur hiPS-Kultivierung
	Plasmocin 1:5000

3.1.1 Konditioniertes Medium (CM)

HiPSCs wurden in konditioniertem Stammzell-Kulturmedium (CM) kultiviert. Für die Konditionierung wurden embryonale Fibroblasten aus Mäusen (Stamm: CF-1) mit Mitomycin C (10 µg/ml, 2,5 h) mitotisch inaktiviert und nach Trypsinierung in einer Konzentration von 60000/cm² in mit 0,1% Gelatine beschichteten Kulturflaschen ausgesät. Nach 24 Stunden Kultivierung in Stammzell-Kulturmedium wurde dieses abgenommen und mit einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert. Direkt vor der Nutzung wurden dem Medium 30 ng/ml bFGF zugesetzt.

3.2 Virusvektoren

3.2.1 Lentiviren

Die verwendeten Lentivirusvektoren wurden in der Hamburg Zentrum für Experimentelle Therapieforschung (HEXT) Vector Facility hergestellt.

Dabei wurden die Transferplasmide pSicoBC CMV GFP-Bsd und pSicoBC CMV GFP-2A-Bsd, sowie die Verpackungsplasmide psPAX2, pMD2.G (Addgene, Didier Trono's Laboratories) verwendet. Die Transfektion erfolgte mit Polyethylenimin. Die Ausbeute betrug je 40 ml DMEM/10% FCS, anschließend erfolgte eine Konzentrierung durch Ultrazentrifugation auf Sucrose-Kissen.

Serotyp	Titer [TU/ml]
pSicoBC CMV GFP-Bsd	2,5*10 ⁹
pSicoBC CMV GFP-2A-Bsd	7,4*10 ⁸

Tabelle 1: Lentiviren und deren Titer.

3.2.2 Adeno-assoziierte Viren (AAV)

AAVs wurden am Universitätsklinikum Heidelberg unter der Leitung von Prof. Dr. Oliver Müller hergestellt.

Serotyp	Titer [vg/ml]
wtAAV1 CMV-EGFP	3,69E+08
AAV1-MPL CMV-EGFP	5,26E+08
AAV1-NEA CMV-EGFP	6,34E+09
AAV1-NEA TropT-EGFP	4,83E+09
wtAAV2 CMV-EGFP	5,72E+10
AAV2-NEA CMV-EGFP	6,42E+10
AAV2-NEA TropT-EGFP	4,86E+10
wtAAV6 CMV-EGFP	3,50E+10
AAV7-NYS CMV-EGFP	3,26E+09
AAV7-NEA CMV-EGFP	1,16E+10
AAV8-NYS CMV-EGFP	4,75E+09
AAV9-NYS CMV-EGFP	2,09E+10
AAV9-NYS TropT-EGFP	2,96E+10
AAV9-SLR CMV-EGFP	9,46E+09
AAV9-SLR TropT-EGFP	5,45E+10
AAV9-NLH CMV-EGFP	8,04E+09
AAV9-NLH TropT-EGFP	1,66E+10

Tabelle 2: Adeno-assoziierte Viren und deren Titer.

3.3 Kultivierung von humanen vaskulären Endothelzellen (HUVECs)

HUVECs wurden in mit 0,1% Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen in Endothelzell-Wachstumsmedium (PromoCell) kultiviert. Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Bei Erreichen von 80% Konfluenz wurden die Zellen mit TrypLE Select im Verhältnis von 1:3 oder 1:6 passagiert. Zum Einfrieren wurden die pelletierten Zellen in Wachstumsmedium resuspendiert und tropfenweise das gleiche Volumen Einfriermedium zugegeben. Die Zellen wurden in einem Isopropanol-Einfriergefäß durch Senkung der Temperatur um 1 °C/Minute bei -80 °C eingefroren und nach 48 h in flüssigen Stickstoff überführt. Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen bei 37 °C aufgetaut, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und tropfenweise 2 ml Wachstumsmedium zugegeben. Dann wurde auf 10 ml aufgefüllt und die Zellen bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert, um Reste von DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden in Wachstumsmedium resuspendiert und in mit 0,1% Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen ausplattiert.

3.4 Humane induzierte pluripotente Zelllinien

Kennung	Reprogrammierungsmethode	Reprogrammierungsfaktoren	Geschlecht	Phänotyp
C25	Lenti-/Retroviral*	OSK M-c	weiblich	Wildtyp
PAS5-641	Lenti-/Retroviral	OSK M-L	weiblich	CPVT
PAS7-770	Lenti-/Retroviral	OSK G +p53sh	männlich	CPVT
DM 03	Sendaiviral	OSK M-c	weiblich	DM1
CMS1-440	Lenti-/Retroviral	OSK M-L	weiblich	HCM

Tabelle 3: Übersicht über die am häufigsten für Optimierungsversuche verwendeten hiPS-Zellen. OSK= *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*; M-c= c-MYC; M-L= MYCL1; G= GLIS1; p53sh= p53shRNA; CPVT= catecholaminerge polymorphe Ventrikulär-Tachykardie; DM1= myotone Dystrophie Typ 1; HCM= hypertrophe Kardiomyopathie. *C25 wurde von Dr. Moretti (München) wie beschrieben reprogrammiert (Moretti et al., 2010).

3.5 Zellkultur humaner induzierter pluripotenter Zellen (hiPSCs)

Zur Kultivierung der hiPSCs wurde die Oberfläche der Zellkulturschalen mindestens 30 Minuten vor der Passage mit Geltrex® beschichtet, indem Geltrex® auf Eis aufgetaut, in kaltem DMEM im Verhältnis 1:200 verdünnt und in der Kulturschale bei 37 °C inkubiert wurde. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in MEF-konditioniertem Medium (CM) bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% rH. Der Mediumwechsel erfolgte täglich, wobei dem Medium 30 ng/ml bFGF frisch zugesetzt wurden. Um eine spontane Differenzierung zu verhindern, erfolgte die Passage vor Erreichen der Konfluenz. Für die Passagierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit EDTA (0,5 mM) für 10 Minuten inkubiert. Nach Entfernen des EDTAs wurden die Zellen schwungvoll mit konditioniertem Medium versetzt, um Zellverbünde von der Zellkulturschale zu lösen. Die Zellaggregate wurden auf mit Geltrex® beschichtete Zellkulturschalen mit 6 Vertiefungen ausgesät. Die Passage erfolgte im Verhältnis 1:3 bis 1:6.

3.5.1 Einfrieren und Auftauen von hiPSCs

Die hiPS-Zellen wurden wie oben beschrieben mit EDTA dissoziiert. Anschließend wurden zu den in Kulturmedium resuspendierten Zellen tropfenweise das gleiche Volumen Einfriermedium gemischt und Y-27632 (10 µM) zugegeben. Die Zellen wurden in einem Isopropanol-Einfriergefäß durch Senkung der Temperatur um 1 °C/Minute bei -80 °C eingefroren und nach 48 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt. Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen bei 37 °C aufgetaut, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und tropfenweise 2 ml CM zugegeben. Dann wurde auf 10 ml aufgefüllt und die Zellen bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert, um Reste von DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden in CM resuspendiert und auf mit Geltrex® beschichteten Zellkulturplatten ausplattiert.

3.5.2 Mykoplasmentest

Um die kultivierten hiPS-Zellen auf Mykoplasmeninfektionen zu testen, wurden 250 µl Zellkulturmedium, welches über Nacht auf den Zellen inkubierte, abgenommen. Dieses wurde mit 750 µl sterilem dest. Wasser gemischt und dann für 10 Minuten in einem Thermoblock bei 100 °C inkubiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 200 g wurde der Überstand zum Ansetzen der PCR verwendet.

PCR-Ansatz:

Komponente	Pro Reaktion [μ l]
H ₂ O	26,75
10 x Puffer	5,0
Q-Lösung	10,0
MgCl ₂ (25mM)	4,0
Primermischung (10 pM)	1,0
dNTP's (4 mM)	1,0
Polymerase (5 U/ml)	0,25
Probe	2,0
Summe	50,0

Nach Zugabe der Probe zum PCR-Ansatz wurde die Reaktion sofort gestartet:

Zyklus	Zeit (t)	°C	Zyklenzahl
Initiation	15 Minuten	95	1
Denaturierung	30 Sekunden	94	} 40
Hybridisierung	30 Sekunden	56	
Extension	1 Minute	72	
Finale Extension	10 Minuten	72	1

Anschließend wurden die Produkte in einem 1% Agarose-Gel analysiert.

3.5.3 Behandlung von Mykoplasmeninfektionen

Zur Behandlung von Mykoplasmeninfektionen wurden die BIOMYC Antibiotika Lösungen (PromoCell) verwendet. BIOMYC-1 und 2 sind zwei Antibiotika, die bei sequentieller Nutzung effizient Mykoplasmen eliminieren. BIOMYC-1 basiert auf dem Antibiotikum Tiamutin, welches von dem Pilz *Pleurotus mutilus* produziert wird. BIOMYC-2 basiert auf dem Antibiotikum Minozyklin, einem verbessertem Derivat des Tetrazyklins. Die kontaminierten Zellkulturen wurden für vier Tage mit BIOMYC-1 und anschließend drei Tage mit BIOMYC-2 gemäß den Anweisungen des Herstellers behandelt. Es wurden 2 Behandlungszyklen durchgeführt, um der Entstehung von Resistenzen entgegen zu wirken.

3.5.4 Karyotypisierung

Die Karyotypisierung der verwendeten hiPS Zelllinien erfolgte regelmäßig zur Qualitätskontrolle am Institut für Humangenetik, UKE.

3.6 Teratomassay

Ein Teratom ist ein benigner Tumor aus einer unorganisierten Mischung von Zellen und kleinen Gewebefoci, welche aus Zellen aller drei Keimblätter bestehen. Um die Pluripotenz der verwendeten hiPSC Linie C25 nachzuweisen und die Teratogenität der aus hiPSC differenzierten Kardiomyozyten zu untersuchen, wurde ein Teratomassay durchgeführt. Dafür wurden Mäusen der immunkompromittierten Linie SCID Beige an beiden Oberschenkel Innenseiten jeweils 1×10^7 hiPSC oder aus hiPSC differenzierte Kardiomyozyten injiziert. Kardiomyozyten wurden wie im Abschnitt 3.10 beschrieben geerntet. HiPSCs wurden vor der Dissoziation zunächst mit 10 μ M des ROCK-Kinaseinhibitors Y-27632 für 1 h vorbehandelt. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen zur Dissoziation für 10 Minuten bei 37 °C mit 0,5 mM EDTA Lösung inkubiert. Die Zellen wurden in PBS in ein Zentrifugenröhrchen überführt und trituriert. Nach Bestimmen der Zellzahl wurden die Zellen für 5 Minuten bei 960 rpm zentrifugiert und in 30% Matrigel Basalmatrix in DMEM/F-12 mit 10 μ M Y-27632 aufgenommen.

Die Injektionen von Zellsuspension oder zellfreiem Medium erfolgten am oberen rechten bzw. linken Hinterlauf im Bereich der Adduktoren. Nach Beobachtung des Versuchstieres über 8-12 Wochen wurden etwaige Tumore im Bereich der Implantationsstelle explantiert, in 4% Roti-Histofix® fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach HE-Färbung von Gewebeschnitten aus drei Ebenen des Präparates erfolgte eine pathologische Einstufung.

3.7 Embryoidkörperchen (EBs)

Die Ausarbeitung eines Protokolls zur Bildung von EBs durch *forced aggregation* und in Spinnerflaschen war Bestandteil dieser Arbeit. Daher sind diese Protokolle bei den Ergebnissen zu finden. Zu Beginn der Arbeit wurden EBs durch spontane Kollagenase-basierte Entstehung generiert.

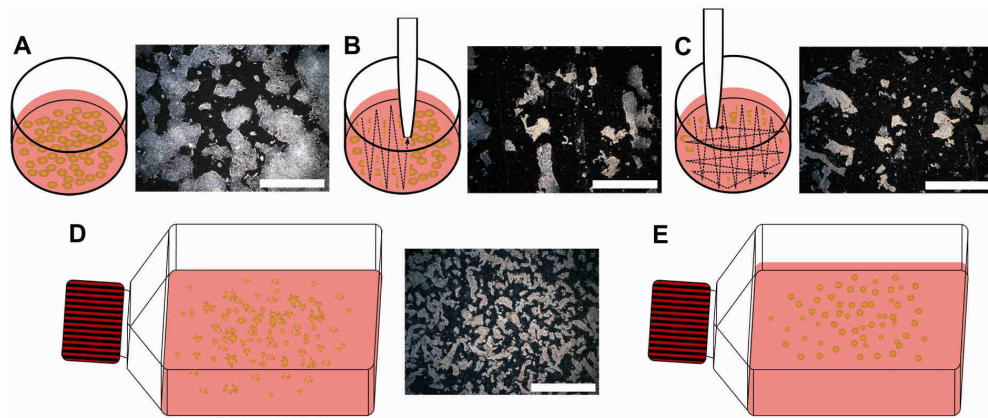


Abbildung 10: Schematische Darstellung und dazugehörige Fotos der EB Bildung. (A) Zellkolonien nach Behandlung mit Kollagenase; (B) Kolonien nach dem ersten und (C) zweiten Durchgang mit einer 5 ml Pipette; (D) Koloniefragmente direkt nach dem Überführen in eine ULA-Flasche; (E) EBs nach 24 Stunden Inkubation. Maßstab 1 mm. Quelle: S. Schaaf, 2011: Künstliche Herzgewebe aus humanen embryonalen Stammzellen als Testsystem für Arzneistoffe.

Dafür wurden die zu mindestens 95% konfluenten Zellen mit DMEM/F-12 gewaschen und anschließend mit 1 mg/ml Kollagenase IV für 2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernen der Kollagenaselösung wurden die Zellen erneut gewaschen und 1,5 ml EB-Formationsmedium zugegeben. Mit einer 5 ml Pipette wurden Koloniefragmente von der Wachstums Oberfläche abgekratzt und in eine am Vortag mit 1% Pluronic® F-127 beschichteten und gründlich gewaschenen Zellkulturflasche überführt. Übrige Zellfragmente wurden mit Medium von den Platten gespült. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37 °C, 90% rH, 5% CO₂ und 5% O₂ in einem Volumen von 90 ml Medium pro eingesetzte Zellen einer Platte des 6-Vertiefung Formates.

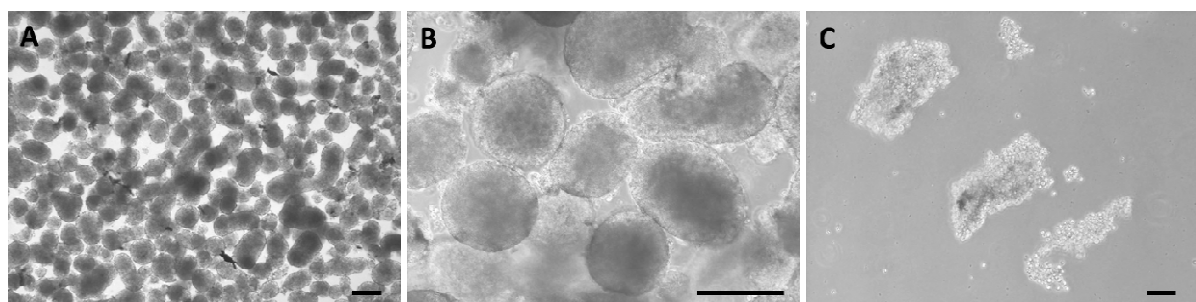


Abbildung 11: (A) und (B) Erfolgreiche Bildung von EBs nach 24 Stunden. Deutlich zu erkennen sind die klaren Begrenzungen jedes Aggregates. (C) Zellfragmente nach gescheiterter EB Formation. Maßstab 200 µm.

3.8 Differenzierung von hiPSCs zu Kardiomyozyten

Das Ausarbeiten eines Protokolls zur effizienten Differenzierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) zu Kardiomyozyten war Bestandteil dieser Arbeit. Das Protokoll ist deshalb bei den Ergebnissen zu finden.

3.8.1 Anreicherung von Kardiomyozyten

Glukose ist die dominierende Energiequelle und Ausgangssubstanz anabolischer Vorstufen in diversen mammalischen Zellen. Bei der Glykolyse wird sie über Glukose-6-phosphat und 3-phosphoglycerat ohne Sauerstoffverbrauch zu Pyruvat und/oder Laktat konvertiert, wobei zwei ATP Moleküle entstehen. Aus Pyruvat entstehen im mitochondriellen Tricarbonsäurezyklus durch oxidative Phosphorylierung 36 ATP Moleküle. Kardiomyozyten sind in der Lage verschiedene Substrate - wie Glukose, Fettsäuren und Laktat - effizient zur Energiegewinnung zu nutzen. Diese einzigartige metabolische Eigenschaft wurde zeitweise genutzt, um effektiv und nicht-invasiv Kardiomyozyten aufzureinigen. In Anlehnung an die Arbeit von Tohyama et al., 2013 wurde ein Protokoll zur Anreicherung von Kardiomyozyten ausgearbeitet, welches im Ergebnisteil näher beschrieben ist.

3.8.2 Einfrieren und Auftauen von hiPS-Kardiomyozyten

Die hiPS-Kardiomyozyten wurden wie unter 3.10 beschrieben aus den EBs dissoziiert. Nach Bestimmen der Zellzahl wurden die Kardiomyozyten in FCS mit 10% DMSO in einer Dichte von mindestens 2×10^6 /ml resuspendiert. Die Zellen wurden in einem Isopropanol-Einfriergefäß durch Senkung der Temperatur um 1 °C/Minute bei -80 °C eingefroren und nach 48 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt. Vor der Verwendung der kryokonservierten Kardiomyozyten wurden die Zellen bei 37 °C aufgetaut, in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml DMEM überführt und bei 100 g für 5 Minuten zentrifugiert, um Reste von DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden in dem gewünschten Medium resuspendiert.

3.8.3 Proliferation von Kardiomyozyten

Um Proliferation in der hiPS-Kardiomyozyten Population zu untersuchen, wurden die EBs zunächst wie in Abschnitt 3.10 beschrieben dissoziiert. Die Zellsuspension wurde in einer Dichte von 1000 Zellen/mm² auf mit 0,1% Gelatine beschichteten Zellkulturplatten ausplattiert und für 6 Tage in Kardiomyozytenmedium bei 37 °C, 21% O₂, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dann wurde 3 µM EdU (Click-iT® Plus EdU Flow Cytometrie Assay

Kit) zu den Zellen gegeben und die Zellen nach 24 Stunden mit TrypLE geerntet. Der Nachweis des während der DNA Synthese eingebauten Thymidin Analogons EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridin) erfolgte nach Anweisung des Herstellers, durch eine durch Kupfer katalysierte kovalente Reaktion zwischen der Alkingruppe der Ethynylgruppe des EdU mit an Alexa Fluor® 488 gekoppeltes Picolyl Azid. Anschließend wurde α -Aktinin wie unter 3.12 beschrieben angefärbt und der Anteil der sich in der S-Phase befindlichen Kardiomyozyten am BD FACSCanto II Flow Cytometer analysiert.

3.9 Differenzierung von hiPSCs zu Endothelzellen

Das Ausarbeiten eines Protokolls zur effizienten Differenzierung von hiPSCs zu Endothelzellen war Bestandteil dieser Arbeit. Das Protokoll ist deshalb bei den Ergebnissen zu finden.

3.9.1 Anreicherung von CD31-positiven Zellen – MACS

Um die differenzierten CD31-positiven Zellen anzureichern, wurden zwei magnetisch aktivierte Zellsortierungen (MACS) durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mit 1 mg/ml (200 U/ml) Kollagenase II in HBSS ohne Calcium mit 1 mM HEPES für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die von der Wachstums Oberfläche abgelösten Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und nach Zugabe von Dissoziationsmedium mit einer Pipette trituriert. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert und in FACS-Puffer aufgenommen. Die magnetische Markierung mit *CD31 MicroBeads* (Miltenyi Biotec) und die Separation in MS oder LS Säulen (Miltenyi Biotec) erfolgten gemäß den Anweisungen des Herstellers. Um eine möglichst hohe Reinheit zu erhalten, wurden zwei MACS-Zyklen durchgeführt. Und der Säulen-Durchfluss wurde nochmals auf eine Säule gegeben, um die Zellausbeute zu erhöhen.

3.9.2 Gefäßbildung

Charakteristisch für Endothelzellen ist die Bildung vaskulärer Netzwerk-ähnlicher Strukturen. Um diese Eigenschaft an den aus hiPSCs generierten CD31-positiven Zellen zu untersuchen, wurde ein Matrigelplug-Assay durchgeführt. Dafür wurde eine 96-Vertiefungen Platte mit 50 µl Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel beschichtet und pro Vertiefung $1,5 \times 10^4$ hiPS-Endothelzellen in hiPS-EC Medium ausplattiert. Als Kontrolle dienten HUVECs.

3.10 Dissoziation der EBs

Um EBs in einzelne Zellen zu dissoziieren, wurden diese zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 1 mg/ml (200 u/ml) Kollagenase II in HBSS ohne Calcium mit 1 mM HEPES für 3,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die von der Wachstums Oberfläche abgelösten Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und nach Zugabe von Dissoziationsmedium mit einer Pipette trituriert. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten bei 100 g zentrifugiert, in DMEM aufgenommen und gezählt. Nach erneuter Zentrifugation für 15 Minuten bei 100 g wurden die Zellen in der gewünschten Zelldichte im gewünschten Medium aufgenommen.

3.11 Engineered Heart Tissue (EHT)

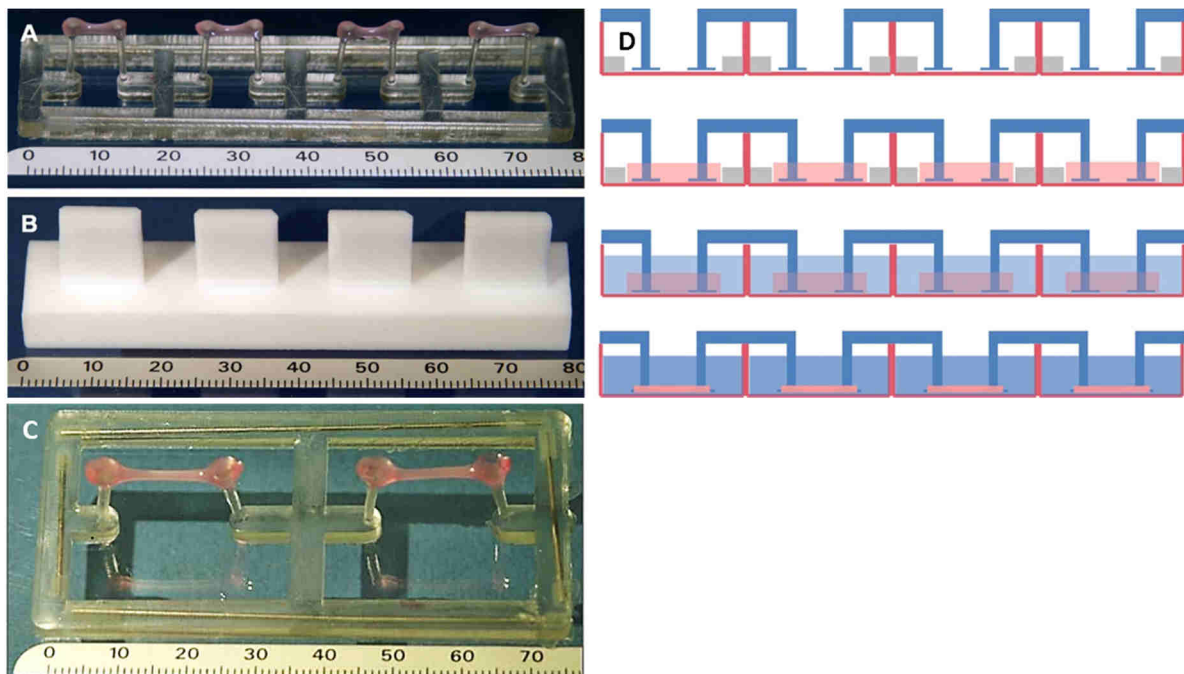


Abbildung 12: (A) EHTs im 24-Vertiefungen Format zwischen Silikonstäbchen, (B) Teflon-Formen für das 24-Vertiefungen Format, (C) EHTs im 6-Vertiefungen Format zwischen Silikonstäbchen. (D) Schematische Darstellung der EHT-Herstellung. Erste Reihe: Agarose-Gussformen (grau) mit Silikon-Matten und Stäbchen, die in die Gussformen reichen. Zweite Reihe: Gussformen mit Mastermix. Dritte Reihe: Nach Polymerisierung des Fibrins mit Silikonstäbchen in eine neue Zellkulturschale überführte und mit Medium überschichtete Konstrukte. Vierte Reihe: Aus dem Fibrinblock zu einem Streifen kondensiertes künstliches Gewebe.

Um EHTs herzustellen, wurden zunächst mit Hilfe von Positiv-Formen aus Teflon die Gussformen hergestellt. Dafür wurden in einer Zellkulturschale mit 24 Vertiefungen 1,6 ml, oder in einer Zellkulturschale mit 6 Vertiefungen 10 ml einer Agarose-Lösung (2% in PBS) vorgelegt und vor dem Aushärten die Teflon-Formen in den Vertiefungen platziert. Nach dem Aushärten der Agarose und Entfernen der Teflon-Formen, wurden die Silikonmatten (für Platten mit 24 Vertiefungen von Jäger Gummi und Kunststoff GmbH & Co. KG und Siltec GmbH

hergestellt; für Platten mit 6 Vertiefungen selbst gegossen) mit den Silikonstäbchen so platziert, dass jeweils zwei Stäbchen in die Gussformen ragten.

EBs wurden an Tag 14 wie unter 3.10 beschrieben in einzelne Zellen dissoziiert und HUVECs wie unter 3.3 beschrieben geerntet. Die Zellsuspension wurde in EHT-Medium mit 10 μM Y-27632 auf die entsprechende Konzentration eingestellt und mit dem Mastermix, bestehend aus Matrigel (10%), bovinem Fibrinogen (5 mg/ml) und DMEM (2x konzentriert), versetzt. Die Zell-Matrix-Suspension wurde vor dem Gießen der EHTs mit 3 μl bzw. 21 μl Thrombin (3U) versetzt, dann wurden vor Koagulation pro EHT 100 μl oder 700 μl für die großen EHTs (entsprechend 5×10^5 Kardiomyozyten und 2×10^5 HUVECs bzw. 5×10^6 Kardiomyozyten und 2×10^6 HUVECs) in jede Gussform pipettiert (Abbildung 12).

Für die Polymerisation wurden die Konstrukte für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend 300 μl bzw. 1 ml EHT Medium auf jedes Konstrukt gegeben, um sie später leichter aus der Gussform lösen zu können. Die ausgehärteten Konstrukte wurden mit den Silikonmatten aus der Gussform herausgezogen, in eine neue 24-Vertiefungen bzw. 6-Vertiefungen Zellkulturschale platziert und mit 1,5 ml bzw. 8 ml EHT-Medium versorgt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 40% O₂, 7% CO₂ und 95% rH. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

Die Qualitätskontrolle der EHTs im 24-Vertiefungen Format erfolgte in der videootischen Messapparatur mit der CTMV-Software (Consulting Team Machine Vision, Pforzheim).

3.12 Durchflusszytometrie

Die zu analysierenden Zellen wurden wie in den entsprechenden Abschnitten beschrieben (siehe 3.3, 3.10 und 3.9.1) geerntet. Nach zweimaligem Waschen wurden zum Nachweis membranständiger Proteine zunächst 30 Minuten bei 4 °C in Blockierlösung unspezifische Bindungsstellen gebunden und die Zellen anschließend mit dem primären Antikörper in FACS-Puffer für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Vor dem Nachweis intrazellulärer Proteine wurden die Zellsuspensionen zur Fixierung mit 1% Formaldehyd in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur, oder mit eiskaltem Methanol für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert und dann die Zellmembranen für 10 Minuten bei Raumtemperatur in FACS-Puffer mit 0,5% Saponin permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem primären Antikörper im selben Puffer inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper in FACS-Puffer, oder FACS-Puffer mit 0,5% Saponin beim Nachweis intrazellulärer Proteine, für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden dreimal gewaschen und zur Analyse in PBS aufgenommen. Die Sortierung erfolgte an einem BD FACSCanto II Flow Cytometer und die Daten wurden mit der BD FACSDiva Software 6.0 analysiert.

3.13 RNA Präparation und quantitative real-time PCR

Im Verlauf der Differenzierung wurde an den Zeitpunkten Tag eins, von Tag zwei bis 16 alle zwei Tage und an Tag 20 Proben genommen. Pro Zeitpunkt wurden 4 Differenzierungsansätze untersucht.

Dafür wurden während der EB Formation 5 ml und während der ersten Differenzierungsphase 10 ml EB Suspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (200 g, 5 Minuten). Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Pellet im Lysis-Puffer (RNeasy Kit, Qiagen) aufgenommen und bei -80 °C eingefroren. Proben während der zweiten Differenzierungsphase wurden gewonnen, indem in Vertiefungen einer 6-Vertiefungen Platte kultivierte EBs direkt in Lysis-Puffer aufgenommen und bei -80 °C eingefroren wurden.

Um RNA Proben aus EHTs zu gewinnen, wurde das EHT in 350 µl Lysis-Puffer lysiert. Zur Entfernung großer Proteinmengen der Fibrinmatrix wurde ein Proteinase K Verdau durchgeführt. Dafür wurden 20 µl Proteinase K zugesetzt und solange bei 56 °C unter

Bewegung (350 RPM) inkubiert, bis die EHTs vollständig aufgelöst waren. Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem RNeasy Kit (Qiagen) gemäß der Anleitung des Herstellers. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde per NanoDrop Spektrophotometrie bestimmt. Zum Umschreiben der RNA in cDNA wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) gearbeitet.

Die qPCR wurde mit SYBR-Green (Fermentas) gemäß der Anleitung des Herstellers in 10 µl Ansätzen durchgeführt, jede Probe wurde dreifach bestimmt. Das Referenz-Transkript war in allen Versuchen Glucuronidase-beta (GUSB). Zur Auswertung wurden die Differenz zwischen dem CT-Wert des Ziel-Gens und des Referenz-Gens (Δ CT-Wert), sowie die Differenz vom Δ CT-Wert der Probe und einer Kontrolle ($\Delta\Delta$ CT-Wert) berechnet. Als Kontrollen dienten undifferenzierte Stammzellen. Aus dem $\Delta\Delta$ CT-Wert wurde der Faktor (F) der Veränderung nach folgender Formel berechnet:

$$F = 2^{\Delta\Delta CT}$$

Dabei wurde für jeden Zyklus eine perfekte Amplifikation um den Faktor 2 angenommen. Die Messung wurde an einem AbiPrism7000HT durchgeführt. Amplifiziert wurde über 40 Zyklen. Zur Qualitätskontrolle wurden nach der Amplifikation Schmelzkurven erstellt.

3.14 DNA Präparation und PCR

Um Meerschweinchengewebe auf humane DNA zu untersuchen, wurden 28 Tage nach Transplantation neben dem Herz auch Lunge, Leber, Niere und Milz explantiert. Die Organe wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, auf N₂ gemörst und bei -80 °C gelagert.

Die DNA wurde mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) isoliert. Dafür wurden jeweils 50 mg der zermörsterten Organe in Lysispuffer im Tissue-Lyser weiter zerkleinert. Die Lyse erfolgte über Nacht in Gegenwart von Proteinase K mit anschließendem RNase-Verdau (10 min., 175 ng/Probe). Die weitere Isolierung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde per NanoDrop Spektrophotometrie bestimmt.

Die PCR mit Primern gegen humanes NANOG wurde wie folgt angesetzt:

Komponente	Pro Reaktion [μ l]
10 x Puffer	2,0
MgCl ₂ (25mM)	2,0
Primer fw (10 pM)	2,0
Primer rv (10 pM)	2,0
dNTP's (4 mM)	1,0
Polymerase (5 U/ml)	0,5
DNA-Probe (100 ng/ μ l)	1,0
H ₂ O	9,5
Summe	20,0

Nach Zugabe der Probe zum PCR-Ansatz wurde die Reaktion sofort gestartet:

Zyklus	Zeit	°C	Zyklenzahl
Initiation	7 Minuten	95	1
Denaturierung	30 Sekunden	95	15, touchdown -0,4°C pro Zyklus
Hybridisierung	30 Sekunden	68	
Extension	45 Sekunden	72	
Denaturierung	30 Sekunden	95	25
Hybridisierung	30 Sekunden	62	
Extension	45 Sekunden	72	
Ende	∞	4	1

Anschließend wurden die Produkte in einem 1% Agarose-Gel analysiert.

3.15 Transduktion von HUVECs und hiPS-Endothelzellen

Zur Herstellung einer stabilen GFP-exprimierenden HUVEC-/ hiPS-Endothelzelllinie, wurden die Zellen lentiviral mit pSicoBC CMV GFP-Bsd bzw. pSicoBC CMV GFP-2A-Bsd transduziert. Dafür wurde der Virus mit einer MOI von 15 in Gegenwart von 4 µg/ml Polybrene zu den in Suspension befindlichen Zellen gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen in mit 0,1% Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen ausplattiert. Nach 6 Tagen wurden erfolgreich transduzierte Zellen mit 10 µg/ml Blasticidin für 14 Tage selektioniert. Die Reinheit der stabilen Zelllinien wurde anhand der GFP-Fluoreszenz im Durchflusszytometer überprüft.

3.16 Transduktion humaner iPS-Kardiomyozyten

Da in der Literatur die Transduktion von humanen Kardiomyozyten mit Adeno-assoziierten Viren (AAVs) bisher nicht beschrieben wurde, wurden zunächst 300 verschiedene Serotypen mit GFP-Sequenz unter CMV-Promotor, darunter viele verschiedene Mosaiktypen, getestet.

Dafür wurden jeweils 40000 hiPS-KMs in mit Geltrex® beschichteten Zellkulturplatten mit 96-Vertiefungen mit einer ungefähren Virenanzahl pro Zelle (MOI) von 15000 für 72 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ und 20% O₂ inkubiert. Von den Serotypen mit den höchsten Transduktionseffizienzen wurden qualitätskontrollierte Produktionen hergestellt. Zur Transduktion mit diesen Serotypen wurden die AAVs in den MOIs von 300, 1000, 3000 und 10000 zu den in Suspension befindlichen Zellen gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurden die Zellen in mit Geltrex® beschichteten Zellkulturplatten ausplattiert. Nach 6 Tagen wurden die mit MOI 10000 infizierten Zellen geerntet und durchflusszytometrisch der Anteil GFP-exprimierender Kardiomyozyten (alpha-Aktinin positiv) analysiert (siehe Abschnitt 3.12). Von fünf der Serotypen mit den besten Transduktionsergebnissen wurden Varianten mit GFP-Sequenz unter TNNT-Promotor hergestellt und der Versuch mit MOIs von 10000, 30000 und 100000 wiederholt.

3.17 In vivo Transplantationsstudie

Alle Versuchstiere wurden in der Versuchstierhaltung am UKE untergebracht.

Die Tierversuche wurden unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

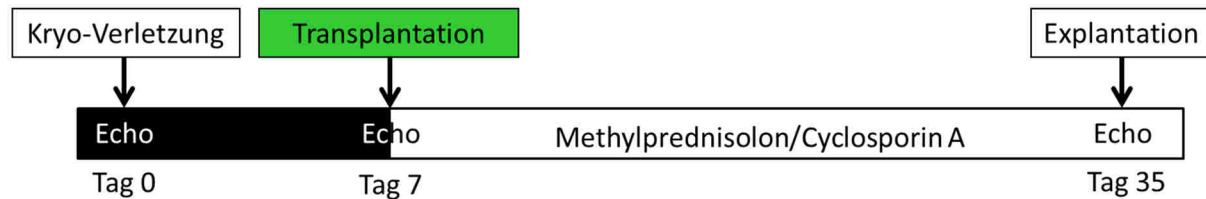


Abbildung 13: Studiendesign.

3.17.1 Induktion der Myokardinfarkte

Die Versuchstiere wurden mit 3% Isofluran in Narkose versetzt. Nach Narkoseeinleitung, bzw. wenn keine Echokardiografie durchgeführt wurde vor Narkoseeinleitung, wurde den Tieren das opioide Analgetikum Buprenorphin (0,05 mg/kg KG s.c.) und das nicht-opioide Analgetikum Carprofen (5 mg/kg KG) appliziert. Eine ausreichende Beatmung wurde durch eine Tracheotomie mit einem Respirator sichergestellt.

Der Zugang zum Herzen erfolgte über eine linkslaterale Thorakotomie. Dabei wurde zunächst eine 3 cm große Hautinzision am Rand des M. cutaneus trunci durchgeführt. Anschließend wurden sowohl der M. cutaneus trunci als auch der M. latissimus dorsi entlang der Faszien mobilisiert und mit Haken nach kranial bzw. kaudal fixiert. Die Mm. intercostales wurden zwischen vierter und fünfter Rippe durchtrennt, die Pleura eröffnet und ein Retraktor in die Thoraxöffnung zwischen die Rippen gesetzt und gespannt. Das Herz wurde mobilisiert und das Perikard sorgfältig mit einer chirurgischen Pinzette entfernt.

Nach Aufsuchen der freien Wand des linken Ventrikels wurde ein mit Stickstoff gekühlter Metalstempel mit einem Durchmesser von 0,5 cm viermal für 30 Sekunden auf das Myokard gepresst. Eine Verdunkelung des entsprechenden linksventrikulären Myokardareals bestätigte die erfolgreiche Infarktinduktion.

Nach sorgfältiger Kontrolle auf Bluttrockenheit erfolgt dann der mehrschichtige Wundverschluss. Der Thorax wurde mit zwei doppelten chirurgischen Knoten in maximaler Inspiration bei einem auf 180 mbar erhöhten Beatmungsdruck dicht geschlossen, um einen

postoperativen Lungenkollaps zu vermeiden. Zusätzlich wurden zum Wundverschluss eine Muskelnahrt und eine fortlaufende Hautnaht vorgenommen. Nach Einsetzen der Spontanatmung wurde den Versuchstieren der Beatmungstubus entfernt.

In den ersten 5 Tagen nach dem Eingriff wurde den Tieren alle 24 Stunden 5 mg/kg KG Carprofen und alle 12 Stunden 0,05 mg/kg KG Buprenorphin subkutan injiziert. Diese Arbeiten wurden im Team mit Dr. Florian Weinberger und Herrn Dr. Simon Pecha, Abteilung für Herz- und Thoraxchirurgie, Universitäres Herzzentrum Hamburg durchgeführt. Die chirurgischen Tätigkeiten wurden von Herrn Dr. Pecha durchgeführt.

3.17.2 Bestimmung der Infarktgröße

Die Infarktgröße wurde durch Messen der Mittellinie des infarzierten Bereichs in Gewebeschnitten des linken Ventrikels ermittelt (Takagawa et al., 2007). Dafür wurden die histologischen Schnitte mit dem Binokular Stemi SV6 (Zeiss) und der Kamera AxioCam MRc 5 (Zeiss) aufgenommen. Zur Bildaufnahme und Vermessung des linken Ventrikels sowie des Infarktgebietes wurde das Programm AxioVision 4.8 verwendet. Es wurde pro Herz bei 15 Gewebeschnitten die Mittellinie des linken Ventrikels im Zentrum zwischen der epikardialen und endokardialen Oberfläche eingezeichnet und deren Länge gemessen.

Als Infarktgröße an der Mittellinie wurden die Infarktgebiete bestimmt, durch die mehr als 50% der Myokardwand geschädigt wurden. Die Infarktgröße wurde durch Division der Summe der Mittellinie-Infarktgrößen aller Schnitte durch die Summe der Umfänge des linken Ventrikels entlang der Mittellinie aller Schnitte und anschließende Multiplikation mit 100 berechnet.

3.17.3 EHT Implantation

Versuchstiere, welche 7 Tage nach Kryo-Verletzung eine reduzierte linksventrikuläre Funktion aufwiesen (fraktionelle systolische Flächenänderung (FAS) <30%), wurden für die weiteren Versuche verwendet. Pro Tier wurden 2 EHTs mit je $5 \cdot 10^6$ aus hiPSC differenzierte Kardiomyozyten und $2 \cdot 10^6$ HUVECs/ hiPS-Endothelzellen (meistens stabil GFP exprimierende) oder ein zellfreies nicht-kontraktilen Fibrin-Konstrukt auf das Infarktareal genäht.

Der operative Zugang zum Herzen zur Implantation erfolgte wie unter 3.17.1 beschrieben. Die EHTs wurden mittels Naht auf dem nativen Myokard fixiert, so dass die Konstrukte sowohl mit dem Narbengewebe, als auch mit dem vitalen Myokard im Randbereich des Infarktes in Kontakt gebracht wurden. Der Wundverschluss sowie die perioperative Medikation erfolgten analog zur Erstoperation.

Zusätzlich erfolgte über den gesamten Beobachtungszeitraum die subkutane Injektion von Immunsuppressiva. Hierfür wurde eine Kombination aus Methylprednisolon (2 mg/kg KG s.c. täglich) und Cyclosporin A (5 mg/kg KG s.c. täglich) eingesetzt. Cyclosporin A wirkt selektiv auf die immunregulatorischen Aktivitäten von T-Helferzellen, ohne einen Effekt auf die Funktionen von T-Suppressor-Zellen, B-Lymphozyten, Granulozyten oder Makrophagen zu haben. Dieser immunologische Effekt von Cyclosporin A ist auf die selektive Hemmung der Interleukin 2-Synthese, über die Bildung von blockierenden Cyclosporin/Cyclophilin-Komplexen zurückzuführen. Zusätzlich wird an den T-Helferzellen eine reduzierte Expression von Interleukin 2 Rezeptoren erreicht. Methylprednisolon ist ein synthetisches Glucocorticoid, welches die Proliferation von T-Zellen hemmt, indem die Freisetzung von Interleukin-1 unterdrückt wird. Es kommt folglich vor allem zur Suppression der humoralen Immunantwort. Es werden weniger entzündungsfördernde Interleukine, Interferone und TNF- α ausgeschüttet, was wiederum die B-Zellen und damit die Antikörperproduktion der Plasmazellen hemmt (Lüllmann H, 2010). Diese Arbeiten wurden im Team mit Dr. Florian Weinberger und Herrn Dr. Simon Pecha, Abteilung für Herz- und Thoraxchirurgie, Universitäres Herzzentrum Hamburg durchgeführt. Die chirurgischen Tätigkeiten wurden von Herrn Dr. Pecha durchgeführt.

3.17.4 Echokardiografie

Die Echokardiografie ist der Goldstandard zur zuverlässigen, nicht-invasiven Beurteilung der kardiovaskulären Struktur und Funktion (Ram et al., 2011). Dabei penetrieren hochfrequente Schallwellen die Thoraxhöhle und werden zurück zum Schallkopf reflektiert, sobald sie die Grenze zwischen Geweben verschiedener akustischer Impedanz, wie Myokard, Herzklappen und Blut, erreichen. Diese zurückgeworfenen Signale ergeben nach Prozessierung mit einer geeigneten Software ein Echtzeit-Bild des Herzens. Die Signale werden als eine Vielzahl von Punkten im Bild dargestellt und deren Helligkeit hängt von der Amplitude des zurückgeworfenen Signals ab - das Myokard reflektiert mehr Ultraschall (erscheint weiß) als Blut (erscheint schwarz).

Es gibt vier Bildgebungsformate um die kardiale Funktion zu untersuchen: den Helligkeits-Modus (B-mode), den Bewegungs-Modus (M-mode), die Doppler-Bildgebung und das dreidimensionale Bildgebungsverfahren.

Beim B-mode wird in Echtzeit ein zweidimensionales schwarz-weiß Bild der beschallten Struktur erzeugt. Dieser Modus erlaubt die nicht-quantitative Beurteilung des kardialen Phänotyps, der Kammerdimensionen, der Herzfunktion und die Visualisierung feiner kardialer Strukturen.

M-mode Bilder werden durch eine schnelle Sequenz von B-mode Scans entlang einer Linie oder Achse erzeugt, die im zeitlichen Verlauf dargestellt werden. Die Bilder zeigen akkurat die Wandbewegungen und erlauben die Beurteilung des Kontraktionsmusters des linken Ventrikels. So können entlang der epikardialen und endokardialen Grenze globale Funktionsparameter des linken Ventrikels wie Auswurfraction (EF), fraktionelle Verkürzung (FS), kardialer Ausstoß, Schlagvolumen, interventrikulärer Durchmesser, abnormale Wandkontraktion und Masse des linken Ventrikels ermittelt werden.

Die Doppler Bildgebung nutzt den Dopplereffekt eines sich bewegenden Objektes, wie z.B. Blutzellen, um die Blutfluss-Geschwindigkeit und -Richtung festzustellen. Durch die

Berechnung von Geschwindigkeiten, Ausstoßzeit (ET) und Geschwindigkeits-Zeitintervallen kann die diastolische Funktion beurteilt werden.

Die Effektivität der Kontraktion des Herzens ist abhängig von der Vor- und Nachlast des Herzens, sowie von der Kontraktilität des Myokards. Zur Beurteilung der Kontraktilität werden verschiedene echokardiografische Parameter bestimmt. Im Folgenden sind kurz diejenigen beschrieben, die zur Beurteilung der linksventrikulären Funktion in dieser Arbeit bestimmt wurden.

Fractional Shortening (FS): es wird die prozentuale Verkürzung des Durchmessers des linken Ventrikels entlang seiner kurzen Achse mittels M-Mode im midpapillären Kurzachsenabschnitt bestimmt.

$$FS = (LVIDd - LVIDs) / LVIDd$$

LVIDd: enddiastolischer Durchmesser

LVIDs: endsystolischer Durchmesser

Fractional Area Shortening (FAS): die fraktionelle Flächenänderungsrate wird aus der Differenz der enddiastolischen und endsystolischen Kammerquerschnittsfläche, dividiert durch die enddiastolische Kammerquerschnittsfläche berechnet. FAS wird im Kurzachsenschnitt bestimmt.

$$FAS = (EDA - ESA) / EDA$$

EDA: enddiastolische Kammerquerschnittsfläche

ESA: endsystolische Kammerquerschnittsfläche

Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF): die Ejektionsfraktion ist der prozentuale Anteil des Schlagvolumens am enddiastolischen Ventrikelvolumen und misst somit die Kontraktion des gesamten Myokards.

$$EF = (ED_{vol} - ES_{vol}) / ED_{vol} \times 100$$

ED_{vol}: enddiastolisches Volumen

ES_{vol}: endsystolisches Volumen

In der durchgeführten Transplantationsstudie wurde die Herzfunktion der Meerschweinchen vor Verletzung des Myokards, 7 Tage nach Verletzung und 28 Tage nach Implantation (35 Tage nach Verletzung) echokardiografisch dokumentiert. Dafür wurden die Tiere mit 2% Isofluran anästhesiert und in Rückenlage auf ein Wärmekissen gelegt. Für die Aufnahmen im Helligkeits-Modus (B-mode) wurde ein MS 250 Transducer mit einer Mittelfrequenz von 21 MHz und einer Bildfrequenz von 376 Bildern/Sekunde verwendet. Die zweidimensionalen Aufnahmen entlang der kurzen Achse wurden auf Höhe des mittleren Papillarmuskels durchgeführt. Parasternal durchgeführte Aufnahmen erfolgten entlang der langen Achse auf Ebene der Aortenklappe mit gleichzeitiger Visualisierung des linksventrikulären Apex. Die Messungen der Dicke der anterioren und posterioren Wand, des Durchmesser des linken Ventrikels und der Fläche des linksventrikulären Hohlraumes wurden nach Standardprozeduren durchgeführt.

Alle Aufnahmen wurden digital aufgenommen und mit dem Programm Vevo 2100 analysiert (Abbildung 14). In der langen Achse wurden der enddiastolische und endsystolische Durchmesser des linken Ventrikels (LVIDd, LVIDs) und das Volumen des linken Ventrikels in Diastole und Systole (LVVold, LVVols) bestimmt, und daraus die Ejektionsfraktion (EF) und die fraktionelle Verkürzung (FS) berechnet. In der kurzen Achse wurden das intraventrikuläre Septum in Diastole und Systole (IVSd, IVSs), LVIDd, LVIDs, die Dicke der posterioren Wand des linken Ventrikels in Diastole und Systole (LVPWd, LVPWs), die Masse und das Volumen des linken Ventrikels in Diastole und Systole (LV Mass, LVVol d, LVVol s), die endokardiale Fläche in Diastole und Systole (ENDOarea d, ENDOarea s) und die epikardiale Fläche in Diastole und Systole (EPIarea d und EPIarea s) bestimmt, und daraus EF, FS und die fraktionelle Flächenverkürzung (FAS) berechnet. Des Weiteren wurden der Durchmesser der Pulmonalarterie und die Flussgeschwindigkeit der Pulmonalarterie (VTI) gemessen.

Die Untersuchungen wurden von Frau Birgit Geertz durchgeführt und ausgewertet.

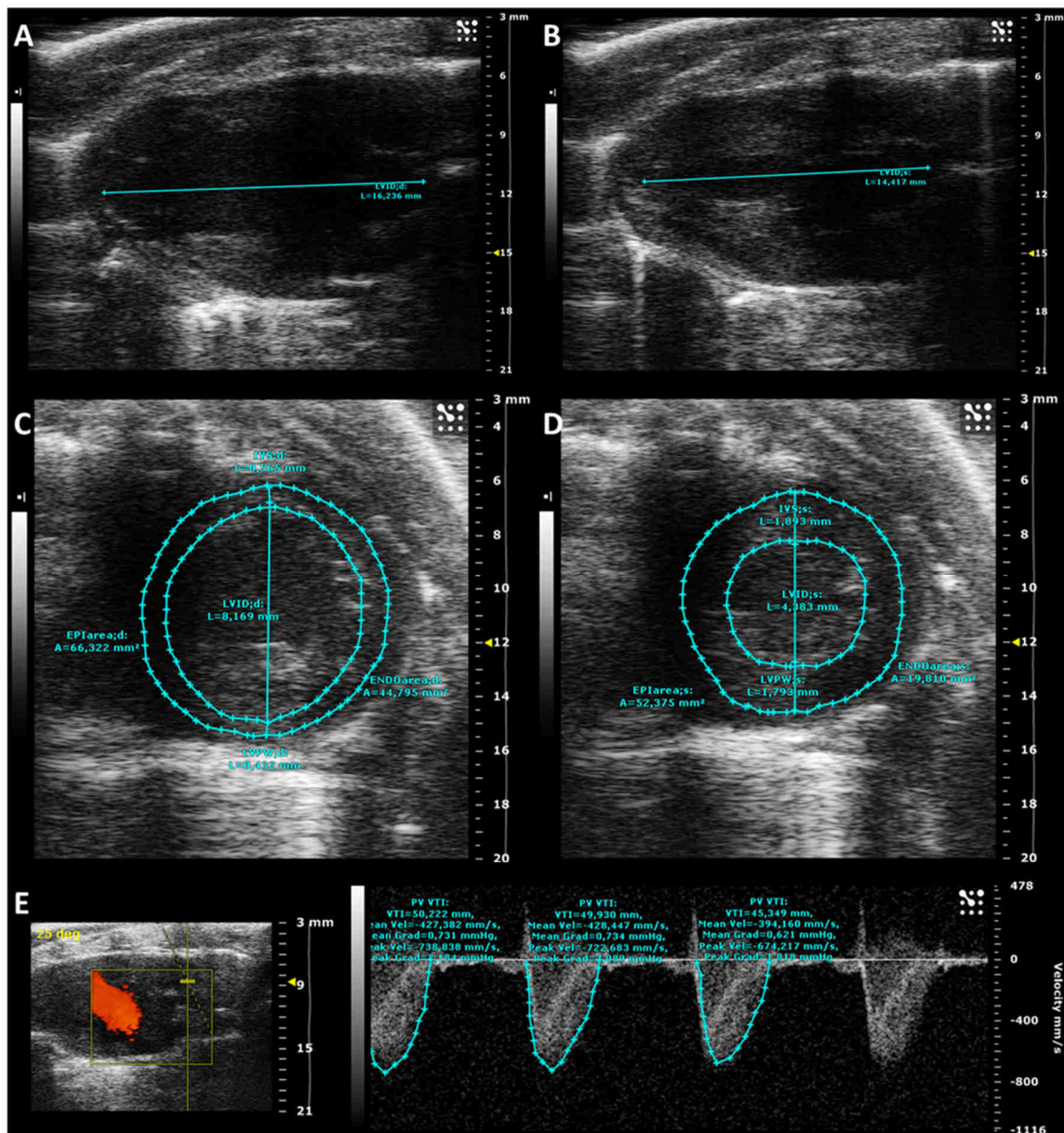


Abbildung 14: Bildgebungs- und Auswertungsverfahren bei der Echokardiografie. B-mode Aufnahmen eines Meerschweinchenherzens in der Ansicht auf die lange Achse des Ventrikels mit eingezeichneter linksventrikulärer enddiastolischer (A) und endsystolischer Länge (B); in der Ansicht auf die kurze Achse mit jeweils eingezeichnetem enddiastolischen (C) und endsystolischen (D) epikardialen und endokardialen Umfang, den Dimensionen der anterioren und posterioren Ventrikelwand und des internen linksventrikulären Durchmessers. Doppler-Bildgebung der Aorten-Flussgeschwindigkeit (E) entlang der links gekennzeichneten Achse. Das Flussgeschwindigkeitsprofil (rechts) in mm/s, ist über die Zeit (in ms, x-Achse) dargestellt.

3.17.4.1 Statistik

Für die statistische Analyse wurden die Tiere berücksichtigt, deren FAS eine Woche nach Kryoverletzung $\leq 30\%$ betrug. Die Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 5. Es wurden eine deskriptive Statistik und zur Beurteilung der Signifikanz eine einfaktorielle ANOVA Analyse mit anschließendem Bonferroni Test zur Neutralisierung der Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen durchgeführt.

3.17.5 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Um den humanen Ursprung des Kardiomyozyten-reichen Gewebes im Infarktbereich nachzuweisen, wurde eine FISH-Analyse gegen humanes Centromer 17 gemacht. Die Analyse wurde am Institut für Tumorbilogie, UKE durchgeführt.

3.17.6 Röntgen-Mikrocomputertomografie

Fixierte Herzen wurden für 2 Tage in 4% wässriger I₂KI-Lösung gefärbt und anschließend in PBS gelagert. Die Aufnahmen und Auswertung wurden von Timur Yorgan am Institut für Osteologie und Biomechanik, UKE gemacht.

Für die Bildgebung wurden die Herzen in einem radiotransluzenten Probenhalter platziert und mit Schaumstoff-Polstern das Verrutschen während der CT-Schichtaufnahmen verhindert. Die Proben wurden mit einem μ CT 40 desktop cone-beam microCT (Scanco Medical) mit einer Voxel Größe von 18 μ m mit 1000 Projektionen pro Schicht und einer Radoröhren-Energie von 70 kVp mit einer Intensität von 57 μ A gescannt.

Die rekonstituierten Schichtbilder wurden als 8-bit graustufige TIF-Bilder exportiert. 3D mediane Filterung mit einem Voxel Radius von 2, orthogonale Schnittdarstellung und 3D Volumen-Modellierung wurden mit der 3D Slicer software suite (v4.3) (<http://www.slicer.org>) durchgeführt (Fedorov et al., 2012).

3.17.7 Zwei-Photon Laser-Scanning Mikroskopie

Um die elektrische Kopplung der implantierten EHTs an das Meerschweinchenmyokard zu untersuchen, wurden in Kooperation mit Godfrey Smith (University of Glasgow) und Allen Kelly (Department of Circulation and Medical Imaging, NTNU) mittels Zwei-Photon Laser-Scanning Mikroskopie (2PLSM) Aktionspotentiale und Ca^{2+} -Signale am Langendorff-perfundierten Herz gemessen.

Dafür wurden die Herzen in tiefer Isofluran-Narkose entnommen und direkt an die Perfusion angeschlossen (Tyrode, 4 mM Ca^{2+} , 10 mmol/L 2,3-Butandionmonoxim). Die Farbstoffe Di-4-ANEPPS (2 mmol/L in DMSO) und Fura-2 AM (1 mmol/L in DMSO-Pluronic F-127; 25% w/v) wurden in das Perfusionssystem injiziert, um die Verteilung der Farbstoffe und eine langsame Beladung des Herzens zu erreichen. Die elektrische Stimulation des Herzens erfolgte ventrikulär mit 3-8 Hz, da Di-4-ANEPPS einen AV-Block verursachte. Die Messungen wurden mit einem Zeiss LSM 510 NLO Mikroskop, welches mit einem 40 x 0.8 NA ins Wasser tauchende Objektiv und einem justierbaren Ti: Sapphire Laser ausgestattet ist, durchgeführt (Abbildung 15).

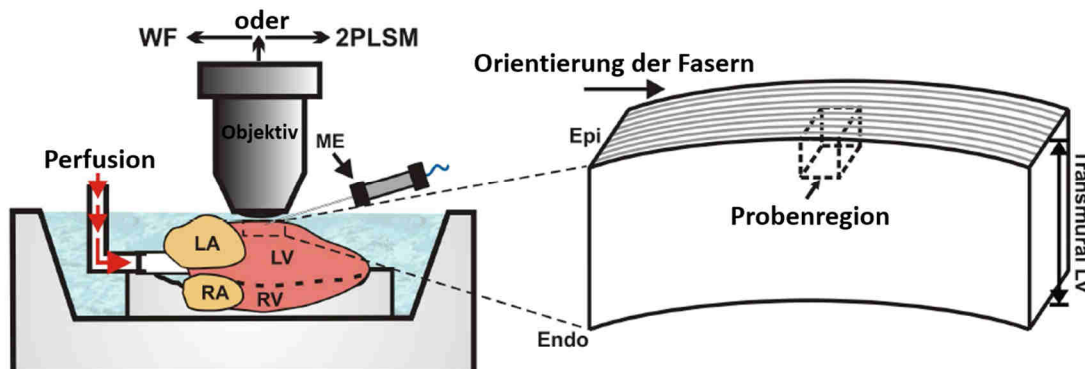


Abbildung 15: Experimenteller Aufbau. Links: Herz im Organbad. Die elektrische Stimulation erfolgte ventrikulär mit einer Mikroelektrode (ME). Rechts: Diagramm des transmuralen LV in Relation zum Volumen der Probenregion. 2PLSM: Zwei-Photon Laser-Scanning Mikroskopie, Endo: Endokard, Epi: Epikard, LA: linkes Atrium, LV: linker Ventrikel, RA: rechtes Atrium, RV: rechter Ventrikel, WF: Wellenfeld. Verändert nach: (Kelly et al., 2013).

Zur Messung von Aktionspotentialen (APs) wurde Di-4-ANEPPS bei 920 nm angeregt, die emittierte Fluoreszenz wurde durch einen 685 nm *shortpass* dichroitischen Spiegel geleitet und das Emissionslicht mit einem zweiten 580 nm dichroitischen Spiegel in Wellenlängen-Bandbreiten von 510-560 nm (PMT1) und 590-685 nm (PMT2) aufgespalten, um das PMT1/PMT2 Verhältnis ermitteln zu können. Es wurden über kurze Distanz

Hochgeschwindigkeits-Scans durchgeführt, um eine maximale zeitliche Auflösung zu gewährleisten. Die Messzeit betrug 0,382 ms (ca. 2,6 kHz Abtastungsfrequenz). Für sequentielle Spannungs- und Ca^{2+} -Messungen war eine hohe zeitliche Auflösung nicht erforderlich, sodass längere Linien-Scans (1,93 ms, ca. 0,52 kHz Abtastungsfrequenz) durchgeführt wurden, um das Fluoreszenzsignal zu maximieren und gleichzeitig das Ausbleichen zu minimieren.

Zur Messung von Ca^{2+} -Signalen wurde Fura-2 AM mit 340 nm (angeregtes Fura-2 empfindlich gegenüber Veränderungen in der Ca^{2+} Konzentration) und 380 nm (angeregtes Fura-2 nicht empfindlich gegenüber der Ca^{2+} Konzentration) angeregt, um die Ratio des Fluoreszenzsignals bilden zu können. Die Fluoreszenzemission wurde durch einen 685 nm *shortpass* dichroitischen Spiegel geleitet und bei 480-520 nm (descanned Detektoren) oder 505-545 nm (non-descanned Detektoren) detektiert.

Die Spannungsmessungen wurden von 100 μm unter der linksventrikulären epikardialen Oberfläche in 100 μm Schritten bis zu einer Tiefe von 500 μm unter der Gewebeoberfläche durchgeführt.

3.18 Histologie

3.18.1 Histologie von EHTs

Die EHTs wurden mit 4% Histofix® über Nacht bei 4 °C fixiert, danach in TBS gewaschen und von den Silikonhalterungen entfernt. Zur besseren Ausrichtung der EHTs im 24-Vertiefungen Format im Paraffinblock wurden sie in 4% Agarose eingebettet. Entwässerung, Einbetten in Paraffin, Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) und der immunologische Nachweis von GFP und des Kardiomyozytenmarkers Dystrophin wurden an der Hamburg Zentrum für Experimentelle Therapieforschung (HEXT) Mauspathologie Facility durchgeführt.

Die Optimierung der Retrieval- und Antikörperbedingungen, sowie die immunhistologische Färbung erfolgten mit der Ventana® BenchMark® XT (Roche), einem Vollautomaten für histologische Färbungen. Das Antigen-Retrieval erfolgte für 60 Minuten in EDTA-Puffer bei pH 8,0. Alle Antikörper wurden mit dem auf Multimer-Technologie basierten UltraView Universal DAB Detection Kit (Roche) visualisiert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Axioskop 2 Mikroskop (Zeiss) gemacht.

3.18.2 Histologie von Meerschweinchenherzen und Teratomen

Die Gewebe wurden in 4% Histofix® bei 4° C fixiert und dann in PBS gewaschen. Die Entwässerung erfolgte in einem Entwässerungsautomaten in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die Meerschweinchenherzen wurden in drei Teile geteilt, um den Infarktbereich vom basalen, mittleren und apikalen Teil ausgehend untersuchen zu können. Anschließend wurden die Proben in Paraffin eingebettet (EG 1120, Leica) und am Mikrotom (RM 2125 RT, Leica) 4 µm dünne Schnitte angefertigt. Die Anfertigung der histologischen Schnitte erfolgte durch Jutta Starbatty.

Zur Analyse des Gewebes wurden Hämatoxylin-Eosin-, Masson-Goldner-Trichrom-, und Sirius-Rot-Färbungen durchgeführt. Dafür wurden die Gewebeschnitte zunächst zweimal 15 Minuten in Xylolersatz entparaffiniert. Die Rehydrierung erfolgte in einer Ethanolreihe mit abnehmender Konzentration (100%, 100%, 96%, 80%, 50%) für jeweils 5 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte kurz mit Wasser gewaschen.

Die **Hämatoxylin-Eosin-Färbung** erfolgte durch eine dreiminütige Inkubation in Mayer's Hämalaun. Durch kurzes Abspülen mit 0,1% Salzsäurelösung wurde der pH-Wert erniedrigt und dann für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Färbung mit Eosin erfolgte mit einer 0,5% Lösung für 5 Minuten.

Für die **Kollagen-Färbung** wurden die Schnitte für 45 Minuten in Sirius-Rot-Lösung inkubiert, anschließend in 0,5% Ethansäure für 20 Sekunden differenziert und dann sofort in Wasser abgespült.

Bei der **Masson-Goldner-Trichrom Färbung** erfolgte zunächst eine zehnminütige Inkubation mit Eisenhämatoxylin nach Weigert, gefolgt von 10 Minuten fließendem Wässern. Anschließend wurden die vier verschiedenen dispersen Farbstoffe Säurefuchsin, Ponceau de Xylidin, Orange G und Anilinblau sukzessiv angewendet. Zunächst wurden die Schnitte 45 Minuten in Ponceaurot gefärbt, dann erfolgte die Behandlung mit Orange-G für 7 Minuten und abschließend wurde 15 Minuten mit Anilinblau gefärbt. Nach der Inkubation mit den einzelnen Farbstoffen wurden die Schnitte jeweils 5 Sekunden in 1% Ethansäure und 5 Sekunden in destilliertem Wasser gespült.

Im Anschluss an alle Färbungen wurden die Schnitte nach Abspülen mit Wasser in einer Ethanolreihe mit ansteigender Konzentration (96%, 96%, 100%, 100%) jeweils 5 Minuten dehydriert und danach zweimal 5 Minuten in Xylolersatz getaucht. Die gefärbten Schnitte wurden mit Mowiol eingedeckelt.

Der immunologische Nachweis von GFP, Dystrophin, MLC-2V, Ki-67, humanem CD45, CD45 Meerschweinchen-spezifisch, KL1 und Neurofilament wurden an der Hamburg Zentrum für Experimentelle Therapieforschung (HEXT) Mauspathologie Facility durchgeführt. Die Optimierung der Retrieval- und Antikörperbedingungen, sowie immunhistologische Färbung erfolgte mit der Ventana® BenchMark® XT (Roche), einem Vollautomaten für histologische Färbungen.

Das Antigen-Retrieval erfolgte für den Dystrophin-Antikörper für 60 Minuten in EDTA-Puffer bei pH 8,0, für alle anderen Antikörper für 30 Minuten in Citrat-Puffer bei pH 6,0. Alle Antikörper wurden mit dem auf Multimer-Technologie basierten UltraView Universal DAB Detection Kit (Roche) visualisiert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Axioskop 2 Mikroskop (Zeiss) gemacht.

4 Ergebnisse

4.1 Zellkultur humaner induzierter pluripotenter Zellen (hiPSCs)

Die hiPSCs wurden in MEF-konditioniertem Medium (CM) kultiviert, in welchem sie nach Einfrier-/Auftauzyklen und nach der Passage gut anwuchsen und stark proliferierten. Allerdings wurden immer wieder Bereiche am Rand der einzelnen Kolonien beobachtet, in denen die Zellen spontan differenzierten (Abbildung 16). Dies war an aus den Kolonien mit definierten Begrenzungen diffus heraus proliferierenden Zellen zu erkennen.

Für eine erfolgreiche Differenzierung müssen die hiPSCs vollständig undifferenziert sein. bFGF ist ein wichtiger Bestandteil des Zellkulturmediums zur Expansion der undifferenzierten hiPSCs. Andererseits ist bFGF instabil und wird innerhalb von 24 Stunden zu einem großen Teil abgebaut (Levenstein et al., 2006). Vor diesem Hintergrund wurde das ursprüngliche CM Protokoll modifiziert und dazu übergegangen, dem CM täglich direkt vor dem Mediumwechsel 30 ng/ml bFGF zuzusetzen. Dieser Schritt führte reproduzierbar zu einer deutlich höheren Differenzierungseffizienz.

Die Kulturbedingungen müssen nicht nur bezüglich der bFGF Konzentration hoch standardisiert sein. Da dies allein durch die mehrtägige Konditionierung des Mediums auf den murinen embryonalen Fibroblasten nicht gewährleistet ist, wurde versucht, die Kultur auf ein definiertes Medium umzustellen. Mit mTeSR-E8, welches ein definiertes proteinfreies Medium ist, war die Proliferationsrate der hiPSCs allerdings deutlich niedriger als in CM, und besonders nach Einfrier-/Auftauzyklen wuchsen die Kolonien nur sehr langsam. Als zweite Alternative zu CM wurde FTDA, ein DMEM/F12-basiertes, definiertes Medium mit humanem Serumalbumin (Frank et al., 2012) getestet. Die Umstellung auf dieses Medium verlief unproblematisch. Die hiPSCs wuchsen nach Einfrier-/Auftauzyklen und nach der Passage gut an und proliferierten gut. Ein erster Differenzierungslauf mit in FTDA kultivierten hiPSCs war erfolgreich (siehe 4.4), sodass die Kultur zukünftig auf dieses Medium umgestellt werden wird.

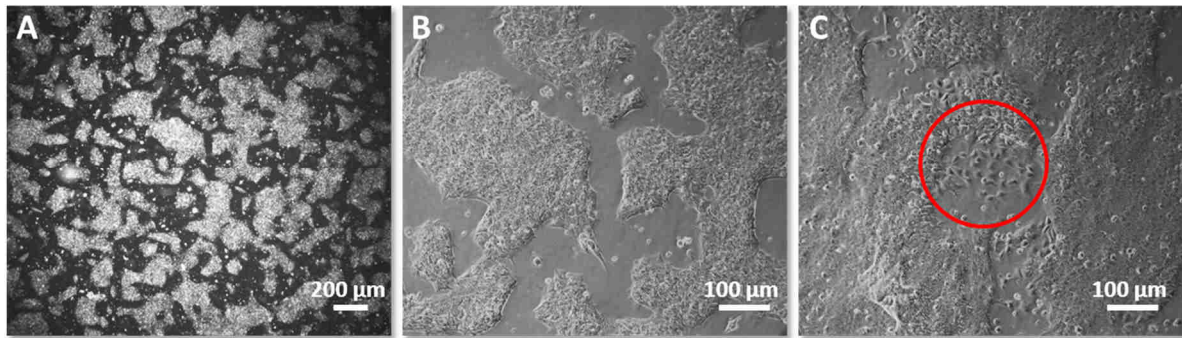


Abbildung 16: Kolonien humaner hiPSCs mit teilweise spontan differenzierenden Arealen. Im Gegensatz zu den in Kolonien mit definierten Begrenzungen wachsenden hiPSCs (B), proliferieren spontan differenzierende Zellen diffus am Rand der Kolonien (C).

4.2 Bildung von Embryoidkörperchen durch *forced aggregation*

Durch spontane Kollagenase-basierte Herstellung von Embryoidkörperchen (EBs) bildeten sich EBs sehr unterschiedlicher Qualität und Größe, oder sie war für einige hiPSC Linien grundsätzlich erfolglos. Daher wurde ein Protokoll zur Bildung von Embryoidkörperchen durch *forced aggregation* ausgearbeitet.

Diese Technik beruht auf der Dissoziation von hiPSC Kolonien in einzelne Zellen und die Sedimentation der Zellsuspension in Oberflächen mit Mikrokavitäten. Das hier beschriebene adaptierte Verfahren beruht auf der Verwendung selbst hergestellter, wieder verwendbarer Tetraederoberflächen aus Silikon mit 80 Mikro-Kavitäten/cm².

Die Tetraederoberflächen wurden zunächst mit Fibrin in den Vertiefungen der Kulturschalen festgeklebt, um deren Aufschwimmen zu verhindern. Um ein Anwachsen der Zellen an die Silikonoberflächen zu verhindern, wurden diese mit 5% Pluronic® F-127 beschichtet. Anschließend wurden sie gründlich mit PBS gewaschen und 3 ml EB-Formationsmedium vorgelegt. Da eine vollständige Benetzung der Oberflächen durch entstehende Luftblasen nicht gewährleistet ist, wurden die mit den Silikonoberflächen bestückten Kulturplatten des 6-Vertiefungen Formates nach Zugabe einer Flüssigkeit immer für 2 Minuten bei 1500 g zentrifugiert, um diese zu entfernen.

Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen zur Dissoziation für 10 Minuten bei 37 °C mit 0,5 mM EDTA Lösung inkubiert. Die Zellen wurden in PBS in ein Zentrifugenröhrchen überführt und trituriert. Nach Bestimmen der Zellzahl wurden die Zellen für 5 Minuten bei

Ergebnisse - Bildung von Embryoidkörperchen durch forced aggregation

200 g zentrifugiert und in EB-Formationsmedium aufgenommen. Es wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen in 1 ml Medium pro Silikonoberfläche ausgesät, sodass ein EB theoretisch aus 2500 Zellen entsteht. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 5% CO₂, 5% O₂ und 90% rH.

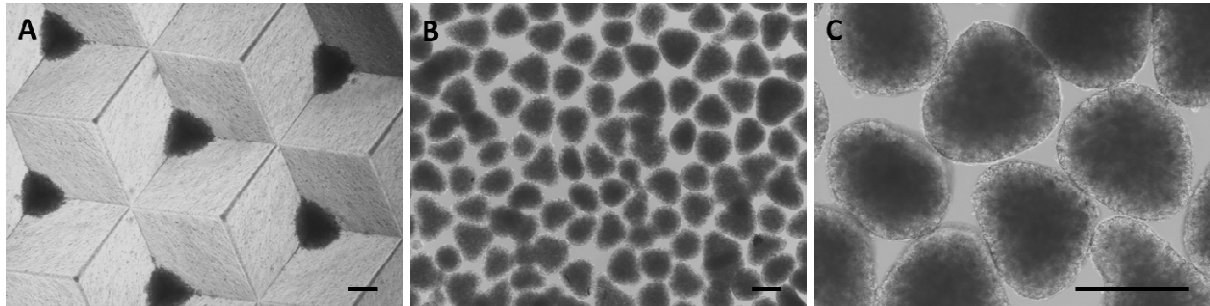


Abbildung 17: Erfolgreiche EB Formation durch *forced aggregation* nach 24 Stunden. (A) EBs in den pyramidalen Vertiefungen der Mikrokavitäten-Silikonoberfläche. (B) und (C) EBs nach Sammeln aus den Silikonoberflächen. Deutlich zu erkennen sind die klaren Begrenzungen jedes Aggregates. Maßstab 200 µm.

Um die entstandenen EBs am nächsten Tag aus den Vertiefungen zu entfernen, wurden die Silikonoberflächen gründlich mit einer Pipette gespült.

Die Bildung von Embryoidkörperchen durch *forced aggregation* erwies sich als eine zuverlässige Methode, die zur Entstehung von einheitlich großen EBs führte. Durch die mehrschrittige Vorbereitung der Tetraederoberflächen und das aufwendige Sammeln der EBs aus den Mikrokavitäten ist eine Hochskalierung dieses Verfahrens jedoch mit erheblichem Arbeits- und Materialaufwand verbunden.

4.3 Bildung von Embryoidkörperchen in Spinnerflaschen

Die Suspensionskultur in Spinnerflaschen mit Glaskolben-Bulbus basiert auf der Dissoziation in einzelne Zellen und Kultivierung unter ständigem Rühren und wurde bereits für die Expansion von hiPSCs beschrieben (Zweigerdt et al., 2011; Olmer et al., 2012).

Vor der Dissoziation der hiPSCs wurden diese zunächst für 1 Stunde mit 10 μM Y-27632 behandelt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 10 Minuten mit 0,5 mM EDTA bei 37 °C inkubiert. Dann wurde das EDTA vorsichtig abgesaugt, die Zellen wurden in PBS durch Klopfen der Kulturflaschen von der Oberfläche gelöst und nach viermaligem Triturieren in ein Reaktionsgefäß mit 10 ml SF-EB Medium überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 250 g wurden die Zellen in SF-EB Medium resuspendiert, gezählt und $3 \cdot 10^7$ Zellen in 100 ml SF-EB Medium in die Spinnerflasche (INTEGRA Biosciences AG) gegeben. Die Kultivierung erfolgte über Nacht auf einem Rührer bei 40 rpm, 37 °C, 5% CO₂, 5% O₂ und 90% rH.

Bereits nach einigen Stunden in den Spinnerflaschen entstanden EBs von relativ konstanter Form und Größe (Abbildung 18).

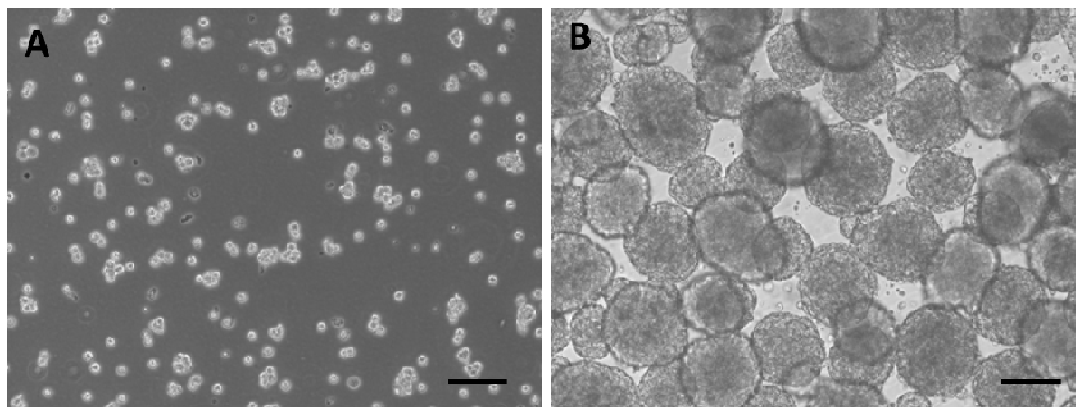


Abbildung 18: EB Formation in Spinnerflaschen. A) hiPSC Suspension nach Dissoziation mit EDTA. B) EBs nach 24 Stunden in Spinnerflasche bei 40 rpm. Deutlich zu erkennen sind die klaren Begrenzungen jedes Aggregates. Maßstab 200 μm .

4.4 Differenzierung von hiPSCs zu Kardiomyozyten

Die Fähigkeit humane pluripotente Stammzellen zielgerichtet zu differenzieren, hat in den letzten 10 Jahren große Fortschritte gemacht. Die reproduzierbarsten und effizientesten Methoden beinhalten die Phasen-spezifische Aktivierung und Inhibierung verschiedener Signaltransduktionswege unter definierten Kulturbedingungen, um die Schlüsselschritte der kardialen Entwicklung des frühen Embryos zu rekapitulieren. Basierend auf den Arbeiten von Yang und Kollegen (Yang et al., 2008) wurden am Institut bereits erfolgreich humane embryonale Stammzellen zu Kardiomyozyten differenziert (Schaaf et al., 2011). Allerdings war die Differenzierung von hiPSCs bisher nicht erfolgreich, weshalb zahlreiche Versuche zur Optimierung durchgeführt wurden (Abbildung 19).

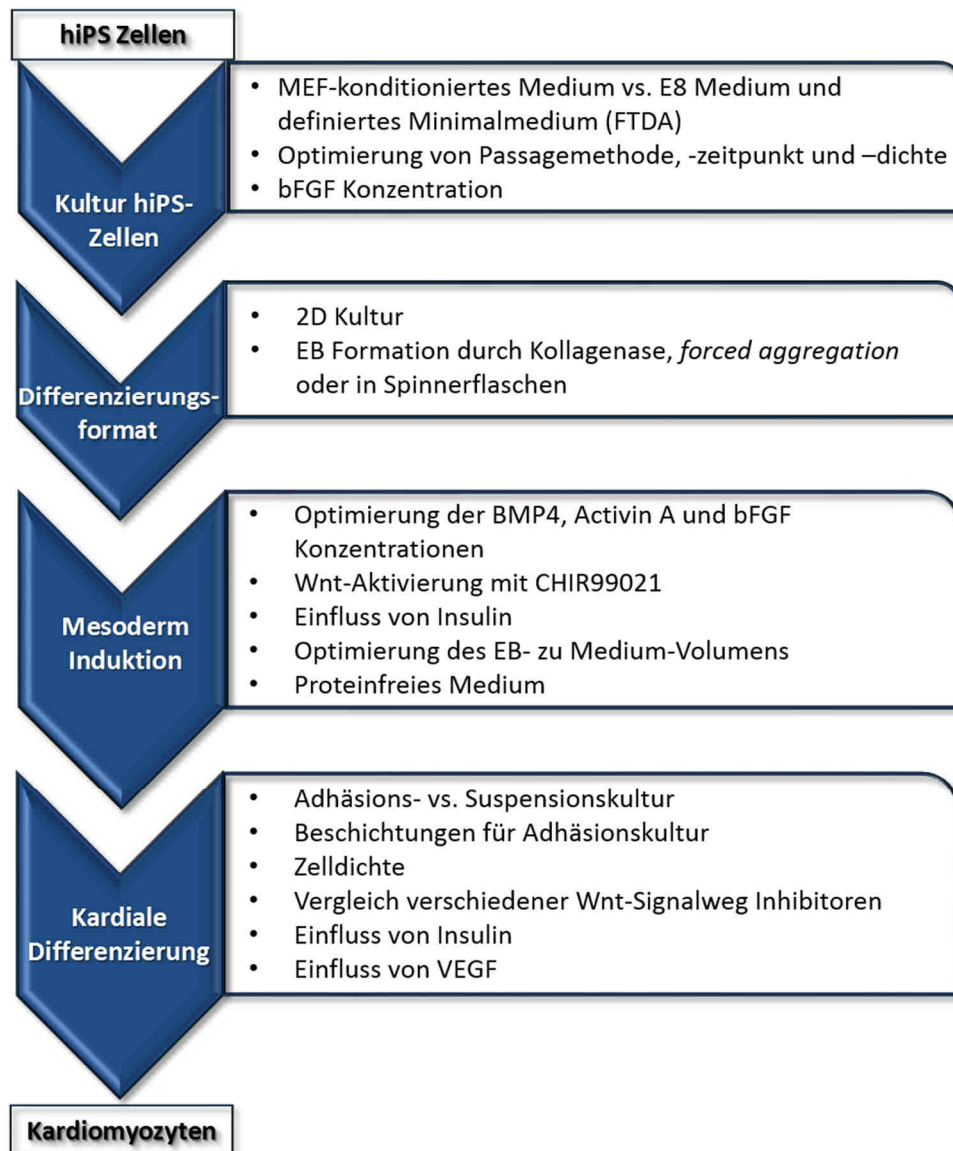


Abbildung 19: Übersicht über die Parameter, die zur Optimierung der Differenzierung untersucht wurden.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der wichtigsten Experimente nach Differenzierungsphasen gegliedert aufgeführt. Dies dient der Übersichtlichkeit und stimmt nicht mit der zeitlichen Durchführung der Versuche überein.

Die Differenzierung kann grundsätzlich in zwei verschiedenen Kulturformaten durchgeführt werden: in 2D-Kultur oder nach EB Formation. Letztere wurde Kollagenase-basiert, durch *forced aggregation* oder in Spinnerflaschen durchgeführt. Reproduzierbarkeit, EB Qualität, Arbeitsaufwand und Skalierbarkeit wurden miteinander verglichen.

Kollagenase-basierte EB Formation führte zu EBs unterschiedlicher Form und Größe, variierte in der Ausbeute und war für einige Zelllinien grundsätzlich erfolglos (Abbildung 11).

EB Formation durch *forced aggregation* (siehe 4.2) ermöglichte es, von allen getesteten Zelllinien EBs gleichmäßiger Form und Größe herzustellen (Abbildung 17). Diese Methode ist jedoch sehr zeit- und arbeitsaufwendig und daher für größere Differenzierungsansätze weniger geeignet.

Die EB Formation in Spinnerflaschen (siehe 4.3) führte schon beim ersten Versuch zu EBs relativ gleichmäßiger Form und Größe (Abbildung 18), ist sehr reproduzierbar, und einfach in der Durchführung und Skalierbarkeit. Wegen dieser Vorteile wurde die Differenzierung auf Grundlage dieser EB Formationsmethode durchgeführt.

4.4.1 Induktion mesodermaler Progenitoren

Im ersten Schritt der Differenzierung werden aus hiPSCs mesodermale Progenitorzellen induziert. Hierfür wird der Wnt-Signalweg mit den Wachstumsfaktoren BMP4, Aktivin A und bFGF aktiviert. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen Wachstumsfaktoren kombinatorisch getestet und die daraus resultierende Differenzierungseffizienz mikroskopisch und teilweise zusätzlich per FACS-Analyse beurteilt (Tabelle 4).

Mit den Konzentrationen von 10 ng/ml BMP4, 3 ng/ml Aktivin A und 5 ng/ml bFGF wurden die höchsten Differenzierungseffizienzen erreicht. bFGF ist essentiell für die Induktion

mesodermaler Progenitoren und somit auch für die kardiale Differenzierung. Ohne diesen Wachstumsfaktor entstanden keine Kardiomyozyten und es wurde ausgeprägte Apoptose beobachtet. Insgesamt war die Differenzierungseffizienz zum Zeitpunkt dieser Experimente noch sehr variabel, was den Optimierungsbedarf an anderen Stellen des Protokolls verdeutlicht.

Konzentration BMP4/ Aktivin A/ bFGF [ng/ml]	α -Aktinin ⁺ -Zellen [%]
10/0/5	1,7±0,8
10/3/5	32,4±4,1
10/6/5	24,0±5,2
10/20/5	8,3±8,0
20/0/5	0,4±0,4
20/20/5	21,2±7,2
10/0/0	0*
10/3/0	0*
10/6/0	0*
10/20/0	0*
20/0/0	0*
20/20/0	0*

Tabelle 4: Differenzierungseffizienzen als Resultat unterschiedlicher kombinatorischer Wachstumsfaktor-Konzentrationen. Angegeben sind der Anteil der α -Aktinin-exprimierenden Zellen±SD (n=3). *= diese Bedingungen wurden nur mikroskopisch beurteilt. Für diese Experimente wurde die Zelllinie C25 verwendet.

Alternativ zu den Protein-Wachstumsfaktoren kann Mesoderm auch mit dem kleinmolekularen Wnt-Signalweg Aktivator CHIR99021 induziert werden. FACS-Analysen an Tag 14 der Differenzierung bestätigten die Kompatibilität dieses Moleküls mit unserem Differenzierungsprotokoll (Tabelle 5 und Abbildung 20).

Zelllinie	Bedingung	α -Aktinin ⁺ -Zellen [%]
C25	BMP4/ Aktivin A/ bFGF	88
C25	CHIR 99021	90
PAS5-641	BMP4/ Aktivin A/ bFGF	87
PAS5-641	CHIR 99021	86

Tabelle 5: Differenzierungseffizienzen nach Induktion mesodermaler Progenitoren mit BMP4, Aktivin A and bFGF bzw. CHIR 99021 und dem *small-molecule* Wnt-Inhibitor DS-I-7 zur kardialen Differenzierung (n=1).

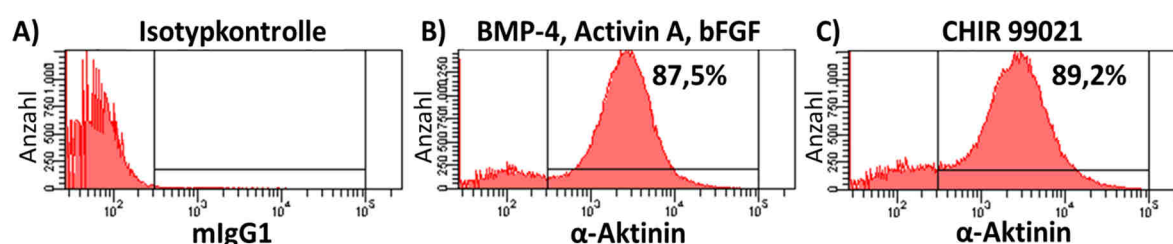


Abbildung 20: Differenzierungseffizienz. FACS-Analyse der differenzierten hiPS-Kardiomyozyten. A) Isotyp Kontrolle. B) Kardiomyozyten die mit BMP4, Aktivin A and bFGF zur Mesoderm Induktion und dem *small-molecule* Wnt-Inhibitor DS-I-7 zur kardialen Differenzierung generiert wurden. C) Kardiomyozyten, die mit CHIR 99021 zur Mesoderm Induktion und dem *small-molecule* Wnt-Inhibitor DS-I-7 zur kardialen Differenzierung generiert wurden.

Die im Vergleich zu den in Tabelle 4 aufgeführten Werten deutliche höheren Differenzierungseffizienzen sind auch auf die Erkenntnis zurück zu führen, dass Insulin während der Induktion mesodermaler Progenitoren negative, und während der nachfolgenden kardialen Differenzierung positive Auswirkungen auf die Differenzierungseffizienz hat. Die Induktion mesodermaler Progenitoren in Abwesenheit von Insulin führte zelllinienunabhängig zu einer deutlichen besseren und reproduzierbareren Kardiomyozytendifferenzierung.

4.4.2 Kardiale Differenzierung

Mit der erfolgreichen Induktion von kardialen Mesoderm waren die Voraussetzungen für eine effiziente Kardiomyozytendifferenzierung gegeben. Doch auch die Bedingungen für diesen zweiten Schritt des Differenzierungsprotokolls wurden optimiert.

Für die kardiale Spezifizierung der mesodermalen Zellen wurden Suspensions- und Adhäsionskulturen getestet. Das erstgenannte Format führte nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen, weshalb die EBs nach der Induktion mesodermaler Progenitoren ausplattiert wurden. Hierfür wurden Gelatine, Kollagen I, Matrigel™, Laminin und Geltrex® in unterschiedlichen Konzentrationen als Beschichtungen der Wachstumsoberfläche ausprobiert. Letzteres erwies sich in der Verdünnung von 1:200 als geeignet, um die Anheftung der EBs zu gewährleisten und die Differenzierung nicht negativ zu beeinflussen.

In der Vorstellung, dass eventuell parakrine Faktoren wichtig für eine gute Differenzierungseffizienz seien, wurden die EBs lange Zeit in einer lockeren Linienformation ausplattiert. Mit der Zeit wurde jedoch beobachtet, dass dies die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zellen im inneren Bereich der EB Ansammlungen beeinträchtigte. Daher wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der EBs auf der Wachstumsoberfläche umgestellt.

Entscheidend für die kardiale Differenzierung aus mesodermalen Zellen ist die Inhibierung des Wnt-Signalweges. Es wurden daher die Wnt-Signalweg Inhibitoren IWR-1 (4 µg/ml), IWP-4 (4 µg/ml), DS-I-6 (100-1000 nM) und DS-I-7 (100-1000 nM) getestet. Die beiden IWR-1 Analoga DS-I-6 und DS-I-7 lieferten bei einer Konzentration von 100 nM vergleichbare Ergebnisse wie das Stammolekül IWR-1 und haben deutlich niedrigere IC50 Werte (Willems et al., 2011). Außerdem standen diese vom Kooperationspartner Dr. Dennis Schade (Technische Universität Dortmund) kostenfrei zur Verfügung. Daher wurden alle folgenden Differenzierungen mit DS-I-7 durchgeführt.

Im Gegensatz zu den Wnt-Signalweg Inhibitoren hatte VEGF keinen Einfluss auf die Differenzierungseffizienz. Dieser Wachstumsfaktor wurde daher dem Medium nicht mehr zugesetzt.

Des Weiteren wurde untersucht, welchen Einfluss Insulin in dieser Phase der Differenzierung auf die Zellen hat. Im Gegensatz zur Induktion mesodermaler Progenitoren konnten keine negativen Auswirkungen beobachtet werden, und das Peptidhormon wurde dem Medium ab dem siebten Differenzierungstag zugesetzt.

Trotz der Vielzahl an Optimierungsversuchen war der Erfolg der Differenzierung immer noch sehr variabel und nicht vorhersehbar. Zwei Komponenten im Differenzierungsprotokoll waren noch undefiniert und standen somit im Verdacht, für die Variabilität in der Effizienz verantwortlich zu sein.

Zum einen wurde dem Basalmedium RPMI 1640 das B-27 Supplement zugesetzt, dessen Zusammensetzung zwar grundsätzlich bekannt ist, welches aber Proteine enthält und somit Qualitätsschwankungen unterliegt. Für die Induktion mesodermaler Progenitoren und die ersten drei Tage der kardialen Differenzierung wurde daher auf ein vollständig definiertes, proteinfreies Medium (FDM) umgestellt, was unproblematisch war und keine negativen Auswirkungen auf die Differenzierungseffizienz hatte.

Zum anderen wurden die undifferenzierten hiPSCs in MEF-konditioniertem Medium kultiviert, welches als biologisches Produkt ebenfalls undefiniert ist und durch die Konditionierung über mehrere Tage qualitative Schwankungen aufweist. Es wird daher daran gearbeitet, auch die hiPSC-Kultur und die EB Formation auf ein vollständig definiertes Medium umzustellen (FTDA, siehe 4.1). Es wurde bereits eine Differenzierung mit in FTDA kultivierten hiPSCs und gebildeten EBs durchgeführt. Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigen, dass die Umstellung auf FTDA unproblematisch war und sich nicht negativ auf die Differenzierungseffizienz auswirkte (Tabelle 6). Weitere Differenzierungsläufe unter diesen Bedingungen müssen diese Ergebnisse noch bestätigen und zeigen, ob die in der CM-Kultur beobachteten Effizienzschwankungen mit diesem Medium nicht mehr auftreten.

Zelllinie	hiPSC Kulturmedium	α -Aktinin ⁺ -Zellen [%]
C25	CM	94
C25	FTDA	96
PAS7-770	CM	86
PAS7-770	FTDA	90
CMS 14	CM	95
CMS 14	FTDA	94
DM04	CM	92
DM04	FTDA	98

Tabelle 6: Differenzierungseffizienzen nach Kultivierung der hiPSCs in CM oder FTDA. Die Induktion mesodermaler Progenitoren erfolgte jeweils mit BMP4, Activin A and bFGF und und dem *small-molecule* Wnt-Inhibitor DS-I-7 zur kardialen Differenzierung (n=1).

Aufgrund der Ergebnisse der Optimierungsversuche erfolgte die Differenzierung nach folgendem Protokoll, welches die Abfolge der Induktion mesodermaler Progenitoren und kardialen Spezifizierung beim Säugetier rekapituliert (siehe Abbildung 22 und Abbildung 21).

Ergebnisse - Differenzierung von hiPSCs zu Kardiomyozyten

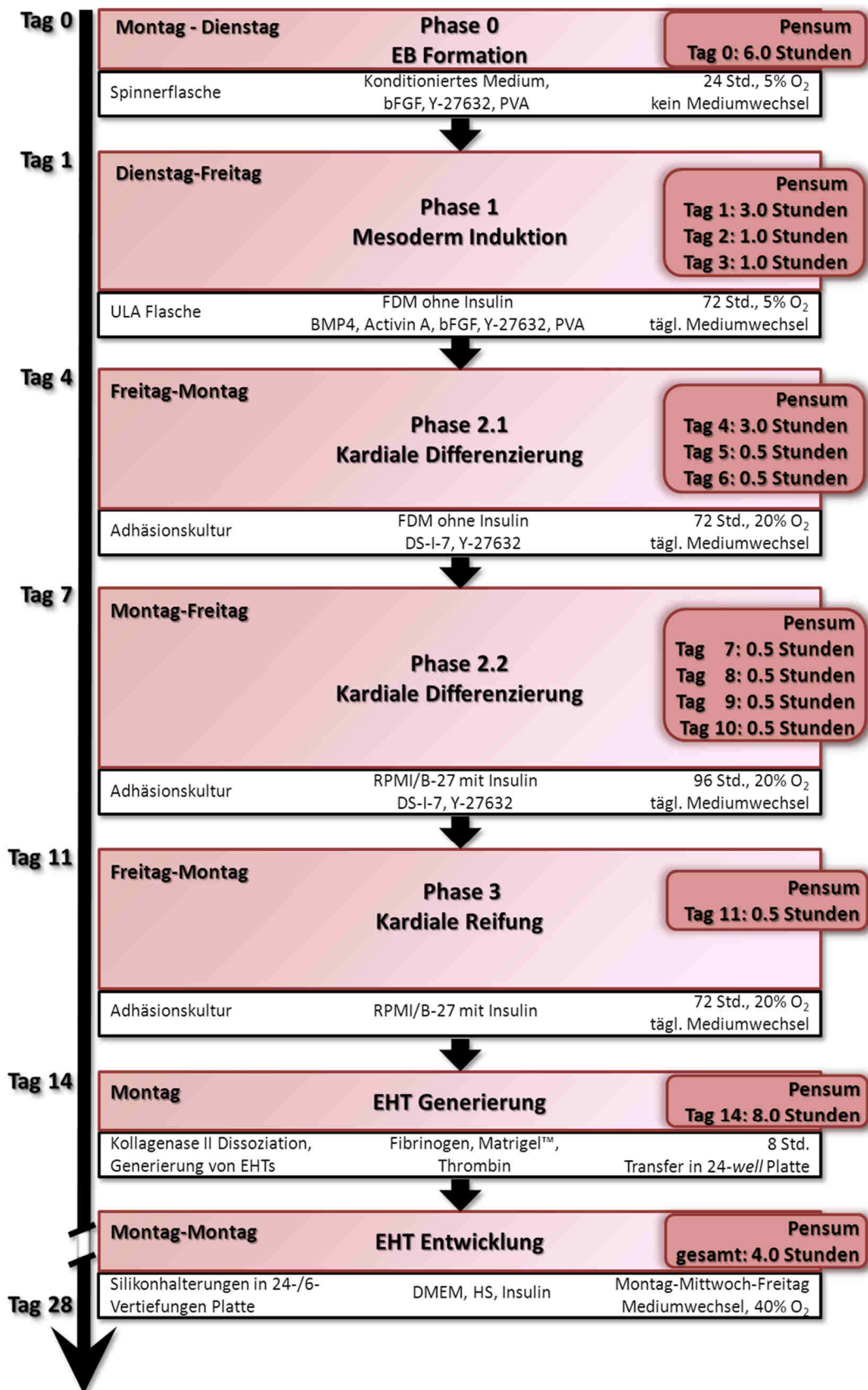


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Protokolls zur Differenzierung von Kardiomyozyten aus in konditioniertem Medium kultivierten hiPSCs mit BMP4, Activin A and bFGF zur Induktion mesodermaler Progenitoren und dem *small-molecule* Wnt-Inhibitor DS-I-7 zur kardialen Differenzierung. Das Pensum bezieht sich auf die parallele Bearbeitung von 5 Zelllinien.

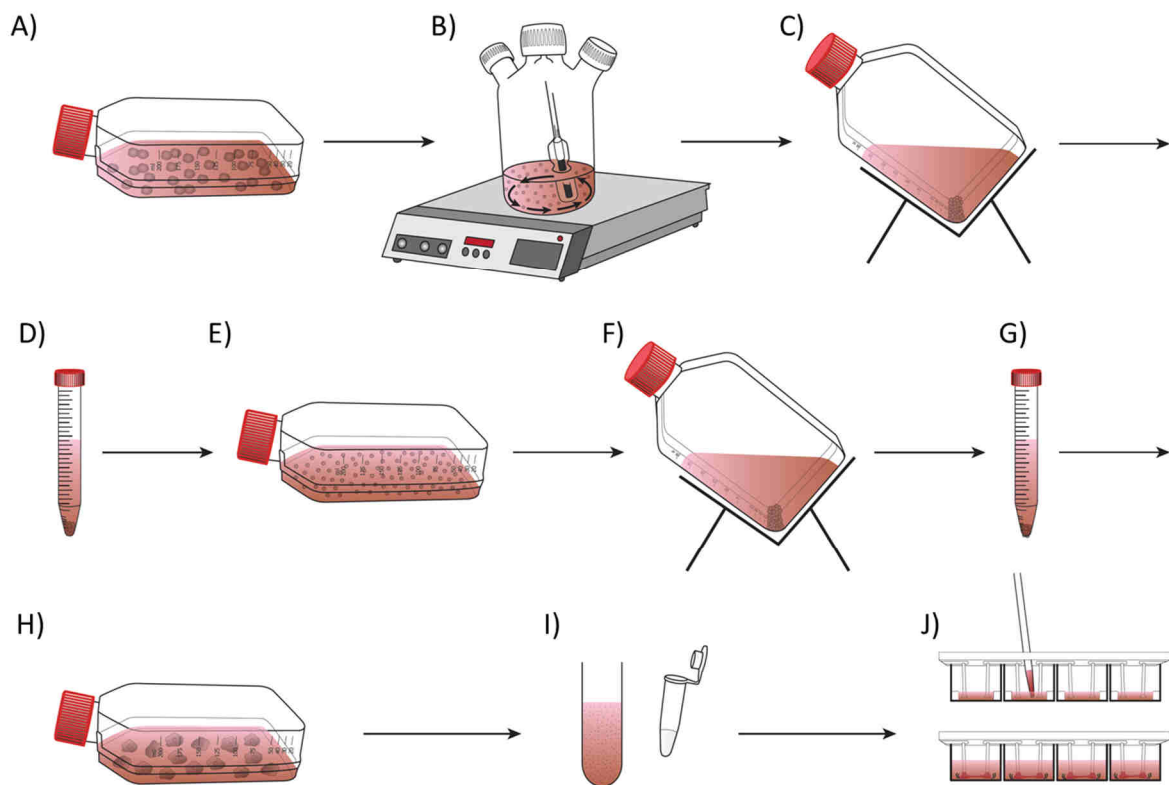


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Differenzierung von humanen iPSCs zu Kardiomyozyten und der Herstellung von EHTs.

A) Kolonien undifferenzierter humaner iPSCs werden in T80 Zellkulturflaschen expandiert.

B) EB Formation in Spinnerflaschen.

C) Die EBs werden in einem V-förmigen Sedimentierungsständer sedimentiert.

D) Das EB Volumen wird in 15 ml Reaktionsgefäßen ermittelt.

E) Die EBs werden in mit Pluronic® F-127 beschichtete Suspensionsflaschen transferiert, und mesodermale Progenitoren werden induziert.

F) Die EBs werden in einem V-förmigen Sedimentierungsständer sedimentiert.

G) Das EB Volumen wird in 15 ml Reaktionsgefäßen ermittelt.

H) Die EBs werden gleichmäßig verteilt ausplattiert und Kardiomyozyten werden differenziert.

I) Die Kardiomyozyten werden dissoziiert, und der EHT Mastermix plus Thrombin Aliquot wird vorbereitet. **J)**

EHTs werden gegossen und unter Zellkulturbedingungen kultiviert.

Vor der Differenzierung wurden die hiPSCs expandiert (siehe 3.5) und im ersten Differenzierungsschritt aus undifferenzierten hiPSCs mit einer Konfluenz von etwa 95% EBs gebildet (siehe 4.3). Die Herstellung der EBs erfolgte innerhalb von 24 Stunden in Spinnerflaschen, die EBs wurden gesammelt, gewaschen und das EB Volumen in 15 ml Röhrchen bestimmt. Aus 30×10^6 undifferenzierten hiPSCs entstand durchschnittlich ein EB Gesamtvolumen von 100 μ l mit einem individuellen EB-Durchmesser von 150 – 400 μ m.

Zur Induktion der mesodermalen Progenitoren (Tag 1–3) wurden die EBs in der ersten Differenzierungsphase in Phase I FDM-Differenzierungsmedium, welches 5 ng/ml FGF2, 10 ng/ml BMP4 und 3 ng/ml Activin A enthält, für 3 Tage in Suspension in mit Pluronic®-F127 beschichteten T175 Zellkulturflaschen bei 37 °C, 90% rH, 5% CO₂ und 5% O₂ kultiviert. Dabei wurde ein EB Volumen von 100 μ l in 35 ml Medium kultiviert, und um einer Versauerung des Mediums vorzubeugen und eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren zu gewährleisten, wurde täglich das Medium gewechselt.

Für die kardiale Spezifizierung und Differenzierung (Tag 4–10) wurde der Wnt/ β -Catenin-Inhibitor DS-I-7 (Willems et al., 2011; Lanier et al., 2012) in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt. Zur Überführung der EBs in diese Differenzierungsphase wurden diese in die untere Ecke der Kulturflasche sedimentiert. Das Medium wurde abgesaugt, die EBs in einem 15 ml Röhrchen gesammelt, vereint und das EB-Volumen bestimmt. Es wurden 100 μ l EBs in Phase 2 FDM-Medium ohne Insulin in mit Geltrex® beschichteten T75 Zellkulturflaschen überführt und gleichmäßig verteilt ausplattiert. Diese Konfiguration ermöglicht eine ausreichende Nähr- und Sauerstoffversorgung der einzelnen Zellen im EB und hemmt nicht deren Proliferation. Die Kultivierung erfolgte für 3 Tage bei 37 °C, 90% rH, 5% CO₂ und 20% O₂ mit täglichem Mediumwechsel. Danach wurde das Phase 2 FDM-Differenzierungsmedium durch Phase 2 B27-Differenzierungsmedium (mit Insulin) ersetzt und weitere 4 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Insulin-haltigem Basalmedium für 3 Tage bei 37 °C, 90% rH, 5% CO₂ und 20% O₂ kultiviert, bevor die Kardiomyozyten reif genug für weitere Analysen und die EHT-Generierung waren.

In Tabelle 7 sind noch einmal detailliert die Zellzahlen, EB- und Medienvolumina zusammengefasst.

	Format	Anzahl	Zellzahl/ Format	Mediumvolumen/ Format	Zeitlicher Ablauf
Undifferenzierte hiPSCs	T80 Flasche	2	15×10^6	20 ml CM	3 Tage, tägl. Mediumwechsel
EB Formation	Spinner Flasche	1	30×10^6 , Suspension	100 ml SF-EB Medium	1 Tag
Mesoderm Induktion	T175 Flasche	1	100 µl EBs, Suspension	35 ml Phase 1-FDM	3 Tage, tägl. Mediumwechsel
Kardiale Differenzierung	T75 Flasche	1	100 µl EBs	25 ml Phase 2-FDM bzw. Phase 2-B27	7 Tage, tägl. Mediumwechsel
Kardiale Reifung	T75 Flasche	1	100 µl EBs	25 ml basales B27- Differenzierungs- medium	3 Tage tägl. Mediumwechsel

Tabelle 7: Zellzahlen, EB Volumina, Zellkultur-Format, Medienvolumina und zeitlicher Ablauf der einzelnen hiPS-Differenzierungsphasen zu Kardiomyozyten.

In Abbildung 23 wurden die für die einzelnen Stadien der Differenzierung typischen Zellmorphologien abgelichtet.

Die Kultivierung der hiPSCs in distinkten Kolonien, ohne differenzierte Areale, war Voraussetzung für eine erfolgreiche Differenzierung. Ein paar Stunden nach Aussähen der hiPSCs in die Spinner Flaschen konnte der Beginn der EB Formation beobachtet werden. Nach 24 Stunden erreichten die EBs eine Größe von 150 – 400 µm und zeigten eine definierte, gleichmäßige Form.

Während der Induktion mesodermaler Progenitoren erreichten die EBs eine Größe von 250 – 650 µm.

Während der kardialen Differenzierung konnten erste spontane Kontraktionen zwischen Tag 7 und 10 beobachtet werden, abhängig von Zelllinie und Qualität der eingesetzten hiPSC-Kultur. Die schlagenden Areale breiteten sich vom Rand der adhärenenten EBs immer weiter aus, bis die gesamte EB Struktur kontrahierte. Aus 15×10^6 hiPSCs entstanden $15-20 \times 10^6$ Kardiomyozyten mit einer Reinheit von bis zu 90% (siehe 4.4.5).

Ergebnisse - Differenzierung von hiPSCs zu Kardiomyozyten

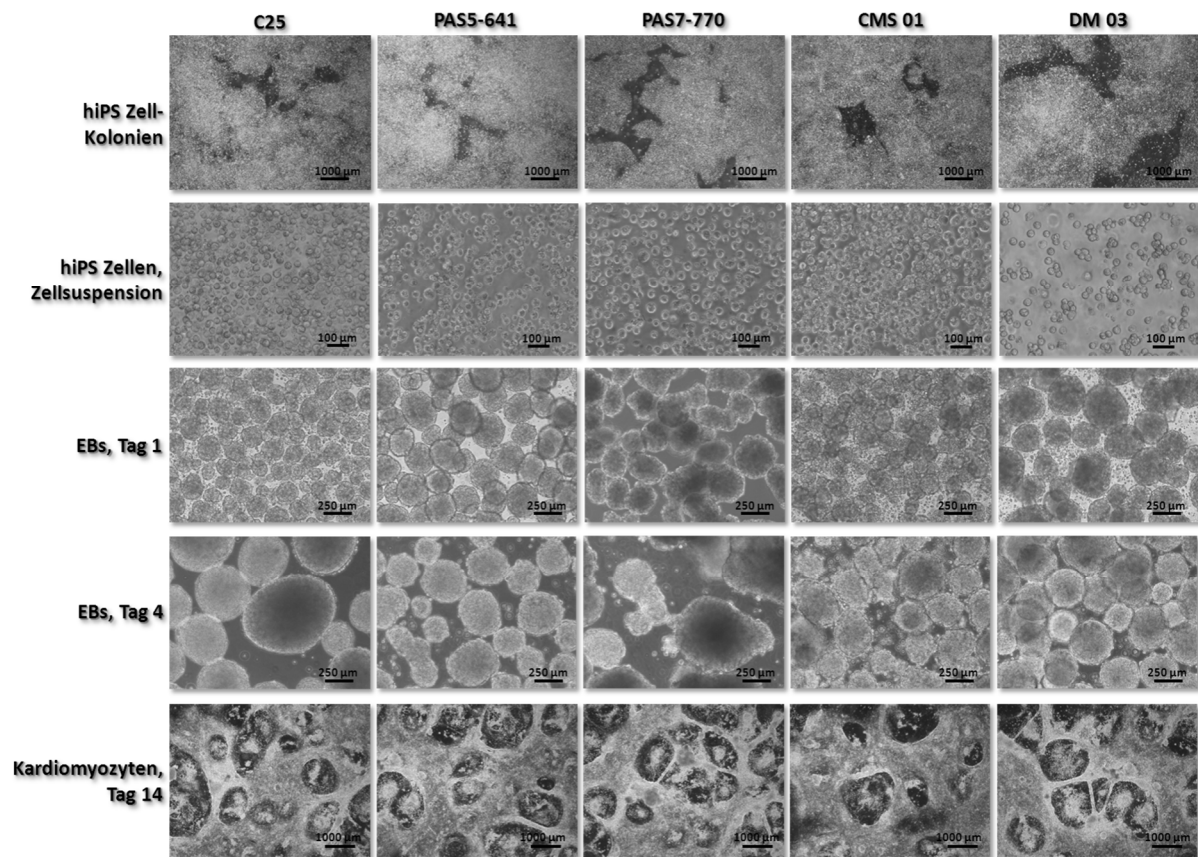


Abbildung 23: Durchlicht Aufnahmen der typischen Morphologie von fünf verschiedenen Zelllinien zu unterschiedlichen Zeitpunkten der kardialen Differenzierung.

4.4.3 Anreicherung von Kardiomyozyten

Während des Optimierungsprozesses des Differenzierungsprotokolls wurden Kardiomyozyten zeitweise mit Laktat-haltigem Medium angereichert, um für die EHT-Generierung geeignete Zellpopulationen zu erhalten. Das unter 4.4 beschriebene Protokoll zur Differenzierung von Kardiomyozyten macht diesen Schritt durch die hohe Differenzierungseffizienz überflüssig.

Aus hiPSCs differenzierte Kardiomyozyten sind laut veröffentlichter Daten an Tag 18 reif genug, um Laktat effizient verstoffwechseln zu können (Tohyama et al., 2013). Die Selektion wurde in Glukose-freiem DMEM, welches 4 mM Laktat enthält, initiiert. Um sekundären zytotoxischen Effekten durch Debris von nicht-Kardiomyozyten vorzubeugen und eine Anreicherung des Mediums mit Glukose und Aminosäuren durch abgestorbene Zellen zu verhindern, war täglicher Mediumwechsel notwendig. Innerhalb von 6-9 Tagen konnten die Kardiomyozyten auf 90% angereichert werden. Um den Verlust von teilweise angewachsenen Zellen im ausgedünnten Zellverbund zu verhindern und den Selektionsprozess zu beschleunigen, wurden die Zellen teilweise an Tag 4-5 dissoziiert und in 2D-Kultur wieder ausplattiert.

Insgesamt war eine Anreicherung von Kardiomyozyten mit diesem Protokoll möglich, ging allerdings mit einem substantiellen Verlust der Kardiomyozyten einher.

4.4.4 Analyse der differenzierten Kardiomyozyten – Genexpression

Um die Expression von wichtigen Transkripten im Verlauf der Differenzierung von hiPSCs zu Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden während des Prozesses Proben genommen und daraus RNA extrahiert. Dabei wurden während der Differenzierung die Zeitpunkte Tag eins, zwei, vier, sechs, acht, zehn, zwölf, vierzehn, sechzehn und zwanzig untersucht. Die Genexpression wurde auf die Expression von β -Glucuronidase (GUSB) normiert und in Relation zur Expression in undifferenzierten hiPSCs gesetzt. Pro Zeitpunkt wurden 4 Differenzierungsansätze im Triplikat untersucht (Abbildung 24).

Oct-4 gehört wie Nanog und Sox-2 zu den wichtigsten Transkriptionsfaktoren in undifferenzierten Zellen. Nach Beginn der Differenzierung wurde OCT-4 herunter reguliert und erreichte an Tag 16 das minimale Expressionsniveau.

Brachyury (T) ist ein Transkriptionsfaktor im T-Box Genkomplex und reguliert die Transkription von Genen, die für Mesodermbildung und Zelldifferenzierung erforderlich sind. An Tag 2 der Differenzierung wurde mit dem ca. 75000-fachen Niveau von undifferenzierten Zellen das Maximum der Expression erreicht, die nach Tag 4 schnell wieder abfiel, bis sie an Tag 20 nur noch dem 4-fachen Niveau entsprach. MESP1, ebenfalls ein Marker für mesodermale Zellen, zeigte ein ähnliches Expressionsmuster mit kleineren Schwankungen.

VEGFR2 (KDR; FLK1) wird mit PDGFRA von frühen kardialen Vorläuferzellen co-exprimiert (Kattman et al., 2011). Die Expression der Rezeptor-Tyrosin-Kinase stieg bis Tag 10 auf das 600-fache Niveau von undifferenzierten Zellen an und reduzierte sich bis Tag 12 um ca. 95%. ISL-1 kodiert einen Transkriptionsfaktor der LIM/Homeodomänenfamilie und wird unter anderem von späten kardialen Vorläuferzellen exprimiert. Bis Tag 6 der Differenzierung stieg die Expression deutlich an, blieb bis Tag 10 in etwa auf dem gleichen Niveau und nahm dann wieder ab.

TNNT2, MYH6 und MYH7 sind Gene, die für die sarkomerischen Proteine Troponin T (kardial, TNNT2) und Myosin (schwere Kette, kardial, alpha und beta; Myh6 und Myh7) kodieren. Die Expression von MYH6, MYH7 und TNNT2 war zu Beginn der Differenzierung noch niedriger als bei undifferenzierten Zellen, stieg dann bei TNNT2 von Tag 4 bis Tag 6 auf das 100-fache Niveau an und erreichte an Tag 14 die maximale Expression (3500-fach). Die Expression von MYH6 und MYH7 nahm von Tag 6 bis 8 deutlich zu. MYH6 war an Tag 8 der Differenzierung etwa 1×10^5 -fach stärker und an Tag 12 6×10^5 -fach stärker exprimiert als in undifferenzierten Zellen. MYH7 war an Tag 8 der Differenzierung etwa 150-fach stärker und an Tag 20 3×10^4 -fach stärker exprimiert als in undifferenzierten Zellen.

Ergebnisse - Differenzierung von hiPSCs zu Kardiomyozyten

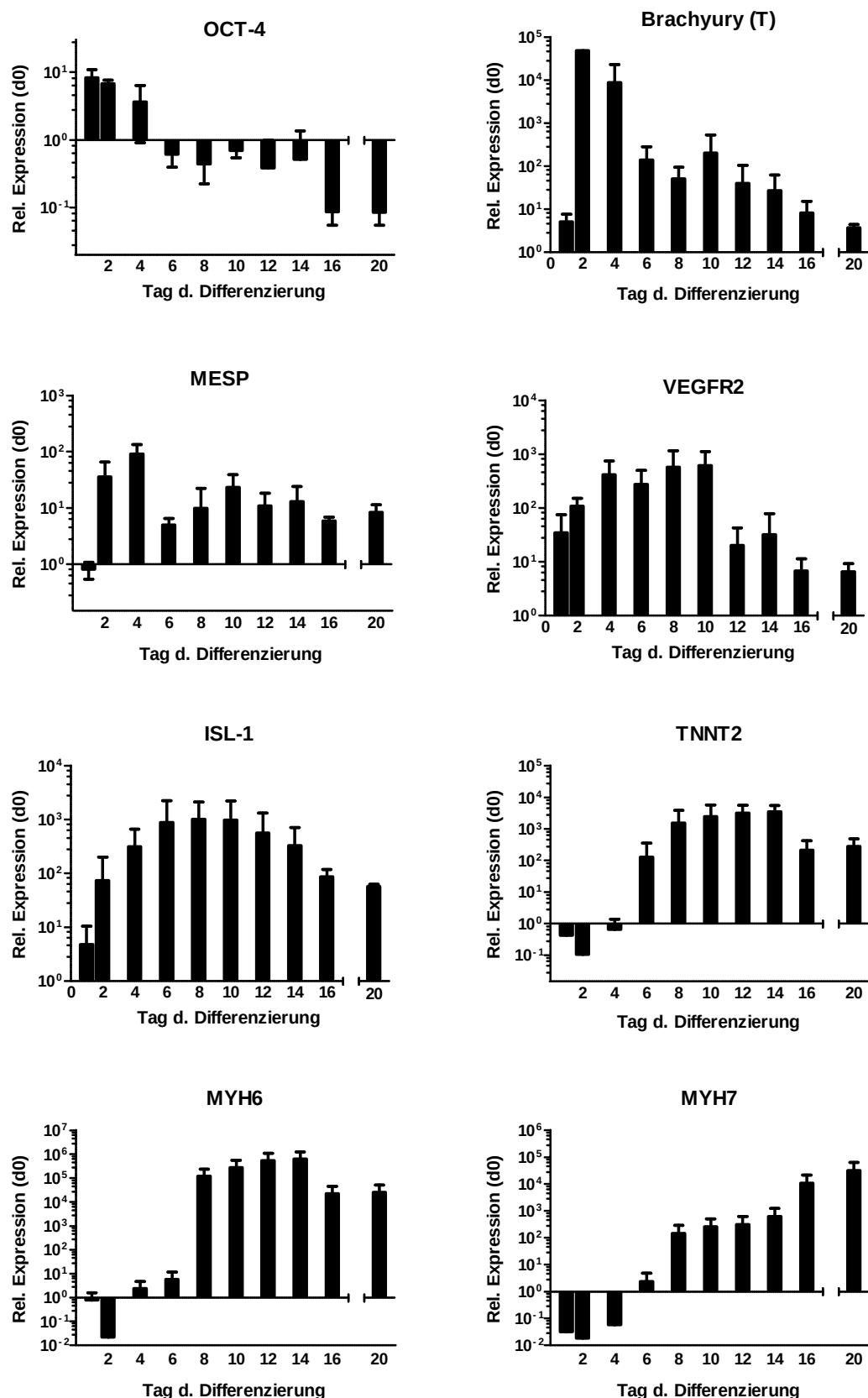


Abbildung 24: Genexpressionsanalyse von wichtigen Genen in der kardialen Differenzierung. Die Differenzierung erfolgte mit B27-Differenzierungsmedien. Die Werte wurden auf GUSB normalisiert und in Relation zu undifferenzierten hiPSCs (Tag 0) gesetzt. Dargestellt ist der Faktor der Expressionsveränderung. Mittelwerte $\pm$ SD, n=4.

Um zu untersuchen, welche Zelltypen neben Kardiomyozyten bei der kardialen Differenzierung von hiPSCs entstehen, wurde die Expression verschiedener charakteristischer Gene untersucht (Abbildung 25). Die Genexpression wurde auf die Expression von GUSB normiert und in Relation zur Expression in undifferenzierten hiPSCs gesetzt. Es wurden 4 Differenzierungsansätze im Triplikat auf die Expression von MYH6, MYH7 und TNNT, sowie 2 Differenzierungsansätze im Triplikat auf die Expression von nicht-kardialen Genen untersucht.

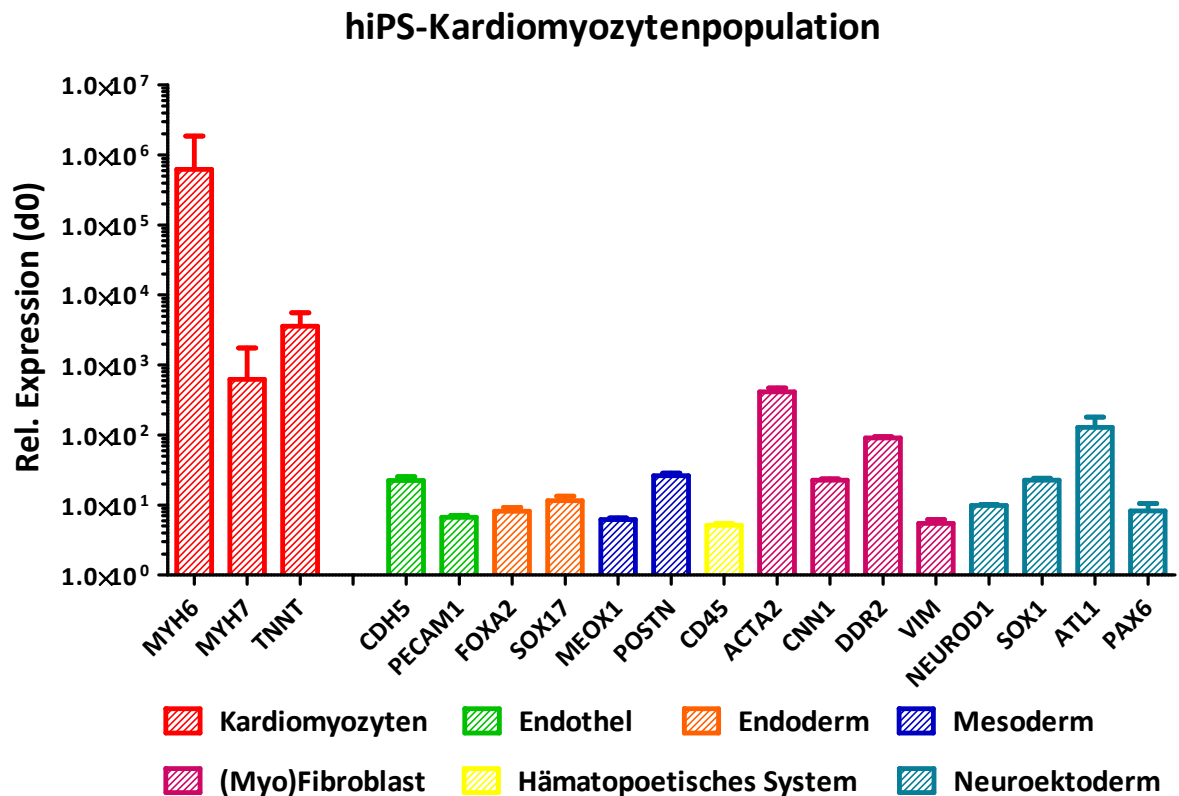


Abbildung 25: Genexpressionsanalyse von Genen verschiedener Zelltypen in der hiPS-Kardiomyozytenpopulation. Die Differenzierung erfolgte mit B27-Differenzierungsmedien. Die Werte wurden auf GUSB normalisiert und in Relation zu undifferenzierten hiPSCs (Tag 0) gesetzt. Dargestellt ist der Faktor der Expressionsveränderung. Mittelwerte $\pm$ SD, MYH6, MYH7 und TNNT n=4, alle anderen n=2.

Gene des Endothels (CDH5: VE-Cadherin, PECAM1: CD31), des Entoderms (FOXA2/3: forkhead box A2/3, SOX17: sex determining region Y-Box 17), des Mesoderms (MEOX1: mesenchyme homeobox 1, POSTN: osteoblast specific factor periostin) und des hämatopoetischen Systems (CD45) wurden im Vergleich zu undifferenzierten hiPSCs nur schwach reguliert.

ACTA2 (Aktin des glatten Muskels), DDR2 (Discoidin Domäne Rezeptor Thyrosin Kinase), VIM (Vimentin) und CNN1 (Calponin) werden von (Myo-)fibroblasten exprimiert. Die zwei zuerst

genannten Gene, welche auch in glatten Muskelzellen nachweisbar sind, waren im Vergleich zu undifferenzierten hiPSCs deutlich hoch reguliert.

Gleiches gilt für ATL1 (Atlastin GTPase), welche spezifisch für Neuroektoderm ist. Die neuroektodermalen Gene NEOROD1 (neurogenic differentiation 1), SOX1 (sex determining region Y-Box 1) und PAX6 (paired box 6) waren hingegen im Vergleich zu undifferenzierten hiPSCs nur gering hoch reguliert.

4.4.5 Reife der differenzierten Kardiomyozyten

Zur weiteren Charakterisierung der hiPS-Kardiomyozyten wurden FACS-Analysen mit Antikörpern gegen α -Aktinin, Troponin T, und die sarkomerischen Proteine atriale Myosin-leichte Kette (MLC-2A) und ventrikuläre Myosin-leichte Kette (MLC-2V) durchgeführt (Abbildung 26).

Der Vergleich mit der α -Aktinin und Troponin T (TNNT) Expression zeigt, dass alle hiPS-Kardiomyozyten an Tag 14 der Differenzierung MLC-2A-positiv waren. Es konnten keine MLC-2V-positive Zellen nachgewiesen werden.

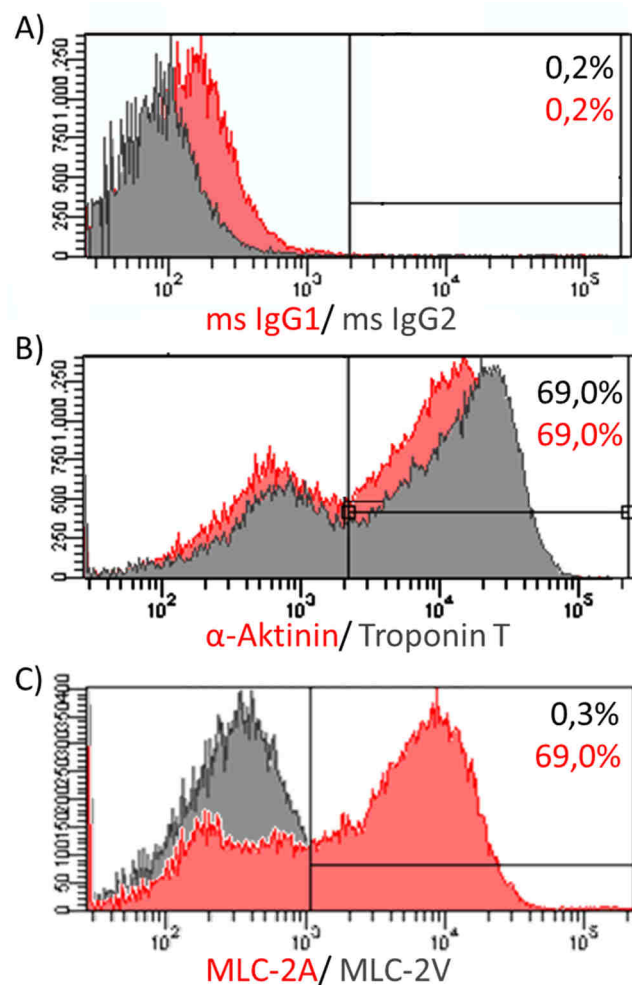


Abbildung 26: FACS Analyse der differenzierten hiPS-Kardiomyozyten.

A) Isotypkontrollen. B) α -Aktinin (rot) und TNNT (grau). C) MLC-2A (rot) und MLC-2V (grau).

4.4.6 Proliferation von Kardiomyozyten

Fetale, unreife Kardiomyozyten durchlaufen im Gegensatz zu adulten Kardiomyozyten den Zellzyklus. Um zu untersuchen, ob die unreifen, MLC-2A exprimierenden hiPS-Kardiomyozyten nach der Differenzierung, zum Zeitpunkt der EHT-Generierung, zur Proliferation fähig sind, wurde mit Hilfe des Click-iT® Plus EdU Flow Cytometrie Assay Kits der Anteil der sich in der S-Phase befindlichen Zellen untersucht.

Nach 24 Stunden in 2D-Kultur in Gegenwart von EdU hatten 11,7% der hiPS-Kardiomyozyten (11% α -Aktinin- und EdU-positiven Zellen von 94% α -Aktinin-positiven Zellen) und 7,7% der nicht-Kardiomyozyten (0,5% der α -Aktinin-negativen und EdU-positiven Zellen von 6,5% α -Aktinin-negativen Zellen) die S-Phase durchlaufen (Abbildung 27).

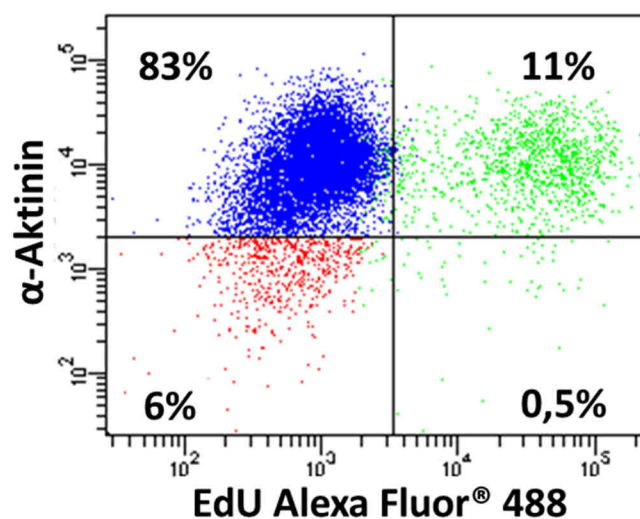


Abbildung 27: FACS-Analyse der sich in der S-Phase befindlichen Zellen nach 24 Stunden Kultivierung in Gegenwart von EdU.

4.5 Teratomassay

Um die Pluripotenz der verwendeten hiPSC Linie C25 und die Teratogenität der aus hiPSC differenzierten Kardiomyozyten zu untersuchen, wurde ein Teratomassay durchgeführt.

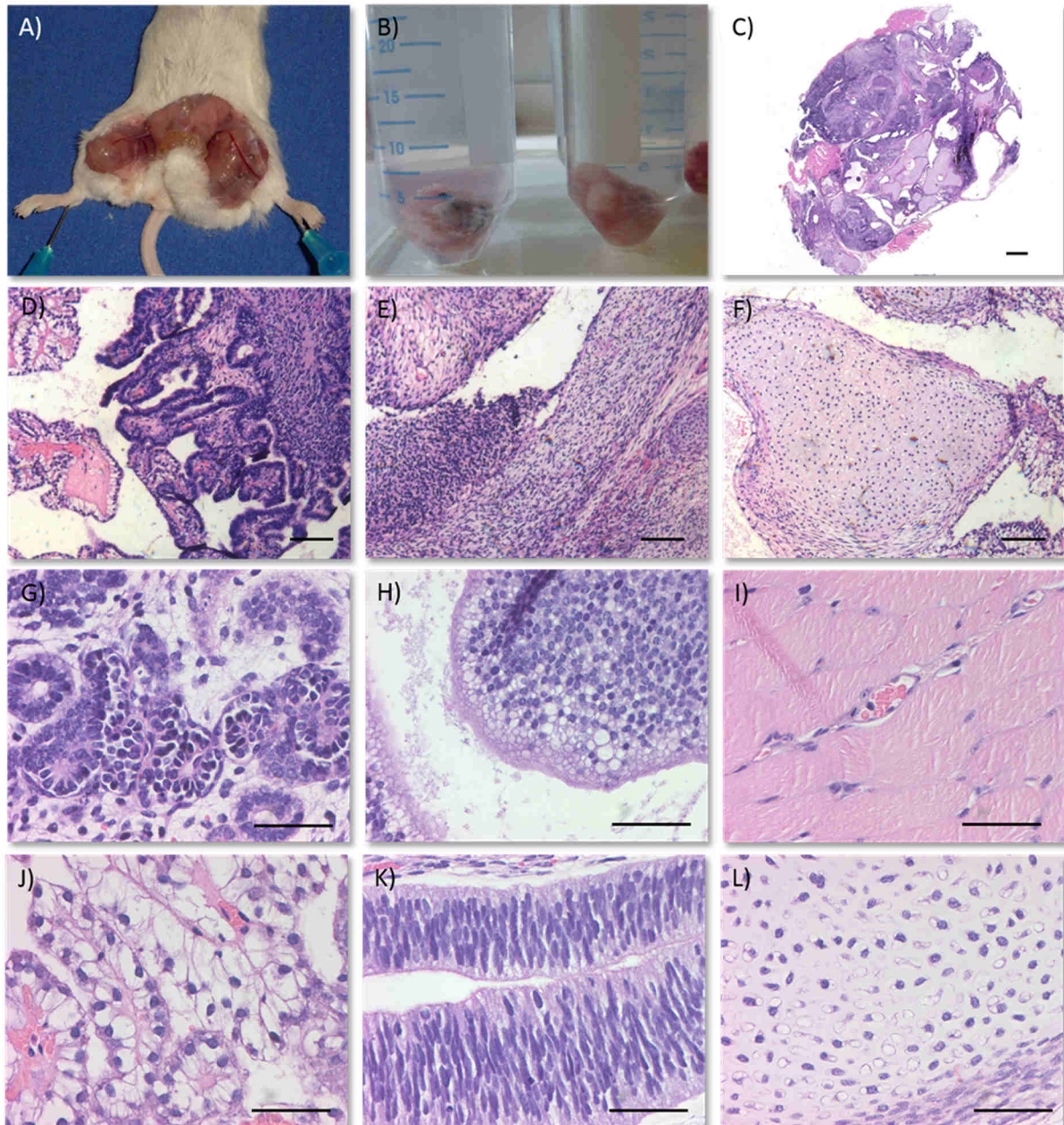


Abbildung 28: Teratome. A) Teratome in einer SCID Beige Maus, 8 Wochen nach Injektion. B) entnommene Teratome, 8 Wochen nach Injektion. C-L) HE gefärbte Schnitte zeigen Differenzierungsloci mit entodermalen (D), ektodermalen (E) und mesodermalen Geweben (F). G-L) Detailaufnahmen von unterschiedlichen Geweben. Maßstab 1 mm (C), 100 µm (D-F), bzw. 50 µm (G-L).

Acht Wochen nach Injektion von undifferenzierten hiPSCs (1×10^7 Zellen pro Injektion) wurden an allen Injektionsstellen große Zellwucherungen explantiert. Die pathologische Begutachtung von HE gefärbten Schnitten zeigte in ähnlichen Anteilen jeweils plattenepitheliale, Knorpel-,

Knochen-, gastrointestinale und drüsige Differenzierungsloci und etwas stärker repräsentiert unreife neurale Gewebe (insbesondere Neuroepithel, Glia, Nervenfasern), eingebettet in unreifem Bindegewebe. Dieser Befund passt zu unreifen Teratomen (high grade).

Um die Teratogenität von hiPS-Kardiomyozyten (hiPS-KMs, 1×10^7 Zellen pro Injektion) zu untersuchen, wurden 23-mal Zellen aus insgesamt fünf verschiedenen Differenzierungen injiziert. Der Beobachtungszeitraum wurde nach der Injektion von hiPS-KMs auf 12 Wochen verlängert, da nach acht Wochen noch keine Teratome tastbar waren. An einer Injektionsstelle entstand ein Teratom. Die für diese Injektion verwendeten Zellen wurden kein weiteres Mal appliziert. Dies deutet darauf hin, dass speziell in der aus diesem Differenzierungslauf resultierenden Zellpopulation noch nicht vollständig differenzierte Zellen vorhanden waren.

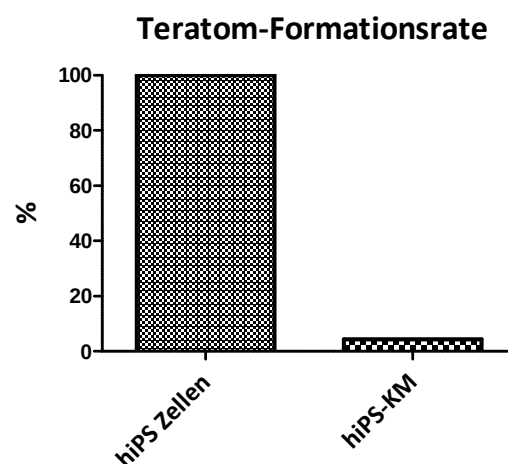


Abbildung 29: Teratom-Formationsrate nach Injektion von undifferenzierten hiPS-Zellen (n=12) und hiPS-Kardiomyozyten (n=23).

4.6 Differenzierung von hiPSCs zu Endothelzellen

Zur Differenzierung von Endothelzellen wird in einem mehrstufigen Prozess zunächst analog zur kardialen Differenzierung Mesoderm induziert und dann durch hohe Konzentrationen von bFGF und VEGF Endothelzellen differenziert. In Anlehnung an das ausgearbeitete Protokoll zur Differenzierung von Kardiomyozyten und die Arbeiten von White und Kollegen (White et al., 2013) wurde für die Wildtyplinie C25 ein Differenzierungsprotokoll erarbeitet:

Im ersten Schritt wurden aus undifferenzierten iPSCs mit einer Konfluenz von etwa 95% EBs gebildet (siehe 4.3). Zur Induktion von mesodermalen Progenitoren (Tag 1–3) wurden die EBs in der ersten Differenzierungsphase in einem StemPro®-34 basiertem Medium mit 5 ng/ml FGF2, 12 ng/ml BMP4 und 6 ng/ml Activin A für 3 Tage in Suspension in mit Pluronic®-F127 beschichteten T175 Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5% CO₂, 5% O₂ und 90% rH kultiviert. Dabei wurde ein EB Volumen von 100 µl in 35 ml Medium kultiviert, und um einer Versauerung des Mediums vorzubeugen und eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren zu gewährleisten, wurde täglich das Medium gewechselt.

Für die endotheliale Spezifizierung und Differenzierung (Tag 4–14) wurde dem StemPro®-34 basiertem Medium 10 ng/ml bFGF und 100 ng/ml VEGF zugesetzt. Die Durchführung erfolgte wie bei der kardialen Differenzierung beschrieben (siehe 4.4). Die Kultivierung erfolgte für 2 Tage bei 37 °C, 5% CO₂, 5% O₂ und 90% rH, dann für weitere 8 Tage bei Normoxie mit täglichem Mediumwechsel.

Zur Bestimmung der Differenzierungseffizienz wurden FACS-Analysen durchgeführt (siehe 3.12). An Tag 14 konnten bis zu 25% CD31-positive Zellen nachgewiesen werden. Da Endothelzellen über das membranständige Protein CD31 einfach aufgereinigt werden können (siehe 3.9.1 und 0) und aufgrund der hohen Proliferationsrate dieser Zellen nur wenige Zellen ausreichen, um den Bedarf an Zellen zu decken, wurden keine weiteren Optimierungsversuche zur Steigerung der Differenzierungseffizienz durchgeführt.

4.6.1 Anreicherung von CD31-positiven Zellen – MACS

Um die differenzierten hiPS-Endothelzellen anzureichern, wurden diese an *CD31 MicroBeads* gekoppelt und über zwei MACS Zyklen aufgereinigt (siehe 3.9.1).

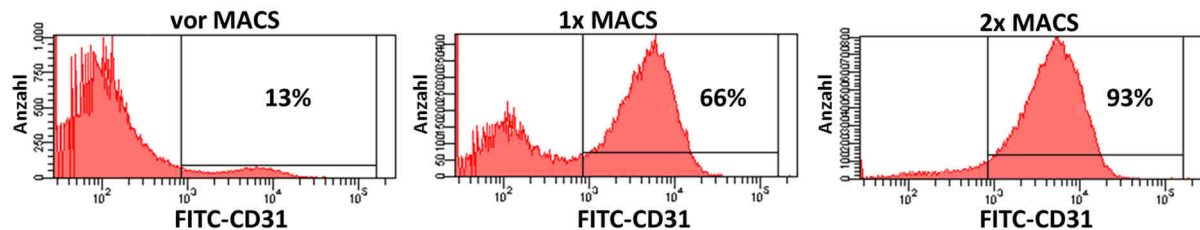


Abbildung 30: FACS-Analyse der hiPS-Endothelzellen an Tag 14 der Differenzierung. Dargestellt ist der Nachweis von CD31 vor, sowie nach einem und zwei MACS-Zyklen.

Abbildung 30 zeigt exemplarisch das Ergebnis der FACS-Analyse von CD31-positiven Zellen vor, sowie nach einem und zwei MACS-Zyklen. Durch die erste MACS Säule wurden die Endothelzellen um das 5,1-fache und durch die zweite MACS Säule 1,4-fach aufgereinigt. Trotz zusätzlicher Aufreinigung des Säulen-Durchflusses gingen bei dem Verfahren Zellen verloren. Die durchschnittliche Ausbeute betrug 43% der aufgrund der Differenzierungseffizienz zu erwartenden Zellzahl.

4.6.2 Kultivierung von hiPS-Endothelzellen

Die Optimierung eines geeigneten Kulturmediums war schwierig, da die hiPS-Endothelzellen in verschiedenen käuflich erwerblichen Endothelzellmedien innerhalb kürzester Zeit in Apoptose gingen. Nach dem erfolglosen Testen verschiedener Basalmedien mit Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen von VEGF und bFGF wurde die Rezeptur eines entsprechenden Mediums veröffentlicht (Orlova et al., 2014). In humanem EC-SFM Medium mit 1% Plättchen-armen Serum, 30 ng/ml VEGF und 20 ng/ml bFGF in mit 0,1% Gelatine-beschichteten Zellkulturflaschen ließen sich die hiPS-Endothelzellen bei 37 °C, 5% CO₂, 5% O₂ und 90% rH erfolgreich kultivieren.

4.6.3 Genexpression der hiPS-Endothelzellen

Um den Erfolg der Differenzierung auf Transkriptebene zu untersuchen, wurde an Tag 14 nach MACS-Aufreinigung die Expression verschiedener Gene untersucht (Abbildung 31). Die Genexpression wurde auf die Expression von GUSB normiert und in Relation zur Expression in undifferenzierten hiPSCs gesetzt.

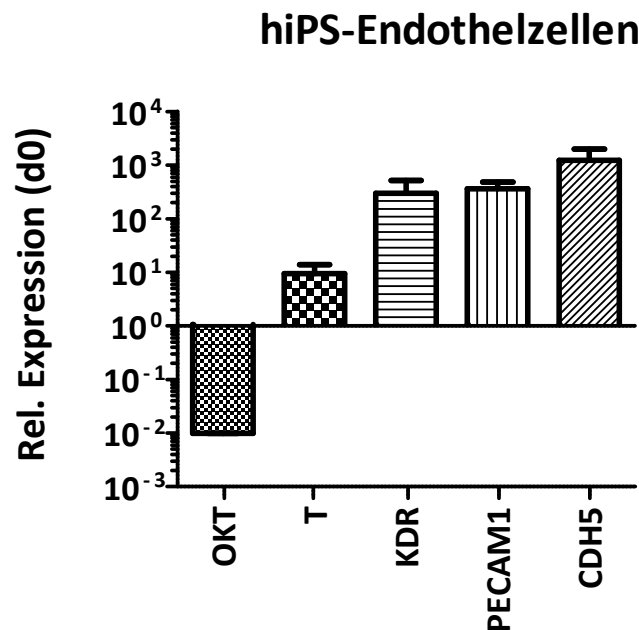


Abbildung 31: Genexpressionanalyse von wichtigen Genen in der endothelialen Differenzierung an Tag 14. Die Werte wurden auf GUSB normalisiert und in Relation zu undifferenzierten hiPSCs (Tag 0) gesetzt. Dargestellt ist der Faktor der Expressionsveränderung. n=3.

OCT-4, einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren in undifferenzierten Zellen, war im Vergleich zu diesen an Tag 14 um den Faktor 100 weniger exprimiert. Die mRNA des für die mesodermale Differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktors Brachyury (T) war hingegen noch nachweisbar. Der VEGF Rezeptor (KDR/Flk1; 290-fach), CD31 (PECAM1; 360-fach) und VE-Cadherin (CDH5; 1200-fach) waren im Vergleich zu hiPSCs deutlich hoch reguliert.

4.6.4 Gefäßbildung

Die Bildung vaskulärer Netzwerk-ähnlicher Strukturen durch hiPS-Endothelzellen wurde im Matrigelplug-Assay untersucht.

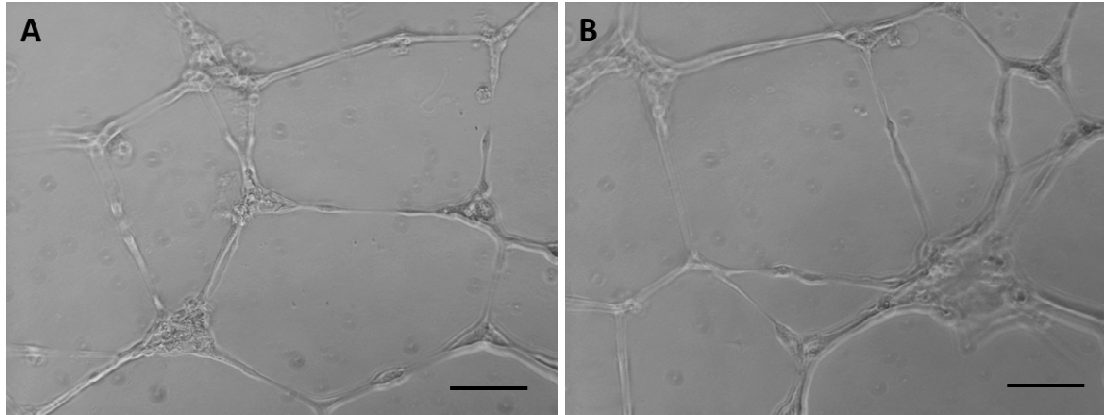


Abbildung 32: Gefäßbildung in Matrigel. A) hiPS-Endothelzellen 24 Stunden auf Matrigel kultiviert. B) HUVECs 24 Stunden auf Matrigel kultiviert. Maßstab 250 μm .

HiPS-Endothelzellen bildeten wie HUVECs auf Matrigel vaskuläre Netzwerk-ähnliche Strukturen (Abbildung 32).

4.7 Engineered Heart Tissue (EHT)

Für die Generierung von EHTs wurden die aus hiPSCs differenzierten Kardiomyozyten mit HUVECs, bzw. hiPS-Endothelzellen in einer Fibrin-Matrigel™-Matrix zu einem Gewebestreifen gegossen. Dabei wurden für EHTs im 24-Vertiefungen Format 5×10^5 hiPS-Kardiomyozyten mit 2×10^5 HUVECs/ hiPS-Endothelzellen in einem initialen Volumen von 100 µl verwendet.

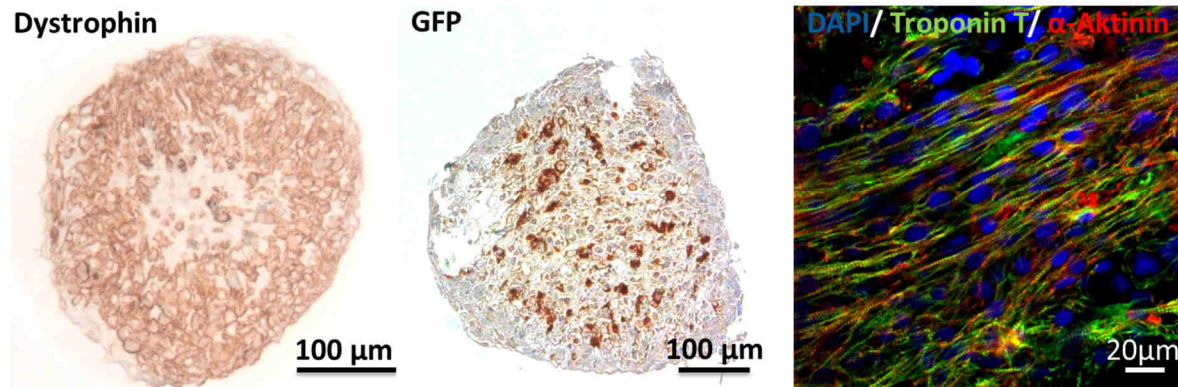


Abbildung 33: Immunhistologie an EHTs im 24-Vertiefungen Format nach 3-wöchiger Kultivierung. Links: Dystrophin-Färbung im EHT-Querschnitt. Mitte: GFP-Färbung zum Nachweis lentiviral transduzierter HUVECs im EHT-Querschnitt. Rechts: Sarkomer-Struktur im EHT-Längsschnitt. Grün: Troponin T, rot: α-Aktinin, blau: DAPI.

Nach der EHT Generierung konnten zwischen Tag 2 und 5 Kontraktionen einzelner Zellen, zwischen Tag 5 und 10 kohärente Kontraktionen kleiner Zell-Areale und kohärente Kontraktionen des gesamten EHTs zwischen Tag 10 und 15 beobachtet werden. Die immunhistologische Analyse (Abbildung 33) zeigte Dystrophin-exprimierende Zellen mit der höchsten Zelldichte an der EHT Oberfläche. Im Längsschnitt waren die Anordnung der Kardiomyozyten entlang von Kraftlinien und deren sarkomerische Organisation von alpha-Aktinin und Troponin T erkennbar. GFP-exprimierende HUVECs/hiPS-Endothelzellen waren vermehrt im Inneren des EHTs nachweisbar. Auffällig waren insgesamt eine hohe Zelldichte und gute Gewebebildung.

Da für eine experimentelle Gewebeersatztherapie am Meerschweinchen größere Gewebekonstrukte als für *in vitro* Versuche notwendig sind, wurden größere EHTs hergestellt, die zwischen einem Paar aus Silikonhaltern in Zellkulturschalen mit 6 Vertiefungen kultiviert werden (6-well 2-post EHTs, Abbildung 5). Dabei erwies sich ein Zellverhältnis von 5×10^6 hiPS-Kardiomyozyten mit 2×10^6 HUVECs/ hiPS-Endothelzellen in einem initialen Volumen von 700 µl als geeignet, sodass nach wenigen Kultivierungstagen auch diese EHTs eine rhythmische

Kontraktion zeigten, wodurch die Silikonhalterungen phasisch gegeneinander bewegt wurden. Die für die Transplantationen verwendeten EHTs im 6-Vertiefungen Format hatten 49 ± 9 Schläge pro Minute ($n=20$).

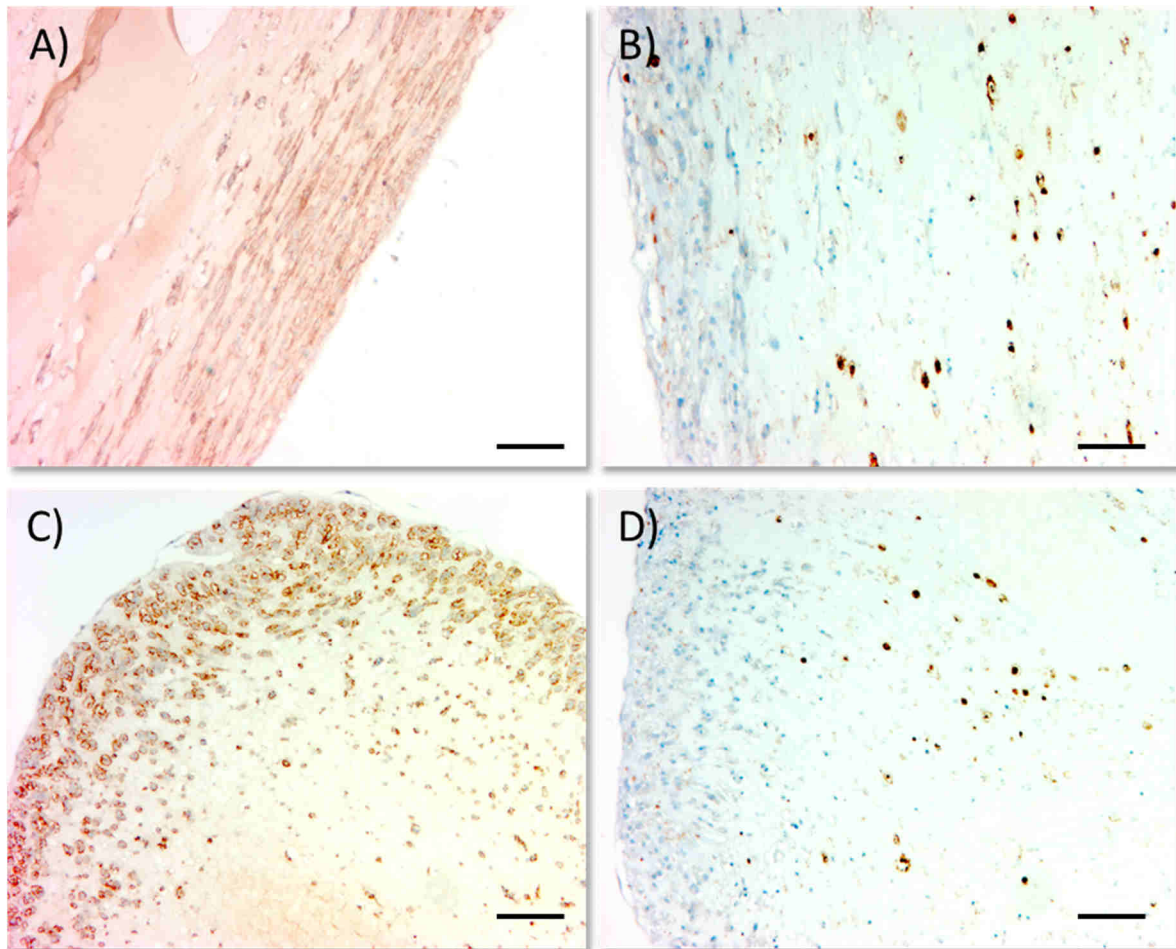


Abbildung 34: Immunhistologie an EHTs im 6-Vertiefungen Format nach 3-wöchiger Kultivierung. A) Dystrophin-Färbung im EHT-Längsschnitt. B) GFP-Färbung zum Nachweis lentiviral transduzierter hiPS-ECs im EHT-Längsschnitt. C) Dystrophin-Färbung im EHT-Querschnitt. D) GFP-Färbung zum Nachweis lentiviral transduzierter hiPS-ECs im EHT-Querschnitt. Maßstab: 100 µm.

Die immunhistologische Analyse (Abbildung 34) zeigte, wie bei den EHTs im 24-Vertiefungen Format, Dystrophin-exprimierende Zellen mit der höchsten Zelldichte an der EHT Oberfläche. Im Längsschnitt waren die Anordnung der Kardiomyozyten entlang von Kraftlinien erkennbar. GFP-exprimierende hiPS-Endothelzellen waren vermehrt im Inneren des EHTs nachweisbar.

Des Weiteren wurden aus EHTs dissoziierte Kardiomyozyten mittels FACS-Analyse auf die Expression der MLC Isoformen MLC-2A und MLC-2V untersucht (Abbildung 35).

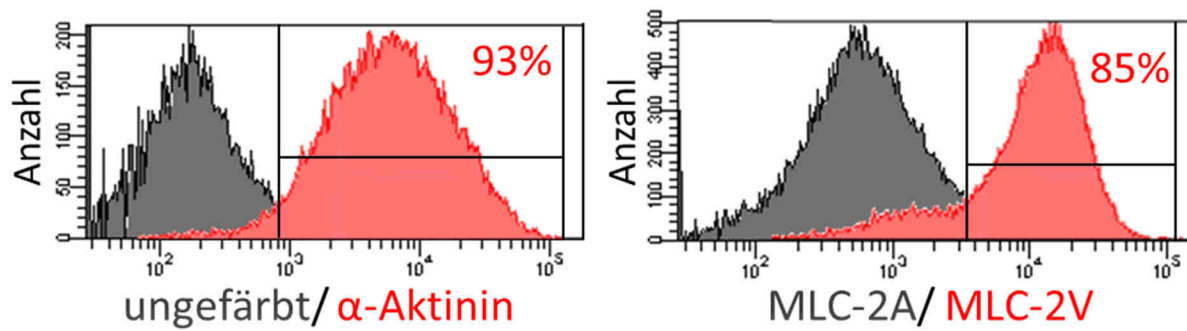


Abbildung 35: FACS Analyse von hiPS-Kardiomyozyten nach drei Wochen im EHT-Format zum Nachweis von α -Aktinin, MLC-2A und MLC-2V.

Während direkt nach der Differenzierung alle hiPS-Kardiomyozyten die fetale Isoform der Myosin leichte Kette (MLC-2A) exprimierten (siehe Abbildung 26), synthetisierten diese Zellen nach drei Wochen im EHT-Format zu einem erheblichen Anteil (>80%) nicht mehr die fetale, sondern die ventrikuläre Isoform (MLC-2V, Abbildung 35).

4.8 Transduktion von HUVECs und hiPS-Endothelzellen

Durch lentivirale Transduktion und anschließende Blasticidin-Selektion konnten $\geq 98\%$ GFP-exprimierende HUVECs und hiPS-Endothelzellen generiert werden (Abbildung 36).

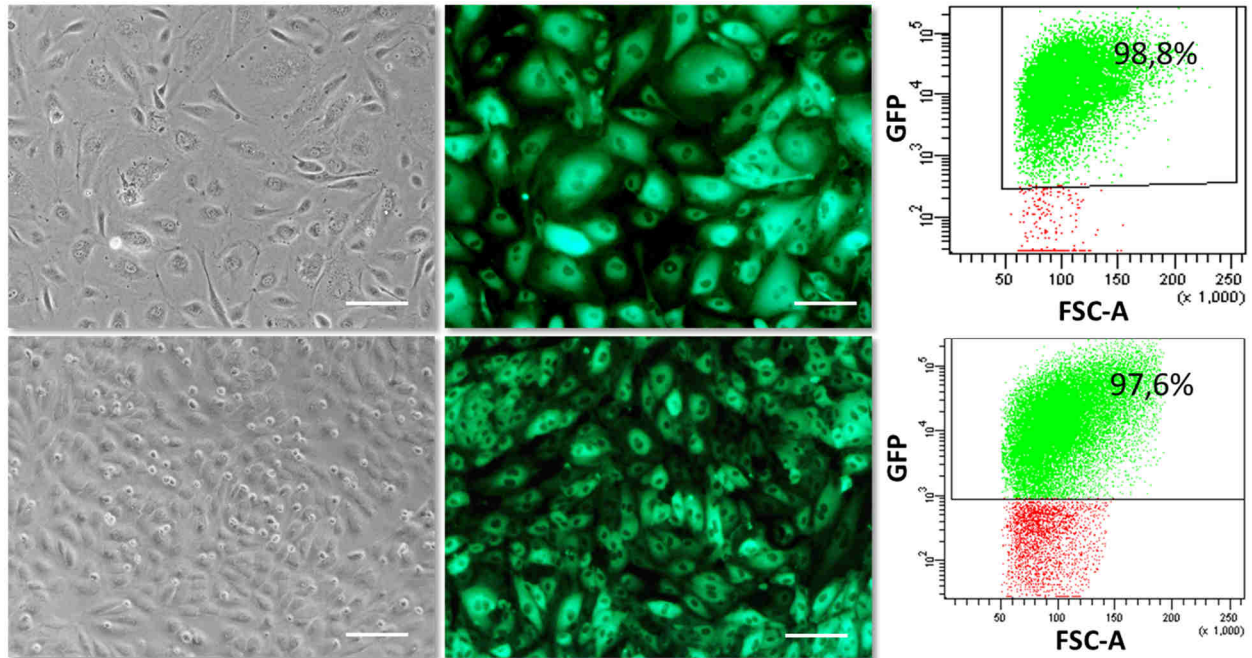


Abbildung 36: Stabil GFP-exprimierende HUVECs (oben) und hiPS-Endothelzellen (unten). Links: Auflichtaufnahme, Mitte: GFP-Fluoreszenz, rechts: FACS-Analyse der GFP-Fluoreszenz. Maßstab: 50 μm .

4.9 Transduktion humaner iPS-Kardiomyozyten

Zunächst wurden hiPS-Kardiomyozyten mit 300 verschiedenen AAV-Serotypen mit GFP-Sequenz unter CMV-Promotor, darunter viele verschiedene Mosaiktypen, transduziert. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Oliver Müller, Universität Heidelberg, durchgeführt. Dabei stammten die uns in ihrer molekularen Identität im Einzelnen nicht bekannten Serotypen direkt aus Heidelberg. Die Testungen an hiPS-Kardiomyozyten wurden von uns in Unkenntnis des genauen Serotyps (verblindet) vorgenommen. Aus diesen 300 getesteten AAV-Serotypen wurden diejenigen mit den höchsten Transduktionseffizienzen ausgewählt. Von fünf dieser acht Serotypen wurden zusätzlich Viren mit TNNT- statt CMV-Promotor hergestellt und an 2D-Kulturen getestet (Tabelle 8). Mittels FACS-Analyse wurden die Transduktionseffizienzen in hiPS-Kardiomyozyten (hiPS-KMs) und nicht-Kardiomyozyten ermittelt (Abbildung 37).

Serotyp	MOI	Promotor	Expressionseffizienz in hiPS-KMs (%)	Expressionseffizienz in nicht-KMs (%)
AAV1-NEA	10000	CMV	92,6	85,1
AAV1-NEA	10000	TNNT	13,7	0,4
AAV2-NEA	10000	CMV	90,7	72,1
AAV2-NEA	10000	TNNT	39,7	1,1
AAV9-NYS	10000	CMV	90,9	91,1
AAV9-NYS	10000	TNNT	44,7	1,6
AAV9-NLH	10000	CMV	80,2	49,7
AAV9-NLH	10000	TNNT	63,2	4,5
AAV9-SLR	10000	CMV	90,7	67,8
AAV9-SLR	10000	TNNT	64,0	3,9
AAV7-NEA	10000	CMV	93,1	84,6
AAV7-NYS	10000	CMV	91,8	84,4
AAV8-NYS	10000	CMV	93,1	81,4

Tabelle 8: Vergleich der EGFP-Expression nach Transduktion mit verschiedenen Serotypen und Promotoren. Ergebnisse der FACS-Analyse nach Markierung der hiPS-KMs mit anti-alpha-Aktinin.

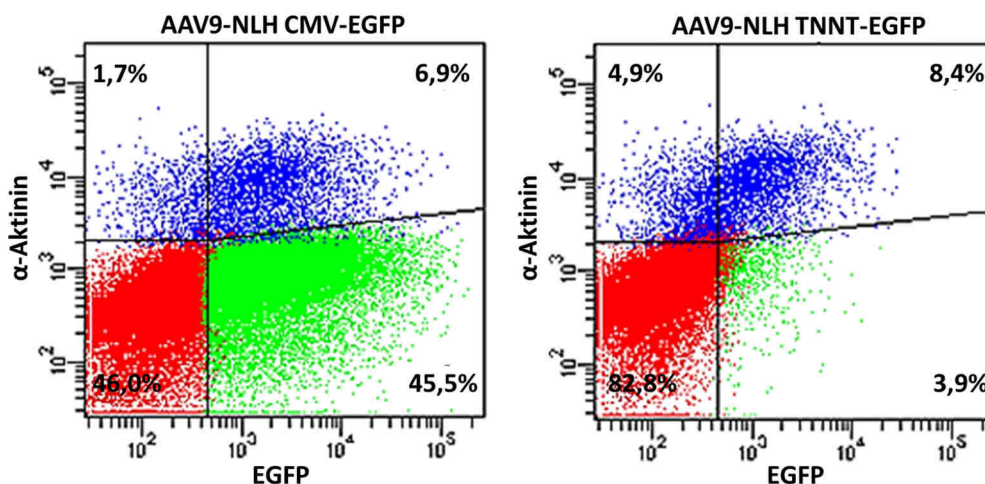


Abbildung 37: FACS-Analyse EGFP-exprimierender Zellen nach Transduktion mit AAV9-NLH CMV-EGFP (MOI 10000) bzw. AAV9-NLH TNNT-EGFP (MOI 10000). Kardiomyozyten wurden mit α -Aktinin nachgewiesen. Der geringe Kardiomyozytenanteil ist zum Teil durch die Proliferation von Nicht-Kardiomyozyten im 2D-Format bedingt.

Sechs Tage nach Transduktion wurde die EGFP-Expression nach Markierung der hiPS-Kardiomyozyten mit anti-alpha-Aktinin und anti-Maus Alexa546 per FACS-Analyse untersucht. Die Transduktionseffizienz in hiPS-KMs betrug bei allen getesteten Serotypen mit CMV-Promotor bei einer MOI von 10000 zwischen 80% (AAV9-NLH) und 93% (AAV7-NEA und AAV8-NYS). Allerdings war die Transduktionseffizienz in nicht-KMs mit 50% (AAV9-NLH) bis 91% (AAV9-NYS) ebenfalls sehr hoch. Die Transduktion mit Viren mit TNNT-Promotor war weniger

effizient und variierte in hiPS-KMs zwischen 14% (AAV1-NEA) und 64% (AAV9-SLR). Der Kardiomyozyten-spezifische Promotor führte jedoch zu einer drastischen Reduktion der Expressionseffizienz in nicht-KMs, die nur noch bei 0,4% (AAV1-NEA) und 4,5% (AAV9-NLH) lag. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Serotypen AAV9-NLH und AAV9-SLR als geeignete Vektoren ausgewählt und die Virenzahl pro Zelle (MOI) für eine möglichst hohe EGFP-Expression angepasst (Tabelle 9).

Serotyp	MOI	Promotor	Expressionseffizienz in hiPS-KMs (%)	Expressionseffizienz in nicht-KMs (%)
AAV9-NLH	10000	TNNT	54,8	2,3
AAV9-NLH	30000	TNNT	69,9	3,5
AAV9-NLH	100000	TNNT	95,4	7,2
AAV9-SLR	10000	TNNT	59,3	1,5
AAV9-SLR	30000	TNNT	77,7	2,2
AAV9-SLR	100000	TNNT	91,6	2,6

Tabelle 9: Titration zur Erhöhung der EGFP-Expression unter TNNT-Promotor. Ergebnisse der FACS-Analyse nach Markierung der hiPS-KM mit anti-alpha-Aktinin.

Die Titration der beiden Serotypen AAV9-NLH und AAV9-SLR ergab, dass bei einer MOI von 1×10^5 95% bzw. 92% der hiPS-KMs EGFP exprimieren, während nur 7% bzw. 3% der nicht-KMs EGFP-positiv waren.

Um zu prüfen, ob die Transduktion auch im EHT Format möglich ist, wurden exemplarisch Viren des Serotyps AAV9-NYS CMV-EGFP in den Mastermix für die EHT Generierung gemischt (MOI 1000). Sechs Tage später war mikroskopisch deutlich EGFP-Expression sichtbar (Abbildung 38).

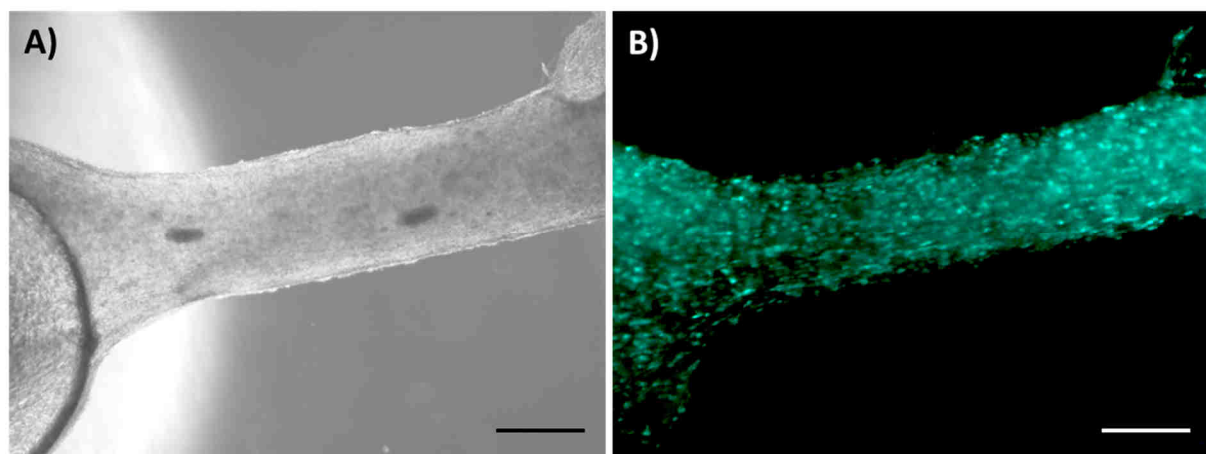


Abbildung 38: hiPS-KM EHT nach Transduktion mit AAV9-NYS CMV-EGFP (MOI 1000). Maßstab 1 mm.

4.10 In vivo Transplantationsstudie

4.10.1 Induktion der Myokardinfarkte und EHT Implantation

Zur Evaluation des optimierten Gewebemodells aus hiPS-Kardiomyozyten und hiPS-Endothelzellen wurde ein Meerschweinchenmodell etabliert. Diese Arbeiten wurden im Team mit Dr. Florian Weinberger und Herrn Dr. Simon Pecha, Abteilung für Herz- und Thoraxchirurgie, Universitäres Herzzentrum Hamburg durchgeführt. Die chirurgischen Tätigkeiten wurden von Herrn Dr. Pecha durchgeführt.

Vor Beginn der Transplantationsversuche wurde in einer Vorstudie die Verletzung des linken Ventrikels optimiert. Wegen der ausgeprägten koronararteriellen Kollateralisierung beim Meerschweinchen wurden Kryo-Verletzungen induziert. An insgesamt 15 Tieren wurde das Kryo-Verletzungsmodell dahingehend optimiert, dass eine gleichmäßige transmurale Verletzung des linken Ventrikels erzielt wurde. Hierzu wurde ein mit flüssigem Stickstoff gekühlter Stempel mit einem Durchmesser von 0,5 cm an zwei direkt benachbarten Stellen viermal für jeweils 30 Sekunden auf das Myokard gepresst. Allerdings zeigte sich, dass initial zu große Verletzungen induziert wurden, sodass nur wenige Tiere die gesamte Studiendauer von 35 Tagen überlebten. Daraufhin wurde das Protokoll angepasst und der Stempel nur noch an einer Stelle 4-mal für je 30 Sekunden auf den linken Ventrikel gedrückt.

Nach diesen Optimierungen wurden die Operationen zur Induktion der Myokardinfarkte und EHT Implantation wie unter 3.17.1 und 3.17.3 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde bisher bei 162 Tieren eine Kryo-Verletzung induziert. Davon überlebten 40 Tiere bis zum Schluss der Studie. 6 Tiere wurden bei der Auswertung der funktionellen Daten nicht berücksichtigt, da bei ihnen 7 Tage nach Kryo-Verletzung keine eingeschränkte linksventrikuläre Funktion nachgewiesen werden konnte. 12 Tiere befinden sich aktuell noch in der Auswertung, da bei 6 von diesen der Beobachtungszeitraum auf 12 Monate verlängert wurde und 6 Tiere derzeit noch für 2PLSM Messungen verwendet werden.

Der Ablauf ist in Abbildung 39 A-I fotografisch dokumentiert. Nach viermaliger Applikation eines mit Stickstoff gekühlten Stempels für 30 Sekunden auf das Myokard war deutlich der Bereich der Verletzung zu erkennen (Abbildung 39 J). Eine Woche später wurden die beiden

EHTs von basal nach apikal so implantiert, dass ein möglichst großer Bereich des geschädigten Gewebes abgedeckt wurde und die EHTs an beiden Enden Kontakt zu gesundem Myokard hatten (Abbildung 39 K). 28 Tage nach Implantation waren die EHTs fast vollständig mit dem Empfänger-Myokard verwachsen (Abbildung 39 L).

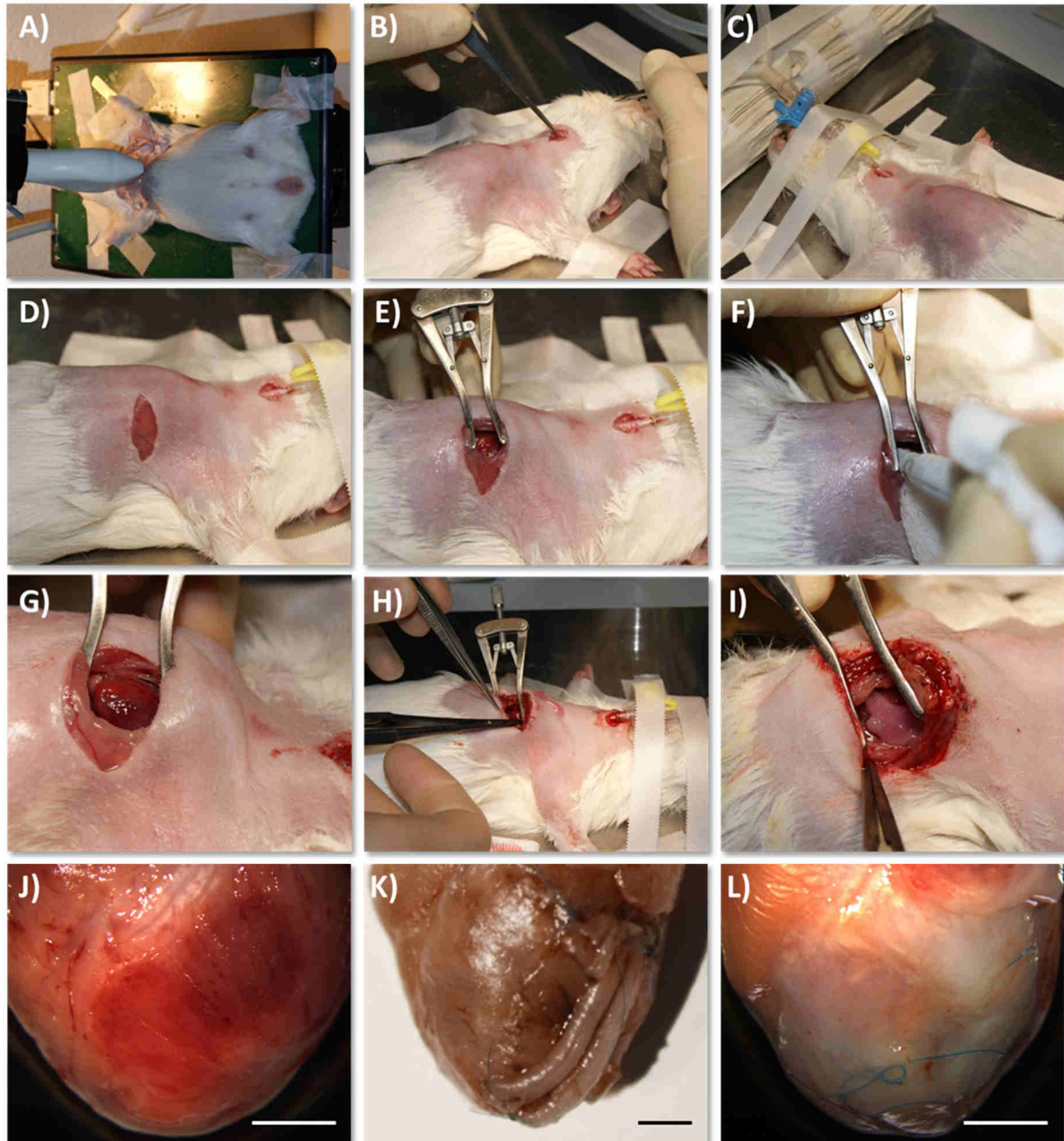


Abbildung 39: Fotografische Übersicht des Operationsverlaufs (A-I) und exemplarische explantierte Meerschweinchenherzen. A) Echokardiografie eines anästhesierten und in Rückenlage fixierten Meerschweinchens. B) Tracheotomie C) Beatmung über Respirator D) Hautinzision E) Einsetzen eines Retraktors in die Thoraxöffnung nach Durchtrennung der Mm. intercostales und Öffnen der Pleura. F) Induktion der Kryo-Verletzung des linken Ventrikels durch Applikation eines mit flüssigem Stickstoff gekühlten Stempels. G) Erfolgreiche Infarktinduktion H) Implantation eines EHTs auf infarziertes Myokard. I) Linker Ventrikel mit zwei implantierten EHTs. J) Herz nach Induktion der Kryo-Verletzung. K) Herz nach Implantation von zwei EHTs. L) Herz 28 Tage nach Implantation von zwei EHTs. Maßstab 0,5 cm.

Um die Abstoßung der transplantierten Gewebe zu verhindern, wurden die Meerschweinchen mit Immunsuppressiva behandelt. Hierfür wurde eine Kombination aus Methylprednisolon (2 mg/kg KG) und Cyclosporin A (5 mg/kg KG) eingesetzt. Die Cyclosporin A Konzentration im Serum betrug durchschnittlich $530 \pm 120 \mu\text{g/l}$. Histologisch konnte keine Abstoßungsreaktionen beobachtet werden.

4.10.2 Histologie

Nach Explantation wurden die Meerschweinchenherzen histologisch aufgearbeitet (siehe 3.18.2). Zunächst wurden zur Übersicht Querschnitte vom Apex bis zur Basis nach Masson-Goldner-Trichrom gefärbt (Abbildung 40). Das durch die Kryo-Verletzung geschädigte Gewebe war, ebenso wie fibrinöse Verwachsungen, bei allen Tieren deutlich zu erkennen (blau). Im Gegensatz zur Transplantation von zellfreien Kontrollen, waren nach EHT Transplantation innerhalb des Implantats nach 28 Tagen muskuläre Zellansammlungen (rot) sichtbar.

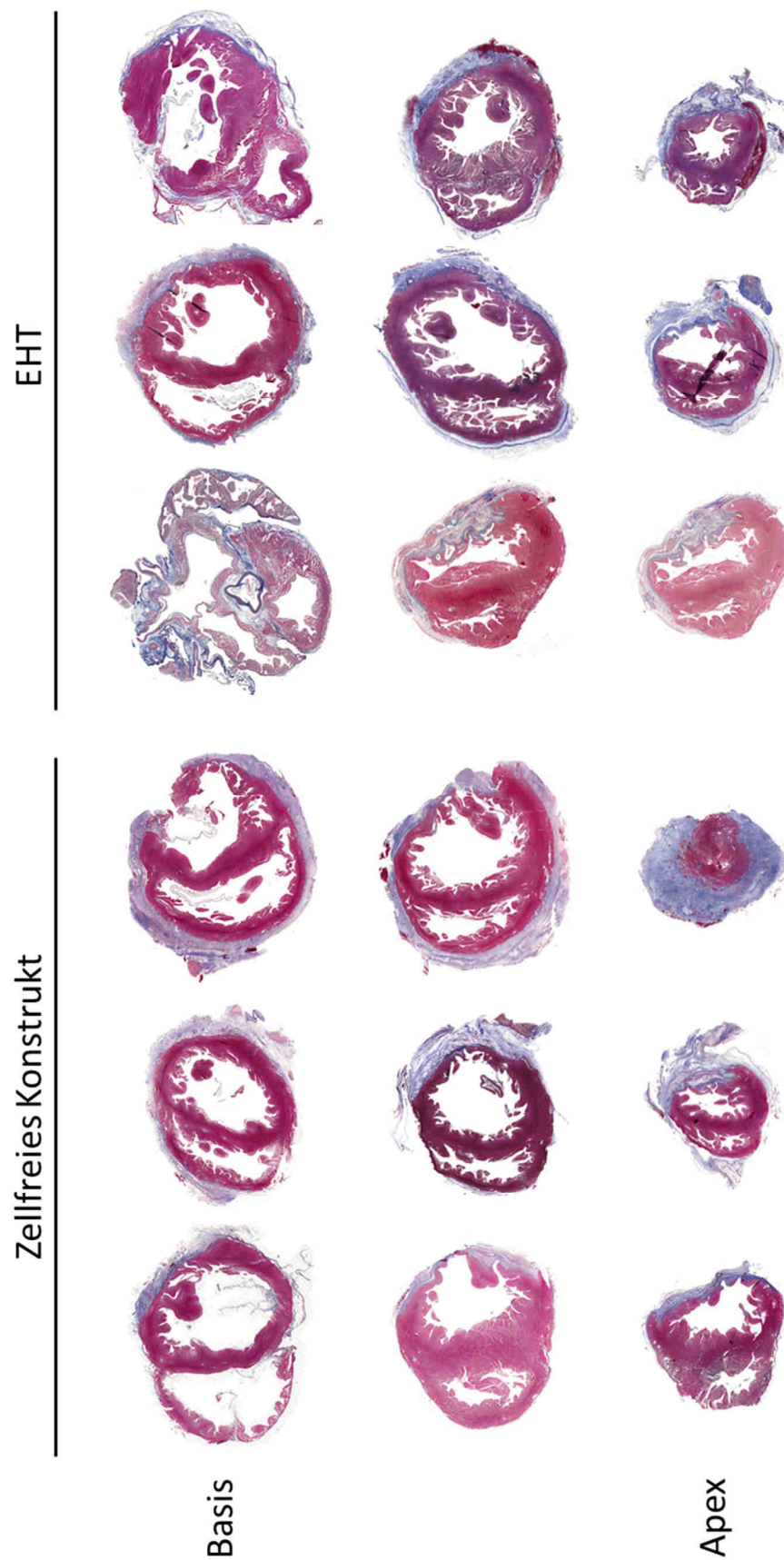


Abbildung 40: Histologische Übersicht. Querschnitte von Meerschweinchenherzen 28 Tage nach Implantation von zellfreien Konstrukten bzw. EHTs nach Masson's Trichrom-Färbung.

4.10.2.1 Infarktgröße

Die Infarktgröße wurde auf der Höhe der Mittellinie des infarzierten Bereichs in Gewebeschnitten des linken Ventrikels ermittelt. Dabei wurden als Infarktlänge die Infarktareale bestimmt, durch die mehr als 50% der Myokardwand geschädigt wurden (vgl. 3.17.2 und Abbildung 41). Durchschnittlich wurden $33,9 \pm 4\%$ des linken Ventrikels um mehr als 50% geschädigt, in vielen Bereichen war der Infarkt transmural.

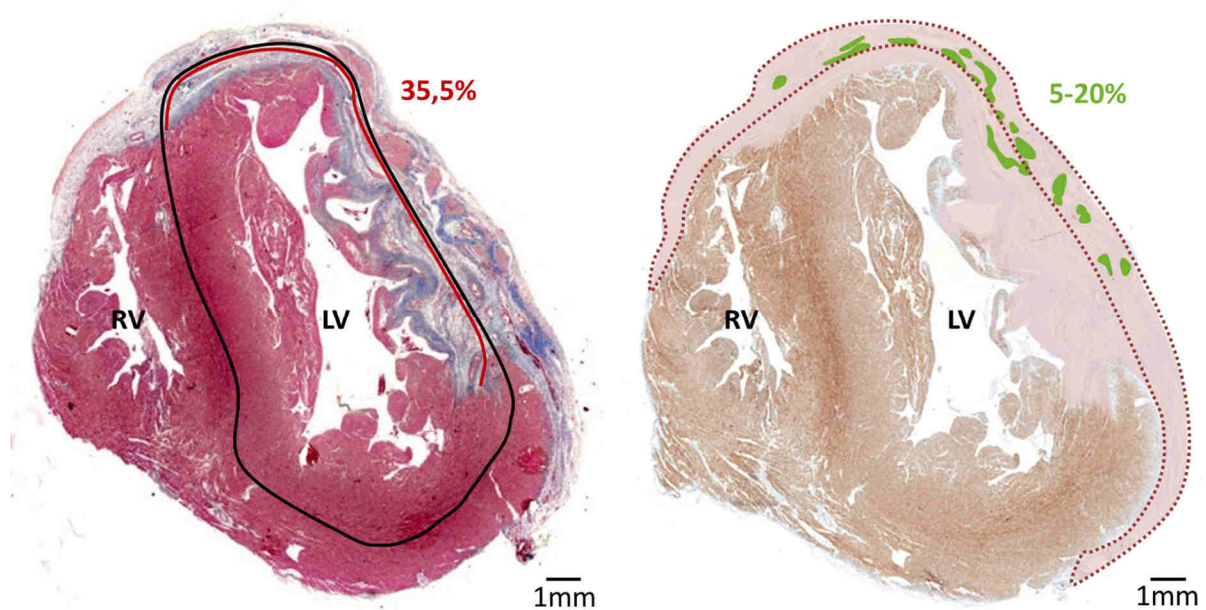


Abbildung 41: Infarktgröße (links) und ersetztes Gewebe (rechts). Querschnitte eines Meerschweinchenherzens 28 Tage nach Implantation von EHTs nach Masson's Trichrom-Färbung (links), bzw. immunhistochemischen Nachweis von Dystrophin mit in Pseudofarbe gekennzeichneteter humaner Muskelmasse (rechts). Epikardiale Verwachsungen sind durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Maßstab 1 mm.

4.10.2.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

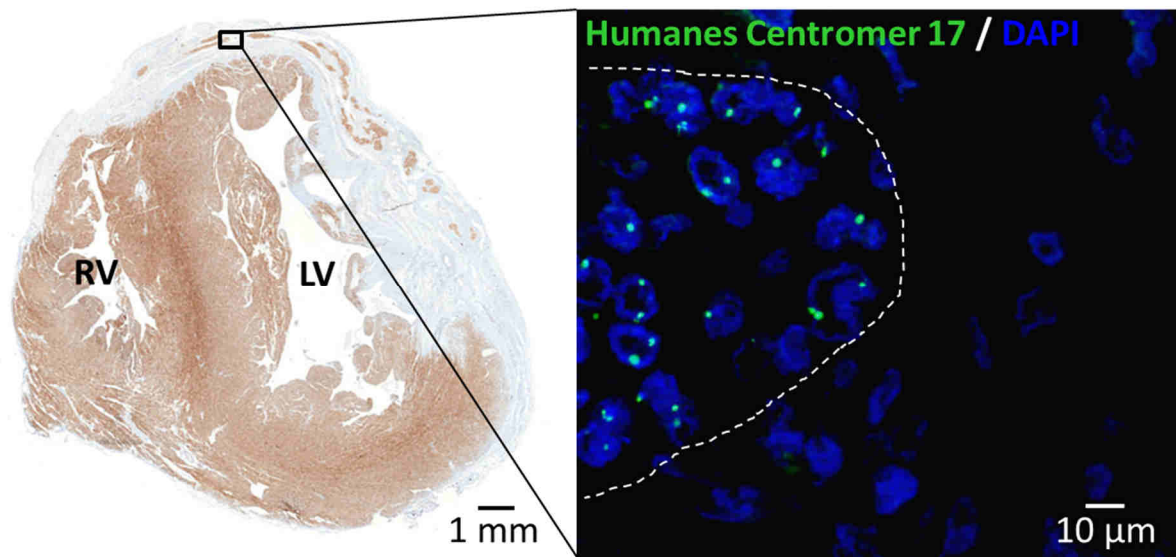


Abbildung 42: FISH-Analyse. Links: Übersicht nach immunhistochemischen Nachweis von Dystrophin. Rechts: Nachweis des humanen Centromers 17 im Bereich des Transplantates. Die gestrichelte Linie markiert die Grenze zwischen Transplantat (links) und Gewebe des Empfängertieres (rechts).

Um zu untersuchen, ob die im Transplantationsbereich des Explantates gefundenen Zellen tatsächlich humanen Ursprung haben, wurde 28 Tage nach Implantation eine FISH-Analyse durchgeführt (Abbildung 42). Die Zellen im Bereich des Transplantates zeigten nach Hybridisierung mit einer Sonde gegen humanes Centromer 17 nukleär positive Signale. Die in der angrenzenden Narbe gelegenen Zellen (vermutlich Bindegewebszellen) waren negativ.

4.10.2.3 Histologische Charakterisierung der explantierten Herzen

Um zu untersuchen, ob es sich bei den Zellen in den Zellansammlungen mit 100-800 µm im Durchmesser und bis zu 2 mm in der Länge innerhalb des infarzierten Bereiches um Kardiomyozyten handelt, wurden diese histologisch charakterisiert.

Der immunhistochemische Nachweis von Dystrophin - ein im Sarkolemm vorkommendes Zytoskelett-Protein, welches Aktinfilamente mit membranständigem Dystroglykan vernetzt - belegt das Vorhandensein von Myozyten im Bereich des Transplantates (Abbildung 43). Des Weiteren waren die Zellen im gleichen Bereich positiv für MLC-2V - einer ventrikulären Untereinheit des sarkomerischen Proteins Myosin - und Querstreifung bei einigen Zellen trotz Querschnitt-Ebene deutlich zu erkennen (Abbildung 43). Der Vergleich mit gesundem Meerschweinchenmyokard zeigte, dass die Zellen des Transplantates kleiner und weniger gleichmäßig angeordnet waren.

Insgesamt wurden etwa 5-20% des Narbengewebes durch die implantierten EHTs ersetzt (Abbildung 41). Die genaue Quantifizierung ist durch die epikardialen Verwachsungen außerhalb des linken Ventrikels schwierig (Kennzeichnung durch gestrichelte Linie).

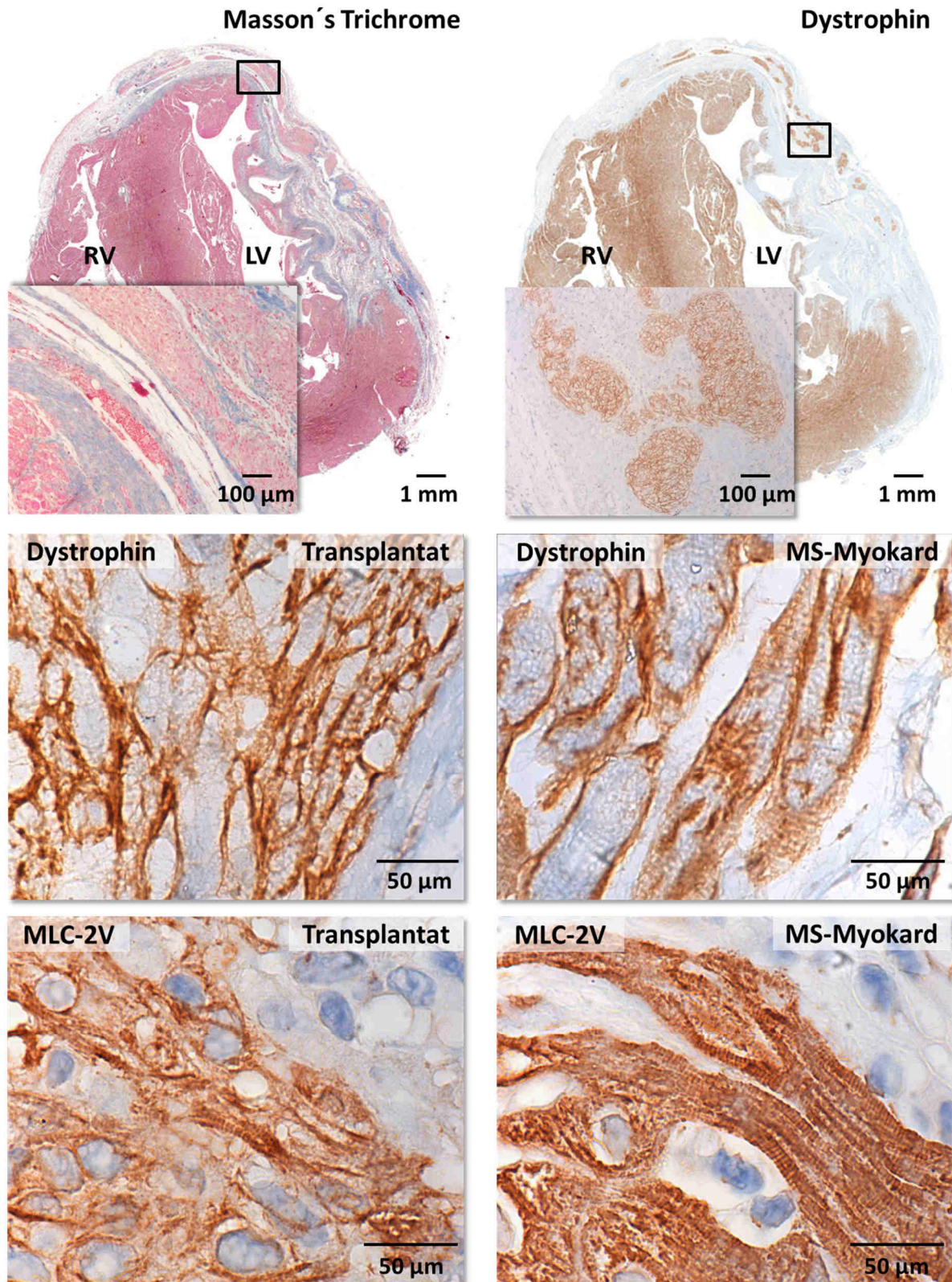


Abbildung 43: Querschnitte eines Meerschweinchenherzens 28 Tage nach Implantation von EHTs. Oben: Übersichten nach Masson's Trichrom-Färbung (links), bzw. immunhistochemischen Nachweis von Dystrophin (rechts). Mitte: Dystrophin im Transplantat und Meerschweinchenmyokard (MS-Myokard). Unten: MLC-2V im Transplantat und Meerschweinchenmyokard.

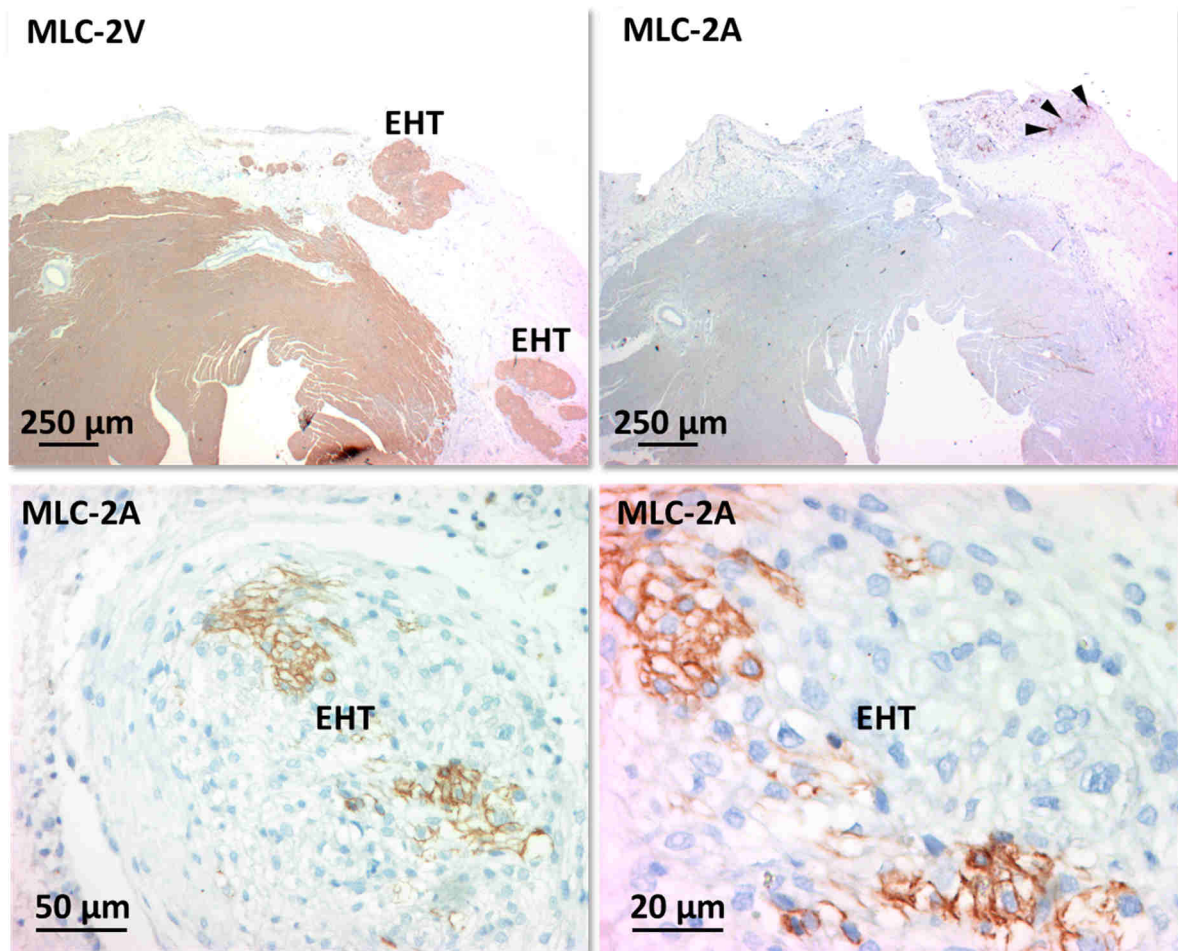


Abbildung 44: Exprimierte Isoformen der Myosin leichte Kette (MLC). Immunhistochemischer Nachweis von MLC-2A und MLC-2V 28 Tage nach Implantation von EHTs.

28 Tage nach Transplantation wurden die Explantate immunhistochemisch auf die Expression der MLC Isoformen MLC-2A und MLC-2V untersucht (Abbildung 44). Es konnten noch kleine Zellansammlungen von MLC-2A-positiven Zellen gefunden werden, allerdings exprimierten die meisten Kardiomyozyten MLC-2V. Das ventrikuläre Myokard des Empfängers erwies sich als homogen MLC-2V-positiv und MLC-2A-negativ.

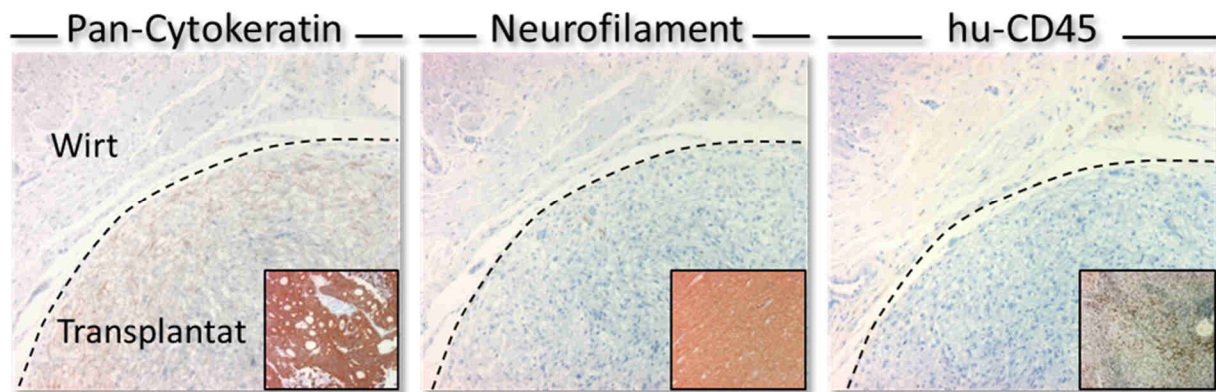


Abbildung 45: Zusätzliche Immunophänotypisierung des Transplantates mit Antikörpern gegen Pan-Cytokeratin (Epithel), Neurofilament (Neurone) und human-spezifisch CD45 (hämatolymphoide Zellen). Die kleinen eingefügten Bilder zeigen humane Gewebe als Positivkontrollen. Für Pan-Cytokeratin: Metastase eines epithelialen Tumors; für Neurofilament: Gehirn mit Rinde und Mark; für humanes CD45: Lymphknoten.

Der Transplantat-Bereich wurde bei drei Tieren exemplarisch immunhistochemisch auf nicht-kardiale Zelltypen untersucht (Abbildung 45). In den humanen Transplantaten konnten keine hämatolymphoide Zellen (human-spezifisch CD45) nachgewiesen werden. Allerdings konnten vereinzelt neuronale Zellen (Neurofilament) angefärbt werden. Bei der Färbung zum Nachweis epithelialer Zellen (Pan-Cytokeratin) zeigte sich eine leichte Braunfärbung des Transplantates, die allerdings nicht mit der Intensität der Positivkontrolle vergleichbar ist. Dies deutet darauf hin, dass es sich um unspezifischen Hintergrund handelt. Als Positivkontrollen dienten entsprechende humane Gewebe. Für Pan-Cytokeratin wurde als Positivkontrolle eine Metastase eines epithelialen Tumors verwendet, für Neurofilament Gehirn mit Rinde und Mark und für humanes CD45 ein Lymphknoten.

4.10.2.4 Vaskularisierung

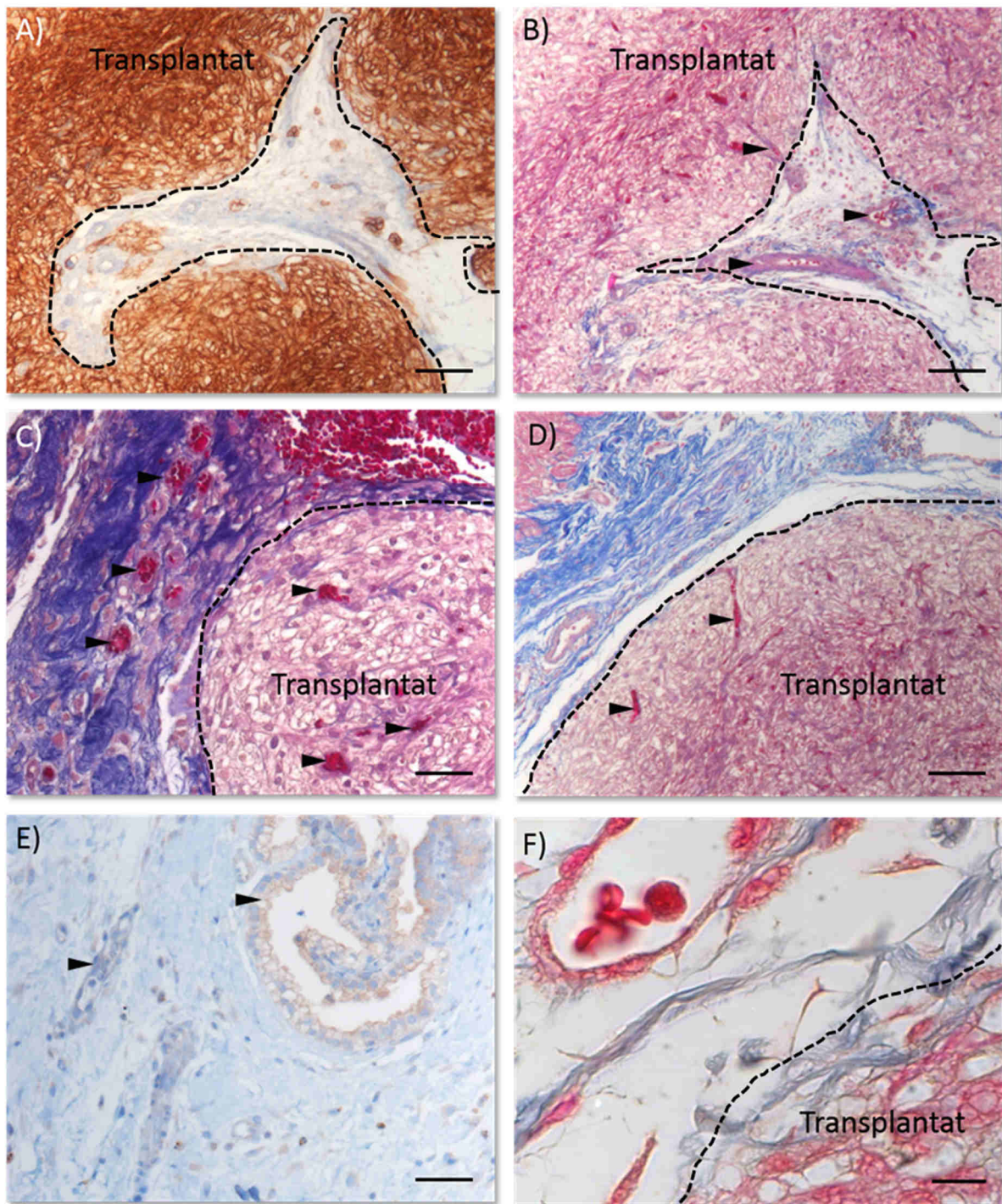


Abbildung 46: Vaskularisierung. A) Dystrophin Färbung im Transplantat. B-D) Exemplarische Darstellung von vaskularisierten Bereichen des Transplantates mit Masson-Goldner-Färbung. Gefäße, gefüllt mit Erythrozyten, sind mit Pfeilen markiert. E) Infarktgebiet nahe dem Transplantat. Markiert sind ein GFP-negatives und ein GFP-positives Gefäß (human). F) Vergrößerung eines mit Erythrozyten gefüllten Gefäßes. Maßstab A-E) 50 µm, F) 20 µm. Die gestrichelten Linien markieren die Grenze zwischen Transplantat und Gewebe des Empfängertieres.

Die Gewebeschnitte wurden bezüglich der Vaskularisierung des Transplantates analysiert (Abbildung 46). Die implantierten EHTs wurden von Gefäßen des Empfängers vaskularisiert, sowohl im Transplantat, als auch in dessen Randbereich, waren viele mit Erythrozyten gefüllte Gefäße sichtbar (Abbildung 46 B-D, F). Des Weiteren konnten benachbart zum Transplantat Gefäße nachgewiesen werden, die mit GFP-exprimierenden, humanen Endothelzellen ausgekleidet waren (Abbildung 46 E).

4.10.2.5 Proliferation

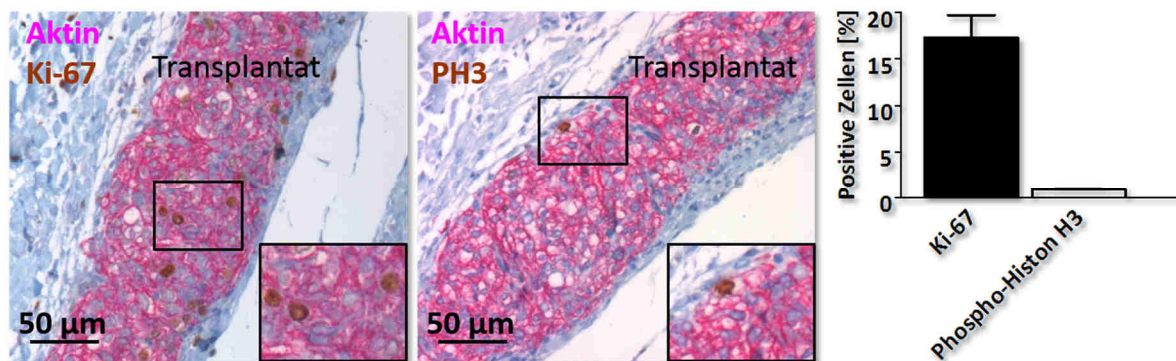


Abbildung 47: Proliferation. Immunhistochemischer Nachweis von Aktin und Ki-67 bzw. Aktin und Phospho-Histon H3 (PH3) und Quantifizierung proliferierender Aktin-exprimierender Zellen (n=3 Tiere).

Um zu untersuchen, ob 28 Tage nach Transplantation immer noch proliferierende Zellen im EHT-Bereich nachweisbar sind (vgl. 4.4.6), wurde exemplarisch an Querschnitten dreier Herzen immunhistologisch die Ko-Expression von Aktin und Ki-67, sowie Aktin und Phospho-Histon H3 (PH3) quantifiziert (Abbildung 47). Durchschnittlich waren $17,3 \pm 4,2\%$ der Aktin-exprimierenden Zellen positiv für Ki-67 und $0,9 \pm 0,1\%$ positiv für PH3.

4.10.3 Distribution humaner Zellen im Empfängerorganismus

Um Meerschweinchengewebe auf humane DNA zu untersuchen und dadurch eine Information zur möglichen Zellverschleppung aus dem Transplantat in den Gesamtorganismus zu erhalten, wurde 28 Tage nach Transplantation aus Herz, Lunge, Leber, Niere und Milz die genomische DNA isoliert und eine PCR mit Primern gegen humanes NANOG angesetzt (siehe 3.14).

Nach 40 Zyklen konnte bei 29% der Tiere in der EHT-Gruppe (n=7) in der aus der Milz isolierten DNA und bei 57% der Tiere in der aus der Lunge isolierten DNA eine Bande auf der erwarteten Höhe von 480 Basenpaaren detektiert werden. In den Organen eines EHT-transplantierten Tieres konnte in keinem der untersuchten Organe humane DNA nachgewiesen werden (14%). Bei Tieren der Kontrollgruppe (n=6), die ein zellfreies Fibrin-Konstrukt implantiert bekamen, konnte keine humane DNA nachgewiesen werden (Abbildung 48), was die Spezifität des Assays belegt.

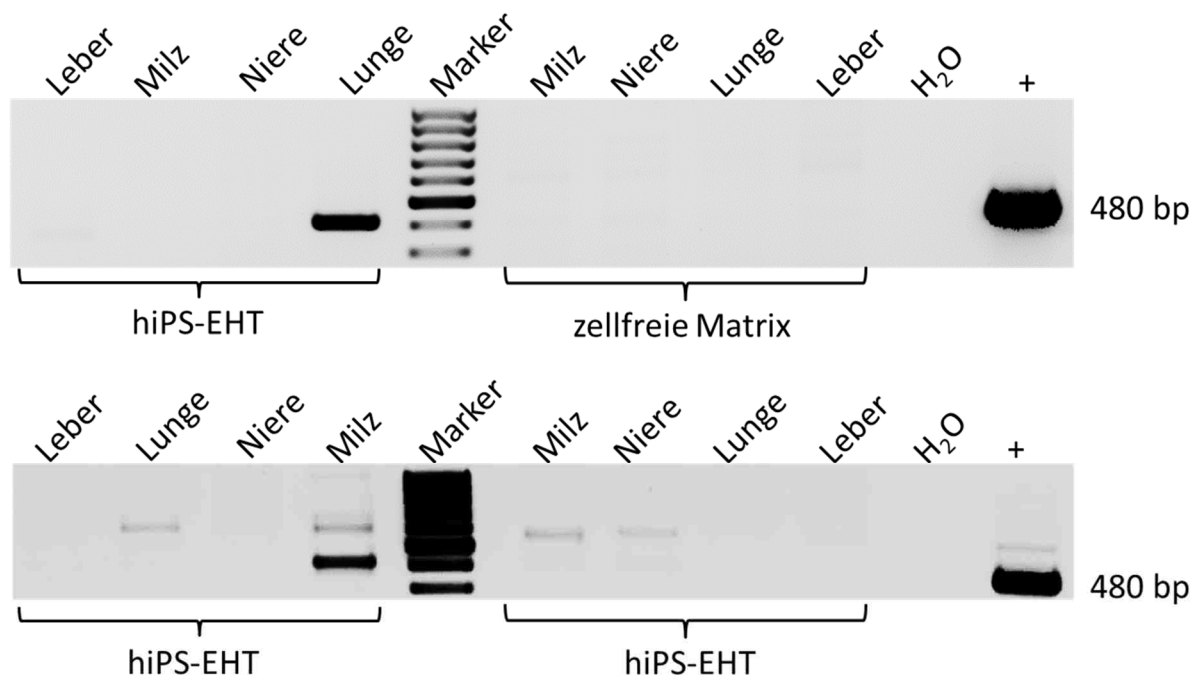


Abbildung 48: Nachweis humaner DNA in Meerschweinchenorganen. Mittels PCR mit Primern gegen humanes NANOG wurde 28 Tage nach Transplantation von hiPS-EHTs bzw. zellfreier Matrix die Distribution humaner Zellen untersucht. Als Positivkontrolle diente DNA aus einem Herzen mit hiPS-EHT Transplantaten.

4.10.4 Echokardiografie

Die Herzfunktion wurde vor Verletzung des Myokards, 7 Tage nach Verletzung und 28 Tage nach Implantation (35 Tage nach Verletzung) echokardiographisch dokumentiert. Die Untersuchungen wurden von Frau Birgit Geertz durchgeführt und ausgewertet. Die Auswertung der Aufnahmen durch Dr. Florian Weinberger oder mich führten unabhängig voneinander zu den gleichen inhaltlichen Aussagen, auch wenn die absoluten Werte systematisch voneinander abwichen.

Zur Beurteilung der linksventrikulären Kontraktilität wurden entlang der kurzen Achse des Herzens der enddiastolische und der endsystolische Durchmesser des linken Ventrikels bestimmt und die fraktionelle Flächenänderungsrate berechnet. Der enddiastolische Durchmesser des linken Ventrikels (LVIDd; Abbildung 49) veränderte sich in der ersten Woche nach Kryo-Verletzung (KV) nicht und betrug $7,9 \pm 1,0$ mm. 28 Tage nach Transplantation des zellfreien Kontroll-Konstruktes vergrößerte sich der LVIDd signifikant auf $9,9 \pm 2,1$ mm, während es nach Transplantation der EHTs nur zu einer leichten Dilatation kam (LVIDd $8,3 \pm 2,0$ mm).

Enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels

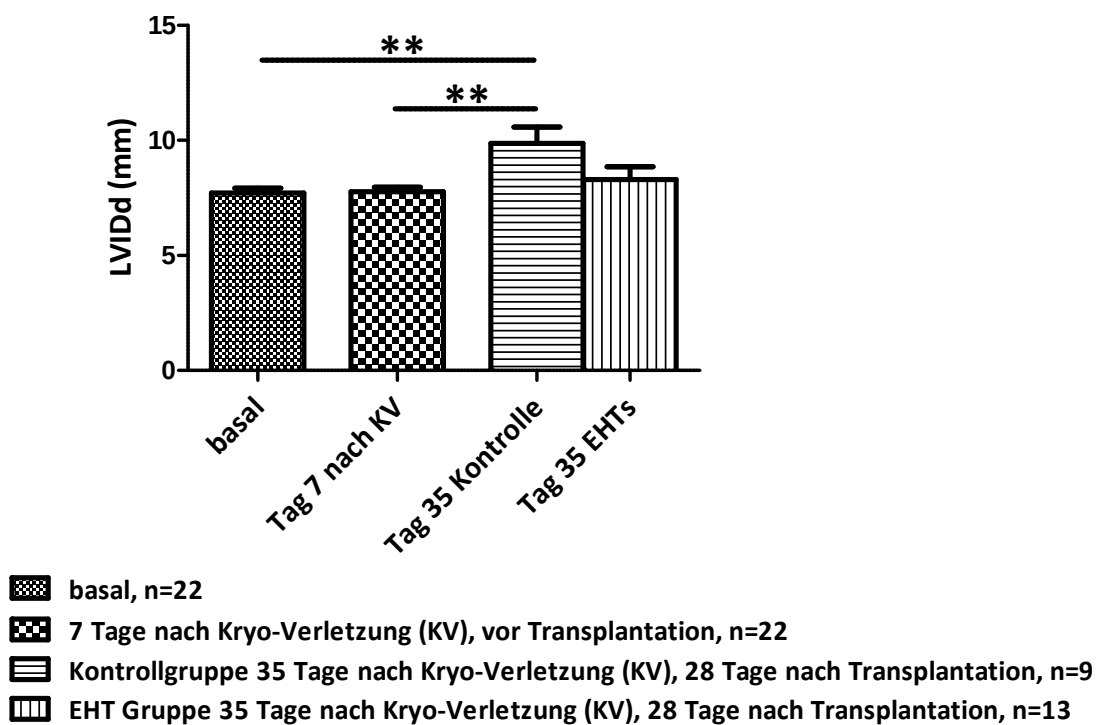


Abbildung 49: Enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels (LVIDd). Die Echokardiografien wurden entlang der kurzen Achse basal, 7 Tage nach Kryo-Verletzung (KV) und 28 Tage nach Transplantation der EHTs bzw. des Kontroll-Konstruktes durchgeführt. Fehlerbalken: SEM. **= p-Wert 0,001 bis 0,01.

Der endsystolische Durchmesser des linken Ventrikels (LVIDs; Abbildung 50) vergrößerte sich in der ersten Woche nach Kryo-Verletzung nur leicht von $5,8 \pm 1,1$ mm auf $6,5 \pm 1,0$ mm und veränderte sich in den folgenden 28 Tagen nach EHT Transplantation nicht ($6,7 \pm 1,4$ mm). Im Gegensatz dazu erhöhte sich der LVIDs nach Implantation des Kontroll-Konstruktes signifikant auf $8,4 \pm 1,9$ mm. Der LVIDs unterschied sich damit zwischen den beiden Interventionsgruppen 35 Tage nach Kryo-Verletzung signifikant.

Endsystolischer Durchmesser des linken Ventrikels

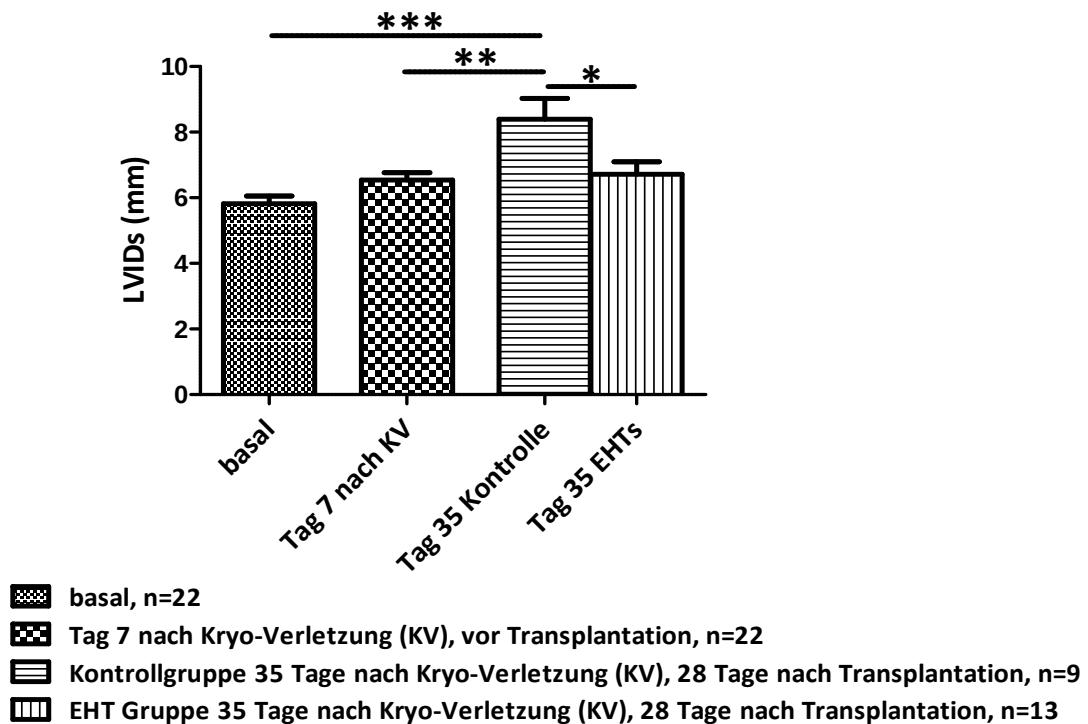


Abbildung 50: Endsystolischer Durchmesser des linken Ventrikels (LVIDs). Die Echokardiografien wurden entlang der kurzen Achse basal, 7 Tage nach Kryo-Verletzung (KV) und 28 Tage nach Transplantation der EHTs bzw. des Kontroll-Konstruktes durchgeführt. Fehlerbalken: SEM. *= p-Wert 0,01 bis 0,05; **= p-Wert 0,001 bis 0,01; ***= p-Wert <0,001.

Durch Bestimmung der fraktionellen Flächenänderungsrate (FAS) lässt sich die Kontraktilität des linken Ventrikels beurteilen. Der basale Wert lag bei $43,1 \pm 9,5\%$. 7 Tage nach KV betrug die FAS nur noch 55% des Ausgangswertes ($23,8 \pm 7,2\%$). 28 Tage nach Implantation des Kontroll-Konstruktes war die linksventrikuläre Funktion mit $24,3 \pm 12,4\%$ weiterhin stark eingeschränkt. Die Transplantation von EHTs führte hingegen zu einer signifikanten Verbesserung der FAS, die mit $38,0 \pm 13,2\%$ nur noch 11,8% unterhalb des basalen Wertes lag. Der Unterschied zwischen den beiden Interventionsgruppen war 35 Tage nach KV signifikant.

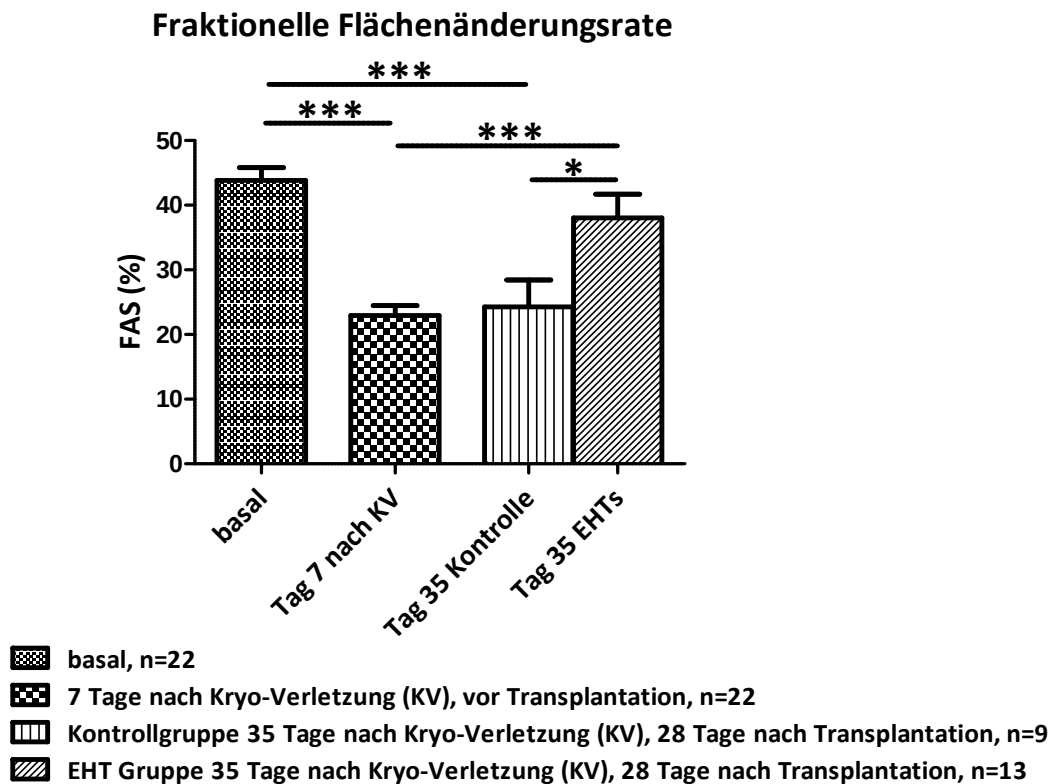


Abbildung 51: Fraktionelle Flächenänderungsrate (FAS). Die linksventrikuläre Funktion wurde basal, 7 Tage nach Kryo-Verletzung (KV) und 28 Tage nach Transplantation der EHTs bzw. des Kontroll-Konstruktes echokardiografisch entlang der kurzen Achse bestimmt. Fehlerbalken: SEM. *= p-Wert 0,01 bis 0,05; ***= p-Wert <0,001.

4.10.5 Röntgen-Mikrocomputertomografie

Um einen Überblick über den gesamten Infarktbereich zu bekommen und die Integration der EHTs in das Meerschweinchenherz beurteilen zu können, wurden μ CT-Aufnahmen des ganzen Herzens gemacht.

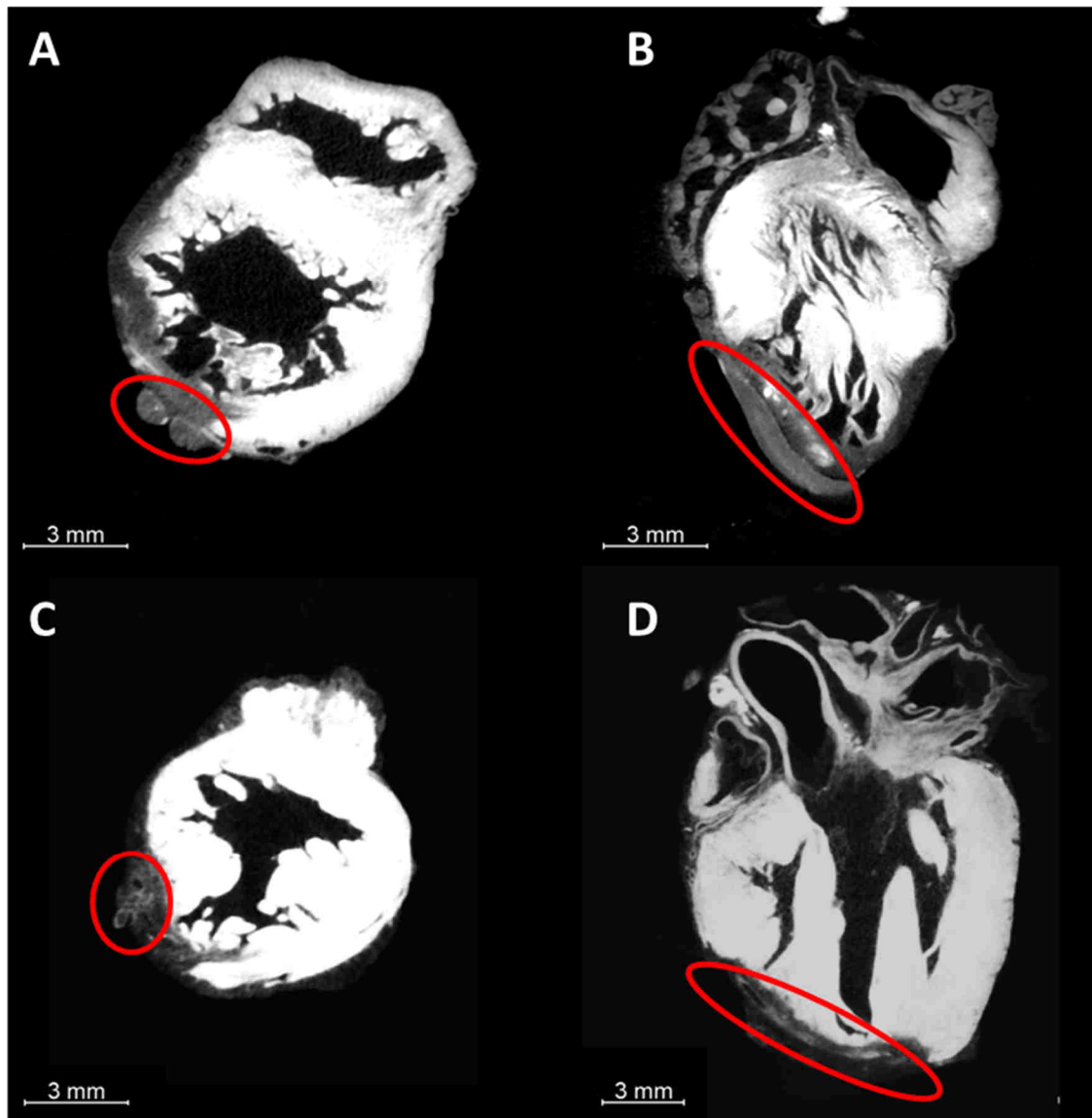


Abbildung 52: Mikro-CT Aufnahmen vom Meerschweinchenherz. A) Axiale Ansicht eines Herzens direkt nach EHT Implantation. B) Sagittale Ansicht eines Herzens direkt nach EHT Implantation. C) Axiale Ansicht eines Herzens 14 Tage nach EHT Implantation. D) Coronale Ansicht eines Herzens 14 Tage nach EHT Implantation. Hervorgehoben ist jeweils der Bereich in dem EHTs sichtbar sind.

Abbildung 52 A und B zeigen eine axiale, bzw. sagittale Ansicht des Herzens direkt nach EHT Implantation. Deutlich zu erkennen sind die große Kryo-Verletzung und die beiden EHTs, die auf dem Narbengewebe aufliegen. Sie haben die gleiche Röntgendichte wie das

Narbengewebe. Zwei Wochen nach EHT Implantation (Abbildung 52 C und D) wurden die EHTs in das fibrinöse Gewebe integriert, es bestand jedoch in den abgebildeten Ebenen kein direkter Kontakt zu gesundem Meerschweinchen-Myokard. Auffällig war der gegenüber der umliegenden Narbe deutlich höhere Kontrast des implantierten Gewebes, das nun gegenüber dieser klar abgrenzbar war.

4.10.6 2-Photon Laser-Scanning Mikroskopie

Mit Hilfe von 2-Photon Laser-Scanning Mikroskopie wurde versucht, eine etwaige elektrische Kopplung der implantierten EHTs an das Meerschweinchen-Myokard zu untersuchen. Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. Allen Kelly und Prof. Dr. Godfrey Smith am Department of Circulation and Medical Imaging der NTNU in Trondheim, Norwegen an 6 Meerschweinchen durchgeführt. Dazu wurden die Meerschweinchen im lebenden Zustand nach Trondheim verbracht.

Im gesunden Langendorff-perfundierten Meerschweinchenherz konnten Aktionspotentiale und Ca^{2+} -Signale gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurden im Narbengewebe keine Signale detektiert. Im EHT-Bereich konnten rhythmische Fluktuationen der Signalintensität detektiert werden. Allerdings stellte sich bei näherer Untersuchung heraus, dass diese synchron mit dem Takt der Perfusionspumpe waren, die keine Aussage über die Kontraktion erlaubten. Diese Versuche werden zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit wiederholt.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein Protokoll zur Differenzierung von hiPSCs zu Kardiomyozyten etabliert und in Hinblick auf Standardisierung, Arbeitsaufwand und Rentabilität entscheidend optimiert. Dadurch ist es möglich, reproduzierbar große Mengen von Kardiomyozyten und EHTs mit vergleichsweise niedrigen Kosten zu generieren. Des Weiteren konnte ein Protokoll ausgearbeitet werden, um Endothelzellen aus hiPSCs zu differenzieren, welche ohne negative Auswirkungen auf die Kontraktionskräfte in die EHTs implementiert werden konnten. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die so hergestellten humanen EHTs nach Transplantation auf das verletzte Myokard von Meerschweinchen überleben und durch Vaskularisierung in das Meerschweinchenmyokard integrieren. Die Transplantation von humanen EHTs führte zu einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion und konnte die Dilatation des linken Ventrikels vermindern.

5.1 Zellkultur humaner induzierter pluripotenter Zellen

Da die Differenzierungseffizienz entscheidend von dem undifferenzierten Status der humanen induzierten pluripotenten Stammzellen abhängig ist und die Zellen sehr empfindlich gegenüber Variationen sind, müssen die Kulturbedingungen hoch standardisiert sein. Es existieren viele verschiedene Protokolle für die Kultivierung und Expansion undifferenzierter hiPSCs, die sich in Standardisierungsniveau und Kosten unterscheiden (Thomson et al., 1998; Xu et al., 2001; Ludwig et al., 2006; Chen et al., 2011).

Durch die Kultivierung in Kolonien wird die Pluripotenz der Zellen aufrechterhalten und gleichzeitig ein hohes Differenzierungspotenzial erreicht. Des Weiteren ist hierbei zur Passage keine Dissoziation in einzelne Zellen erforderlich, was die Anwachsrate deutlich erhöht. EDTA-basiertes Passagieren ist besser standardisierbar als Enzym-basierte Techniken, und ist diesen unserer Erfahrung nach auch bezüglich Zellviabilität nach der Passage und Einfrier-/ Auftauzyklen überlegen. Um Variabilität durch nicht konsistente Zelldichten und zu große Zellkolonien zu vermeiden, wurde ein Passage Schema mit kurzen Intervallen und einer Aufteilungsrate von 1:2 bis 1:4 etabliert.

Die Pluripotenz der Zellen hängt auch ganz entscheidend von dem Kultivierungsmedium ab. Ein iPSC Medium sollte aus vollständig definierten xeno-freien Komponenten zusammengesetzt sein, eine hohe Teilungsrate der hiPSCs unterstützen, Faktoren enthalten, die eine spontane Differenzierung verhindern, und eine vorhersehbare und ökonomische Kultivierung zahlreicher hiPSC Linien ermöglichen. Bezüglich der Pluripotenz der Stammzellen ist eine vollständige Aktivierung des FGF Rezeptors ganz entscheidend (Levenstein et al., 2006; Greber et al., 2007; Lanner und Rossant, 2010; Lotz et al., 2013). An unserer hiPSC Kultur wurden drei Medien getestet, wobei eine hohe Teilungsrate, die Abwesenheit von differenzierten Bereichen in der hiPSC Kultur und die resultierende kardiale Differenzierungseffizienz als Parameter für die Beurteilung herangezogen wurden.

In MEF-konditioniertem Medium, welches das Wachstum ohne *Feeder-Layer* ermöglicht, konnten verschiedene Zelllinien ökonomisch kultiviert werden. Allerdings ist dieses Medium ungenügend definiert, da nicht bekannt ist, in welcher Konzentration die einzelnen Faktoren wie bFGF, Activin A und TGF β während der Konditionierung in das Medium abgegeben werden. Hinzu kommt, dass die murinen embryonalen Fibroblasten über einen Zeitraum von 10 Tagen zur Konditionierung verwendet werden und das geerntete Medium daher qualitative Schwankungen aufweist. Dies machte sich immer wieder durch chargenabhängige Schwankungen im Wachstumsverhalten der hiPSCs und folglich in der Differenzierungseffizienz bemerkbar. Neben diesen die Reproduzierbarkeit und Qualität der hiPSCs betreffenden Einschränkungen können durch die Verwendung von Serum oder Serumersatz im Stammzell-Kulturmedium, welche humanes oder tierisches Serum-Albumin enthalten, die strikten Voraussetzungen für eine spätere klinische oder späte prä-klinische Anwendungen nicht erfüllt werden.

Mittlerweile wurden große Fortschritte bezüglich *feeder*- und Serum-freien chemisch definierten Kulturmedien gemacht und Substrate für die adhärente hiPSC Kultur entwickelt (Li et al., 2005; Vallier et al., 2005; Chen et al., 2011). Erst vor wenigen Jahren wurde ein hiPSC-Kulturmedium entwickelt, welches auf DMEM/F-12 Medium basiert, proteinfrei ist und nur sieben weitere, vollständig definierte, xeno-freie Komponenten enthält (E8; Chen et al., 2011). Es wurde versucht, unsere hiPSC Kultur auf ein ähnliches Medium umzustellen (mTeSR E8).

Allerdings waren das Wachstum der Kulturen deutlich langsamer als in MEF-konditionierten Medium und die Anwachsrate nach der Passage niedriger. Gleichzeitig wurden tendenziell mehr differenzierte Bereiche beobachtet als in der CM-Kultur, was zum Teil auf das Fehlen von Proteinen und die geringere FGF Stabilität in nicht-konditioniertem Medium zurück zu führen sein könnte (Levenstein et al., 2006). Die Umstellung auf das vollständig definierte xeno-freie Medium FTDA mit humanem Serumalbumin, welches auf der Aktivität von Selbsterhaltungsfaktoren beruht (Frank et al., 2012), war hingegen unproblematisch. In Kombination mit einer ausreichend hohen bFGF Konzentration im Medium war die vorhersehbare und ökonomische Kultivierung zahlreicher hiPSC Linien möglich.

Da eine vollständige Aktivierung des FGF Rezeptors ganz entscheidend für die Pluripotenz der Stammzellen ist (Levenstein et al., 2006; Greber et al., 2007; Lanner und Rossant, 2010; Lotz et al., 2013) und bFGF in Zellkulturmedien sehr instabil ist, wurden dem Medium direkt vor Nutzung bFGF (CM 30 ng/ml, FTDA 10 ng/ml) zugesetzt und die Zellen jeden Tag gefüttert. In FTDA sind neben bFGF noch weitere Faktoren in definierten Konzentrationen enthalten, die den undifferenzierten Status der hiPSCs unterstützen (Activin A, TGF β) und deren Differenzierung unterdrücken (Dorsomorphin). Dies ist wahrscheinlich der Grund, weshalb bei diesem Medium der Zusatz von 10 ng/ml bFGF ausreichend war.

Eine weitere Hürde war die kontrollierte Expansion in einem Maßstab, der den klinischen Einsatz ermöglicht. Dies ist mit adhärennten Kulturen in Zellkulturschalen und -flaschen kaum realisierbar. Die Suspensionskultur von hiPSCs stellt eine machbare Alternative dar. Ein wichtiger Schritt in diese Richtung war die Beschreibung des Rho-assoziierten *coiled-coil* Kinase (ROCK) Inhibitors Y-27632 (Watanabe et al., 2007), welcher das Überleben von dissoziierten humanen embryonalen Stammzellen und hiPSCs deutlich erhöht. Der erfolgreiche Einsatz von Spinner Flaschen wurde mittlerweile mehrfach beschrieben (Krawetz et al., 2010; Singh et al., 2010; Steiner et al., 2010; Abbasalizadeh et al., 2012; Chen et al., 2012; Fluri et al., 2012; Olmer et al., 2012). Trotz der schnellen Entwicklung der hiPSC-Suspensionskulturen in diesen Studien, basieren die meisten reproduzierbaren Systeme auf kommerziell erhältlichem serumfreiem Medium, StemPro und mTeSR, welche komplex und teuer sind, und deren Zusammensetzung teilweise unbekannt ist (StemPro).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Kultivierung der hiPSCs in CM mit bFGF auf Geltrex®-beschichteten Zellkulturplatten ein effizientes Wachstum undifferenzierter Zellen und damit die Differenzierung von Kardiomyozyten/ Endothelzellen ermöglicht. Allerdings sollte in den nächsten Jahren in Hinblick auf Standardisierung und Produktion größerer Zellmengen an der Kultivierung der hiPSCs in Suspension und der weiteren Validierung des getesteten vollständig definierten Mediums gearbeitet werden.

Die Qualität der Zellen wurde anhand der für hiPSC Kolonien typischen Morphologie mikroskopisch überwacht, etwaige Mykoplasmen-Kontaminationen per PCR detektiert, und gegebenenfalls mit speziellen Antibiotika therapiert, und regelmäßig Karyotypisierungen durchgeführt. Zusätzlich könnte der Nachweis von Pluripotenz-Markern per FACS-Analyse oder qPCR Informationen über den Status der Undifferenziertheit der Zellen liefern. Dies wurde bisher nicht umgesetzt, da der Erkenntnisgewinn für den experimentellen Aufwand in Hinblick auf die Optimierung des Differenzierungsprotokolls begrenzt erschien.

5.2 Bildung von Embryoidkörperchen

Embryoidkörperchen (EBs) sind für unser Protokoll die entscheidende Stufe zur Differenzierung von pluripotenten Zellen, da sie aus Geweben bestehen, die die Stadien der zellulären Differenzierung der frühen mammalischen Embryogenese rekapitulieren (Desbaillets et al., 2000; Itskovitz-Eldor et al., 2000). Allerdings besteht ein entscheidender Nachteil von EB-basierten Differenzierungsmethoden in der inkonsistenten EB Formation.

Die spontane Kollagenase-basierte EB Entstehung ist sehr schwierig und für viele Zelllinien nicht erfolgreich. Der Erfolg hängt unter anderem von der Konfluenz der undifferenzierten Zellen ab. Des Weiteren ist die Größe und Form der EBs undefiniert und sehr variabel.

Im Gegensatz dazu ist die EB Formation durch *forced aggregation* nicht abhängig von der Konfluenz der Zellen und sie führt zu EBs definierter Größe (Ungrin et al., 2008; BurrIDGE et al., 2011). Ein großer Nachteil ist der hohe Preis für kommerziell erhältliche Mikrokavitäten-Platten. Das in dieser Arbeit beschriebene adaptierte Verfahren beruht auf der Verwendung selbst hergestellter, wieder verwendbarer Tetraederoberflächen aus Silikon mit 80 Mikrokavitäten/cm². Sie können gereinigt, autoklaviert und beschichtet werden, und stellen somit eine kostengünstige Alternative zu den kommerziell erhältlichen Einwegprodukten dar. Durch den damit verbundenen hohen Arbeits- und Zeitaufwand ist ein *up-scaling* aber schwierig, und durch die vielen händischen Arbeitsschritte sind Kontaminationen häufig.

Spinnerflasche-basierte Protokolle zur EB Formation beruhen auf der Dissoziation in einzelne Zellen und dem Aussähen dieser in durchmischter Suspension in Spinnerflaschen mit Glasbulbusimpeller (Zweigerdt et al., 2011; Olmer et al., 2012). Mit dieser Methode können vorhersehbar und unabhängig von der verwendeten Zelllinie und deren Kolonie-Dichte EBs homogener Größe hergestellt werden. Auch ein *up-scaling* ist einfach möglich. Ein Nachteil sind die Scherkräfte, die durch den Glasbulbusimpeller entstehen und die weitere Durchführung der Differenzierung in diesem Format unmöglich machen.

5.3 Differenzierung von hiPSCs zu Kardiomyozyten

Da der immense Zellverlust nach einem Myokardinfarkt durch endogene Regeneration nicht ausgeglichen werden kann, wird versucht Methoden zu entwickeln, um abgestorbenes Myokard zu ersetzen. Eine Möglichkeit besteht in der Transplantation von EHTs mit aus hiPSCs differenzierten Kardiomyozyten.

Es wurden bereits einige Protokolle zur kardialen Differenzierung veröffentlicht. Allerdings ist die inter- und intralaboratorische Variabilität sehr groß. Viele Faktoren tragen dazu bei, dass die kardiale Differenzierung so schwierig und die Reproduzierbarkeit gering ist. Insgesamt handelt es sich um technisch anspruchsvolle Protokolle und Techniken, die für eine korrekte Umsetzung einiges an Erfahrung und Sorgfalt voraussetzen. Da die Differenzierungseffizienz entscheidend von dem undifferenzierten Status der humanen induzierten pluripotenten Stammzellen abhängig ist und die Zellen sehr empfindlich gegenüber Variationen sind, müssen die Kulturbedingungen hoch standardisiert sein. Bei vielen Protokollen werden allerdings sowohl für die Kultivierung der hiPSCs, als auch für die kardiale Differenzierung, nicht standardisierte Medien-Komponenten verwendet. Hinzu kommt, dass der undifferenzierte Status schwer zu definieren und nachzuweisen ist. Während der kardialen Differenzierung, bei der viele verschiedene Schritte aufeinander aufbauen und einander bedingen, ist eine separate Qualitätskontrolle der einzelnen Schritte nicht etabliert und auch perspektivisch schwierig durchführbar, da alle Schritte fortlaufend in einem definierten Zeitraster durchgeführt werden müssen. Für die Generierung von EHTs sind außerdem deutlich höhere Differenzierungseffizienzen und mehr Kardiomyozyten notwendig als für Experimente im 2D-Format.

Wir haben uns für einen EB basierten Ansatz entschieden, da bereits gezeigt wurde, dass in diesem Format Aspekte der frühen mammalischen Embryonalentwicklung rekapituliert werden. IPS-Kardiomyozyten sind unreif und der Reifungsprozess ist nicht hinreichend untersucht. Da Kardiomyozyten *in vivo* nach der Embryonalentwicklung ausreifen, ist es bei der *in vitro* Differenzierung von Vorteil, wenn man versucht, die physiologischen Entwicklungsprozesse soweit wie möglich nachzuahmen.

5.3.1 Induktion mesodermaler Progenitoren

Im EB Format können, analog zur physiologischen Embryogenese, aus hiPSCs mesodermale Zellen induziert werden (Yang et al., 2008). Diese Phase der Differenzierung wurde in mit Pluronic® F 127-beschichteten Zellkulturflaschen in Suspension durchgeführt, was eine kostengünstige Alternative zu kommerziell erhältlichen *ultra-low attachment* Flaschen darstellt.

Das Medium enthält BMP4 (10 ng/ml), Activin A (3 ng/ml) und bFGF (5 ng/ml), drei Wachstumsfaktoren, die in vielen Publikationen für die Differenzierung von kardialem Mesoderm eingesetzt wurden (Yang et al., 2008; Kattman et al., 2011; Uosaki et al., 2011; Willems et al., 2011). Mittlerweile wurde auch ein kleinmolekularer Wnt-Signalweg Aktivator (CHIR99021) als effektiver Induktor mesodermaler Progenitoren beschrieben (Lian et al., 2013). Im Vergleich zu Protein-Wachstumsfaktoren sind kleinmolekulare Substanzen besser standardisiert und kostengünstiger. Unser Differenzierungsprotokoll erwies sich als mit CHIR9901 zur Mesoderm-Induktion kompatibel (7,5 μ M, 24 Stunden zu Beginn von Phase 1) und führte zur vergleichbar effizienten Differenzierung von Kardiomyozyten aus verschiedenen hiPSC Linien (bis zu 90% alpha-Aktinin-positive Zellen an Tag 14). Allerdings zeigten die EHTs, die aus mit CHIR99021 zur Induktion mesodermaler Progenitoren differenzierten Kardiomyozyten generiert wurden, eine verzögerte Entwicklung und ein abnormales Kontraktionsverhalten, was nach Differenzierung mit BMP4, Activin A und bFGF in dieser Form nicht beobachtet wurde. Wie oben bereits beschrieben, ist es bei der *in vitro* Differenzierung von Vorteil, wenn man versucht, die physiologischen Entwicklungsprozesse soweit wie möglich nachzuahmen. BMP4, Activin A und bFGF sind Wachstumsfaktoren, die auch unter physiologischen Bedingungen an der Induktion mesodermaler Progenitoren beteiligt sind. CHIR99021 ist hingegen ein synthetisches Molekül, dessen Auswirkungen auf die Physiologie der Zellen noch nicht genügend untersucht wurde.

Eine weitere wichtige Beobachtung war, dass die Zellzahl im EB Format leicht unterschätzt wird und dass das Zell-zu-Medium Verhältnis maßgeblich die Differenzierungseffizienz beeinflusst. Daher ist eine genaue Adjustierung des Medium Volumens zum EB Volumen (35 ml Medium für 100 μ l EBs) ganz entscheidend für den Erfolg der Differenzierung. Die

zugrunde liegenden Mechanismen sind noch unklar. Möglich ist eine Kombination aus ausreichender Nährstoffversorgung, Sauerstoff-Diffusion, Akkumulation von Stoffwechselprodukten und parakrinen Faktoren. In diesem Zusammenhang wäre die Kultivierung der EBs in Spinner Flaschen während der ersten Differenzierungsphase von Vorteil, da hier die Nähr- und Sauerstoffversorgung im Vergleich zu T175 Zellkulturflaschen verbessert ist. Erste Versuche führten jedoch durch die Scherkräfte zu einer deutlichen Reduktion des EB Volumens und wurden nicht weiter verfolgt.

Insulin ist ein Schlüssel-Regulator der kardialen Differenzierung. Allerdings wurde in mehreren Veröffentlichungen gezeigt, dass die mesodermale Induktion von humanen pluripotenten Stammzellen durch Insulin inhibiert wird (Freund et al., 2008; Tran et al., 2009; Lian et al., 2013b). Dem entsprechend beobachteten wir in Abwesenheit von Insulin in Phase 1 eine höhere Differenzierungseffizienz und gleichzeitig weniger neuroektodermale Zellen, welche im Zuge eines alternativen Spezifizierungsweges aus hiPSCs differenzieren (Lian et al., 2013b).

Wie schon für die Kultur von hiPSCs diskutiert (siehe 5.1), hat das verwendete Medium einen großen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Differenzierung. Die Verwendung von Serum oder Serumersatz (B27) hat den Nachteil, dass dessen Komponenten und deren Konzentrationen im Einzelnen nicht bekannt sind und diese Schwankungen unterliegen, welche gegebenenfalls einen negativen Effekt auf die Differenzierungseffizienz haben. Zusätzlich können bei Verwendung eines undefinierten Mediums die strikten Voraussetzungen für eine klinische oder prä-klinische Anwendung nicht erfüllt werden. Wir verwendeten für unsere Differenzierung lange Zeit RPMI-basiertes B27 Medium. Grundsätzlich ist dieses Medium für die Differenzierung geeignet und führte mitunter zu sehr guten Differenzierungseffizienzen von bis zu 90% α -Aktinin-positiven Zellen. Dennoch beobachteten wir von Lauf zu Lauf und zwischen den verschiedenen Zelllinien immer wieder große Schwankungen in der Effizienz. Diese konnten durch die Umstellung auf proteinfreies, vollständig definiertes Differenzierungsmedium deutlich verringert werden. Eine Umstellung der hiPSC Kultur auf definiertes Medium könnte zusätzlich zu einer reproduzierbareren Differenzierungseffizienz führen.

5.3.2 Kardiale Differenzierung

Nach der Induktion mesodermaler Progenitoren erfolgt die kardiale Differenzierung. Da dieser Schritt in Suspensionskultur zu unbefriedigenden Ergebnissen führte, wurden die EBs für ein adhärentes Format in beschichtete T75 Flaschen oder Schalen mit 6 Vertiefungen überführt.

Für die Beschichtung wurden unterschiedliche Proteinlösungen (Gelatine, Matrigel™, Laminin, Geltrex®) in verschiedenen Konzentrationen getestet. Dabei zeigte sich, dass die Verwendung von Geltrex® in einer Verdünnung von 1:200 am besten geeignet ist, die Adhäsion der EBs und eine effiziente kardiale Differenzierung zu gewährleisten. Die gleichmäßige Verteilung der EBs auf der Wachstumsoberfläche erwies sich als gut reproduzierbar, und ermöglichte eine ausreichende Nähr- und Sauerstoffversorgung und Proliferation der einzelnen Zellen im EB.

Um die Differenzierung zu Kardiomyozyten voranzutreiben, werden potente kleinmolekulare Wnt-Antagonisten eingesetzt (Willems et al., 2011; Lanier et al., 2012). Während unserer Optimierungsversuche testeten wir verschiedene Substanzen, wie IWR-1, IWP-4, DS-I-6 und DS-I-7. Die beiden IWR-1 Analoga DS-I-6 und DS-I-7 lieferten bei einer Konzentration von 100 nM vergleichbare Ergebnisse wie das Stammolekül IWR-1 und haben deutlich niedrigere IC₅₀ Werte (IC₅₀ IWR-1 0,2 µM; IC₅₀ DS-I-6/7 unter dem µM Bereich; Willems et al., 2011). FACS-Analysen zeigten, dass alle Moleküle potent die kardiale Differenzierung fördern. Im Gegensatz dazu hatte der Wachstumsfaktor VEGF, welcher von anderen Arbeitsgruppen in dieser Phase der Differenzierung eingesetzt wird (Yang et al., 2008), keine Auswirkungen auf die Differenzierungseffizienz.

Bei erfolgreicher Differenzierung können spontan kontrahierende Bereiche zwischen Tag 8 und 10 beobachtet werden. Eine Limitation des Differenzierungsprotokolls ist die gemischte Population unterschiedlicher Typen von Kardiomyozyten. Bisher gelang es noch nicht, überzeugende Protokolle zur gezielten Differenzierung atrialer oder ventrikulärer Kardiomyozyten zu etablieren. Durch genetische Marker wurden ventrikuläre Kardiomyozyten in der Vergangenheit nachträglich über ihre MLC-2V Expression selektioniert (Bizy et al., 2013).

Die mit dem in dieser Arbeit etablierten Protokoll erreichten Differenzierungseffizienzen von 90% sind im Vergleich zu anderen veröffentlichten Protokollen, die im EB Format mit Wachstumsfaktoren arbeiten, deutlich höher. Die höchste, mit einem vergleichbaren Protokoll erreichte, veröffentlichte Effizienz bei der kardialen Differenzierung wird in der Arbeit von Yang et al., 2008 mit 40-50% Kardiomyozyten angegeben. Mit neueren Protokollen, die PSCs im 2D-Format mit kleinmolekularen Substanzen zu Kardiomyozyten differenzieren (Lian et al., 2013), wurden mit unserem Wert vergleichbare Differenzierungseffizienzen erreicht. Allerdings hat unser Protokoll den Vorteil Wachstumsfaktoren zu nutzen, die auch an den physiologischen Entwicklungsprozessen beteiligt sind. Die Auswirkungen der Nutzung von synthetischen Molekülen auf die Physiologie der Zellen sind bislang noch nicht genügend untersucht.

5.3.3 Analyse der differenzierten Kardiomyozyten

Anhand der erstellten Expressionsprofile konnte der beschriebene Verlauf der Differenzierung gut abgebildet werden.

Undifferenzierte hiPSCs exprimierten OCT-4, NANOG und SOX-2. Nach Beginn der Differenzierung wurden diese Gene herunter reguliert und Gene der mesodermalen Entwicklung (Brachyury und MESP1) erreichten an Tag zwei ihr maximales Expressionsniveau. KDR, ein Gen der frühen kardialen Vorläufer, wurde ab Tag vier exprimiert und der früh-kardiale Transkriptionsfaktor ISL1 erreichte zwischen Tag sechs und zehn seine maximale Expression. Die Expression der kardialen Gene MYH6, MYH7 und TNNT2 war zu Beginn der Differenzierung aus ungeklärten Gründen noch niedriger als bei undifferenzierten Zellen. Zwar wurde die maximale Expression zu späteren Zeitpunkten der Differenzierung beobachtet, aber schon während der mesodermalen Entwicklung konnte im Vergleich zu undifferenzierten Zellen eine deutlich gesteigerte Expression gemessen werden. Bei den untersuchten Differenzierungsläufen (n=4) waren die Schwankungen der Genexpression relativ gering, was von einer guten Reproduzierbarkeit des Entwicklungsverlaufes zeugt.

FACS-Analysen zeigten jedoch zum Teil große Schwankungen in der Differenzierungseffizienz zwischen verschiedenen Differenzierungsläufen und Zelllinien. Bei guten Läufen konnten 60-90% α -Aktinin, bzw. Troponin T positive Zellen nachgewiesen werden. Die Genexpressionsanalyse von für verschiedene Zelltypen charakteristischen Genen zeigte, dass

neben Kardiomyozyten vor allem Fibroblasten und neuroektodermale Zellen differenzieren. Das Vorhandensein von neuroektodermalen Zellen zeugt davon, dass schon zu einem frühen Zeitpunkt der Differenzierung, vor Entstehung des kardialen Mesoderms, alternative Entwicklungswege eingeschlagen werden. Es ist daher ganz entscheidend, nur qualitativ hochwertige, vollständig undifferenzierte hiPSCs einzusetzen und die Induktion der mesodermalen Progenitoren gut zu kontrollieren.

Die hiPS-Kardiomyozyten erreichen nach erfolgreicher Differenzierung keinen adulten Phänotyp. Es wurden spontane Kontraktionen beobachtet, die sich dann in der Zellschicht ausbreiteten. Adulte ventrikuläre Kardiomyozyten müssen hingegen zur Depolarisation elektrisch stimuliert werden. Im Gegensatz zu adulten Kardiomyozyten sind die aus hiPSCs generierten Zellen proliferativ, und sie exprimieren überwiegend die fetale Isoform der Myosin-leichte-Kette MLC-2A. Des Weiteren durchlaufen Kardiomyozyten während ihrer Entwicklung eine Reihe von strukturellen und funktionellen Veränderungen. So unterscheiden sich fetale von adulten Zellen unter anderem in ihrer Morphologie, der Expression sarkomerischer Proteine - was einen großen Einfluss auf deren kontraktile Funktion hat - strukturellen und funktionellen Merkmalen der Mitochondrien, ihrem Metabolismus, ihrer nukleären Ploidie und den elektrophysiologischen Eigenschaften (Yang et al., 2014). Diese Parameter wurden bisher an den in unserer Arbeitsgruppe differenzierten hiPS-Kardiomyozyten nicht untersucht.

Als kardialer Gewebeersatz eigneten sich hiPS-Kardiomyozyten, deren elektrische und mechanische Eigenschaften dem nativen Myokard möglichst ähnlich sind. Auch für deren Anwendung bei der Krankheitsmodellierung und beim *Drug Screening* wären reife Kardiomyozyten von Vorteil, da sie die Physiologie des adulten Herzens besser widerspiegeln. Daher wäre es sinnvoll, zukünftig verstärkt an der Reifung dieser Zellen zu arbeiten.

Mit der Implementation der hiPS-Kardiomyozyten in EHTs ist bereits ein wichtiger Schritt zur Reifung der Zellen gemacht (siehe auch 5.6). Im Verlauf der Kultivierung im EHT änderte sich das Expressionsprofil der Myosin-leichte-Kette, sodass bereits nach zwei Wochen ein erheblicher Anteil der hiPS-Kardiomyozyten nicht mehr die fetale, sondern die ventrikuläre

Isoform (MLC-2V) synthetisierte. Diese Änderung des Expressionsprofils wurde von anderen Arbeitsgruppen zeitabhängig auch im 2D Format beobachtet (Burridge et al., 2014).

Andererseits wurde bei Rattenkardiomyozyten beobachtet, dass adulte Kardiomyozyten nach Injektion in Kryo-verletzte Rattenherzen, im Gegensatz zu fetalen und neonatalen Kardiomyozyten, nicht überleben (Reinecke et al., 1999). Dies könnte auf den durch oxidative Metabolisierung von Fettsäuren, gegenüber unreifen Kardiomyozyten gesteigerten Sauerstoffbedarf zurückzuführen sein, der nach Injektion in, bzw. Transplantation auf Narbengewebe wegen fehlender Vaskularisierung nicht gedeckt werden kann. Wann also der beste Zeitpunkt, bzw. Reifepunkt für eine Transplantation ist, und ob sich hierbei EHTs von Einzelzellen unterscheiden, ist bisher unklar.

5.3.4 Anreicherung von Kardiomyozyten

Um aus hiPSCs generierte Kardiomyozyten erfolgreich für klinische Fragestellungen nutzen zu können, müssen diese einen für die jeweilige Anwendung ausreichend großen Anteil der differenzierten Zellpopulation ausmachen. Da die Differenzierung nach wie vor schwierig ist und die Effizienz teilweise großen Schwankungen unterliegt, wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Methoden zur Anreicherung von Kardiomyozyten ausgearbeitet. Mit Hilfe von Dichtegradienten-Zentrifugation (Laflamme et al., 2007), genetischen Modifikationen, bei denen kardial-spezifische Promotoren die Expression von Antibiotikum Resistenzgenen regulieren (Kim et al., 2010), mitochondriellen Farbstoffen (Hattori et al., 2010), oder Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmarker wie SIRPA (Dubois et al., 2011) und VCAM1 (Uosaki et al., 2011), konnten Populationen von großer Reinheit gewonnen werden. Allerdings führen alle Aufreinigungsmethoden zu einem großen Verlust an Kardiomyozyten und einige dieser Methoden sind bei einer nachfolgenden Transplantation der Kardiomyozyten nicht geeignet, da sie entweder nur zu einer unzureichenden Reinheit führen, die Zellen schädigen, oder genetisch verändern.

Kardiomyozyten sind in der Lage, verschiedene Substrate wie Glukose, Fettsäuren und Laktat effizient zur Energiegewinnung zu nutzen. Diese einzigartige metabolische Eigenschaft nutzten Tohyama et al., 2013, um effektiv und nicht-invasiv Kardiomyozyten aufzureinigen. In Anlehnung an diese Arbeit etablierten wir ein Protokoll zur Anreicherung von

Kardiomyozyten, was während der Optimierungsphase auch die Nutzung von Populationen ermöglichte, die ursprünglich nur einen geringen Anteil von Kardiomyozyten aufwiesen. Allerdings ging diese Methode ebenfalls mit einem hohen Zellverlust, auch von Kardiomyozyten, einher. Die Kardiomyozyten müssen eine gewisse Reife haben, um Laktat verstoffwechseln zu können. Dieser Punkt ist bisher wenig definiert und untersucht. Des Weiteren ist es erforderlich, in kurzen Zeitabständen das Kulturmedium zu wechseln, da sterbende Zellen zu zytotoxischen Effekten auf die anderen Zellen haben und außerdem durch die verbleibenden Zellbestandteile das Medium mit Nährstoffen angereichert wird, was den Selektionsmechanismus entscheidend abschwächt. Der Mediumwechsel ist jedoch, vor allem bei fortschreitender Selektion schwierig, da die zuvor stabilen EBs durch das Sterben vieler Zellen immer instabiler werden und sich leicht von der Wachstumsoberfläche ablösen.

Mit fortschreitender Optimierung des Differenzierungsprotokolls entschieden wir uns daher, auf diesen zusätzlichen Schritt zu verzichten und die Kardiomyozyten direkt für die Generierung von EHTs einzusetzen.

5.4 Teratomassay

Der Einsatz von aus hiPSCs generierten Zellen in der Gewebeersatztherapie birgt theoretisch ein Teratogenitätsrisiko. In einem SCID beige-Maus Teratomassay wurde daher untersucht, ob die Transplantation von differenzierten hiPS-Kardiomyozyten mit einem geringeren Teratomrisiko verbunden ist als die Transplantation von undifferenzierten hiPSCs.

Es zeigte sich, dass nach Applikation von hiPS-Kardiomyozyten ein geringes Risiko für Teratomentstehung bestehen bleibt (1 von 23 Injektionen). Die bei dieser einzigen Injektion mit Teratomausgang verwendete Charge von hiPS-Kardiomyozyten wurde nur bei einem Tier appliziert, so dass nicht klar ist, ob sie grundsätzlich teratogen war. Möglicherweise waren die Kardiomyozyten in dieser Charge noch nicht vollständig differenziert, da zu jenem Zeitpunkt die Optimierungsversuche noch nicht so weit voran geschritten waren, wie am Ende dieser Arbeit.

Diese Ergebnisse zeigen in jedem Fall, dass es erforderlich ist, Kriterien für eine angemessene Qualitätskontrolle auszuarbeiten, um das große Potential für den medizinischen Einsatz von aus hiPSCs differenzierten Zellen nutzen zu können. Dies könnte durch einen mehrstufigen Prozess realisiert werden, bei dem zunächst der Erfolg der Differenzierung in den gewünschten Zelltyp durch Nachweis spezifischer Proteine mittels FACS-Analysen bestätigt und anschließend die Expression von Pluripotenzgenen mittels quantitativer PCR ausgeschlossen wird (Kuroda et al., 2012). Außerdem könnten große Chargen hergestellt und kleine Aliquots davon prätherapeutisch zur Teratomtestung an einer ausreichend großen Zahl von immunkompromittierten Mäusen verwendet werden.

Die hier verwendeten iPSCs wurden durch die Retrovirus-medierte Transduktion der vier Transkriptionsfaktoren c-Myc, Oct3/4, Sox2 und Klf4 generiert (Takahashi und Yamanaka, 2006). Für die klinische Anwendung sind sicherlich Reprogrammierungsmethoden vorzuziehen, welche die Transgene ohne retro- oder lentivirale Transduktion in die Zellen bringen, da eine zufällige genomische Integration andere Gene (z.B. Tumorsuppressorgene, oder Kardiomyozytengene) in ihrer Funktion beeinträchtigen kann. Durch die Transduktion der Reprogrammierungsfaktoren mit Adenoviren, Sendaiviren, Plasmidvektoren und

entfernbaren Transposon Systemen kann dieses Risiko wahrscheinlich umgangen werden (Okita et al., 2008; Stadtfeld et al., 2008; Fusaki et al., 2009; Kaji et al., 2009; Woltjen et al., 2009).

5.5 Differenzierung von hiPSCs zu Endothelzellen

Da bereits in mehreren Studien gezeigt wurde, dass die Kokultivierung von Endothelzellen in künstlichen Geweben deren Vaskularisierung und Funktionalität erhöht (Narmoneva et al., 2004; Levenberg et al., 2005; Sekine et al., 2008), und das Beifügen von HUVECs und MEFs in künstliche Herzgewebe sogar zu einem vermehrten Anschluss an die Vaskulatur des Empfängers und zu größeren überlebenden Implantaten führte (Stevens et al., 2009), wurde ein Protokoll zur Differenzierung von hiPSCs zu Endothelzellen ausgearbeitet.

Wie für die kardiale Differenzierung wurden viele Protokolle zur Differenzierung von hESCs und hiPSCs zu Endothelzellen veröffentlicht, welche im 3D EB Format oder 2D Monolayer durchgeführt werden, und entweder Medium mit Serum, oder chemisch definiertes Medium mit Cytokinen und Wachstumsfaktoren nutzen.

In einem mehrstufigen Prozess werden zunächst analog zur kardialen Differenzierung mesodermale Progenitoren induziert und dann durch hohe Konzentrationen von bFGF und VEGF Endothelzellen differenziert.

Voraussetzungen für eine erfolgreiche Differenzierung waren, wie unter 5.1 und 5.2 beschrieben, vollständig undifferenzierte hiPSCs und die erfolgreiche EB Formation. Diese Schritte wurden genau wie bei der kardialen Differenzierung durchgeführt.

Die Induktion mesodermaler Progenitoren und endotheliale Differenzierung erfolgte in einem StemPro®-34-basierten Medium, da die Differenzierungseffizienz in RPMI-basiertem Medium bisher geringer war. Die mit dem hier etablierten Protokoll erreichten Differenzierungseffizienzen von bis zu 25% CD31-exprimierender Zellen sind mit bereits veröffentlichten Werten vergleichbar (Costa et al., 2013; White et al., 2013; Orlova et al., 2014).

Weil die mit den bisher veröffentlichten Protokollen erreichten Differenzierungseffizienzen relativ gering sind, nutzen viele Arbeitsgruppen fluoreszenz-aktivierte, oder magnetisch-aktivierte Zellsortierung (FACS bzw. MACS), um Endothel-Vorläuferzellen oder reifende Endothelzellen zu isolieren. Wir entschieden uns für die Aufreinigung CD31-exprimierender Zellen nach der zweiten Differenzierungsphase mittels MACS, da in unseren Händen der Nachweis KDR-positiver Zellen an Tag 6 der Differenzierung nicht gut funktionierte und die Aufreinigung durch FACS, bei vergleichbar hohem Zellverlust, mit deutlich höherem technischen Aufwand verbunden war. Zwar war der Zellverlust bei zwei Zyklen MACS auch hoch (ca. 50%), aber es konnten reproduzierbar über 90% reine Endothelzellen gewonnen werden. Entscheidend für eine gute Ausbeute war die vollständige Dissoziation der EBs, denn an den CD31-positiven Zellen haftende CD31-negative Zellen verringerten die Effizienz der Anreicherung. Außerdem führte ein Überladen der MACS-Säule dazu, dass CD31-positive Zellen mit dem Durchfluss verloren gehen. Durch Optimierung dieser kritischen Punkte könnte es möglich sein, die hiPS-Endothelzellen in nur einem MACS Zyklus auf die gewünschte Reinheit zu sortieren.

Da Endothelzellen sehr proliferativ sind, konnten aus wenigen aufgereinigten Zellen genügend Endothelzellen für unsere Anwendungen expandiert werden. Allerdings gestaltete sich die Entwicklung eines geeigneten Kulturmediums sehr schwierig. Kommerziell erhältliche Medien für Endothelzellen, welche bei der Kultivierung von HUVECs zu hohen Proliferationsraten führen und eine Kultivierung über viele Passagen ermöglichen, waren nicht für hiPS-Endothelzellen geeignet. Die Zellen wurden nicht adhärent und gingen nach kurzer Zeit in Apoptose. Erst der Zusatz von bovinem Plättchen-armen Serum in humanem serumfreien Medium mit hohen VEGF und bFGF Konzentrationen führte zum Erfolg.

Die Genexpressionsanalyse an Tag 14 der Differenzierung zeigte erwartungsgemäß eine im Vergleich zu hiPSCs geringere OCT-4 Expression und eine starke Expression der endothelialen Marker KDR (VEGFR), CD31 und VE-Cadherin. In einem Matrigel™ Plug Assay bildeten die hiPS-Endothelzellen wie HUVECs vaskuläre Netzwerk-ähnliche Strukturen, was für eine normale biologische Funktion dieser Zellen spricht. Zur genaueren Charakterisierung der hiPS-Endothelzellen können in Zukunft noch weitere, für Endothelzellen typische, Eigenschaften

überprüft werden. Hierzu zählen die Inkorporation von Dil-Ac-LDL (1,1'-diocradecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat-acetyliertes Lipoprotein niedriger Dichte), die Migration entlang eines VEGF Gradienten und das Einwachsen in Kollagen Gele.

5.6 Engineered Heart Tissue (EHT)

Die Implantation von künstlichen Herzgeweben stellt eine Therapiestrategie zur Behandlung der aus einem Myokardinfarkt resultierenden Herzinsuffizienz dar, und entsprechende Gewebe sind in unterschiedlichen Formaten entwickelt worden (Eschenhagen et al., 2012; Hirt et al., 2014b). Sie unterscheiden sich in der Größe des Konstruktes, der Art der Aufspannung, der extrazellulären Matrix und der Technik zur Analyse der Kontraktilität.

Fibrin-basierte EHTs im Streifenformat können unter geringem Aufwand mit hohem Grad an Standardisierung im 24- und 6-Vertiefungen Format hergestellt werden. Fibrin als extrazelluläre Matrix hat die Vorteile, von verschiedenen Spezies verfügbar und biodegradierbar zu sein, schnell zu gelieren und gut an den Silikon-Halterungen zu haften.

Direkt nach der Generierung der EHTs sind diese noch sehr dick und instabil und die Silikon-Halterungen stehen parallel zueinander. Nach kurzer Zeit in Kultur beginnen sich die Muskelstreifen durch Umformung der Matrix zu verkürzen, wodurch die Silikon-Halterungen aufeinander zu gebogen werden. Dies stellt eine entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung der EHTs dar, da die Muskelstreifen hierdurch auxoton kontrahieren. Dies kommt im Gegensatz zu statischer Dehnung den physiologischen Bedingungen gleich.

In den hier vorgenommenen Untersuchungen mit hiPSC-EHTs bildeten die Kardiomyozyten in der Fibrinmatrix entlang der Kraftlinien ein Netzwerk kontrahierender Zellen aus und zeigten eine klare sarkomerische Organisation von α -Aktinin und MLC-2V. Dabei nahm die Dichte an Kardiomyozyten zum Inneren des EHTs deutlich ab, was wahrscheinlich unter anderem auf eine begrenzte Nähr- und Sauerstoffdiffusion schließen lässt. Im Vergleich zu EHTs aus neugeborenen Ratten waren die Dichte an Kardiomyozyten aber insgesamt eher höher und die Verteilung im Querschnitt gleichmäßiger, was wahrscheinlich auf eine hohe Hypoxieresistenz hinweist. Außerdem war die eingesetzte Zelldichte höher als bei den Ratten-EHTs. Die beobachtete Orientierung der Zellen im EHT konnte in anderen künstlichen

Herzmuskelkonstrukten nicht gezeigt werden (Caspi et al., 2007; Shapira-Schweitzer et al., 2009). In Konstrukten aus hESC-Kardiomyozyten konnte ansatzweise eine Orientierung beobachtet werden. Allerdings konnte kaum eine Elongation der Zellen und eine gleichmäßige Querstreifung beobachtet werden (Tulloch et al., 2011).

Eine wichtige Aufgabe besteht in der Zukunft darin, die EHTs zu perfundieren. Dies könnte nicht nur für die Qualität der EHTs an sich, sondern auch in Hinblick auf den *in vivo* Einsatz als Transplantat von Vorteil sein. Im gesunden Gewebe ist jede Kardiomyozyte von Kapillaren umgeben, die von Endothelzellen und Perizyten stabilisiert werden. Zwischen den Kardiomyozyten liegen kardiale Fibroblasten, und größere Koronargefäße, welche von vaskulären glatten Muskelzellen umgeben sind, sorgen für eine ausreichende Blutversorgung. Da diese komplexe Gewebearchitektur sehr wichtig für die normale Funktion ist, muss auch für künstliche Herzgewebe eine Kokultur verschiedener Zelltypen angestrebt werden. Ein wichtiger Schritt in diese Richtung war die Entwicklung einer *in vitro* Perfusionsmethode von EHTs, bei der Mikrokanäle in die Fibrinmatrix integriert wurden, welche von Endothelzellen besiedelt wurden (Vollert et al., 2014). Auf diese Weise konnte die Sauerstoffkonzentration und folglich die Zahl der Kardiomyozyten im Inneren der EHTs erhöht werden. Problematisch für eine spätere Anwendung sind allerdings der hohe Aufwand und der zunehmende Komplexitätsgrad, was einer klinischen Anwendung entgegensteht. Gerade unter diesem Aspekt ist der Erfolg der in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen einfachen Transplantation sehr wichtig.

An EHTs im 24-Vertiefungen Format konnte gezeigt werden, dass kontinuierliche elektrische Stimulation zu einer höheren Kraftentwicklung von EHTs führt. Dies spiegelte sich in einer höheren Zelldichte im Inneren der EHTs und einer verbesserten Sarkomerstruktur wider (Hirt et al., 2014a). Weitere Experimente müssen zeigen, ob diese Ergebnisse auch an EHTs im 6-Vertiefungen Format reproduzierbar sind und wie sich eine etwaige bessere Qualität auf die Ergebnisse der Transplantationsversuche auswirkt.

Ein weiterer entscheidender Faktor, um die Reifung von Kardiomyozyten in EHTs zu fördern, ist das Kulturmedium. Das für diese Arbeit verwendete Medium ist Glukose-haltig und enthält

nur an Proteine gebundene Fettsäuren aus bovinem Serum. Während der Reifung von Kardiomyozyten finden grundlegende metabolische Veränderungen statt. Während fetale Kardiomyozyten ihre Energie hauptsächlich durch Glykolyse gewinnen, versorgt sich das adulte Herz fast ausschließlich durch oxidative Metabolisierung von Fettsäuren (Katz, 2011). Mit zunehmender Reifung der Kardiomyozyten im EHT treten also zwei Probleme auf. Erstens ist die Medienkomposition nicht mehr auf die metabolischen Bedürfnisse abgestimmt und zweitens steigt der Sauerstoffverbrauch, was die Hypoxie im Inneren der EHTs verschärft. Diesbezüglich muss zukünftig noch ein optimiertes Medium entwickelt werden.

Zur Qualitätskontrolle der EHTs im 24-Vertiefungen Format hat sich die Video-optische Analyse der Kontraktionskraft als nützlich erwiesen, da diese mit einem hohen Grad an Standardisierung und Reproduzierbarkeit unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden kann. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass bei der Implementation von 30% Endothelzellen in die EHTs mit Kontroll-EHTs vergleichbare Kräfte erreicht werden. Mit dieser Methode ist es aber mit dem aktuellen Aufbau der Messapparatur nicht möglich, Kraft und kontraktile Parameter an EHTs im 6-Vertiefungen Format zu messen. Da in Hinblick auf die Transplantationsversuche im Meerschweinchen gerade für diese Muskeln eine Qualitätskontrolle sinnvoll wäre, besteht an diesem Punkt noch Optimierungsbedarf. Eine Technik, die derartige Messungen ermöglichen würde, beruht auf der Nutzung elektromechanischer Biegewandler und wurde kürzlich zum Patent angemeldet (Europäisches Patentamt Aktenzeichen 13160816.8; Vollert, 2013).

5.7 Transduktion humaner iPS-Kardiomyozyten

Eine effiziente und spezifische Transduktion von hiPS-Kardiomyozyten ermöglicht es, nicht nur *in vitro* die Zellen zu markieren und genetisch zu modifizieren, sondern auch diese für gentherapeutische Ansätze *in vivo* einzusetzen. In den vergangenen Jahren wurden große Fortschritte in der Spezifität von Adeno-assoziierten Viren (AAVs) gemacht. Um eine möglichst hohe Zellspezifität zu erreichen, ist die Wahl des Serotyps entscheidend und in das Viruskapsid inkorporierte Peptid-Liganden können die Selektivität weiter erhöhen (Michelfelder et al., 2011; Varadi et al., 2012). Zusätzlich kann ein spezifischer Promotor die Genexpression auf einen Zelltyp beschränken.

Für die Transduktion von hiPS-Kardiomyozyten haben sich in der vorliegenden Arbeit AAVs des Serotyps 9 als besonders effizient erwiesen. Durch die Modifikation des Kapsids mit den Peptiden NLH, SLR und NYS wurde eine deutlich höhere Transduktionseffizienz erreicht als mit wtAAV9. Die Verwendung eines kardial-spezifischen TNNT-Promotors führte zu einer hohen Selektivität (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9).

Für gentherapeutische Ansätze könnte jedoch eine noch höhere Selektivität für Kardiomyozyten erforderlich sein. Dies ist durch microRNA-kontrollierte Transgenexpression möglich (Geisler et al., 2011). Dabei werden Plasmide und AAV Vektoren konstruiert, die in der 3'-untranslatierten Region des zu exprimierenden Gens eine Bindungsstelle für micro-RNAs enthalten, welche spezifisch für den Zelltyp sind, in denen man die Expression verhindern möchte. Auf diese Weise könnten die in dieser Arbeit identifizierten AAV-Serotypen verbessert und die Genexpression in nicht-Kardiomyozyten verhindert werden. Voraussetzung dafür wäre allerdings, diese Population genauer zu charakterisieren.

5.8 *In vivo* Transplantationsstudie

Um langfristig eine klinische Anwendung als Gewebeersatz zu entwickeln, wurden die EHTs aus hiPS-Kardiomyozyten und humanen Endothelzellen in einem Kleintier Infarktmodell getestet. Dabei sollte insbesondere untersucht werden, ob die humanen EHTs die Transplantation auf das infarzierte Myokard überleben können, sich die linksventrikuläre Funktion folglich verbessert, und ob die EHTs elektrisch an das Empfängermyokard koppeln können.

Ein geeignetes Kleintiermodell zur Evaluation des optimierten Gewebemodells aus humanen Kardiomyozyten und Endothelzellen ist schwierig, da die klassischen Modelle, wie Maus, bzw. Ratte, aufgrund der hohen Herzfrequenz und der sich stark vom humanen Myokard unterscheidenden Parameter der ventrikulären Repolarisation zur Untersuchung von humanem Herzgewebe wahrscheinlich ungeeignet sind (Knollmann et al., 2007). Es wurde ein Meerschweinchenmodell etabliert, da diese Spezies eine dem Menschen ähnliche Wellenform des ventrikulären Aktionspotentials und vergleichbare Repolarisations-eigenschaften zeigt (Watanabe et al., 1985).

Initial war geplant, die Infarkte durch LAD-Ligatur auszulösen. Aufgrund der ausgeprägten Kollateralisierung beim Meerschweinchen ist es jedoch nicht möglich, durch Ligatur der hauptversorgenden Arterie eine Ischämie hervorzurufen (Maxwell et al., 1987). Daher hatte eine andere Arbeitsgruppe stattdessen eine Kryoverletzung des linken Ventrikels etabliert (Shiba et al., 2012). Diese Operation ist technisch einfach durchzuführen und führte auch in unseren Händen reproduzierbar zu großen transmuralen Verletzungen. Initial wurde eine sehr große Verletzung induziert, indem ein mit flüssigem Stickstoff gekühlter Stempel mit einem Durchmesser von 0,5 cm an zwei direkt benachbarten Stellen viermal für jeweils 30 Sekunden auf das Myokard gepresst wurde. Allerdings zeigte sich, dass diese Verletzungen zu groß waren, sodass nur wenige Tiere die gesamte Studiendauer von 35 Tagen überlebten. Daraufhin wurde der Stempel nur noch an einer Stelle viermal für je 30 Sekunden auf den linken Ventrikel gedrückt, was die Anzahl der überlebenden Tiere deutlich erhöhte.

Eine Woche nach Verletzung des linken Ventrikels wurde eine zweite Operation zur Implantation der EHTs oder eines zellfreien Konstruktes durchgeführt. Wegen der durch die erste OP und die daraus resultierenden Umstrukturierungsprozesse am Herzen auftretenden Adhäsionen kam es häufig zu Komplikationen, und die ohnehin geschwächten Tiere verstarben. Durch Verringerung des Atemzugvolumens und durch die mit größerer Erfahrung des Operators immer kürzere OP Dauer konnte die Überlebensrate weiter gesteigert werden, sodass sie nach beiden OPs bei etwa 30% lag.

Um die Abstoßung der xenogenen transplantierten Gewebe zu verhindern, wurden die Meerschweinchen mit den Immunsuppressiva Methylprednisolon und Cyclosporin A behandelt. Im Falle einer Abstoßungsreaktion können mikroskopisch ein kleinzelliges Infiltrat und fleckige Nekrosen im Transplantat beobachtet werden (Platt et al., 1991). Unter der Immunsuppression wurde so ein Infiltrat zu keinem Zeitpunkt beobachtet. Das ist durchaus erstaunlich, da unsere Arbeitsgruppe bei Implantationen von Ratten-EHTs auf Rattenherzen auch unter Immunsuppression leichte Abstoßungsreaktionen gesehen hatte (Zimmermann et al., 2002; Zimmermann et al., 2006).

Bei einem xenogenen Ansatz hätten eher stärkere Reaktionen erwartet werden können. Allerdings konnte auch bei der Injektion von hESC-Kardiomyozyten in Makakenherzen keine Immunreaktion beobachtet werden (Chong et al., 2014). Nach Injektion von hESC-Kardiomyozyten in Meerschweinchenherzen wurde eine nach klinischen Standards höchstens als sehr milde einzustufende Abstoßungsreaktion beobachtet (Shiba et al., 2012). Diese Studien sind jedoch nur eingeschränkt mit dieser Arbeit zu vergleichen, da sich die Expression von Proteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes zwischen ESCs und iPSCs unterscheidet. MHC-Proteine, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind, sind für die Erkennung durch Zellen des Immunsystems und eine Abstoßungsreaktion verantwortlich. Humane ESCs exprimieren wie alle somatischen Zellen MHC-Klasse-I Proteine, allerdings in einem geringeren Ausmaß (Drukker et al., 2002; Bonde et al., 2008). MHC-Klasse-II Proteine, die auf Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden, konnten auf ESCs nicht nachgewiesen werden (Li et al., 2004). Es gibt Hinweise auf geringere immunogene Eigenschaften von iPSCs und den von ihnen abgeleiteten Zellen. So konnte in einer Studie keine Expression von MHC-

Klasse-I und MHC-Klasse-II Proteinen nachgewiesen werden (Schnabel et al., 2014). Somit ist eine MHC-vermittelte Immunreaktion nicht zu erwarten und könnte das völlige Ausbleiben einer histologisch nachweisbaren Immunreaktion zumindest miterklären. Allerdings ist diese Frage unter anderem wegen der großen Variabilität der hiPSC Linien zum jetzigen Zeitpunkt nicht sicher zu beantworten. Eine detaillierte Untersuchung der Immunreaktion mittels Elispot, bei der Lymphozyten aus der Milz eines transplantierten Meerschweinchens mit Zellen der implantierten Zelllinie inkubiert wurden, war nicht erfolgreich, da die Antikörper keine Meerschweinchen-Antigene erkannten.

Der Effekt der Transplantationen wurde 28 Tage nach der Zweitoperation histologisch und echokardiographisch untersucht. Hierbei zeigte sich, dass hiPSC-EHTs eine Transplantation auf das verletzte Myokard überleben und neues humanes Myokard im Narbengewebe entsteht. Histologisch zeigten sich Inseln humaner Herzmuskelgewebe im Narbengewebe. Diese Zellen waren quergestreift und exprimierten die ventrikuläre Isoform der Myosin-Leichtkette. Der humane Ursprung dieser Zellen wurde durch eine Fluorescent-in-situ-Hybridisierung (FISH) gegen das humane Zentromer 17 nachgewiesen.

Mikro-CT Aufnahmen zeigten ebenfalls deutlich den großen Infarkt und die beiden EHTs, die direkt nach Transplantation noch auf dem Narbengewebe auflagen. Zwei Wochen später wurden die EHTs in das fibrinöse Gewebe integriert, und die Zelldichte war höher. Dies könnte ein Hinweis auf Proliferation der Kardiomyozyten und ihr Größenwachstum, und dadurch die höhere Muskeldichte sein. Dazu dürfte ein Abbau der Fibrinmatrix kommen, wodurch die Zellen näher aneinander liegen würden.

Eine wichtige Voraussetzung für das Überleben und die Funktionalität des Transplantates ist die Vaskularisierung. Ein unvascularisiertes Transplantat kann aus etwa 280 000 Zellen/cm³ bestehen, ohne dass Hypoxie auftritt (Muschler et al., 2004). Da physiologisches Herzgewebe mit 2×10^7 Zellen/cm³ eine deutlich höhere Dichte von Kardiomyozyten hat (Giraud et al., 2007), muss angenommen werden, dass künstliches Gewebe nur dann langfristig auf dem Myokard überlebt, wenn es entweder so locker bleibt wie vor der Implantation oder aber sekundär vaskularisiert wird. Da die Dichte der hiPS-EHT Myokardinseln 28 Tage nach

Transplantation wie oben beschrieben hoch war, kann auf eine ausreichende Vaskularisierung geschlossen werden. Tatsächlich ließen sich histologisch viele Gefäße darstellen, die aus dem Narbengewebe in das Transplantat reichten und eindeutig perfundiert waren (Füllung mit Erythrozyten; ausführlichere Diskussion unten).

In jedem Fall muss aber angenommen werden, dass zwischen dem Zeitpunkt der Transplantation und der funktionellen Vaskularisierung Zeit vergeht, in der Kardiomyozyten absterben. Ansätze zur Verringerung eines durch Hypoxie verursachten Zelltods der transplantierten Zellen umfassen die Überexpression von Proteinen, die das Überleben fördern (Muschler et al., 2004), oder anti-apoptotisch wirken (Nakamura et al., 2006) und Hitzeschockbehandlung vor Implantation (Muschler et al., 2004). Unklar ist zum jetzigen Zeitpunkt, ob solche Maßnahmen, oder eine Prävaskularisierung der hiPS-EHTs über die Kokultur mit Endothelzellen hinaus, den Effekt einer Transplantation verbessern würden. Wie oben ausgeführt, würde jedes Verfahren dieser Art die Komplexität des Versuchsaufbaus und damit die regulatorischen Hürden für eine klinische Anwendung erhöhen.

Es gibt verschiedene Strategien, um künstliche Herzgewebe *in vivo*, oder *in vitro*, vor Transplantation zu vaskularisieren. Vorteile eines prävaskularisierten Gewebes sind, dass die Größe der EHTs nicht durch die beschränkte Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen begrenzt ist, da dieses zusätzlich durch Perfusion versorgt wird. Dieses kommt den physiologischen Bedingungen nahe und ermöglicht theoretisch den operativen Anschluss an das Gefäßsystem des Empfängertieres. Ohne eine solche akkurate Operation ist eine Verbindung zwischen Transplantat- und Empfängergefäßen allerdings sehr unwahrscheinlich und erhöht zusätzlich die Komplexität dieses Versuchsaufbaus. Bei der Prävaskularisierung von Gewebekonstrukten *in vivo* in der Bauchhöhle eines Tieres kommen erschwerend noch die dort herrschenden, nicht standardisierten Kulturbedingungen für die später zu transplantierenden Zellen hinzu, was für empfindliche Zellpopulationen wie hiPS-Kardiomyozyten ein Ausschlusskriterium sein kann. Im Gegensatz dazu ist die *in vitro* Kokultur von Kardiomyozyten mit Endothelzellen, Perizyten und/oder glatten Muskelzellen biotechnologisch viel einfacher durchführbar als eine Vaskularisierung, aber gleichzeitig deutlich komplexer als eine Kardiomyozyten-Monokultur. Eine Kokultur kann an die

physiologische Zellzusammensetzung angepasst werden. Nach Transplantation eines solchen Gewebekonstruktes ist eine Rekrutierung dieser Zellen in einsprossende Gefäße denkbar.

Für EHTs bietet sich die Kokultivierung von Endothelzellen mit der Kardiomyozytenpopulation an, da die Zellen im Rekonstitutionsmix einfach gemischt werden können. Dass die Kokultivierung angiogener Zellen (Endothelzellen allein, oder in Kombination mit Perizyten, muralen Zellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten oder mesenchymalen Stammzellen) in künstlichen Geweben deren Vaskularisierung und Funktionalität erhöht, konnte bereits in vielen Studien gezeigt werden (Narmoneva et al., 2004; Levenberg et al., 2005; Sekine et al., 2008). Nach Mischen von Endothelzellen (HUVECs) und Fibroblasten (MEFs) in künstliche Herzgewebe wurden diese sogar vermehrt an die Vaskulatur des Empfängers angeschlossen und größere überlebende Implantate beobachtet (Stevens et al., 2009). Nachteile der Kokultur sind, dass *in vitro* keine Perfusion des Gewebekonstruktes stattfindet, weshalb die Größe dieser weiterhin durch die Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen limitiert ist. Dabei ist zu beachten, dass dieses Problem durch die Erhöhung der Zelldichte im EHT noch verschärft wird. Des Weiteren sind die Mechanismen der Rekrutierung noch unklar, weshalb bisher nicht gezielt Einfluss auf diesen Prozess genommen werden kann.

Histologisch waren 28 Tage nach Implantation der EHTs sowohl im Transplantat, als auch in dessen Randbereich, viele funktionelle, mit Erythrozyten gefüllte Gefäße sichtbar, was zeigt, dass das neue humane Myokard an die Blutversorgung des Meerschweinchens angeschlossen wurde. Um untersuchen zu können, ob die Gefäße, die in das Transplantat hinein wuchsen, humane Zellen rekrutierten, wurden GFP-exprimierende humane Endothelzellen in die EHTs gemischt. Benachbart zum Transplantat konnten vereinzelt GFP-positive Gefäße gefunden werden. Das bedeutet, dass tatsächlich humane Endothelzellen an der Vaskularisierung des Implantates beteiligt waren. Insgesamt waren aber hauptsächlich GFP-negative, also Meerschweinchen-Gefäße zu finden. Dass humane Gefäße benachbart zum Transplantat gefunden wurden und nicht innerhalb, könnte durch ein teilweises Absterben der implantierten Zellen, oder durch den Abbau der Fibrin-Matrix und eine daraus resultierende Verdichtung der hiPS-Kardiomyozyten erklärt werden. In anderen Studien wurde gezeigt, dass nach Myokardinfarkt weniger als 1% der transplantierten Endothelzellen länger als 8 Wochen

überleben (Li et al., 2009). Es wäre also möglich, dass die Endothelzellen des Transplantates in den ersten Tagen nach Implantation angiogene Faktoren sezernieren, die die Vaskularisierung des humanen Gewebes durch Gefäße des Meerschweinchens fördern. Dennoch sind die ersten Tage nach Transplantation für das Überleben der EHTs kritisch, da noch keine Vaskularisierung durch Gefäße des Meerschweinchens besteht.

Die funktionelle Konsequenz einer hiPSC-EHT-Transplantation wurde mittels Echokardiographie untersucht. Die Kryoverletzungen führten zu einer deutlichen Abnahme der linksventrikulären Funktion, was sich in der signifikant reduzierten fraktionellen Flächenänderungsrate widerspiegelte. In der Kontrollgruppe, in welcher zellfreie Konstrukte transplantiert wurden, erholte sich die linksventrikuläre Funktion im weiteren Studienverlauf nicht, und es kam zu einer linksventrikulären Dilatation. Die Transplantation von hiPSC-EHTs führte zu einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion und konnte die Dilatation des linken Ventrikels vermindern. Dies ist ein bemerkenswerter Befund, da zuvor bei der Transplantation von Ratten-EHTs auf Rattenherzen nur eine Stabilisierung der Ejektionsfraktion beobachtet werden konnte (Zimmermann et al., 2006). Dies deckt sich wie aus Tabelle 10 ersichtlich mit den funktionellen Daten der Studie von Shiba et al., 2012, bei der nach Injektion von hESC-Kardiomyozyten eine Stabilisierung des *Fractional Shortening* beobachtet wurde. In der darauf folgenden Makaken-Studie (Chong et al., 2014) konnte kein funktioneller Effekt nachgewiesen werden.

Die Beurteilung der linksventrikulären Funktion mittels Echokardiografie hat jedoch Limitationen. Die Ejektionsfraktion ist zwar einfach zu bestimmen, ist aber lastabhängig. Das *Fractional Shortening* ist bei regionalen Wandbewegungsstörungen, wie sie nach einem Infarkt auftreten, nicht repräsentativ. Außerdem muss, wie auch bei der fraktionellen Flächenänderungsrate, die Ansicht der kurzen Achse (SAX) genau rund erscheinen und sich in der Systole konzentrisch verkleinern (Wilkenshoff U, 2011). Des Weiteren unterliegt die Auswertung erfahrungsgemäß subjektiver Variabilität, weshalb sie nur von einer Person (Birgit Geertz) durchgeführt wurde. Da zur Untersuchung der linksventrikulären Funktion und zur Beurteilung der regionalen Wandbewegungen Magnetresonanztomographien besser

standardisierbar sind als echokardiografische Aufnahmen, wurden bereits damit begonnen, ergänzend MRT Untersuchungen durchzuführen.

Aufgrund der großen transmuralen Verletzung des linken Ventrikels (34%) stellt sich die Frage, ob die Implantation von 10 Millionen Zellen der hiPS-Kardiomyozytenpopulation und 4 Millionen hiPS-Endothelzellen, deren Überlebensrate unbekannt ist, tatsächlich die beobachtete Funktionsverbesserung erklären kann. Ein Meerschweinchenherz besteht schätzungsweise aus etwa 80 Millionen Kardiomyozyten. Ein Drittel der Zellen des linken Ventrikels, welcher circa 60% des Herzens ausmacht, starben nach Kryoverletzung. Das entspricht etwa 18 Millionen toten Zellen. Nimmt man an, dass die Hälfte der implantierten Zellen überleben (5 Millionen KMs), entspräche das einer rechnerischen Verbesserung um 28%. Tatsächlich zeigten die histologischen Untersuchungen, dass etwa 20% des linken Ventrikels durch humane Muskelmasse ersetzt wurde. Die fraktionelle Flächenänderungsrate als funktioneller Parameter verbesserte sich um 14%. Weitere Faktoren, die zu dem positiven therapeutischen Effekt beitragen könnten, sind verbesserte Angiogenese, mechanische Stabilisierung, reduzierte Fibrosebildung und parakrine Effekte. Außerdem ist denkbar, dass das Herz Einschränkungen der Muskelmasse bis zu einem bestimmten Grad kompensieren kann. Demnach hätte die Kryoverletzung einen überschweligen Verlust der Muskelmasse verursacht, was die erhebliche Abnahme der Auswurfraction erklären würde. Die Zunahme der Muskelmasse nach Transplantation könnte danach gerade ausreichen, diese kritische Schwelle wieder zu überschreiten, auch wenn sie nicht zu einer Normalisierung der Muskelmasse führt. Dosis-Wirkungs-Beziehungen müssen in Zukunft klären, ob sich diese Annahme bestätigen lässt.

Bei der regenerativen Therapie von Myokardinfarkten mit künstlichen Herzgeweben ist eine wichtige Fragestellung, ob die applizierten Zellen elektrisch an das Empfänger-Myokard koppeln und somit eine synchrone Kontraktion möglich ist. Eine Unterstützung der linksventrikulären Funktion durch aktive, synchrone Kontraktion könnte einen höheren therapeutischen Effekt haben als das einfache mechanische Stabilisieren der Narbe. Da eine Kopplung im Narbengewebe, wo kein direkter Kontakt zu gesundem Meerschweinchen-Myokard besteht (siehe μ CT Aufnahmen Abbildung 52), nicht zu erwarten ist, wurde darauf

geachtet, die EHTs so zu implantieren, dass an dessen Enden ein Kontakt zum unbeschädigten Gewebe besteht.

Techniken, die das Messen von Aktionspotentialen (AP) und intrazellulären Ca^{2+} Signalen mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung ermöglichen, sind wichtig, um die Charakteristika der Kardiomyozyten unter *in situ* physiologischen Bedingungen zu verstehen und transmurale Unterschiede festzustellen. In der Vergangenheit wurden unterschiedliche Techniken eingesetzt um Ca^{2+} -Signale *in vivo* unter physiologischen Bedingungen messen zu können. So wurden biolumineszente Aequorin-Fusionsproteine erfolgreich als Ca^{2+} -Reporter im Kleintiermodell eingesetzt (Rogers et al., 2007; Bakayan et al., 2011). Die elektrische Integration von künstlichen Herzwegen konnte durch epikardiales Multielektroden Mapping nachgewiesen werden (Zimmermann et al., 2006). In anderen Studien wurden genetisch modifizierte Kardiomyozyten verwendet, um GCaMP3-Fluoreszenz zu messen (Shiba et al., 2012; Chong et al., 2014). Die Zwei-Photon (2P) Laser-Scanning Mikroskopie (2PLSM) ermöglicht es, mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung APs und Ca^{2+} Signale am perfundierten Herzen zu messen (Ghouri et al., 2013). Die 2PLSM nahe dem Infrarot-Bereich ermöglicht aufgrund der niedrigen Licht-Streuung Messungen mit einer hohen Eindringtiefe (500-1000 μm). Im Gegensatz zu Einzel-Photon Laser-Scanning Mikroskopie ist für die 2PLSM Exzitation die simultane Absorption von zwei Photonen von Licht einer längeren Wellenlänge (niedrigerer Energie) notwendig, um das Fluorophor anzuregen. Da die Absorptionswahrscheinlichkeit proportional zum Quadrat der momentanen Lichtintensität ist, werden Laser benutzt, die extrem kurze, aber intensive Pulse generieren, um einen Photonenfluss zu erzeugen, der die Exzitation auf ein ellipsoides Volumen um den Brennpunkt des Objektivs begrenzt. Dabei wird keine defokussierte Exzitation und Fluoreszenzemission erzeugt. Daher kann die Laserenergie mit steigender Fokustiefe erhöht werden, um ein ausreichend starkes Signal zu erhalten, ohne dass defokussierte Signale interferieren. Dies macht sogar eine Detektor-Aperturblende überflüssig, was die Fluoreszenz Erfassung noch effizienter macht. In Kombination mit Spannungs- und Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffen, die nach 2P Anregung fluoreszieren, ist somit eine hoch aufgelöste Bildgebung von Aktionspotentialen und intrazellulären Ca^{2+} -Signalen der Kardiomyozyten möglich. Zu diesen Farbstoffen zählen die Aminonaphthylethylenpyridinium (ANEP) Farbstoffe, welche an die Plasmamembran von

Zellen binden und deren Emissionsspektrum sich in Folge von Veränderungen der Membranspannung ändert (Fluhler et al., 1985), und Ca^{2+} -sensitive Fura Farbstoffe, welche in Abhängigkeit von intrazellulärem Ca^{2+} ihr Anregungsspektrum verändern (Gryniewicz et al., 1985).

Die 2PLSM Untersuchungen am Meerschweinchenmyokard waren bisher aufgrund von technischen Schwierigkeiten noch nicht erfolgreich, weshalb weitere Experimente geplant sind. Des Weiteren war der EHT-Bereich unter dem Mikroskop schwierig zu lokalisieren, und das Fehlen einer direkten Rohdaten-Prozessierung war zusätzlich erschwerend. Für die nächsten Experimente wurden die Zellen im EHT daher mit AAVs transduziert, um durch GFP-Expression die transplantierten EHTs leichter auffinden zu können.

Sollte keine elektrische Kopplung nachgewiesen werden, könnte dies dadurch zu erklären sein, dass nach den Operationen durch den Wundheilungsprozess eine zellfreie extrazelluläre Matrix zwischen Meerschweinchenherz und EHTs entstand, welche einen direkten Kontakt der Kardiomyozyten verhinderte. Andererseits könnte der Nachweis einer Kopplung damit erklärt werden, dass nur wenige Kontakte zwischen Kardiomyozyten ausreichen um die elektrischen Signale weiterzuleiten und auch parakrine Faktoren eine Rolle spielen. Eine weitere Möglichkeit wäre die elektrische Kopplung über kardiale Fibroblasten (Kohl und Camelliti, 2007). Diese weisen ein fast depolarisiertes Ruhemembranpotential zwischen 0 und -20 mV auf (Camelliti et al., 2005). Obwohl diese Zellen selbst nicht elektrisch stimulierbar sind, können sie durch ihren elektronischen Einfluss bei Kardiomyozyten eine Depolarisierung auslösen (Miragoli et al., 2006).

Wie schon unter 5.3 diskutiert, sind die hiPS-Kardiomyozyten nach der Differenzierung noch unreif und im Gegensatz zu adulten Kardiomyozyten proliferativ. Nach 2 bis 3 Wochen in Kultur und 28 Tage nach Transplantation lag die durch Ki67 gemessene Proliferationsrate bei 17%. Dieser Wert ist mit bereits veröffentlichten Daten vergleichbar (Laflamme et al., 2005). Zu diesem Zeitpunkt waren auch nur noch wenige Zellen MLC-2A-positiv, die meisten exprimierten die ventrikuläre Isoform (MLC-2V, Abbildung 44).

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse bestehen bei einer Zell-basierten Therapie potentiell elektrophysiologische Herausforderungen und das Risiko für Arrhythmien. HiPS-Kardiomyozyten sind im Gegensatz zu adulten Kardiomyozyten unreif und haben andere elektrophysiologische Eigenschaften. So entspricht die Verteilung der gap junctions der von neonatalen Kardiomyozyten, welche eine langsamere Leitungsgeschwindigkeit haben (Kehat et al., 2002). Die Cadherin und gap junctions Kontakte zwischen aus Stammzellen generierten und Empfänger-Kardiomyozyten passen nicht zusammen, was dazu führt, dass die Ausbreitung der Aktionspotentiale (APs) möglicherweise unvorhersehbar und inhomogen ist. Dies könnte in einer erhöhten Anisotropie und Herzrhythmusstörungen resultieren (Kehat et al., 2004). Auch die voneinander abweichende Zellgröße, welche die Determinante der Impuls Weiterleitung und der maximalen AP Depolarisationsrate ist, könnte zu Problemen führen (Spach et al., 2004). Weitere Faktoren, wie eine voneinander abweichende Ausrichtung der myokardialen Fasern, unterschiedliche AP Verläufe und Ca^{2+} Signalverarbeitung, könnten Arrhythmien hervorrufen (Chen et al., 2009). Zudem ist es nicht unwahrscheinlich, dass die spontan kontrahierenden EHTs nach Transplantation autonom weiter schlagen. Vor diesem Hintergrund, und weil bereits beobachtet wurde, dass zumindest nach Injektion von hESC-Kardiomyozyten Arrhythmien auftraten (Chong et al., 2014), ist es wichtig, zukünftig bei den Meerschweinchen mit implantierten EHTs Langzeit-EKGs abzuleiten.

Ein weiterer negativer Aspekt der Gewebeersatztherapie ist die Distribution von humanen Zellen aus dem Transplantat in andere Organe des Empfängertieres, vor allem der Lunge (Abbildung 48). In Hinblick auf das bestehende Risiko für eine Teratomentstehung aus hiPS-Kardiomyozyten stellt dies eine Limitation dar. Auch andere Arbeitsgruppen beschrieben das Auswaschen von transplantierten Zellen aus dem Herzen über die Blutbahn, vor allem nach Injektion von Zellsuspensionen, bei denen man von initialen Zellverlusten von >90% ausgeht (Dow et al., 2005). Dagegen sollte ein strukturiertes Gewebe wie ein EHT, anders als eine Injektion, zu einem viel höheren Prozentsatz die Zellen am Ort der Transplantation fixieren. Dass in der vorliegenden Arbeit humane DNA vor allem in der Lunge nachgewiesen wurde, könnte auf die feinen Lungenkapillaren zurückzuführen sein, in denen sich ausgeschwemmte, zirkulierende, humane Zellen festsetzten.

In der Vergangenheit gab es bereits mehrere Studien zur kardialen Gewebeersatztherapie, wobei entweder *in vitro* gezüchtete Herzmuskelgewebe implantiert, oder Kardiomyozyten injiziert wurden. In Tabelle 10 sind vergleichend technische Eckdaten und Ergebnisse von zwei Zellinjektionsstudien (Shiba et al., 2012; Chong et al., 2014), einer Gewebeersatztherapie mittels künstlichem Ratten-Herzgewebe (Zimmermann et al., 2006) und dieser humanen Gewebeersatztherapie zusammengefasst.

	Gewebeersatz mit humanen EHTs	Gewebeersatz mit Ratten-EHTs (Zimmermann et al., 2006)	Zellinjektion (Shiba et al., 2012)	Zellinjektion (Chong et al., 2014)
Versuchstiere	Meerschweinchen	Ratten	Meerschwein- chen	Makaken
Zellart	hiPS-KMs und hiPS-ECs	Neonatale Ratten- KMs	hESC-KMs	hESC-KMs
Reinheit der Zellen	KM 90%, EC 95%	Natürliche Zellpopulation	63%	73%
Zellzahl	KM 10×10^6 , EC 4×10^6	$12,5 \times 10^6$	1×10^8	1×10^9
Verletzung	Kryo-Verletzung (KV)	LAD-Ligatur	Kryo-Verletzung	Ischämie- Reperfusion
Infarktgröße	30% des LV	Keine Angabe	14% des LV	2,5-10,5% des LV
Implantations- technik	Implantation von Gewebekonstruk- ten	Implantation von Gewebekonstruk- ten	Injektion von Zellen	Injektion von Zellen
Aufbau von Myokard	20% der Narbe	$443 \pm 32 \mu\text{m}$ umfassendes Muskelgewebe	$8,4 \pm 1,5\%$ der Narbe	40% des Infarktes
Funktioneller Effekt (Echokardiografie)	FAS $23,8 \pm 7,2\%$ 7 Tage nach KV vs. $38,0 \pm 13,2\%$ 28 Tage nach	Stabilisierung von LVEDd und FAS nach 28 Tage nach Implantation	FS 27% vor Injektion vs. 25% 28 Tage nach Injektion von	Kein Effekt

	Transplantation von EHTs bzw. 24,3±12,4% in Kontrollgruppe		KMs bzw. 20% in Kontrollgruppen	
Elektrische Kopplung	bisher keine Daten	bei 100% der Tiere	bei 60% der Tiere	bei 100% der Tiere
Arrhythmien	bisher keine Daten	keine	Antiarrhyth- mischer Effekt	bei 100% der Tiere
Teratome	nein	keine Angabe	nein	nein
Vaskularisierung	ja	ja	ja	ja
Verschleppung humaner Zellen	29% Milz, 57% Lunge	Keine Angabe	keine Daten	nein
Abstoßungs- reaktion	Nein	ja	ja	nein

Tabelle 10: Gegenüberstellung von Eckdaten der durchgeführten Transplantationsstudie im Vergleich zu zwei Zellinjektionsstudien.

Ein großer Vorteil bei der Implantation von EHTs ist, dass deutlich weniger Zellen benötigt werden als bei der Zellinjektion. Dennoch wird bei deutlich größerer Verletzung des linken Ventrikels (LV) viel mehr neues Myokard aufgebaut als in der Studie von Shiba et al. (2012). Der Infarkt in der Makaken-Studie ist kleiner als klinisch relevant (Chong et al., 2014), und auch wenn davon 40% durch neues Myokard ersetzt werden, ist der Wirkungsgrad für die hohe Zahl an injizierten Kardiomyozyten gering. Während die Implantation von humanen EHTs zu einer deutlichen Verbesserung der linksventrikulären Funktion führte, konnte ein solcher Effekt in den beiden Zellinjektionsstudien nicht nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist die signifikante Zunahme der kontraktilen Funktion in der vorliegenden Untersuchung auch deshalb, weil sie bislang bei Transplantation von Ratten-EHTs auf infarzierte Rattenherzen nicht beobachtet werden konnte (Zimmermann et al. 2006). In dieser ersten großen *proof-of-concept* Studie zeigte sich nach EHT Implantation vor allem eine Stabilisierung der Ejektionsfraktion nach der Verletzung, während sich die Kontrollgruppen weiter verschlechterten.

In den beiden Studien mit humanen injizierten Zellen und den transplantierten Ratten-EHTs konnte eine elektrische Kopplung des regenerierten Myokards mit dem Empfänger-Myokard gezeigt werden. Inkonklusiv sind die Daten bezüglich Arrhythmien, da diese in der

Makakenstudie bei allen Tieren auftraten, während die Injektion von Kardiomyozyten in Meerschweinchenherzen einen antiarrhythmischen Effekt zeigte. Vor diesem Hintergrund ist es wichtig, nach Implantation von EHTs Daten zur elektrischen Kopplung zu erheben und EKGs abzuleiten.

Hervorzuheben ist außerdem, dass in der Makakenstudie, nach Zellinjektion in das Myokard, mikroskopisch keine humanen Zellen in anderen Geweben nachgewiesen werden konnten, während in unserer Studie in Lungen und Milzen humane DNA detektiert wurde. Dabei ist allerdings in der Makakenstudie die sehr geringe Zahl von Versuchstieren (zellfreie Kontrolle n=2, KM-Injektion n=4) zu beachten, und es bleibt unklar, wie intensiv nach solchen Zellen gefahndet worden ist. Wie oben beschrieben ist es extrem unwahrscheinlich, dass es bei Zellinjektionen zu weniger Abschwemmung kommt als bei Implantation eines strukturierten Gewebes wie den EHTs. Viel wahrscheinlicher ist, dass die Diskrepanz auf die viel höhere Sensitivität einer PCR mit 40 Zyklen im Vergleich zur mikroskopischen Auswertung von histologischen Gewebeschnitten zurückzuführen ist. Unbeantwortet bleibt aber die Frage, welche Relevanz den PCR Befunden zukommt. Dies macht weitere Untersuchungen notwendig.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass sich humane künstliche Herzgewebe prinzipiell zum Gewebeersatz nach Myokardinfarkt eignen, da sie zu einer relevanten Re-Muskularisierung und einer ausgeprägten Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktion führen und diese Technik Vorteile gegenüber der Injektion von Zellsuspensionen hat.

6 Ausblick

Bei der Differenzierung von hiPSCs zu Kardiomyozyten und Endothelzellen wurden große Fortschritte gemacht. Es sollte jedoch in Zukunft versucht werden, die vielversprechenden Ergebnisse zur Kultivierung der undifferenzierten hiPSCs in einem vollständig definierten Kulturmedium (FTDA) zu validieren, da das bisher verwendete MEF-konditionierte Medium nicht von gleichbleibender Qualität ist, und somit das Wachstum der Stammzellen Schwankungen unterliegt und es zu unerwünschten spontanen Differenzierungen kommen kann. Des Weiteren ist die Produktion größerer Zellmengen eine Herausforderung, die sich in Suspensionskultur besser realisieren ließe als in adhärenter Kultur. Besonders geeignet wäre ein Bioreaktorsystem, bei dem ein kontinuierlicher Austausch des Mediums möglich ist. Dadurch könnte durch stoßweisen Austausch des Mediums bedingten Schwankungen in der Wachstumskinetik vorgebeugt werden. Da bFGF sowohl für den undifferenzierten Status der hiPSCs, als auch für die Differenzierung von Kardiomyozyten und Endothelzellen essentiell, aber sehr instabil ist, könnte die Verwendung von FGF-Mikropartikeln (Lotz et al., 2013) eine gleichmäßige Versorgung mit diesem wichtigen Wachstumsfaktor gewährleisten. Auch die Differenzierung in Bioreaktoren könnte ökonomisch zu höheren Differenzierungseffizienzen und Zellzahlen führen.

Um den maximalen Nutzen aus den differenzierten Kardiomyozyten ziehen zu können und die Generierung der EHTs besser auf den Bedarf abstimmen zu können, ist es notwendig das Protokoll zum Einfrieren zu optimieren. Tatsächlich gelang es bereits, aus kryo-konservierten Kardiomyozyten direkt EHTs zu generieren.

Die Funktionalität der differenzierten hiPS-Endothelzellen wurde bereits in einem Matrigel™ Plug Assay gezeigt. Um diese Zellen genauer zu charakterisieren, werden in Kooperation mit Prof. Ralf Brandes, Universität Frankfurt, weitere für Endothelzellen typische Eigenschaften überprüft werden. Hierzu zählen unter anderem die Inkorporation von Dil-Ac-LDL (1,1'-diocradecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat-acetyliertes Lipoprotein niedriger Dichte), die Migration entlang eines VEGF Gradienten und das Einwachsen in Kollagen Gele.

Auch bei den EHTs gibt es Optimierungsbedarf. Insbesondere bei den großen Geweben im 6-Vertiefungen Format nimmt die Dichte an Kardiomyozyten zum Inneren des EHTs deutlich ab. Um die Nähr- und Sauerstoffversorgung zu verbessern, muss die *in vitro* Perfusion zum Standard werden und die Auswirkungen der Kokultur von Kardiomyozyten mit Endothelzellen, Perizyten und/oder glatten Muskelzellen auf die Qualität der EHTs untersucht werden. In Hinblick auf den *in vivo* Einsatz in Transplantationsstudien wäre die Verwendung eines Kulturmediums vorteilhaft, welches keine tierischen Produkte enthält. Die Kontraktilität der EHTs könnte durch kontinuierliche elektrische Stimulation verbessert werden. Des Weiteren sollten Qualitätsstandards festgelegt werden, für die eine Qualitätskontrolle, zum Beispiel durch den Einsatz elektromechanischer Biege wandler, umgesetzt werden sollte.

Die Transplantationsstudie am Meerschweinchen zeigte vielversprechende Ergebnisse, sodass an diesem Modell weitere Fragestellungen untersucht werden können. Die Versuche zur elektrischen Kopplung mittels 2PLSM sind erfolgversprechend und weitere Experimente bereits in Vorbereitung. Dafür wurden die Zellen im EHT mit AAVs transduziert, um durch GFP-Expression die transplantierten EHTs für die Messungen leichter auffinden zu können.

Die Etablierung von hämodynamischen Untersuchungen am Meerschweinchen war nicht erfolgreich, sodass als weitere Methode zur Untersuchung der linksventrikulären Funktion und zur Beurteilung der regionalen Wandbewegungen Magnetresonanztomographien des Herzen geplant sind. Diese werden in Kooperation mit der Radiologie am UKE durchgeführt werden. Erste Aufnahmen zur Etablierung eines Messprotokolls wurden bereits erfolgreich durchgeführt.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob die Transplantation von EHTs Arrhythmien verursacht. Zukünftig sollen Transponder implantiert werden, mit denen Langzeit-EKGs aufgenommen werden können.

Auch die Immunreaktion auf die xenogene Transplantation wurde bisher nicht systematisch untersucht. Grundsätzlich wären durch Patienten-spezifische hiPSCs auch autologe

Transplantationen möglich. Allerdings benötigt der Reprogrammierungs- und Differenzierungsprozess mindestens 6 Monate. Hinzu kommt, dass jede hiPSC Linie formal ein neues Produkt darstellt, welches vor der ersten Applikation toxikologisch untersucht und zugelassen werden muss. Dies könnte den autologen Ansatz zu teuer und langwierig machen. Eine Alternative könnte eine Zellbank charakterisierter hESC oder hiPSC Linien sein, in der Zellen mit passenden Leukozyten Antigenen für die meisten Patienten bereit stehen, sodass nur eine minimale Immunsuppression erforderlich wäre.

Bisher war der Beobachtungszeitraum der operierten Meerschweinchen mit 28 Tage relativ kurz, weshalb eine Folgestudie geplant ist, bei der die Tiere bis zu einem Jahr nach Transplantation beobachtet werden. Auf diese Weise können aussagekräftigere Aussagen über das Teratomrisiko, maligne Transformationen infolge von Chromosomeninstabilität und Mutationen und die Verteilung der humanen Zellen im Empfängerorganismus getroffen werden. Außerdem ist es in Hinblick auf die beobachtete Proliferation der implantierten Kardiomyozyten interessant, die Entwicklung der humanen Muskelmasse zu verfolgen.

Bevor EHTs zum Gewebeersatz an Menschen eingesetzt werden können, ist es aber noch ein weiter Weg. Untersuchungen an einem größeren Tier, beispielsweise dem Schwein, wären ein wichtiger Schritt. Die Muskelkonstrukte müssten hierfür deutlich größer sein, oder es müssten sehr viele, oder komplexere EHTs implantiert werden. Hier werden weitere Untersuchungen notwendig sein, um die richtige Gewebe-Dosis zu finden.

7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, effiziente Protokolle zur Differenzierung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen (hiPSCs) zu Kardiomyozyten und Endothelzellen zu etablieren, um danach aus diesen EHTs zu generieren. Anschließend erfolgte die Evaluation dieser EHTs aus humanen Kardiomyozyten und Endothelzellen als Gewebeersatz in einem Kleintiermodell, um langfristig eine klinische Anwendung als Therapieoption für infarziertes Myokard zu entwickeln. In dieser Studie sollte insbesondere untersucht werden, ob die EHTs die Transplantation auf das infarzierte Myokard überleben, ob die Transplantation die linksventrikuläre Funktion verbessert und ob die humanen EHTs elektrisch an das Empfängermyokard koppeln können.

Durch Optimierung und Standardisierung der kardialen Differenzierung von hiPSC gelang es ein Protokoll zu etablieren, mit dem Differenzierungseffizienzen von bis zu 90% erreicht wurden. Die Differenzierung basierte auf der Bildung von *Embryoid bodies* (EBs) in Spinner Flaschen, wodurch Zelllinien-unabhängig große Mengen an EBs einheitlicher Qualität hergestellt werden konnten. In weiteren Schritten erfolgte die Induktion von mesodermalen Progenitorzellen mit der Kombination der Wachstumsfaktoren BMP4, Activin A und bFGF. Die Differenzierung von spontan schlagenden Kardiomyozyten erfolgte durch den kleinmolekularen Wnt-Signalweginhibitor DS-I-7.

Des Weiteren konnte ein Protokoll etabliert werden, um Endothelzellen aus hiPSCs zu differenzieren. Dieses beruht in Analogie zu dem etablierten Protokoll zur kardialen Differenzierung auf der Induktion von mesodermalen Progenitoren und der anschließenden Differenzierung zu Endothelzellen mit den Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF. Die Differenzierungseffizienz lag bei etwa 20%. Zur Anreicherung CD31 positiver Zellen wurde eine zweistufige MACS-Aufreinigung optimiert, wodurch reproduzierbar Endothelzellen mit >95% Reinheit generiert wurden. Im *Matrigel™-tube-formation-assay* bildeten diese Endothelzellen Gefäße aus.

Zusammenfassung

Als Transplantat wurden 2-Post EHTs im 6-Vertiefungen Format mit jeweils 5 Millionen hiPS-Kardiomyozyten und 2 Millionen HUVECs/hiPS-Endothelzellen generiert. Diese zeigten nach zwei Wochen in Kultur kohärente Kontraktionen des gesamten EHTs.

Für die Transplantationsstudie wurde der linke Ventrikel von Meerschweinchen mit einem Kryo-Stempel verletzt. Eine Woche nach Verletzung des linken Ventrikels erfolgte die Transplantation von zwei EHTs, bzw. eines zellfreien Konstruktes in der Kontrollgruppe. Der Erfolg der Transplantationen wurde 28 Tage später histologisch und echokardiographisch verifiziert. Hierbei zeigte sich, dass hiPSC-EHTs eine Transplantation auf das verletzte Myokard überleben und neues humanes Myokard im Narbengewebe entsteht. Histologisch zeigten sich Inseln (100-800 μm im Durchmesser und bis zu 2 mm in der Länge) von humanem Herzmuskelgewebe im Narbengewebe. Diese Zellen waren quergestreift und exprimierten die ventrikuläre Isoform der Myosin-Leichtkette. Der humane Ursprung dieser Zellen wurde durch eine Fluorescent-in-situ-Hybridisierung (FISH) gegen das humane Zentromer 17 nachgewiesen. Die implantierten EHTs wurden von Gefäßen des Wirtes vaskularisiert, und es konnten in einem relativ hohen Prozentsatz proliferierende humane Kardiomyozyten (17% Ki67-positiv) nachgewiesen werden.

Die linksventrikuläre Funktion wurde vor Kryo-Verletzung, sieben Tage nach Verletzung (vor Transplantation) und 28 Tage nach Transplantation mittels Echokardiographie untersucht. Die Transplantation von humanen EHTs führte sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe, als auch zur Ausgangslage vor Transplantation zu einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Funktion (fraktionelle Verkürzungsfraction $38,0 \pm 13,2\%$ vs. $23,8 \pm 7,2\%$ vor Transplantation), während zellfreie Konstrukte keinen Effekt hatten ($24,3 \pm 12,4\%$ vs. $23,8 \pm 7,2\%$ vor Transplantation).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hiPSC-abgeleitete Fibrin-EHTs in einem Meerschweinchen Kryoinfarktmodell zu einer teilweisen Re-Muskularisierung und einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktion führen. Sie ist damit die erste *proof-of-concept* Studie für einen humanen Tissue Engineering Ansatz in einem nicht-Nager Tiermodell.

8 Summary

The aim of this study was to establish efficient protocols to differentiate human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) to cardiomyocytes and endothelial cells, to subsequently generate EHTs. Afterwards, the EHTs from human cardiomyocytes and endothelial cells were evaluated in a small animal model to develop a tissue replacement for clinical application in a long term. In particular it was examined whether the EHTs survive after transplantation onto the infarcted myocardium, if the left ventricular function is improved after transplantation and whether the human EHTs couple electrically to the host myocardium.

Optimization and standardization led to a cardiac differentiation protocol, which resulted in differentiation efficiencies of up to 90%. The differentiation was based on embryoid body (EB) formation in spinner flasks, cell line independently leading to large quantities of EBs of uniform quality. In further steps the induction of mesodermal progenitor cells was induced by the growth factors BMP4, Activin A and bFGF. The differentiation of spontaneously contracting cardiomyocytes was initiated by the small-molecule Wnt-signalling inhibitor DS-I-7.

Furthermore, a protocol was established to differentiate endothelial cells from hiPSCs. In analogy to the established cardiac differentiation protocol, the principle is to induce mesodermal progenitor cells and subsequently differentiate endothelial cells with the growth factors bFGF and VEGF. Differentiation efficiency was about 20%. To enrich CD31- positive cells, a two-step MACS purification has been optimized and endothelial cells were reproducibly generated with >95% purity. In a Matrigel™ tube-formation assay these endothelial cells were able to form tubes.

As a transplant, 2-Post EHTs were generated in a 6-well format, each containing 5 million hiPS-cardiomyocytes and 2 million HUVECs/ hiPS-endothelial cells. After two weeks in culture, they showed coherent contractions of the entire EHT.

For the transplantation study, the left ventricle of guinea pigs was injured with a cryo-probe. One week after injuring the left ventricle, either two EHTs or a cell-free construct in the control

Summary

group were transplanted onto the injured heart. The success of the transplantation was verified histologically and echocardiographically four weeks later. The results showed that hiPSC-EHTs survived the transplantation onto the injured myocardium and that novel human myocardium was formed in the scar area. Histological examination showed islands (100-800 microns in diameter and up to 2 mm in length) of human heart muscle in the scar tissue. These cells were cross-striated and expressed the ventricular isoform of myosin light chain. The human origin of these cells was confirmed by fluorescent-in-situ-hybridization (FISH) against human centromere 17. The implanted EHTs were vascularized by vessels of the host and showed proliferating human cardiomyocytes at a relatively high frequency (17% Ki67 positive cells).

Left ventricular function was examined before cryo-injury, seven days after injury (before transplantation) and four weeks after transplantation by echocardiography. The transplantation of human EHTs resulted in a significant improvement of left ventricular function both compared to control and pre-transplantation function (fractional area shortening $38.0 \pm 13.2\%$ vs. $23.8 \pm 7.2\%$ before transplantation), whereas cell-free constructs had no effect ($24.3 \pm 12.4\%$ vs. $23.8 \pm 7.2\%$ before transplantation).

This work showed that hiPSC-derived human EHTs lead to partial remuscularization and significant improvement of the left ventricular function of cryo-injured guinea-pig hearts. The study is the first to provide proof of concept for cardiac repair by an engineered human heart construct in a non-rodent animal model.

9 Literatur

Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilic J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boue S, Izpisua Belmonte JC (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26: 1276-1284

Abbasalizadeh S, Larijani MR, Samadian A, Baharvand H (2012) Bioprocess development for mass production of size-controlled human pluripotent stem cell aggregates in stirred suspension bioreactor. *Tissue engineering Part C, Methods* 18: 831-851

Arnold SJ, Robertson EJ (2009) Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 91-103

Bakayan A, Vaquero CF, Picazo F, Llopis J (2011) Red fluorescent protein-aequorin fusions as improved bioluminescent Ca²⁺ reporters in single cells and mice. *PLoS One* 6: e19520

Behfar A, Perez-Terzic C, Faustino RS, Arrell DK, Hodgson DM, Yamada S, Puceat M, Niederlander N, Alekseev AE, Zingman LV, Terzic A (2007) Cardiopoietic programming of embryonic stem cells for tumor-free heart repair. *J Exp Med* 204: 405-420

Beqqali A, Kloots J, Ward-van Oostwaard D, Mummery C, Passier R (2006) Genome-wide transcriptional profiling of human embryonic stem cells differentiating to cardiomyocytes. *Stem Cells* 24: 1956-1967

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) *Biochemistry*. W.H. Freeman, New York

Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisen J (2009) Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324: 98-102

Bizy A, Guerrero-Serna G, Hu B, Ponce-Balbuena D, Willis BC, Zarzoso M, Ramirez RJ, Sener MF, Mundada LV, Klos M, Devaney EJ, Vikstrom KL, Herron TJ, Jalife J (2013) Myosin light chain 2-based selection of human iPSC-derived early ventricular cardiac myocytes. *Stem cell research* 11: 1335-1347

Bonde S, Chan KM, Zavazava N (2008) ES-cell derived hematopoietic cells induce transplantation tolerance. *PLoS One* 3: e3212

Bondue A, Blanpain C (2010) Mesp1: a key regulator of cardiovascular lineage commitment. *Circulation research* 107: 1414-1427

Bondue A, Lapouge G, Paulissen C, Semeraro C, Iacovino M, Kyba M, Blanpain C (2008) Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. *Cell Stem Cell* 3: 69-84

Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S (2005) Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 6: 826-835

- Burridge PW, Keller G, Gold JD, Wu JC (2012) Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell stem cell* 10: 16-28
- Burridge PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD, Lan F, Diecke S, Huber B, Mordwinkin NM, Plews JR, Abilez OJ, Cui B, Gold JD, Wu JC (2014) Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nature methods* 11: 855-860
- Burridge PW, Thompson S, Millrod MA, Weinberg S, Yuan X, Peters A, Mahairaki V, Koliatsos VE, Tung L, Zambidis ET (2011) A universal system for highly efficient cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells that eliminates interline variability. *PloS one* 6: e18293
- Camelliti P, Borg TK, Kohl P (2005) Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovascular research* 65: 40-51
- Cao F, Wagner RA, Wilson KD, Xie X, Fu JD, Drukker M, Lee A, Li RA, Gambhir SS, Weissman IL, Robbins RC, Wu JC (2008) Transcriptional and functional profiling of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One* 3: e3474
- Caspi O, Lesman A, Basevitch Y, Gepstein A, Arbel G, Habib IH, Gepstein L, Levenberg S (2007) Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells. *Circulation research* 100: 263-272
- Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, Bolin JM, Ruotti V, Probasco MD, Smuga-Otto K, Howden SE, Diol NR, Propson NE, Wagner R, Lee GO, Antosiewicz-Bourget J, Teng JM, Thomson JA (2011) Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nature methods* 8: 424-429
- Chen HS, Kim C, Mercola M (2009) Electrophysiological challenges of cell-based myocardial repair. *Circulation* 120: 2496-2508
- Chen VC, Couture SM, Ye J, Lin Z, Hua G, Huang HI, Wu J, Hsu D, Carpenter MK, Couture LA (2012) Scalable GMP compliant suspension culture system for human ES cells. *Stem cell research* 8: 388-402
- Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, Mahoney WM, Van Biber B, Cook SM, Palpant NJ, Gantz JA, Fugate JA, Muskheli V, Gough GM, Vogel KW, Astley CA, Hotchkiss CE, Baldessari A, Pabon L, Reinecke H, Gill EA, Nelson V, Kiem HP, Laflamme MA, Murry CE (2014) Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 510: 273-277
- Coletta A, Thackray S, Nikitin N, Cleland JG (2002) Clinical trials update: highlights of the scientific sessions of The American College of Cardiology 2002: LIFE, DANAMI 2, MADIT-2, MIRACLE-ICD, OVERTURE, OCTAVE, ENABLE 1 & 2, CHRISTMAS, AFFIRM, RACE, WIZARD, AZACS, REMATCH, BNP trial and HARDBALL. *European journal of heart failure* 4: 381-388
- Cooke JP (2003) Flow, NO, and atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 768-770

- Costa M, Sourris K, Lim SM, Yu QC, Hirst CE, Parkinson HC, Jokubaitis VJ, Dear AE, Liu HB, Micallef SJ, Koutsis K, Elefanty AG, Stanley EG (2013) Derivation of endothelial cells from human embryonic stem cells in fully defined medium enables identification of lysophosphatidic acid and platelet activating factor as regulators of eNOS localization. *Stem cell research* 10: 103-117
- Costello I, Pimeisl IM, Drager S, Bikoff EK, Robertson EJ, Arnold SJ (2011) The T-box transcription factor Eomesodermin acts upstream of *Mesp1* to specify cardiac mesoderm during mouse gastrulation. *Nat Cell Biol* 13: 1084-1091
- David R, Brenner C, Stieber J, Schwarz F, Brunner S, Vollmer M, Mentele E, Muller-Hocker J, Kitajima S, Lickert H, Rupp R, Franz WM (2008) *MesP1* drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling. *Nat Cell Biol* 10: 338-345
- David R, Jarsch VB, Schwarz F, Nathan P, Gegg M, Lickert H, Franz WM (2011) Induction of *MesP1* by Brachyury(T) generates the common multipotent cardiovascular stem cell. *Cardiovasc Res* 92: 115-122
- Davis RP, van den Berg CW, Casini S, Braam SR, Mummery CL (2011) Pluripotent stem cell models of cardiac disease and their implication for drug discovery and development. *Trends Mol Med* 17: 475-484
- Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M (2000) Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol* 85: 645-651
- Dow J, Simkhovich BZ, Kedes L, Kloner RA (2005) Washout of transplanted cells from the heart: a potential new hurdle for cell transplantation therapy. *Cardiovascular research* 67: 301-307
- Drukker M, Katz G, Urbach A, Schuldiner M, Markel G, Itskovitz-Eldor J, Reubinoff B, Mandelboim O, Benvenisty N (2002) Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9864-9869
- Dubois NC, Craft AM, Sharma P, Elliott DA, Stanley EG, Elefanty AG, Gramolini A, Keller G (2011) *SIRPA* is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* 29: 1011-1018
- Eschenhagen T, Didie M, Munzel F, Schubert P, Schneiderbanger K, Zimmermann WH (2002) 3D engineered heart tissue for replacement therapy. *Basic research in cardiology* 97 Suppl 1: I146-152
- Eschenhagen T, Eder A, Vollert I, Hansen A (2012) Physiological aspects of cardiac tissue engineering. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 303: H133-143
- Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattchow J, Weil J, Zimmermann W, Dohmen HH, Schafer H, Bishopric N, Wakatsuki T, Elson EL (1997) Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11: 683-694

- Fedorov A, Beichel R, Kalpathy-Cramer J, Finet J, Fillion-Robin JC, Pujol S, Bauer C, Jennings D, Fennessy F, Sonka M, Buatti J, Aylward S, Miller JV, Pieper S, Kikinis R (2012) 3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network. *Magnetic resonance imaging* 30: 1323-1341
- Fluhler E, Burnham VG, Loew LM (1985) Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes. *Biochemistry* 24: 5749-5755
- Fluri DA, Tonge PD, Song H, Baptista RP, Shakiba N, Shukla S, Clarke G, Nagy A, Zandstra PW (2012) Derivation, expansion and differentiation of induced pluripotent stem cells in continuous suspension cultures. *Nature methods* 9: 509-516
- Frank S, Zhang M, Scholer HR, Greber B (2012) Small molecule-assisted, line-independent maintenance of human pluripotent stem cells in defined conditions. *PLoS One* 7: e41958
- Freund C, Ward-van Oostwaard D, Monshouwer-Kloots J, van den Brink S, van Rooijen M, Xu X, Zweigerdt R, Mummery C, Passier R (2008) Insulin redirects differentiation from cardiogenic mesoderm and endoderm to neuroectoderm in differentiating human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26: 724-733
- Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M (2009) Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85: 348-362
- Geisler A, Jungmann A, Kurreck J, Poller W, Katus HA, Vetter R, Fechner H, Muller OJ (2011) microRNA122-regulated transgene expression increases specificity of cardiac gene transfer upon intravenous delivery of AAV9 vectors. *Gene therapy* 18: 199-209
- Ghouri IA, Kelly A, Burton FL, Smith GL, Kemi OJ (2013) 2-photon excitation fluorescence microscopy enables deeper high-resolution imaging of voltage and Ca in intact mice, rat, and rabbit hearts. *Journal of biophotonics*
- Giraud MN, Armbruster C, Carrel T, Tevæarai HT (2007) Current state of the art in myocardial tissue engineering. *Tissue engineering* 13: 1825-1836
- Greber B, Lehrach H, Adjaye J (2007) Silencing of core transcription factors in human EC cells highlights the importance of autocrine FGF signaling for self-renewal. *BMC developmental biology* 7: 46
- Grego-Bessa J, Luna-Zurita L, del Monte G, Bolos V, Melgar P, Arandilla A, Garratt AN, Zang H, Mukoyama YS, Chen H, Shou W, Ballestar E, Esteller M, Rojas A, Perez-Pomares JM, de la Pompa JL (2007) Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Dev Cell* 12: 415-429
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry* 260: 3440-3450

Hansen A, Eder A, Bonstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, Aksehirlioglu B, Schwoerer AP, Uebeler J, Eschenhagen T (2010) Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circulation research* 107: 35-44

Hattori F, Chen H, Yamashita H, Tohyama S, Satoh YS, Yuasa S, Li W, Yamakawa H, Tanaka T, Onitsuka T, Shimoji K, Ohno Y, Egashira T, Kaneda R, Murata M, Hidaka K, Morisaki T, Sasaki E, Suzuki T, Sano M, Makino S, Oikawa S, Fukuda K (2010) Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nature methods* 7: 61-66

Hirt MN, Boeddinghaus J, Mitchell A, Schaaf S, Bornchen C, Muller C, Schulz H, Hubner N, Stenzig J, Stoehr A, Neuber C, Eder A, Luther PK, Hansen A, Eschenhagen T (2014a) Functional improvement and maturation of rat and human engineered heart tissue by chronic electrical stimulation. *Journal of molecular and cellular cardiology* 74C: 151-161

Hirt MN, Hansen A, Eschenhagen T (2014b) Cardiac tissue engineering: state of the art. *Circulation research* 114: 354-367

Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, Melton DA (2008a) Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 26: 795-797

Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA (2008b) Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26: 1269-1275

Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N (2000) Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 6: 88-95

Jhund PS, Macintyre K, Simpson CR, Lewsey JD, Stewart S, Redpath A, Chalmers JW, Capewell S, McMurray JJ (2009) Long-term trends in first hospitalization for heart failure and subsequent survival between 1986 and 2003: a population study of 5.1 million people. *Circulation* 119: 515-523

Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Blueloch R (2009) Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol* 27: 459-461

Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K (2009) Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458: 771-775

Kane NM, Meloni M, Spencer HL, Craig MA, Strehl R, Milligan G, Houslay MD, Mountford JC, Emanuelli C, Baker AH (2010) Derivation of endothelial cells from human embryonic stem cells by directed differentiation: analysis of microRNA and angiogenesis in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30: 1389-1397

Kane NM, Xiao Q, Baker AH, Luo Z, Xu Q, Emanuelli C (2011) Pluripotent stem cell differentiation into vascular cells: a novel technology with promises for vascular re(generation). *Pharmacology & therapeutics* 129: 29-49

- Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, Dubois NC, Niapour M, Hotta A, Ellis J, Keller G (2011) Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell stem cell* 8: 228-240
- Katz AM (2011) *Physiology of the heart*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins Health, Philadelphia, PA
- Kehat I, Gepstein A, Spira A, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L (2002) High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction. *Circulation research* 91: 659-661
- Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L (2001) Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108: 407-414
- Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, Huber I, Satin J, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L (2004) Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 22: 1282-1289
- Kelly A, Ghouri IA, Kemi OJ, Bishop MJ, Bernus O, Fenton FH, Myles RC, Burton FL, Smith GL (2013) Subepicardial action potential characteristics are a function of depth and activation sequence in isolated rabbit hearts. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 6: 809-817
- Kennedy M, D'Souza SL, Lynch-Kattman M, Schwantz S, Keller G (2007) Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood* 109: 2679-2687
- Kim C, Majdi M, Xia P, Wei KA, Talantova M, Spiering S, Nelson B, Mercola M, Chen HS (2010) Non-cardiomyocytes influence the electrophysiological maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes during differentiation. *Stem cells and development* 19: 783-795
- Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS (2009) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4: 472-476
- Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ (1996) Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98: 216-224
- Knollmann BC, Roden DM (2008) A genetic framework for improving arrhythmia therapy. *Nature* 451: 929-936
- Knollmann BC, Schober T, Petersen AO, Sirenko SG, Franz MR (2007) Action potential characterization in intact mouse heart: steady-state cycle length dependence and electrical restitution. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 292: H614-621
- Kohl P, Camelliti P (2007) Cardiac myocyte-nonmyocyte electrotonic coupling: implications for ventricular arrhythmogenesis. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 4: 233-235

- Krawetz R, Taiani JT, Liu S, Meng G, Li X, Kallos MS, Rancourt DE (2010) Large-scale expansion of pluripotent human embryonic stem cells in stirred-suspension bioreactors. *Tissue engineering Part C, Methods* 16: 573-582
- Kuhn EN, Wu SM (2010) Origin of cardiac progenitor cells in the developing and postnatal heart. *J Cell Physiol* 225: 321-325
- Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, Takahashi M, Nishikawa S, Kawamata S, Sato Y (2012) Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells. *PLoS One* 7: e37342
- Kurosawa H (2007) Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *Journal of bioscience and bioengineering* 103: 389-398
- Kwon C, Arnold J, Hsiao EC, Taketo MM, Conklin BR, Srivastava D (2007) Canonical Wnt signaling is a positive regulator of mammalian cardiac progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 10894-10899
- Kwon C, Qian L, Cheng P, Nigam V, Arnold J, Srivastava D (2009) A regulatory pathway involving Notch1/beta-catenin/Isl1 determines cardiac progenitor cell fate. *Nat Cell Biol* 11: 951-957
- Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, Reinecke H, Xu C, Hassanipour M, Police S, O'Sullivan C, Collins L, Chen Y, Minami E, Gill EA, Ueno S, Yuan C, Gold J, Murry CE (2007) Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature biotechnology* 25: 1015-1024
- Laflamme MA, Gold J, Xu C, Hassanipour M, Rosler E, Police S, Muskheli V, Murry CE (2005) Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *The American journal of pathology* 167: 663-671
- Laflamme MA, Murry CE (2011) Heart regeneration. *Nature* 473: 326-335
- Lanier M, Schade D, Willems E, Tsuda M, Spiering S, Kalisiak J, Mercola M, Cashman JR (2012) Wnt inhibition correlates with human embryonic stem cell cardiomyogenesis: a structure-activity relationship study based on inhibitors for the Wnt response. *Journal of medicinal chemistry* 55: 697-708
- Lanner F, Rossant J (2010) The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development* 137: 3351-3360
- Lavine KJ, Yu K, White AC, Zhang X, Smith C, Partanen J, Ornitz DM (2005) Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation in vivo. *Dev Cell* 8: 85-95
- Lesman A, Habib M, Caspi O, Gepstein A, Arbel G, Levenberg S, Gepstein L (2010) Transplantation of a tissue-engineered human vascularized cardiac muscle. *Tissue engineering Part A* 16: 115-125

- Levenberg S, Rouwkema J, Macdonald M, Garfein ES, Kohane DS, Darland DC, Marini R, van Blitterswijk CA, Mulligan RC, D'Amore PA, Langer R (2005) Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nature biotechnology* 23: 879-884
- Levenstein ME, Ludwig TE, Xu RH, Llanas RA, VanDenHeuvel-Kramer K, Manning D, Thomson JA (2006) Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 24: 568-574
- Li L, Baroja ML, Majumdar A, Chadwick K, Rouleau A, Gallacher L, Ferber I, Lebkowski J, Martin T, Madrenas J, Bhatia M (2004) Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties. *Stem Cells* 22: 448-456
- Li Y, Powell S, Brunette E, Lebkowski J, Mandalam R (2005) Expansion of human embryonic stem cells in defined serum-free medium devoid of animal-derived products. *Biotechnology and bioengineering* 91: 688-698
- Li Z, Wilson KD, Smith B, Kraft DL, Jia F, Huang M, Xie X, Robbins RC, Gambhir SS, Weissman IL, Wu JC (2009) Functional and transcriptional characterization of human embryonic stem cell-derived endothelial cells for treatment of myocardial infarction. *PloS one* 4: e8443
- Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, Hsiao C, Kamp TJ, Palecek SP (2013a) Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. *Nature protocols* 8: 162-175
- Lian X, Zhang J, Zhu K, Kamp TJ, Palecek SP (2013b) Insulin inhibits cardiac mesoderm, not mesendoderm, formation during cardiac differentiation of human pluripotent stem cells and modulation of canonical Wnt signaling can rescue this inhibition. *Stem Cells* 31: 447-457
- Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, Kim K, Miller JD, Ng K, Daley GQ (2009) Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113: 5476-5479
- Loh YH, Hartung O, Li H, Guo C, Sahalie JM, Manos PD, Urbach A, Heffner GC, Grskovic M, Vigneault F, Lensch MW, Park IH, Agarwal S, Church GM, Collins JJ, Irion S, Daley GQ (2010) Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Cell Stem Cell* 7: 15-19
- Lotz S, Goderie S, Tokas N, Hirsch SE, Ahmad F, Corneo B, Le S, Banerjee A, Kane RS, Stern JH, Temple S, Fasano CA (2013) Sustained levels of FGF2 maintain undifferentiated stem cell cultures with biweekly feeding. *PLoS One* 8: e56289
- Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, Frane JL, Crandall LJ, Daigh CA, Conard KR, Piekarczyk MS, Llanas RA, Thomson JA (2006) Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nature biotechnology* 24: 185-187
- Lüllmann-Rauch R (2009) Taschenlehrbuch Histologie. Verlag Thieme
- Lüllmann H MK, Hein L (2010) Pharmakologie und Toxikologie. Georg Thieme Verlag
- Maherali N, Hochedlinger K (2009) Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol* 19: 1718-1723

Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM (1987) Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovascular research* 21: 737-746

Michelfelder S, Varadi K, Raupp C, Hunger A, Korbelen J, Pahrman C, Schrepfer S, Muller OJ, Kleinschmidt JA, Trepel M (2011) Peptide ligands incorporated into the threefold spike capsid domain to re-direct gene transduction of AAV8 and AAV9 in vivo. *PLoS One* 6: e23101

Miragoli M, Gaudesius G, Rohr S (2006) Electrotonic modulation of cardiac impulse conduction by myofibroblasts. *Circulation research* 98: 801-810

Moretti A, Bellin M, Welling A, Jung CB, Lam JT, Bott-Flugel L, Dorn T, Goedel A, Hohnke C, Hofmann F, Seyfarth M, Sinnecker D, Schomig A, Laugwitz KL (2010) Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *The New England journal of medicine* 363: 1397-1409

Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JJ, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ (2004) Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428: 664-668

Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG (2004) Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 86-A: 1541-1558

Naito H, Melnychenko I, Didie M, Schneiderbanger K, Schubert P, Rosenkranz S, Eschenhagen T, Zimmermann WH (2006) Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation* 114: 172-78

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26: 101-106

Nakamura Y, Yasuda T, Weisel RD, Li RK (2006) Enhanced cell transplantation: preventing apoptosis increases cell survival and ventricular function. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 291: H939-947

Narmonova DA, Vukmirovic R, Davis ME, Kamm RD, Lee RT (2004) Endothelial cells promote cardiac myocyte survival and spatial reorganization: implications for cardiac regeneration. *Circulation* 110: 962-968

Neri T, Stefanovic S, Puceat M (2010) Cardiac regeneration: still a 21st century challenge in search for cardiac progenitors from stem cells and embryos. *J Cardiovasc Pharmacol* 56: 16-21

Nourse MB, Halpin DE, Scatena M, Mortisen DJ, Tulloch NL, Hauch KD, Torok-Storb B, Ratner BD, Pabon L, Murry CE (2010) VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: implications for tissue engineering. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30: 80-89

- Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK, Jacobsen SE (2004) Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nature medicine* 10: 494-501
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313-317
- Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322: 949-953
- Olmer R, Lange A, Selzer S, Kasper C, Haverich A, Martin U, Zweigerdt R (2012) Suspension culture of human pluripotent stem cells in controlled, stirred bioreactors. *Tissue engineering Part C, Methods* 18: 772-784
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001a) Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* 938: 221-229; discussion 229-230
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001b) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701-705
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001c) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10344-10349
- Orlova VV, Drabsch Y, Freund C, Petrus-Reurer S, van den Hil FE, Muenthaisong S, Dijke PT, Mummery CL (2014) Functionality of endothelial cells and pericytes from human pluripotent stem cells demonstrated in cultured vascular plexus and zebrafish xenografts. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34: 177-186
- Packer M, Califf RM, Konstam MA, Krum H, McMurray JJ, Rouleau JL, Swedberg K (2002) Comparison of omapatrilat and enalapril in patients with chronic heart failure: the Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events (OVERTURE). *Circulation* 106: 920-926
- Pfister O (2013) 10 Jahre Stammzelltherapie in der Kardiologie. In: info@herz+gefäß. medinfo, pp. 24-26
- Platt JL, Fischel RJ, Matas AJ, Reif SA, Bolman RM, Bach FH (1991) Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplantation* 52: 214-220
- Qyang Y, Martin-Puig S, Chiravuri M, Chen S, Xu H, Bu L, Jiang X, Lin L, Granger A, Moretti A, Caron L, Wu X, Clarke J, Taketo MM, Laugwitz KL, Moon RT, Gruber P, Evans SM, Ding S, Chien KR (2007) The renewal and differentiation of Isl1+ cardiovascular progenitors are controlled by a Wnt/beta-catenin pathway. *Cell Stem Cell* 1: 165-179
- Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE (1999) Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation* 100: 193-202

- Rogers KL, Picaud S, Roncali E, Boisgard R, Colasante C, Stinnakre J, Tavitian B, Brulet P (2007) Non-invasive in vivo imaging of calcium signaling in mice. *PLoS One* 2: e974
- Schaaf S, Shibamiya A, Mewe M, Eder A, Stohr A, Hirt MN, Rau T, Zimmermann WH, Conradi L, Eschenhagen T, Hansen A (2011) Human engineered heart tissue as a versatile tool in basic research and preclinical toxicology. *PLoS One* 6: e26397
- Schnabel LV, Abratte CM, Schimenti JC, Felipe MJ, Cassano JM, Southard TL, Cross JA, Fortier LA (2014) Induced pluripotent stem cells have similar immunogenic and more potent immunomodulatory properties compared with bone marrow-derived stromal cells in vitro. *Regenerative medicine in print*
- Sekine H, Shimizu T, Hobo K, Sekiya S, Yang J, Yamato M, Kurosawa H, Kobayashi E, Okano T (2008) Endothelial cell coculture within tissue-engineered cardiomyocyte sheets enhances neovascularization and improves cardiac function of ischemic hearts. *Circulation* 118: S145-152
- Shapira-Schweitzer K, Habib M, Gepstein L, Seliktar D (2009) A photopolymerizable hydrogel for 3-D culture of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes and rat neonatal cardiac cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* 46: 213-224
- Shi Y, Do JT, Despons C, Hahm HS, Scholer HR, Ding S (2008) A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2: 525-528
- Shiba Y, Fernandes S, Zhu WZ, Filice D, Muskheli V, Kim J, Palpant NJ, Gantz J, Moyes KW, Reinecke H, Van Biber B, Dardas T, Mignone JL, Izawa A, Hanna R, Viswanathan M, Gold JD, Kotlikoff MI, Sarvazyan N, Kay MW, Murry CE, Laflamme MA (2012) Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature* 489: 322-325
- Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezumi M, Okano T (2002) Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circulation research* 90: e40
- Singh H, Mok P, Balakrishnan T, Rahmat SN, Zweigerdt R (2010) Up-scaling single cell-inoculated suspension culture of human embryonic stem cells. *Stem cell research* 4: 165-179
- Solloway MJ, Harvey RP (2003) Molecular pathways in myocardial development: a stem cell perspective. *Cardiovasc Res* 58: 264-277
- Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ (1994) Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 264: 98-101
- Spach MS, Heidlage JF, Barr RC, Dolber PC (2004) Cell size and communication: role in structural and electrical development and remodeling of the heart. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 1: 500-515

- Stadtfield M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322: 945-949
- Steiner D, Khaner H, Cohen M, Even-Ram S, Gil Y, Itsykson P, Turetsky T, Idelson M, Aizenman E, Ram R, Berman-Zaken Y, Reubinoff B (2010) Derivation, propagation and controlled differentiation of human embryonic stem cells in suspension. *Nature biotechnology* 28: 361-364
- Stevens KR, Kreutziger KL, Dupras SK, Korte FS, Regnier M, Muskheli V, Nourse MB, Bendixen K, Reinecke H, Murry CE (2009) Physiological function and transplantation of scaffold-free and vascularized human cardiac muscle tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 16568-16573
- Takagawa J, Zhang Y, Wong ML, Sievers RE, Kapasi NK, Wang Y, Yeghiazarians Y, Lee RJ, Grossman W, Springer ML (2007) Myocardial infarct size measurement in the mouse chronic infarction model: comparison of area- and length-based approaches. *J Appl Physiol* 102: 2104-2111
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676
- Tam PP, Loebel DA (2007) Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nat Rev Genet* 8: 368-381
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147
- Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, Fukuda K (2013) Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* 12: 127-137
- Tran TH, Wang X, Browne C, Zhang Y, Schinke M, Izumo S, Burcin M (2009) Wnt3a-induced mesoderm formation and cardiomyogenesis in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27: 1869-1878
- Tulloch NL, Muskheli V, Razumova MV, Korte FS, Regnier M, Hauch KD, Pabon L, Reinecke H, Murry CE (2011) Growth of engineered human myocardium with mechanical loading and vascular coculture. *Circulation research* 109: 47-59
- Ungrin MD, Joshi C, Nica A, Bauwens C, Zandstra PW (2008) Reproducible, ultra high-throughput formation of multicellular organization from single cell suspension-derived human embryonic stem cell aggregates. *PLoS One* 3: e1565

- Uosaki H, Fukushima H, Takeuchi A, Matsuoka S, Nakatsuji N, Yamanaka S, Yamashita JK (2011) Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression. *PloS one* 6: e23657
- Vallier L, Alexander M, Pedersen RA (2005) Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of cell science* 118: 4495-4509
- van Laake LW, Passier R, Monshouwer-Kloots J, Verkleij AJ, Lips DJ, Freund C, den Ouden K, Ward-van Oostwaard D, Korving J, Tertoolen LG, van Echteld CJ, Doevendans PA, Mummery CL (2007) Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction. *Stem Cell Res* 1: 9-24
- Varadi K, Michelfelder S, Korff T, Hecker M, Trepel M, Katus HA, Kleinschmidt JA, Muller OJ (2012) Novel random peptide libraries displayed on AAV serotype 9 for selection of endothelial cell-directed gene transfer vectors. *Gene therapy* 19: 800-809
- Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, Wang TJ, Parikh NI, D'Agostino RB, Levy D, Kannel WB, Vasan RS (2008) Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation* 118: 2057-2062
- Vollert I, Seiffert M, Bachmair J, Sander M, Eder A, Conradi L, Vogelsang A, Schulze T, Uebeler J, Holnthoner W, Redl H, Reichenspurner H, Hansen A, Eschenhagen T (2014) In vitro perfusion of engineered heart tissue through endothelialized channels. *Tissue engineering Part A* 20: 854-863
- Wang L, Li L, Shojaei F, Levac K, Cerdan C, Menendez P, Martin T, Rouleau A, Bhatia M (2004) Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity* 21: 31-41
- Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7: 618-630
- Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi JB, Nishikawa S, Muguruma K, Sasai Y (2007) A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 25: 681-686
- Watanabe T, Rautaharju PM, McDonald TF (1985) Ventricular action potentials, ventricular extracellular potentials, and the ECG of guinea pig. *Circulation research* 57: 362-373
- Weber MA (2001) Vasoepitidase inhibitors. *Lancet* 358: 1525-1532
- White MP, Rufaihah AJ, Liu L, Ghebremariam YT, Ivey KN, Cooke JP, Srivastava D (2013) Limited gene expression variation in human embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells. *Stem Cells* 31: 92-103
- Wilkenshoff U KI (2011) *Handbuch der Echokardiografie*. Georg Thieme Verlag

- Willems E, Spiering S, Davidovics H, Lanier M, Xia Z, Dawson M, Cashman J, Mercola M (2011) Small-molecule inhibitors of the Wnt pathway potently promote cardiomyocytes from human embryonic stem cell-derived mesoderm. *Circulation research* 109: 360-364
- Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hamalainen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A (2009) piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458: 766-770
- Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK (2001) Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 19: 971-974
- Yamanaka S, Blau HM (2010) Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465: 704-712
- Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, Henckaerts E, Bonham K, Abbott GW, Linden RM, Field LJ, Keller GM (2008) Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* 453: 524-528
- Yang X, Pabon L, Murry CE (2014) Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circulation research* 114: 511-523
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920
- Zimmermann WH, Didie M, Wasmeier GH, Nixdorff U, Hess A, Melnychenko I, Boy O, Neuhuber WL, Weyand M, Eschenhagen T (2002) Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation* 106: 1151-157
- Zimmermann WH, Melnychenko I, Eschenhagen T (2004) Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts. *Biomaterials* 25: 1639-1647
- Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didie M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis B, Dhein S, Schwoerer A, Ehmke H, Eschenhagen T (2006) Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nature medicine* 12: 452-458
- Zweigerdt R, Olmer R, Singh H, Haverich A, Martin U (2011) Scalable expansion of human pluripotent stem cells in suspension culture. *Nature protocols* 6: 689-700
- Zwi L, Caspi O, Arbel G, Huber I, Gepstein A, Park IH, Gepstein L (2009) Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Circulation* 120: 1513-1523

10 Bildnachweis

Alle unten nicht aufgeführten Abbildungen wurden selbst erstellt.

Abbildung 1: Autor: ZooFari, März 2010. Abgerufen am 21.07.2014 unter http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Heart_diagram-en.svg.

Abbildung 2: Abgerufen am 20.09.2014 unter http://www.studyinukraine.eu/wp-content/uploads/2014/05/FG09_06a-b.jpg.

Abbildung 3: In Übereinstimmung mit der Fair Use Policy § 107 des US-amerikanischen Copyright Act (17 U.S.C.) verändert nach Knollmann BC, Roden DM (2008) A genetic framework for improving arrhythmia therapy. Nature 451: 929-936.

Abbildung 6: In Übereinstimmung mit der Fair Use Policy § 107 des US-amerikanischen Copyright Act (17 U.S.C.) verändert nach Yamanaka S, Blau HM (2010) Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. Nature 465: 704-712.

Abbildung 7: In Übereinstimmung mit der Fair Use Policy § 107 des US-amerikanischen Copyright Act (17 U.S.C.) verändert nach Burrridge PW, Keller G, Gold JD, Wu JC (2012) Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. Cell stem cell 10: 16-28.

Abbildung 8: In Übereinstimmung mit der Fair Use Policy § 107 des US-amerikanischen Copyright Act (17 U.S.C.) verändert nach Burrridge PW, Keller G, Gold JD, Wu JC (2012) Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. Cell stem cell 10: 16-28.

Abbildung 9: In Übereinstimmung mit der Fair Use Policy § 107 des US-amerikanischen Copyright Act (17 U.S.C.) verändert nach White MP, Rufaihah AJ, Liu L, Ghebremariam YT, Ivey KN, Cooke JP, Srivastava D (2013) Limited gene expression variation in human embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells. Stem Cells 31: 92-103.

Abbildung 10: Dissertation S. Schaaf, 2011: Künstliche Herzgewebe aus humanen embryonalen Stammzellen als Testsystem für Arneistoffe.

Abbildung 15: In Übereinstimmung mit der Fair Use Policy § 107 des US-amerikanischen Copyright Act (17 U.S.C.) verändert nach Kelly A, Ghouri IA, Kemi OJ, Bishop MJ, Bernus O, Fenton FH, Myles RC, Burton FL, Smith GL (2013) Subepicardial action potential characteristics are a function of depth and activation sequence in isolated rabbit hearts. Circulation Arrhythmia and electrophysiology 6: 809-817.

11 Anhang

11.1 Geräte, Materialien und Substanzen

11.1.1 Geräte

Mikro-CT 40 desktop cone-beam μ CT (Scanco Medical)

Abi Prism 7000HT (Applied Biosystems)

Analysenwaage Genius (Sartorius AG)

BD FACSCanto II Flow Cytometer (BD Biosciences)

Binokular Stemi SV6 (Zeiss) mit Kamera AxioCam MRc 5 (Zeiss)

Combispin FVL-2400N mit Vortex (PeqLab)

Dampfsterilisator Varioklav (Medi-Tech)

Digitalwaage Ohaus Precision Advanced (Ohaus)

Entwässerungsautomat HM325 (Microm)

Inkubatoren für die Zellkultur (Thermo Fischer)

Konfokales Laser Scan Mikroskop LSM 510 Meta (Zeiss)

Kühlplatte EG 1150C (Leica)

Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 NLO (Zeiss) mit 40 x 0.8 NA Objektiv (Zeiss) und

Ti : Sapphire 690–1040 nm justierbarem Laser (Chamelion, Coherent)

Magnet-/Heizplatte IKA Combimag RET (Janke und Kunkel GmbH und Co KG)

Magnetplatte Variomag/ Cimatec Biosystem 4 Direct (Thermo Scientific)

Magnetplatte Variomag/ Cimatec Biosystem Direct (Thermo Scientific)

Mikroskop Axioskop 2 (Zeiss) mit Kamera AxioCam (Zeiss)

Mikroskop Axiovert 25 (Zeiss) mit Kamera (Jenoptik)

Mikrotom RM 2125 RT (Leica)

Paraffineinbette EG 1120 (Leica)

pH-Meter, digital (Mettler Toledo)

Pipetten 10/100/1000 μ l (Eppendorf, Pqlab)

Pipettierhilfe accu-jet® pro (Brand)

Sicherheitswerkbank HERAsafe® (Thermo Scientific)

Spektrophotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)

Thermal Cycler PCR Sprint (Hyboid)

Thermal Cycler vapo.protect (Eppendorf)

Thermomixer 5436 (Eppendorf)

Videooptische Messapparatur (Eigenbau) mit Kamera A602f (Basler) und Kamera-Achsenführung (IAI Corporation)

Wasserbad (GFL)

Wasserbad 25900 (Medax)

Zellzähler CASY® (Schärfe System)

Zentrifuge 5415 R (Eppendorf)

Zentrifuge 5810 R (Eppendorf)

Zentrifuge J-6B (Beckmann)

Zentrifuge Rotanta/RP (Hettich)

Zentrifuge Universal 30 RF (Hettich)

11.1.2 Materialien

250 ml Vacuum Filtration "rapid"-Filtermax (TPP, 99250)

500 ml Vacuum Filtration "rapid"-Filtermax (TPP, 99500)

FACS Röhrchen (Sarstedt, 55.1579)

MACS MultiStand (Miltenyi Biotec, 130-042-303)

MACS® Separation Columns (Miltenyi Biotec, 130-042-401 und 130-042-201)

MidiMACS Separator (Miltenyi Biotec, 130-042-302)

MiniMACS Separator (Miltenyi Biotec, 130-042-102)

Neubauer-Zählkammer (Karl-Hecht KG)

Objektträger mit Vertiefung (Thermo Scientific / Menzel Gläser)

Objektträger Superfrost/Plus (Hecht-Assistent)

Pipettenspitzen (Sarstedt)

Pipettenspitzen mit Filter Biosphere® (Sarstedt)

Positiv-Formen, Teflon (eigene Herstellung)

Reaktionsgefäße konisch 15 ml, 50 ml (Sarstedt)

Reaktionsgefäße Safe Lock 0,2 bis 2ml (Eppendorf)

Serologische Pipetten (Sarstedt)

Silikon-Matten für Platten mit 24 Vertiefungen (Jäger Gummi und Kunststoff GmbH & Co. KG und Siltec GmbH)

Silikon-Matten für Platten mit 6 Vertiefungen (eigene Herstellung)

Silikonoberflächen mit Mikrokavitäten (eigene Herstellung)

Spinner Flaschen (INTEGRA Biosciences AG, 182 051 und 182 101)

Sterilfilter Filtropur S 0,2 µm (Sarstedt)

Zellkulturflaschen 25, 75, 175 cm² (Sarstedt)

Zellkulturflaschen mit ultra-niedriger Zelladhäsion, 25 cm² (T25, Corning, 3815) und 75 cm² (T75, Corning, 3814)

Zellkulturschalen, 24-Wells (Nunc)

Zellkulturschalen, 6-Wells (Greiner)

Zellkulturschalen, 6-Wells (Nunc, 140.675)

Zellkulturschalen, 96-Wells (Nunc)

Zellschaber (Sarstedt)

11.1.3 Proteine

Accutase® Cell Dissociation Reagent (Gibco, A11105-01)

Activin A (R&D Systems, 338-AC)

Aprotinin (Sigma-Aldrich, F4753)

BMP4 (R&D Systems, 314-BP)

DNase (Sigma-Aldrich, D8764)

FGF2 (basic FGF, R&D Systems, 233-FB)

Fibrinogen (Sigma-Aldrich, F8630)

Humanes Serumalbumin (Biological Industries, 05-720-1B)

Insulin (Sigma-Aldrich, I9278)

Kollagen I aus Rattenschwanz (Gibco, 13954)

Kollagenase II (Worthington, LS004176)

Kollagenase IV (Gibco, 17104)

Laminin (Gibco, 23017-015)

TGFβ1 (Peprotech, 100-21)

Thrombin (Sigma-Aldrich, T7513)

Transferrin (Sigma-Aldrich, S5261)

TrypLE Select (Gibco, 12563-011)

VEGF₁₆₅ (R&D Systems, 293-VE)

11.1.4 Lösungen, Puffer

Lösung	Zusammensetzung
Antikörperlösung für IHC	0,05 M TBS, pH 7,4 1% BSA (bovines Serum-Albumin) 0,5% Triton X-100
Blockierlösung für IHC	0,05 M TBS, pH 7,4 10% Eselserum 1% BSA (bovines Serum-Albumin) 0,5% Triton X-100
Dissoziationsmedium	DMEM DNase, 6 µl/ml
FACS-Puffer	PBS 5% FCS 0,05% Natriumazid 0,5% Saponin (für intrazelluläre Färbungen)
Kollagenase II Lösung	HBSS MINUS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ Collagenase II, 200 units/ml 10 mM HEPES sterilfiltrieren 0,2 µM
Lugol'sche Lösung, 4%	0,8 g Iod 1,6 g Kaliumiodid 17,6 ml H_2O
Na-Selenit	27 mg Na-Selenit 400 ml PBS
Orange-G	20 g Phosphorwolframsäure 10 g Orange G ad 2 l aqua dest.
Phosphoascorbat, 250 mM	1 g Phosphoascorbat 12,4 ml H_2O
Ponceaurot	20 g Ponceau de Xylidine 10 g Säurefuchsin 4 ml 100% Ethansäure ad 2 l aqua dest.
TBS	150 mM NaCl 10 mM Tris, pH 7,4/ 8,24
Transferrin-Lösung	27,5 mg Transferrin 49,5 ml PBS
Transferrin-Selenium	49,5 ml Transferrin-Lösung 0,5 ml Na-Selenit

11.1.5 Antikörper

11.1.5.1 Primäre Antikörper

Primärer Antikörper	Wirt	Isotyp	Klonalität	Hersteller
Aktin	Maus	IgM, κ	monoklonal	Dako, M0874
Alpha-Aktinin	Maus	IgG	monoklonal	Sigma-Aldrich, A7811
CD45 human	Maus	IgG2a, κ	monoklonal	Dako, M0742
Connexin-43	Maus	IgG	monoklonal	BD Biosciences, 610061
Dystrophin	Maus	IgG1	monoklonal	Millipore, MAB 1645
FITC anti-human CD31	Maus	IgG1, κ	monoklonal	BioLegend, 303104
GFP	Kaninchen	IgG	polyklonal	Abcam, ab290
Ki-67	Kaninchen	IgG	polyklonal	Abcam, ab15580
KL1 (Zytokeratine)	Maus	IgG1	monoklonal	Immunotech, IM1918
Myosin Light Chain 2 (MLC-2V)	Kaninchen	IgG	polyklonal	Proteintech, 10906-1-AP
Myosin Light Chain A (MLC-2A)	Maus	IgG2b	monoklonal	Synaptic Systems, 311011
Neurofilament	Maus	IgG1, κ	monoklonal	Dako, M0762
PH3	Kaninchen		polyklonal	BioCare Medical, CP404A
Troponin T	Maus	IgG	monoklonal	R&D, MAB1874
Troponin T	Kaninchen	IgG	polyklonal	Abcam, ab45932

Tabelle 11: Spezifikation der verwendeten primären Antikörper.

11.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Reaktivität	Label	Wirt	Isotyp	Hersteller
Anti-Kaninchen	Alexa Fluor® 488	Ziege	IgG	Life technologies, A-11034
Anti-Maus	Alexa Fluor® 488	Ziege	IgG	Life technologies, A-11001
Anti-Maus	Alexa Fluor® 546	Kaninchen	IgG	Life technologies, A-11060

Tabelle 12: Spezifikation der verwendeten sekundären Antikörper.

11.1.5.3 Isotypkontrollen

Antikörper	Wirt	Isotyp	Hersteller
FITC mIgG1	Maus	IgG1, κ	BioLegend, 400107
mIgG1	Maus	IgG1, κ	BD Biosciences, 554121
mIgG2b	Maus	IgG2b, κ	BD Biosciences, 555740

Tabelle 13: Spezifikation der verwendeten Isotypkontrollen.

11.1.6 Substanzen

2,3-Butanedione Monoxime (Sigma-Aldrich, B0753)

2-Propanol (Merck Millipore, 107022)

Agarose (Invitrogen, 15510-027)

Anilinblau (Aldrich Chemical, 102-2)

Bovines Serum Albumin (Roth, 8076.3)

CHIR99021 (Cayman Chemical, 13122)

Di-4-ANEPPS (4-(2-(6-(Dibutylamino)-2-naphthalenyl)ethenyl)-1-(3-sulfopropyl)pyridinium
hydroxide inner salt, Sigma-Aldrich, D8064)

DMSO (Sigma-Aldrich, D4540)

EDTA (Roth, 8043.2)

Eosin Y Lösung (AppliChem, A0822)

Ethanol, absolut (J.T. Baker, JT9229-3C)

Ethansäure (Merck Millipore, 100063)

Formaldehyd (Merck Millipore, 107022)

Fura-2/AM (Sigma-Aldrich, F0888)

HEPES (Sigma-Aldrich, 9105.4)

Histofix (Roth, P087.3)

IWR (Sigma-Aldrich, I0161)

Magnesium Ascorbyl-Phosphat (Merck)

Mayer`s Hämatoxylin (Sigma-Aldrich, 51275)

Mowiol® 4-88 (AppliChem, A9011)

MTG (Sigma-Aldrich, M6145)

Natriumazid (Sigma-Aldrich, 71290)

Na-Selenit (Sigma-Aldrich, T8158)

Orange G (Sigma-Aldrich, 03756)

Paraffin (Sigma-Aldrich, 327204)

Phosphoascorbat (2-Phospho-L-ascorbic acid trisodium salt, Sigma-Aldrich, 49752)

Pimonidazol (Sigma-Aldrich, N1165)

Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich, P2443)
Polybrene (Hexadimethrine bromide; Sigma-Aldrich, 107689)
Ponceau de Xylidine (Sigma-Aldrich, P-2395)
PVA (Sigma-Aldrich, P8136)
Saponin (Sigma-Aldrich, 47036)
Säurefuchsin (Sigma-Aldrich, A-3908)
TBS (Sigma-Aldrich, T6664)
Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T8787)
Trypan-Blau (Biochrom, L 6323)
Xylolersatz Roti®-Histol (Roth, 6640)
Y-27632 (Biaffin, PKI-Y27632-010)

11.1.7 Small molecules

4-(*cis-endo*-1,3-dioxooctahydro-2*H*-4,7-methanoisoindol-2-yl)-*N*-(quinolin-8-yl)-*trans*-cyclohexylcarboxamide (DS-I-7, Dr. Dennis Schade, Technische Universität Dortmund)
CHIR99021 (6-[[2-[[4-(2,4-dichlorophenyl)-5-(5-methyl-1*H*-imidazol-2-yl)-2-pyrimidinyl]amino]ethyl]amino]-3-pyridinecarbonitrile, Cayman Chemical, 13122)
DS-I-6 (Dr. Dennis Schade, Technische Universität Dortmund)
Dorsomorphin (abcam, ab120843)
IWP-4 (Cayman Chemical, 13954)
IWR-1 (Sigma-Aldrich, I0161)
Y-27632 (Biaffin, PKI-Y27632-010)

11.1.8 Pharmakologische Wirkstoffe

BIOMYC-1 (PromoCell, PK-CC03-036-1B)
BIOMYC-2 (PromoCell, PK-CC03-037-1B)
Blasticidin S (InvivoGen, ant-bl-1)
Buprenorphin (Buprenovet®, Bayer)
Carprofen (Rimadyl®, Pfizer)
Cyclosporin A (Sandimmun®, Novartis Pharma)
Isofluran (Furan, AbbVie)
Methylprednisolon (Urbason®, Sanofi-Aventis)

Penicillin/ Streptomycin (Gibco, 15140)

Plasmocin™ (InvivoGen, ant-mpp)

11.1.9 Kits

CD31 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, 130-091-935)

Click-iT® Plus EdU Flow Cytometrie Assay Kit (Life Technologies, C10632)

dNTP mix (Thermo Scientific, R1121)

DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific, EP0702)

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4368814)

Maxima SYPBR Green / ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, K0222)

Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, 69506)

Qiagen RNeasy Kit (Qiagen, 74104)

11.1.10 Primer für quantitative real-time PCR

Alle verwendeten Primer für die quantitative PCR wurden mit dem NCBI Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) komplementär zur cDNA entworfen. Bei den untersuchten Genen überspannt der amplifizierte Bereich mindestens ein Intron (*intron spanning*). Die Schmelztemperatur beträgt bei allen Primern zwischen 59 °C und 61 °C und die Länge des PCR-Produkts liegt zwischen 150 und 250 Basenpaaren. Sämtliche Oligonukleotide wurde bei der Firma MWG/Eurofins gekauft.

Name	Gen	NM nummer	Primer (vorwärts)	Primer (rückwärts)
Alpha MHC	MYH6	NM_002471	TTCATTGACTTTGGCATGGA	GGCTTCTGGAAATTGTTGGA
Atlastin GTPase	ATL1	NM_019554.2	CTTGACACGCTGTTGCTAT	CCTGTTGCTGTCCAAGTTGC
Beta MHC	MYH7	NM_000257.2	CACAGCTCTGCTCTGCTCTG	TTCTAGCCGCTCCTTCTCTG
Brachyury homolog	T	NM_003181.2	GCAAAAGCTTTCCTTGATGC	ATGAGGATTTCAGGTGGAC
Calponin	CNN1		AAGGACGCACTGAGCAACGC TATT	ACGCCACTGTACATCCACAT AGT
Cardiac troponin T (total)	TNNT2	NM_001001432 Etc.	TTCGACCTGCAGGAGAAGTT	GAGCGAGGAGCAGATCTTTG
Cluster of differentiation 31	PECAM1		TCTATGACCTCGCCCTCCACA AA	GAACGGTGTCTTCAGGTTGG TATTCA
Cluster of differentiation 45	CD45		ACCACTGCATTCTACCCGCA AG	GTTTTGCATTGGCGCGGAG C
Connexin 43	GJA1	NM_000165.3	TGAGTGCCTGAACTTGCCTT	ATCTCCCCAGGCTGACTCAA
Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase	DDR2	NM_001014796 .1	TTTTTGGGTGGGGAAACGC	TCCTCAAAAACAGCTGGCCT

Anhang - Geräte, Materialien und Substanzen

Forkhead box A2	FOXA2	NM_153675.1	GCATTCCCAATCTTGACACGG TGA	GCCCTTGACGCCAGAATACA CATT
Glucuronidase beta	GUSB	NM_000181.1	AAACGATTGCAGGGTTTCAC	CTCTCGTCGGTGACTGTTCA
Islet	ISL1	NM_002202.1	GTTACCAGCCACCTTGGA	GGACTGGCTACCATGCTGTT
Kinase insert domain receptor, VEGFR2	KDR/ FLK1	NM_002253.1	GCGATGGCCTCTTCTGTAAG	ACACGACTCCATGTTGGTCA
Mesenchyme homeobox 1	MEOX1		TGGAAGCGTGTGAAGGGAG GT	AAGGAAGAGGGTGAAGGTG GGATTG
Mesoderm posterior 1 homolog	MESP1	NM_018670.1	GAAGTGGTTCCTTGCCAGAC	TCCTGCTTGCCTCAAAGTGT
Mykoplasmen			ACTCCTACGGGAGGCAGCAG TA	TGCACCATCTGTCAC TCTGTAAACCTC
Neurogenic differentiation 1	NEUROD1		CGCCCGCGCTTAGCATCACTA	AGTCTCATAACCCTGGGGCC TCC
Oct4 POU class 5 homeobox 1	POU5F1	NM_203289.2 NM_002701.3	CGAAAGAGAAAGCGAACCA G	GCCGGTTACAGAACCACACT
Paired box 6	PAX6		CTCTGCCGCTATGCCAGC	GAAGTGGTGCCCGAGGTGCC
Periostin	POSTN	NM_001135936 .1	TGTCGTGGTAGCACCTTCAA	AACTTCTCACGGGTGTGTC
Sex determining region Y- box 1	SOX1		CCTGTGTGTACCCTGGAGTTT CTGT	TGCACGAAGCACCTGCAATA AGATG
Sex determining region Y- box 17	SOX17		AGGAAATCCTCAGACTCCTG GGTT	CCCAAAGTGTCAAGTGGCA GACA
Smooth muscle actin	ACTA2		AATACTCTGTCTGGATCGGT GGCT	ACGAGTCAGAGCTTTGGCTA GGAA
VE-Cadherin	CDH5		TGGAGAAGTGGCATCAGTCA ACAG	TCTACAATCCCTGCAAGTGTG AG
Vimentin	VIM	NM_003380.3	GGACCAGCTAACCAACGACA	AAGGTCAAGACGTGCCAGAG

Tabelle 14: Primer für die quantitative PCR. Die Sequenzen sind von 5' nach 3' angegeben.

11.1.11 Primer für PCR

Die verwendeten Primer für die PCR wurden mit dem NCBI Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) komplementär zur DNA entworfen. Die Schmelztemperatur beträgt 59,6° und 59,9° C und die Länge des PCR-Produkts beträgt 480 Basenpaare. Die Oligonukleotide wurde bei der Firma MWG/Eurofins gekauft.

Name	Gen	Primer (forwärts)	Primer (rückwärts)
Nanog	NANOG	TGCTCGGTTTTCTAGTTCCCCACCT	AGGCAAGCTTTGGGGACAAGCT

Tabelle 15: Primer für die PCR. Die Sequenzen sind von 5' nach 3' angegeben.

11.2 Sicherheitsinformationen

Substanz	CAS Nummer	H-Sätze	P-Sätze
Anilinblau	61813-75-0	H: 319	P: 305+351+338
Buprenorphin	52485-79-7	H: 302-361	P: 281
Carprofen	53716-49-7	H: 301	P: 301+310
CHIR99021	252917-06-9	H: 302-315-318-361	P: 264-280-362+364-201-202-281-301+312-330-302+352-P332+313-305+351+338-310-308+313
Cyclosporin A	59865-13-3	H: 302-350-360	P: 201-308+313
EDTA	60-00-4	H: 319	P: 305+351+338
Ethanol, abs.	64-17-5	H: 225	P: 210
Ethansäure	64-19-7	H: 226-314	P: 280-301+330+331-307+310-305+351+338
Formaldehyd	50-00-0	H: 351-331-311-301-314-317	P: 301+310-303+361+353-305+351+338 320-361-405-501
Hämatoxylin	517-28-2	H: 315-319-335	P: 261-305+351+338-302+352-321-405-501
Isofluran	26675-46-7	H: 336	P: 304+340-312-403+233-405-501
Methanol	67-56-1	H: 225-331-311-301-370	P: 210-233-280-302+352
Natriumazid	26628-22-8	H: 300-400-410	P: 273-309-310
Natriumhydroxid	1310-73-2	H: 314	P: 280-301+330+331-309-310-305+351+338
Paraformaldehyd	30525-89-4	H: 228-302-332-351-335-315-319-317	P: 281-302+352-305+351+338-308+313-304+340
Penicillin	61-33-6	H: 317	P: 280
Ponceau de Xylidin	3761-53-3	H: 351	P: 281
Ponceau S	6226-79-5	H: 315-319-335	P: 261-305+351+338
Salzsäure	7647-01-0	H: 314-335	P: 260-301+330+331-303+361+353-305+351+338-405-501
Säurefuchsin	3244-88-0	H: 315-319-335	P: 261-305+351+338
Streptomycin	57-92-1	H: 302	
Triton X-100	9002-93-1	H: 302-318-411	P: 273-280-305+351+338
Trypanblau	72-57-1	H: 350	P: 201-308+313
Xylol-Ersatz	64742-49-0	H: 304-226-400-410-315-317	P210-280-273-301+310-303+361+353-332+313
Y-27632	331752-47-7	H302-H312-H332	P: 280

Tabelle 16: Sicherheitsinformationen zu allen verwendeten Substanzen, Bedeutung der H- und P-Sätze siehe unter 11.2.1 und 11.2.2.

Alle Versuche wurden, unter Berücksichtigung der Sicherheitsdatenblätter der gentechnischen Anlage, in Laboren der Sicherheitsstufe 1 und 2 durchgeführt. Die Entsorgung von Chemikalien, Lösungen und Puffern erfolgte in die dafür vorgesehenen Behälter. Alle Zellsuspensionen und kontaminierte Materialien wurden vor Entsorgung oder Wiederverwendung autoklaviert und mit GVOs in Berührung gekommene Oberflächen mit 70% Ethanol desinfiziert.

11.2.1 H-Sätze

- H200 Instabil, explosiv.
H201 Explosiv, Gefahr der Massenexplosion.
H202 Explosiv; große Gefahr durch Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H203 Explosiv; Gefahr durch Feuer, Luftdruck oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H204 Gefahr durch Feuer oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
H205 Gefahr der Massenexplosion bei Feuer.
H220 Extrem entzündbares Gas.
H221 Entzündbares Gas.
H222 Extrem entzündbares Aerosol.
H223 Entzündbares Aerosol.
H224 Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.
H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226 Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H228 Entzündbarer Feststoff.
H240 Erwärmung kann Explosion verursachen.
H241 Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen.
H242 Erwärmung kann Brand verursachen.
H250 Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.
H251 Selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
H252 In großen Mengen selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
H260 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können.
H261 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase.
H270 Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.
H271 Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.
H272 Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
H280 Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
H281 Enthält tiefgekühltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder –Verletzungen verursachen.
H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H300 Lebensgefahr bei Verschlucken.
H301 Giftig bei Verschlucken.
H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.
H311 Giftig bei Hautkontakt.
H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H315 Verursacht Hautreizungen.
H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H318 Verursacht schwere Augenschäden.
H319 Verursacht schwere Augenreizung.
H330 Lebensgefahr bei Einatmen.
H331 Giftig bei Einatmen.
H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335 Kann die Atemwege reizen.
H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H340 Kann genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H350 Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H350i Kann bei Einatmen Krebs erzeugen.
H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H360 F Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H360 D Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H360 FD Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H360 Fd Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H360 Df Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H361 Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H361 f Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.

Anhang - Sicherheitsinformationen

- H361 d Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
- H361 fd Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
- H362 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
- H370 Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H371 Kann die Organe schädigen (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H372 Schädigt die Organe (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H373 Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H400 Sehr giftig für Wasserorganismen.
- H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
- H411 Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- H413 Kann für Wasserorganismen schädlich sein, mit langfristiger Wirkung.
- EUH001 In trockenem Zustand explosiv.
- EUH006 Mit und ohne Luft explosionsfähig.
- EUH014 Reagiert heftig mit Wasser.
- EUH018 Kann bei Verwendung explosionsfähige / entzündbare Dampf /Luft-Gemische bilden.
- EUH019 Kann explosionsfähige Peroxide bilden.
- EUH044 Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss.
- EUH029 Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.
- EUH031 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.
- EUH032 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
- EUH059 Die Ozonschicht schädigend.
- EUH066 Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.
- EUH070 Giftig bei Berührung mit den Augen.
- EUH071 Wirkt ätzend auf die Atemwege.
- EUH201 Enthält Blei. Nicht für den Anstrich von Gegenständen verwenden, die von Kindern gekaut oder gelutscht werden könnten.
- EUH201 A Achtung! Enthält Blei.
- EUH202 Cyanacrylat. Gefahr. Klebt innerhalb von Sekunden Haut und Augenlider zusammen. Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
- EUH203 Enthält Chrom(VI). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
- EUH204 Enthält Isocyanate. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
- EUH205 Enthält epoxidhaltige Verbindungen. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
- EUH206 Achtung! Nicht zusammen mit anderen Produkten verwenden, da gefährliche Gase (Chlor) freigesetzt werden können.
- EUH207 Achtung! Enthält Cadmium. Bei der Verwendung entstehen gefährliche Dämpfe. Hinweise des Herstellers beachten. Sicherheitsanweisungen einhalten.
- EUH208 Enthält (Name des sensibilisierenden Stoffes). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
- EUH209 Kann bei Verwendung leicht entzündbar werden.
- EUH209 A Kann bei Verwendung entzündbar werden.
- EUH210 Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
- EUH401 Zur Vermeidung von Risiken für Mensch und Umwelt die Gebrauchsanleitung einhalten.

11.2.2 P-Sätze

- P101 Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.
- P102 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
- P103 Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.
- P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
- P202 Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
- P210 Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
- P211 Nicht gegen offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen.
- P220 Von Kleidung /.../ brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.
- P221 Mischen mit brennbaren Stoffen /... unbedingt verhindern.
- P222 Kontakt mit Luft nicht zulassen.
- P223 Kontakt mit Wasser wegen heftiger Reaktion und möglichem Aufflammen unbedingt verhindern.
- P230 Feucht halten mit
- P231 Unter inertem Gas handhaben.
- P232 Vor Feuchtigkeit schützen.
- P233 Behälter dicht verschlossen halten.
- P234 Nur im Originalbehälter aufbewahren.
- P235 Kühl halten.
- P240 Behälter und zu befüllende Anlage erden.
- P241 Explosionsgeschützte elektrische Betriebsmittel / Lüftungsanlagen / Beleuchtung /... verwenden.
- P242 Nur funkenfreies Werkzeug verwenden.
- P243 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.
- P244 Druckminderer frei von Fett und Öl halten.
- P250 Nicht schleifen / stoßen /.../ reiben.
- P251 Behälter steht unter Druck: Nicht durchstechen oder verbrennen, auch nicht nach der Verwendung.
- P260 Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.
- P261 Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
- P262 Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.
- P263 Kontakt während der Schwangerschaft / und der Stillzeit vermeiden.
- P264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen.
- P270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
- P271 Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
- P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
- P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
- P280 Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
- P281 Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.
- P282 Schutzhandschuhe / Gesichtsschild / Augenschutz mit Kälteisolierung tragen.
- P283 Schwer entflammbare / flammhemmende Kleidung tragen.
- P284 Atemschutz tragen.
- P285 Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.
- P231 + P232 Unter inertem Gas handhaben. Vor Feuchtigkeit schützen.
- P235 + P410 Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen.
- P301 Bei Verschlucken:
- P302 Bei Berührung mit der Haut:
- P303 Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):
- P304 Bei Einatmen:
- P305 Bei Kontakt mit den Augen:
- P306 Bei kontaminierter Kleidung:
- P307 Bei Exposition:
- P308 Bei Exposition oder falls betroffen:
- P309 Bei Exposition oder Unwohlsein:
- P310 Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P311 Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P312 Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P313 Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P314 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P315 Sofort ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P320 Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P321 Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P322 Gezielte Maßnahmen (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P330 Mund ausspülen.
- P331 Kein Erbrechen herbeiführen.
- P332 Bei Hautreizung:
- P333 Bei Hautreizung oder -ausschlag:
- P334 In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.
- P335 Lose Partikel von der Haut abbürsten.
- P336 Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben.
- P337 Bei anhaltender Augenreizung:

Anhang - Sicherheitsinformationen

P338 Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
P340 Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P341 Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P342 Bei Symptomen der Atemwege:
P350 Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
P351 Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
P352 Mit viel Wasser und Seife waschen.
P353 Haut mit Wasser abwaschen / duschen.
P360 Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
P361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
P362 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
P363 Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
P370 Bei Brand:
P371 Bei Großbrand und großen Mengen:
P372 Explosionsgefahr bei Brand.
P373 Keine Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe / Gemische / Erzeugnisse erreicht.
P374 Brandbekämpfung mit üblichen Vorsichtsmaßnahmen aus angemessener Entfernung.
P375 Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
P376 Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
P377 Brand von ausströmendem Gas: Nicht löschen, bis Undichtigkeit gefahrlos beseitigt werden kann.
P378 ... zum Löschen verwenden.
P380 Umgebung räumen.
P381 Alle Zündquellen entfernen, wenn gefahrlos möglich.
P390 Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
P391 Verschüttete Mengen aufnehmen.
P301 + P310 Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P301 + P312 Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P301 + P330 + P331 Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.
P302 + P334 Bei Kontakt mit der Haut: In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.
P302 + P350 Bei Kontakt mit der Haut: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.

P302 + P352 Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.
P303 + P361 + P353 Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
P304 + P340 Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P304 + P341 Bei Einatmen: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P305 + P351 + P338 Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P306 + P360 Bei Kontakt mit der Kleidung: Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
P307 + P311 Bei Exposition: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P308 + P313 Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P309 + P311 Bei Exposition oder Unwohlsein: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P332 + P313 Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P333 + P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P335 + P334 Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.
P337 + P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P342 + P311 Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P370 + P376 Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
P370 + P378 Bei Brand: ... zum Löschen verwenden.
P370 + P380 Bei Brand: Umgebung räumen.
P370 + P380 + P375 Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
P371 + P380 + P375 Bei Großbrand und großen Mengen: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
P401 ... aufbewahren.
P402 An einem trockenen Ort aufbewahren.
P403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
P404 In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.

Anhang - Sicherheitsinformationen

P405 Unter Verschluss aufbewahren.

P406 In korrosionsbeständigem /... Behälter mit
korrosionsbeständiger Auskleidung
aufbewahren.

P407 Luftspalt zwischen Stapeln / Paletten lassen.

P410 Vor Sonnenbestrahlung schützen.

P411 Bei Temperaturen von nicht mehr als ... °C / ...
aufbewahren.

P412 Nicht Temperaturen von mehr als 50 °C
aussetzen.

P413 Schüttgut in Mengen von mehr als ... kg bei
Temperaturen von nicht mehr als ... °C
aufbewahren.

P420 Von anderen Materialien entfernt
aufbewahren.

P422 Inhalt in / unter ... aufbewahren

P402 + P404 In einem geschlossenen Behälter an
einem trockenen Ort aufbewahren.

P403 + P233 Behälter dicht verschlossen an einem
gut belüfteten Ort aufbewahren.

P403 + P235 Kühl an einem gut belüfteten Ort
aufbewahren.

P410 + P403 Vor Sonnenbestrahlung geschützt an
einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

P410 + P412 Vor Sonnenbestrahlung schützen und
nicht Temperaturen von mehr als 50 °C
aussetzen.

P411 + P235 Kühl und bei Temperaturen von nicht
mehr als ... °C aufbewahren.

P501 Inhalt / Behälter ... zuführen.

11.3 Abkürzungen

	Englisch	Deutsch
2PLSM	2-photon laser scanning microscopie	2-Photon Laser Scanning Mikroskopie
AAV	Adeno-associated virus	Adeno-assoziiertes Virus
AC	Adenylate cyclase	Adenylatcyclase
ACE	Angiotensin-converting enzyme	Angiotensin-konvertierendes Enzym
AP	Actionpotential	Aktionspotential
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintriphosphat
AV-Knoten	Atrioventricular knote	Atrioventrikularknoten
BMP4	Bone morphogenic protein 4	Bone morphogenic protein 4
BPM	Beats per minute	Schläge pro Minute
BSA	Bovine serum albumin	bovines Serum-Albumin
Ca²⁺	Calcium ion	Calcium-Ion
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CM	Conditioned medium	Konditioniertes Medium
CT	Cycle threshold (qPCR)	Zyklus-Schwellenwert (qPCR)
CV	Contraction velocity	Kontraktionsgeschwindigkeit
d	Day	Tag
DKK1	Dickkopf-related protein 1	Dickkopf-verwandtes Protein 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
DS-I-7	4-(<i>cis-endo</i> -1,3-dioxooctahydro-2 <i>H</i> -4,7-methanoisindol-2-yl)- <i>N</i> -(quinolin-8-yl)- <i>trans</i> -cyclohexylcarboxamide	4-(<i>cis-endo</i> -1,3-dioxooctahydro-2 <i>H</i> -4,7-methanoisindol-2-yl)- <i>N</i> -(quinolin-8-yl)- <i>trans</i> -cyclohexylcarboxamid
EB	Embryoid Body	Embryoidkörperchen
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine	5-ethynyl-2'-deoxyuridin
ED_{vol}	Enddiastolic volume	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejection fraction	Auswurfraction
EHT	Engineered Heart Tissue	Künstliches Herzgewebe
EKG	Electrocardiography	Elektrokardiogramm
ENDO area d	Endocardial area diastole	Endokardiale Fläche Diastole
ENDO area s	Endocardial area systole	Endokardiale Fläche Systole
EPC	endothelial progenitor cells	Epitheliale Vorläuferzelle
EPI area d	Epicardial area diastole	Epikardiale Fläche Diastole
EPI area s	Epicardial area systole	Epikardiale Fläche Systole
ESC	Embryonic stem cell	Embryonale Stammzelle
ES_{vol}	Endsystolic volume	Endsystolisches Volumen
F	Force	Kraft
FACS	Fluorescence activated cell sorting	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
FAS	Fractional area shortening	Fraktionelle Flächenverkürzung
FCS	Fetal calf serum	Fetales Kälberserum
FDM	Fully defined medium	Vollständig definiertes Medium
FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	Fibroblastenwachstumsfaktor 2
FHF	First heart field	erstes Herzfeld

Anhang - Abkürzungen

FS	Fractional shortening	Fraktionelle Verkürzung
GFP	Green fluorescent protein	grün fluoreszierendes Protein
GUSB	Glucoronidase beta	Glucoronidase beta
HE	Hematoxylin and eosin	Hämatoxylin und Eosin
HEK293	Human embryonic kidney	Humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
hESC	Human embryonic stem cells	Humane embryonale Stammzelle
hiPSC	Human induced pluripotent stem cell	Humane induzierte pluripotente Stammzelle
hiPS-EC	hiPS-endothelial cell	hiPS-Endothelzelle
hiPS-KM	hiPS-cardiomyocyte	hiPS-Kardiomyozyte
hKM	Human cardiomyocyte	humane Kardiomyozyte
HS	Horse serum	Pferdeserum
IC₅₀	half maximal inhibitory concentration	Mittlere inhibitorische Konzentration
IGF	Insulin like growthfactor	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IHC	Immunehistochemistry	Immunhistochemie
I_{Kr}	Inward delayed rectifier, rapid	Kaliumaustrom, schnell
I_{Ks}	Inward delayed rectifier, slow	Kaliumaustrom, langsam
iPSC	Induced pluripotent stem cell	induzierte pluripotente Stammzelle
ISL1	Islet-1	Islet-1
IVS d	Intraventricular septum- diastole	Intraventrikuläres Septum- Diastole
IVS s	Intraventricular septum- systole	Intraventrikuläres Septum- Systole
IWP-2	N-(6-Methyl-2-benzothiazolyl)-2-[(3,4,6,7-tetrahydro-4-oxo-3-phenylthieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl)thio]-acetamide	N-(6-Methyl-2-benzothiazolyl)-2-[(3,4,6,7-tetrahydro-4-oxo-3-phenylthieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl)thio]-acetamid
IWR-1	4-(1,3,3a,4,7,7a-Hexahydro-1,3-dioxo-4,7-methano-2H-isoindol-2-yl)-N-8-quinoliny-benzamide	4-(1,3,3a,4,7,7a-Hexahydro-1,3-dioxo-4,7-methano-2H-isoindol-2-yl)-N-8-quinoliny-benzamid
KDR	Kinase domain inert receptor	VEGF-Rezeptor
KG	Body weight	Körpergewicht
Klf4	Krüppel-like factor 4	Krüppel-like factor 4
LIF	Leukemia inhibitory factor	Leukemia inhibitory factor
LV Mass	Left ventricular mass	Linksventrikuläre Masse
LV Vol d	Left ventricular volume diastole	Volumen des linken Ventrikels Diastole
LV Vol s	Left ventricular volume systole	Volumen des linken Ventrikels Systole
LVIDd	Left ventricular internal dimension-diastole	Enddiastolischer innerer Durchmesser des linken Ventrikels
LVIDs	Left ventricular internal dimension-systole	Endsystolischer innerer Durchmesser des linken Ventrikels
LVPWd	Left ventricular posterior wall - diastole	Linksventrikuläre Hinterwand Diastole
LVPWs	Left ventricular posterior wall - Systole	Linksventrikuläre Hinterwand Systole
MEF	Mouse embryonic fibroblast	Murine embryonale Fibroblasten
MESP1	Mesoderm posterior 1 homolog	Mesoderm posterior 1 homolog
MLC-2A	Myosin light chain 2A (atrial, fetal)	Myosin leichte Kette 2A (atriell, fetal)
MLC-2V	Myosin light chain 2V (ventricular)	Myosin leichte Kette 2V (ventrikulär)

Anhang - Abkürzungen

MOI	Multiplicity of infection	Virenanzahl pro Zelle
MTG		1-Thioglycerol
MYH6	Myosin heavy chain, alpha	Myosin, schwere Kette, alpha
MYH7	Myosin heavy chain, beta	Myosin, schwere Kette, beta
NANOG	Nanog	Nanog
NEAA	Non-essential aMinuteno acid	Nicht-essentielle Aminosäure
Oct-4	octamer-binding transcription factor 4	octamer-binding transcription factor 4
PBS	Phosphate buffered saline	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor	Platelet derived growth factor
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor	PDGF-Rezeptor
PKA	Protein kinase A	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban	Phospholamban
POU5F1	POU class 5 homeobox 1, Oct-4	POU class 5 homeobox 1, Oct-4
PS	Primitve Streak	Primitivstreifen
PVA	Polyvinyl alcohol	Polyvenylalkohol
qPCR	Quantitative real-time PCR	Quantitative Real-Time PCR
rH	Relative humidity	Relative Luftfeuchtigkeit
RIVA	<i>Ramus interventrikularis anterior</i>	<i>Ramus interventrikularis anterior</i>
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleinsäure
RPM	Revolutions per minute	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	Reverse-transcription PCR	Reverse Transkriptions-PCR
RV	Relaxation velocity	Relaxationsgeschwindigkeit
RYR2	Ryanodine receptor 2	Ryanodin-Rezeptor 2
s.c.	subcutaneous	subkutan
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase	Calciumpumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums
SHF	Second heart field	zweites Herzfeld
SLC8A1	NCX (sodium calcium exchanger)	Natrium-Calcium-Austauscher
Sox-2	sex determining region Y-box 2	Geschlechtsdeterminierende Region Y-Box 2
SR	Sarcoplasmic reticulum	Sarkoplasmatisches Retikulum
T	Brachyury homolog	Brachyury Homolog
TBS	Tris buffered saline	Tris-gepufferte Salzlösung
TGF-β	TransforMinuteng growth factor	Transformierender Wachstumsfaktor
TNNT2	cardiac troponin T	Kardiales Tropnin T
ULA	Ultra low attachment	Ultra-niedrige Zelladhäsion
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
β-ADR	β-adrenergic receptor	β-adrenerger Rezeptor

Tabelle 17: Abkürzungen und ihre Bedeutung.

11.4 Finanzielle Förderung

Dieses Projekt wurde finanziell durch die Deutsche Herzstiftung, das Deutsche Zentrum für Herz-Kreislauf Forschung (DZHK) und die Werner-Otto-Stiftung gefördert.

11.5 Veröffentlichungen

Folgende Manuskripte sind in Arbeit:

- Generation of human Engineered Heart Tissue
Autoren: Kaja Breckwoldt, Sebastian Schaaf, David Letuffe-Brenière, Christiane Neuber, Ingra Vollert, Arne Hansen, Thomas Eschenhagen
- Human induced pluripotent stem cells for tissue-engineered cardiac repair
Autoren: Kaja Breckwoldt, Florian Weinberger, Simon Pecha, Birgit Geertz, Jutta Starbatty, Arne Hansen, Thomas Eschenhagen
- Functional relevance of endothelial hypoxia-sensitive long non-coding RNAs
Autoren: Jan Fiedler, Kaja Breckwoldt, Christian Remmele, Angelika Pfanne, Annette Just, Marcus Dittrich, Arne Hansen, Thomas Dandekar, Thomas Eschenhagen, Thomas Thum

11.5.1 Kongressteilnahmen

1st Annual Conference of the German Stem Cell Network, 11/2013:

Human induced pluripotent stem cells for tissue-engineered cardiac repair, Posterpräsentation.

Frontiers in CardioVascular Biology 2014 meeting Barcelona, 7/2014:

Human induced pluripotent stem cells for tissue-engineered cardiac repair, Young Investigators Competition, Follow-up Prize.

12 Danksagung

Nach spannenden Jahren intensiver Arbeit ist sie nun fertig – meine Dissertation. Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person. Daher es an der Zeit, mich bei denjenigen zu bedanken, die mich in dieser aufregenden Phase meiner akademischen Laufbahn begleitet haben. Zu besonderem Dank bin ich Herrn Prof. Eschenhagen verpflichtet, der mir das Forschen an seinem Institut an diesem vielfältigen und äußerst interessanten Thema ermöglicht hat und mich als Doktorvater stets mit seinen Anregungen unterstützt hat. Auch Frau Prof. Oetjen bin ich für ihr zweites Gutachten zu Dank verpflichtet. Hervorheben möchte ich die außerordentlich gute Betreuung und Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Hansen und Herrn Dr. Weinberger, die mit ihrem unerschöpflichen Fundus an thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen und ihrer tatkräftigen Unterstützung im Labor ganz entscheidend zum Erfolg des Projektes beigetragen haben. Meinen wissenschaftlichen Kollegen am Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit und die überragende Arbeitsatmosphäre, ohne die vielen wertvollen Ratschläge wäre diese Arbeit nicht entstanden. Insbesondere danke ich Simon Pecha, der im OP Meisterleistungen vollbracht hat, Birgit Geertz für die tollen Echo-Aufnahmen und ihre Hilfe im OP, Jutta Starbatty für ihre Unterstützung bei der histologischen Aufarbeitung und der Stammzellgruppe für ihren unermüdlichen Fleiß bei der Differenzierung. Ebenso vielen Dank an die HEXT Stem Cell Facility und die HEXT Mauspathologie Facility. Die 2PLSM waren durch eine Kooperation mit Prof. Godfrey Smith von der Universität Glasgow und Dr. Allen Kelly von der NTNU in Trondheim möglich, vielen Dank für die spannenden Versuche! Herzlichen Dank auch an Prof. Oliver Müller für die Bereitstellung der zahlreichen AAVs.

Ein derartiges Projekt benötigt natürlich auch finanzielle Förderungen. Ohne die Deutsche Herzstiftung, das Deutsche Zentrum für Herz-Kreislauf Forschung und die Werner-Otto-Stiftung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Genauso aufregend waren die vergangenen Jahre für meinen Freund Timur, der jederzeit ein offenes Ohr für die Probleme des Wissenschaftleralltags hatte und die tollen Mikro-Ct Aufnahmen gemacht hat.

Nicht zu vergessen sind an dieser Stelle meine Eltern, die mir das Studium mit ihrer fortwährenden Unterstützung überhaupt erst ermöglicht haben.

13 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kaja Breckwoldt, M.Sc.

Geburtsdatum, -ort: 13.02.1988, Hamburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung

1994 -1998: Stadtschule Rotenburg/Wümme

1998- März 2003: staatlich anerkanntes Gymnasium in freier Trägerschaft Eichenschule
Scheeßel

April 2003 – Juni 2006: Gymnasium Rissen in Hamburg

Schulabschluss

14.06.2006: Allgemeine Hochschulreife

Studium

2006 – 2009: Bachelor of Science Molecular Life Science Universität Hamburg

2009 - 2011: Master of Science Molecular Life Science Universität Hamburg

Akademischer Abschluss

16.07.2009: Bachelor of Science

Bachelorarbeit: „Einfluss der D-myo-inositol-1,4,5-trisphosphatkinase A auf die Aktinpolymerisierung“ in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Windhorst am Institut für Biochemie und Signaltransduktion, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

04.10.2011: Master of Science

Masterarbeit: „Untersuchungen zur Funktion des Glykoproteins CEACAM10 bei der Angiogenese in der Maus“ in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Horst am Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Seit Januar 2012: Promotion am Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

14 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die an der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„Kardiale Gewebeersatztherapie mittels künstlichem Herzgewebe aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen“

am Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen, der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Arne Hansen und Herrn Dr. med. Florian Weinberger und der Betreuung durch Frau Prof. Dr. Elke Oetjen für den Fachbereich Chemie ohne fremde Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen, als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner versichere ich, dass ich bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht habe.

Hamburg, den 20.04.2015