

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Universitäres Herz- und Gefäßzentrum

Prof. Dr. Dr. Hermann Reichenspurner

Optimierung geometrischer Formen von künstlich hergestelltem Herzgewebe zur Verbesserung des Zellüberlebens

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Vorgelegt von:
Louisa Degener
aus Witten

Hamburg 2023

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 23.06.2023

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Arne Hansen

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Simon Pecha

Für meine Eltern und meine Schwester Clara Sophia

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung	4
1.1 Myokardinfarkt	4
1.1.1 Pathogenese	4
1.1.2 Therapie	6
1.2 Regenerative Medizin	8
1.2.1 Kardiales Tissue Engineering	9
1.2.2 Human induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC Zellen)	11
1.2.3 Grenzen und Potential des kardialen Tissue Engineering	13
1.3 Sauerstoff	14
1.3.1 Sauerstoffdiffusion	15
1.3.2 Hypoxie im Gewebe	16
2 Fragestellung	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Hilfsmittel und Geräte	18
3.2 Chemikalien und Lösungen	20
3.3 Zellkulturmedien	22
3.4 Primer	24
3.5 Mathematische Herleitung von Oberflächen-Volumen-Verhältnissen	25
3.6 Methoden der Zellkultur	27
3.6.1 Kultivierung von hiPSC Zellen	27
3.6.2 Lentivirale Transduktion von hiPSC Zellen mit Firefly Luciferase	27
3.6.3 Mycoplasmentest	29
3.6.4 Behandlung von Mycoplasmeninfektionen	30
3.6.5 Differenzierung der hiPSC-Zellkultur zu hiPSC-Kardiomyozyten	30
3.6.6 Kultivierung der hiPSC-Kardiomyozyten	31
3.7 Zellzahl und Zellgrößenbestimmung	32
3.8 Karyotypisierung	33
3.9 Zubehör für die EHT Generierung	33

3.9.1	Herstellung des Zubehörs für Infinity-EHTs und des Ring-EHTs	35
3.9.2	Herstellung des Zubehörs für Streifen-EHTs	36
3.10	Herstellung von EHTs	37
3.10.1	Kultivierung der EHTs	39
3.11	Hypoxieexperiment	39
3.12	Molekularbiologie	40
3.12.1	RNA Isolation	40
3.12.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	41
3.12.3	Reverse Transkription	41
3.12.4	PCR	42
3.12.5	Gelelektrophorese	44
3.12.6	Quantitative Echtzeit-PCR (RT-PCR)	44
3.12.7	DNA Isolation	45
3.13	Durchflusszytometrie	46
3.14	Histologie	47
3.14.1	Fixierung, Paraffineinbettung und Schneiden	47
3.14.2	Deparaffinierung und Antigendemaskierung	48
3.14.3	Hämatoxylin-Eosin (HE)	49
3.14.4	Immunzytochemie	50
3.14.5	Dystrophinfärbung	54
3.14.6	Mikroskope	55
3.15	Biolumineszenz Imaging	55
3.16	Statistische Auswertung	55
4	Ergebnisse	56
4.1	Mathematische Herleitung verschiedener Geometrien mit einem optimalen Oberflächen-Volumen-Verhältnis	56
4.2	Ergebnisse der Zellkultur	56
4.2.1	Zellkultur human induzierter pluripotenter Zellen (hiPSC)	56
4.2.2	Lentivirale Transduktion von hiPSC Zellen mit Firefly Luciferase	61
4.2.3	Differenzierung von hiPSC zu Kardiomyozyten	62
4.2.4	Analyse der differenzierten Kardiomyozyten-Genexpression	68
4.3	Der Einfluss von Hypoxie auf hiPSC-Kardiomyozyten	71
4.4	Engineered Heart Tissue (EHT)	73

4.4.1	RNA Quantifizierung der EHT Geometrien mittels RT-PCR-Methode	74
4.4.2	Durchflusszytometrische Analysen der EHT Geometrien	78
4.4.3	Spontan kontrahierende EHTs	79
4.4.4	Biolumineszenz Analysen der EHT Geometrien	80
4.4.5	Histologische Charakterisierung der EHT Geometrien	82
4.5	Histologische Charakterisierung von nativem Myokard	85
4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	86
5	Diskussion	89
5.1	Ziele der Dissertation	89
5.2	Zellkultur human induzierter pluripotenter Zellen (hiPSC)	90
5.3	Differenzierung von hiPSC Zellen zu hiPSC-Kardiomyozyten	92
5.3.1	Induktion mesodermaler Vorläuferzellen	93
5.3.2	Entwicklung kardial differenzierter Zellen	93
5.3.3	Analyse der differenzierten Kardiomyozyten	94
5.4	Der Einfluss von Hypoxie auf hiPSC-Kardiomyozyten	95
5.5	Engineered Heart Tissue (EHT)	97
5.5.1	RNA Quantifizierung der EHT Geometrien mittels RT-PCR	99
5.5.2	Durchflusszytometrische Analysen der EHT Geometrien	101
5.5.3	Biolumineszenzanalysen der EHT Geometrien	102
5.5.4	Histologische Charakterisierung der EHT Geometrien	104
5.6	Ausblick	105
6	Zusammenfassung	107
7	Summary	109
	Abkürzungsverzeichnis	111
	Abbildungsverzeichnis	114
	Tabellenverzeichnis	117
	Literaturverzeichnis	118
	Danksagung	134
	Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen	135
	Eidesstattliche Erklärung	136

1 Einleitung

1.1 Myokardinfarkt

1.1.1 Pathogenese

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in den westlichen Industrieländern die am häufigsten zum Tode führenden Erkrankungen. Dabei liegt die Rate der in Deutschland an Todesursachen durch Herz-Kreislaufkrankungen bei Frauen bei 45% und bei Männern bei 39% (Timmis et al. 2022). Die Lebenszeitprävalenz in Deutschland für einen Myokardinfarkt liegt durchschnittlich bei 4,7% (Gößwald et al. 2013). Als Grunderkrankung eines akuten Myokardinfarktes liegt eine koronare Herzerkrankung, im Folgenden als KHK abgekürzt vor. Zu einem Infarkt kommt es auf Grund einer kritischen Reduktion des Blutflusses, meist in Folge eines lokalen Thrombus auf dem Boden einer rupturierten arteriosklerotischen Plaque, einer Plaqueerosion. Während das Blutgerinnsel beim STEMI das Gefäß in der Regel vollständig verschließt, verbleibt bei der instabilen Angina pectoris und beim NSTEMI der Blutfluss erhalten. Gelingt innerhalb von 20 Minuten keine Reperfusion der betroffenen Arterie kommt es zur irreversiblen Myokardnekrose. Bei anhaltender Koronarinsuffizienz oder Minderperfusion nehmen irreversible Schäden zu und es folgen ischämische Schäden des Endokards und Epikards. Klinische Hinweise auf einen Myokardinfarkt sind neben infarktspezifischer Symptomatik, wie pectanginöse Thoraxschmerzen, Kaltschweiß und Todesangst, typische EKG-Veränderungen und die Erhöhung der Serumkonzentration spezifischer Herzenzyme (Flora and Nayak 2019).

Klinisch wird der akute Myokardinfarkt dem Akuten Koronarsyndrom (ACS) zugeteilt und je nach Ausprägung in eine instabile Angina pectoris, einen ST-Hebungsinfarkt (STEMI = ST-segment elevation myocardial infarction) oder einen Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI = non ST-segment elevation myocardial infarction) klassifiziert (Meyers et al. 2021).

Die Differenzierung eines STEMI von einem NSTEMI erfolgt durch die elektrokardiographische Untersuchung (EKG). Je nach Lokalisation und Ausprägung des Myokardinfarktes sind infarkttypische Veränderungen über den einzelnen Ableitungen zu sehen (Bhatt et al. 2022). Ein STEMI betrifft dabei alle Anteile der Herzwand, eingeschlossen sind das Endokard und Epikard auch als transmuraler Myokardinfarkt

bezeichnet. Ein NSTEMI zeigt keine typischen Veränderungen im EKG, da sich der Infarkt nur auf das subendokardiale Myokard beschränkt (Loewe et al. 2018).

Dabei grenzt sich die instabile Angina pectoris mit einer typischen Beschwerde-Symptomatik länger als 20 Minuten anhaltend, aber dem Ausbleiben eines Anstiegs der herzspezifischen Nekrosemarker- Troponin I und T vom Myokardinfarkt ab (McKavanagh et al. 2018).

Troponin I und T sind Proteine des Sarkomers von Kardiomyozyten und damit Teil des kontraktiven Apparates. Troponin I zeigt ein Vorkommen ausschließlich im Myokard und gilt als herzspezifisch (Park et al. 2017). Troponin T findet sich zusätzlich auch in der Skelettmuskultur bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (Chesnaye et al. 2019).

Troponine werden folglich beim Untergang der Kardiomyozyten in das periphere Blut freigesetzt. Dabei dient das hs-c-TNT (high sensitiv cardiac troponin T) als Myokard spezifischer und sensibler Laborparameter (Neumann et al. 2019). Prognose entscheidend ist dabei der Verlauf des hs-c-TNT, welches bei initialer Erhöhung innerhalb von 3h wiederholt bestimmt wird (Bay et al. 2022). Die Infarktgröße korreliert dabei mit dem Ausmaß des im Blut nachgewiesenen hs-c-TNT. Das hs-c-TNT steigt, während einer myokardialen Ischämie innerhalb von 2-6 Stunden an, ein Maximum wird nach 5-24 Stunden erreicht (Chaulin and Duplyakov 2021). In der Regel bleiben sie als Nekroseparameter für ca. 10-14 Tage im Blut erhöht (Collinson and Gaze 2007).

Aufgrund schwerer Postinfarkt-Komplikationen sind Myokardinfarkte mit einer hohen Letalität verbunden (Elbadawi et al. 2019, Kapur et al. 2019). Dabei dienen als prognoseverschlechternde Parameter eine anhaltend eingeschränkte linksventrikuläre Ejektionsfraktion, bestehende Ischämiezeichen und ventrikuläre Rhythmusstörungen (Al-Khatib et al. 2002, Perron and Sweeney 2005, Piccini et al. 2012).

Bei irreversibler Myokardschädigung und abnehmender Herzleistung resultiert als Folge eines Myokardinfarktes eine Herzinsuffizienz.

1.1.2 Therapie

Die allgemeinen Maßnahmen beim Vorliegen eines ACS belaufen sich auf die Gabe von 150-300mg ASS p.o/i.v., 1-2 Hübe Glyceroltrinitrat sublingual, 2,5-5mg i.v. Morphin titriert und die Gabe von 1-2,5mg Midazolam iv. Darüber hinaus kann ein Antiemetikum bei Bedarf verabreicht werden. Bei einer O₂-Sättigung <90% ist die Gabe von Sauerstoff über eine Nasenbrille indiziert. Allgemein gilt die ständige Reanimationsbereitschaft (Collet et al. 2021).

Aktuell richten sich konkrete therapeutische Maßnahmen auf die Klassifikation von Myokardinfarkten, wie folgt:

Therapie des STEMI:

Leitliniengerecht soll innerhalb der ersten 60-120 Minuten eine primäre PCI erfolgen, ist diese nicht verfügbar so sollte eine medikamentöse Fibrinolyse erfolgen (O'Gara et al. 2013). Bei einer STEMI-Diagnose wird während der primären perkutanen Koronarintervention (PCI = percutaneous coronary intervention) die Antikoagulation mit unfraktioniertem Heparin empfohlen.

Pharmakologische Therapie sollte sofort mit ASS begonnen werden und im Verlauf, je nach Befund der Koronarangiographie sollte die Etablierung einer Dualen Antiplättchentherapie (DAPT) erfolgen.

Die Wahl der DAPT ist dabei individualisiert und orientiert sich an folgenden Schemen:

- *Augustus-Schema:* 2x5mg Eliquis und 75mg Clopidogrel (Steffel et al. 2020),
- *Compass-Schema:* 100mg ASS und 2x2,5mg Xarelto (Steffel et al. 2020),
- *Pegasus-TIMI-54-Schema:* 100mg ASS und 2x90mg Ticagrelor (Parker and Storey 2016).

Die Dauer der Therapie umfasst 12 Monate kann aber bei Evaluation entsprechender Risikofaktoren darüber hinaus weitergeführt werden (Kedhi et al. 2018). Im Anschluss ist eine Monotherapie mit ASS oder Eliquis lebenslang weiterzuführen. Als kardioprotektive Maßnahme kann die Gabe von Betablockern und ACE-Hemmern in Erwägung gezogen werden.

Ist eine Koronarangiographie mit PCI nicht binnen 120min oder liegt der Beschwerdebeginn länger als 120 Minuten zurück ist ein ist eine Fibrinolyse mit Tenecteplase i.v. oder ASS plus Clopidogrel p.o. oder Enoxaparin i.v. empfohlen.

Therapie des NSTEMI:

Über therapeutische Maßnahmen wird nach Diagnostik mittels Koronarangiografie entschieden. Leitliniengerecht sollte die Koronarangiographie früh-elektiv innerhalb von 2-72h erfolgen (Jobs 2021, Rubini Gimenez et al. 2022). Je nach Befund kann eine therapeutische PCI anschließend erfolgen.

Pharmakologisch ist der sofortige Beginn mit ASS oder Clopidogrel indiziert. Bei sicherer EKG-Diagnose und klinischem Befund ist prähospital Ticagrelor oder Prasugrel indiziert.

Bei NSTEMI ohne Stent Intervention ist eine lebenslange Einnahme von ASS 100mg/d empfohlen (Szummer et al. 2015). Nach Stent Intervention ist eine DAPT für 12 Monate empfohlen mit ASS plus einen P2Y12-Antagonisten (Clopidogrel/ Prasugrel/Ticagrelor). Im Anschluss ist eine Monotherapie mit ASS lebenslang ausreichend.

Darüber hinaus sind neben den Akutmaßnahmen bei Vorliegen eines ACS auch Maßnahmen zur Prävention möglicher Komplikationen empfohlen. Diese umfassen eine Nikotin- und Alkoholkarenz, sowie die optimale Einstellung bei vorliegenden Vorerkrankungen wie Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie (Zeymer et al. 2013). Auch sollten die Blutfettwerte durch Statine im individuellen Zielbereich gehalten werden. Eine Umstellung auf cholesterinarme Ernährung und tägliche Bewegung sind ebenso erfolgsentscheidend (Tuka et al. 2022, von Schacky 2004).

Als Folge eines Myokardinfarktes resultiert eine Herzinsuffizienz, die bei voranschreitender Myokardschädigung als einzigen kurativen Therapieansatz eine Herztransplantation nach sich zieht.

Auf Grund einer limitierten Spendersituation stellte die regenerative Medizin in der aktuellen Forschung einen vielversprechenden Ansatz dar (Javier et al. 2021, Orlando et al. 2011).

1.2 Regenerative Medizin

Nach der Schädigung des Myokards, beispielsweise durch einen Myokardinfarkt ist ein adultes menschliches Herz nicht in der Lage eine ausreichende endogene Regeneration zu gewährleisten. Nach Remodelingprozessen resultiert im Ischämiegebiet eine Infarktnarbe (Anzai 2018, Libby and Theroux 2005). Daher stellt die Etablierung der regenerativen kardialen Gewebeersatztherapie ein wichtiges Ziel der Forschung dar.

Die verlorenen Kardiomyozyten sollen mit Hilfe eines in-vitro hergestellten künstlichen Herzgewebes zum einen die mechanischen als auch elektrische Funktion des nativen Myokards ersetzen, um einen neuen funktionstüchtigen Herzmuskel zu generieren (Pomeroy et al. 2020, Tadevosyan et al. 2021).

Dabei werden drei verschiedene Strategien mit dem Ziel der regenerativen Therapie verfolgt. Die Arbeiten von Breckwoldt (Breckwoldt et al. 2016) und Garben (Garbern and Lee 2013) stellen einen Vergleich der drei Ansätze der kardialen regenerativen Medizin zusammen.

Die erste Möglichkeit stellt die direkte zelluläre In-vivo-Reprogrammierung dar, dabei werden nach einer Ischämie remodelte Fibroblasten durch die Applikation von Transkriptionsfaktoren, bspw. durch virale Vektoren, MicroRNAs (Devang et al. 2020) oder kleinmolekulare Substanzen induziert, sich zu Kardiomyozyten zu reprogrammieren (Chen and Qian 2015). Des Weiteren kann auch mit Hilfe von viralen Vektoren oder kleinmolekularen Substanzen (Wachstumsfaktoren oder MicroRNAs) versucht werden die limitierte endogene Wundheilung durch die Proliferation von Kardiomyozyten zu stimulieren (Senyo et al. 2014).

Als weitere Forschungsstrategie wird die intramyokardiale oder koronare Injektion von Stammzellen, kardialen Vorläuferzellen oder in-vitro differenzierten Kardiomyozyten verfolgt. In verschiedenen Studien konnte bereits ein positiver Effekt nach Injektion der verschiedenen Zellarten auf die Herzleistung gezeigt werden (Fan et al. 2021, Laflamme et al. 2007, Moreira Rde et al. 2011, Reinecke et al. 1999).

Die dritte Strategie stellt die Zell-Ersatz Therapie als Engineered Heart Tissue (EHT) dar. Dabei werden beispielsweise humane embryonale Stammzellen (ECS) oder humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC Zellen) mit Zugabe von Wachstumsfaktoren zu Kardiomyozyten differenziert. Anschließend werden aus Kardiomyozyten und

extrazellulärer Matrix, in-vitro, drei-dimensionale Gewebe hergestellt, welche auf eine Ischämienarbe im Herzen transplantiert werden können. Die Zusammensetzung der generierten Herzmuskelgewebe variiert je nach Methode (Curtis and Russell 2009).

1.2.1 Kardiales Tissue Engineering

Aus human induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) generierte Kardiomyozyten stellen ein attraktives Werkzeug für den Ersatz abgestorbener oder dysfunktionaler Myokardanteile im Herzgewebe dar. Es lassen sich unter Zuhilfenahme verschiedener Kultivierungstechniken aus hiPSC-Kardiomyozyten dreidimensionale Herzmuskelkonstrukte (EHTs) in-vitro herstellen. Die gewonnenen Herzmuskelkonstrukte erfüllen dabei morphologische und funktionelle Eigenschaften eines nativen humanen Myokards. Bereits in Tiermodellen konnte der positive Effekt künstlich generierter Herzmuskelkonstruktionen für ein Infarktmodell gezeigt werden (Pecha et al. 2019). Zur Etablierung von in-vitro generiertem künstlichen Herzgewebe gibt es mehrere Forschungsansätze.

Die erste Möglichkeit stellt die Zellbesiedlung in einem synthetischen Zellgerüst oder einer biodegradierbaren Matrix, wie zum Beispiel Alginat, Polyglykolsäure oder Kollagen dar.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit sich einer Hydrogel Technik zu bedienen, dabei wird eine Kombination einer Matrix aus Kollagen oder Fibrin/Thrombin mit entsprechenden Zellen vermengt und in eine anschließende Gussform überführt, welche letztendlich die Endform bestimmt (Yildirim et al. 2007). Alternativ bedient man sich einer Matrix aus Polyglykolsäure (PGS), die bereits als Grundgerüst dient und letztendlich mit Zellen besiedelt wird. Die Form ist in diesem Modell modifizierbar (Li et al. 2000, Radisic et al. 2006), (Papadaki et al. 2001).

Eine weitere Möglichkeit stellt die Dezellularisierung eines physiologischen Herzens in einer Perfusion mit anionischen Tensiden (Natriumdodecylsulfat, Octoxinol) mit anschließender Rezellularisierung von in-vitro hergestellten Kardiomyozyten dar (Ott et al. 2008).

Als letzte Methode wird in der Literatur die Cell-Sheet-Methode aufgeführt. Dabei werden in Zellkulturflaschen einschichtige Herzmuskelzell-Verbände gezüchtet, die anschließend den Kulturflaschen entnommen und in mehreren Schichten zusammengelagert werden (Shimizu et al. 2006) (Furuta et al. 2006, Miyagawa et al.

2005, Sekine et al. 2016). Diese werden dann als mehrschichtiges Gewebe in natives Myokard implantiert.

Aktuell nimmt die Herstellung von künstlichen Herzgeweben mit Hydrogelen großen Stellenwert in der Forschung ein und findet auch in der vorliegenden Studie Anwendung. Dabei werden in-vitro Herzmuskelzellen generiert, anschließend beispielsweise mit Fibrin oder Kollagen vermengt, um ein dreidimensionales Gewebe zu entwickeln (Majid et al. 2020, Weinberger et al. 2017). Die Herstellung dieser Form des künstlichen Herzgewebes ist in der Form und Größe variabel (Finklea et al. 2021).

Neben dem regenerativen Therapieansatz wird Engineered Heart Tissue auch für die in-vitro Wirkstofftestung verwendet (Goldfracht et al. 2019, Hansen et al. 2010).

1.2.2 Human induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC Zellen)

Zur Gewinnung von hiPSC wurden erstmals im Jahr 2006 durch Takahashi und Yamanaka embryonale und adulte Fibroblasten von Mäusen durch retrovirale Transduktion umprogrammiert. Mithilfe von vier Transkriptionsfaktoren (Oct-4, Sox2, c-Myc und Klf4) wurden Fibroblasten in pluripotente Stammzellen (iPSC Zellen) zurückdifferenziert (Takahashi and Yamanaka 2006). 2007 wurden erste Ergebnisse mit humanen iPSC Zellen durch Reprogrammierung menschlicher Hautfibroblasten von James A. Thomson aufgezeigt (Takahashi and Yamanaka 2006, Yu et al. 2007). Humane iPSC Zellen zeigen den Vorteil, dass sie teilbar sind und als Ursprung aller menschlich differenzierten Zellen, wie beispielsweise Kardiomyozyten geeignet sind.

Abbildung 1 veranschaulicht den Prozess der EHT-Generierung aus adulten Fibroblasten über den Schritt der Reprogrammierung mit Hilfe von Sox2, Klf-4, c-Myc und Oct-4 zu human induzierten Stammzellen. Diese können wiederum zu Kardiomyozyten ausdifferenziert werden und als künstliches Herzgewebe modelliert werden.

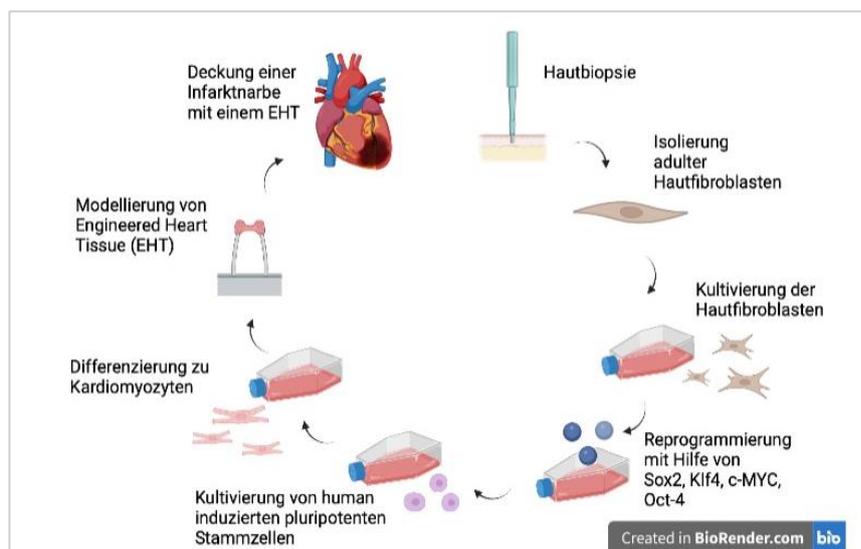


Abbildung 1: Generierung von Engineered Heart Tissue, erstellt mit BioRender

Human induzierte Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Differenzierung in Zellen der drei Keimblätter des Entoderms, Ektoderms und Mesoderms. Damit sind sie essenzieller Bestandteil der embryonalen Entwicklung.

Abbildung 2 veranschaulicht die Entwicklung der Blastozyste in die entsprechenden Keimblätter.

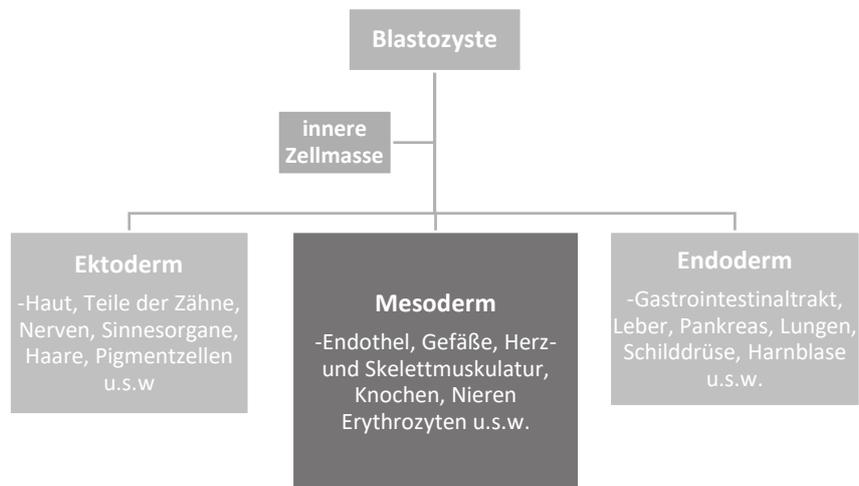


Abbildung 2: Differenzierung embryonaler Stammzellen

Stammzellen lassen sich einteilen in uni-, multi-, pluri- und totipotente Zellen (Breckwoldt 2014). Unipotente Stammzellen weisen das niedrigste Differenzierungspotential auf. Sie können sich nur in eine Zellart differenzieren, der sie bereits selbst angehören. Multipotente Stammzellen besitzen die Eigenschaft sich in mehrere Zellarten eines entsprechenden Gewebes auszudifferenzieren. Pluripotente Stammzellen zeigen das Differenzierungspotenzial aller Zellen der drei Keimblätter, können aber keinen gesamten Organismus entwickeln, was Sie von totipotenten Stammzellen unterscheidet (Surani et al. 2007). Ihnen fehlt die Eigenschaft sich in extraembryonale Gewebe in der Placenta zu differenzieren. Totipotente Stammzellen existieren nur im Blastomerenstadium bis zur ersten Furchung und sind Grundlage der Entstehung eines vollständigen, lebensfähigen Organismus (Medvedev et al. 2010, Thomson et al. 1998).

Human induzierte pluripotente Stammzellen werden durch künstliche Programmierung aus somatischen Zellen, überwiegend aus Haut und Blutzellen gewonnen (Rony et al. 2015). Sie charakterisieren Stammzellen mit pluripotentem Charakter. Verwendung finden die hiPSC-Zellen in der Entwicklung von Behandlungsstrategien in der regenerativen Medizin und bei der in-vitro Wirkstofftestung (Magdy et al. 2018, Tanaka et al. 2009). Vorteil und Zukunft der Generierung von human induzierten pluripotenten Stammzellen liegt darin für jeden Patienten individuelle Zelllinien zu züchten, um eine Immunsuppression umgehen zu können (Breckwoldt 2014, Edgar et al. 2020, Zhang et al. 2018).

1.2.3 Grenzen und Potential des kardialen Tissue Engineering

Kardiales Tissue Engineering stellt trotz enormer wissenschaftlicher Fortschritte in einigen Bereichen noch ungelöste Herausforderungen dar.

Insbesondere die Frage der optimalen Nährstoffversorgung für das Zellüberleben ist eine große Hürde, da es sich in-vitro um ein nicht perfundiertes System handelt. Vor allem in Konstrukten mit kleinen Durchmessern kann die Nährstoffversorgung durch Diffusion aufrechterhalten werden.

Herzmuskelzellen zeigen einen sehr hohen Energie- und Sauerstoffverbrauch, der durch Diffusion jedoch nur innerhalb eines Durchmessers von 80-100µm aufrechterhalten werden kann (Eschenhagen and Zimmermann 2005, Radisic et al. 2005). Daher bleibt die Anwendung kardialer Ersatzgewebe mit großer Gewebedicke derzeit limitiert. Das humane Herz besteht aus circa 10^8 Kardiomyozyten/cm³ (Vunjak-Novakovic et al. 2010). Neben Kardiomyozyten sind weitere funktionelle Gewebezellen für die Funktion des Herzmuskels obligat. Da derzeit auch die Anzahl an Zellen zur Herstellung von kardialen Ersatzgewebe limitiert ist, ist es besonders wichtig, Methoden zu finden, ausreichende Zellzahlen zu kultivieren und diese mit einer hohen Effizienz in kardiales Ersatzgewebe einzubauen.

1.3 Sauerstoff

Molekularer Sauerstoff (O_2) ist ein farb-, geruch- und geschmackloses Gas und gilt als essenzielles Molekül für das Überleben einer Zelle im Gewebe. Als Sauerstoffaufnahme wird die Menge an Sauerstoff verstanden, die vom Organismus aus dem eingeatmeten Atemgas der Atmosphäre pro Zeiteinheit aufgenommen wird. Sauerstoff ist lebensnotwendig für Aerobier und Voraussetzung für Stoffwechselprozesse (Gell 2018). Im Blut wird Sauerstoff an Hämoglobin nach dem Bohr-Effekt gebunden (Benner et al. 2022). Liegt ein alkalischer pH ($<7,36$) im Blut vor, welcher aus einer niedrigen pCO_2 Konzentration resultiert, bindet Sauerstoff leichter an Hämoglobin. Als Endprodukt von Stoffwechselprozesse fällt CO_2 an, steigt die CO_2 Konzentration im Blut wird Sauerstoff leichter an die Umgebung abgegeben.

Im nativen und künstlichen Herzgewebe ist Sauerstoff entscheidend für die Energiebereitstellung von Stoffwechselprozessen (Arieli et al. 1992). Während der Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff kommt es zur Oxidation von Glucose, Fettsäuren und weiteren Metaboliten, diese halten den Protonengradienten in Mitochondrien aufrecht. Dabei werden zwei Coenzyme NAPH/ H^+ und $FADH_2$ zur Verfügung gestellt, ihre Protonen in die Zwischenmembran von Mitochondrien abzugeben und am Ende der Reaktion ATP als Energiemolekül bereitzustellen (Löffler 1998, Müller-Esterl 2018).

Herzgewebe ist sehr sensibel gegenüber einem Sauerstoffmangel, da Myokardzellen zum einen keine Sauerstoffspeicherfunktion besitzen und zum anderen durch eine ständige Depolarisation und einer anschließenden Kontraktion einen großen Anteil von ATP verbrauchen (Simonenkov and Fedorov 2008). Das erklärt die Bedeutung der hohen Koronarperfusion, 5% des Herzzeitvolumens sowie 10% der gesamten Sauerstoffaufnahme sind für die Aufrechterhaltung der Koronarperfusion entscheidend. In Ruhe entspricht das 300ml Blut pro Minuten, unter Belastung steigen die Werte stark an (Velicka et al. 2019).

1.3.1 Sauerstoffdiffusion

Der Sauerstofftransport im in-vitro nicht perfundiertem künstlichen Herzgewebe findet ausschließlich per Diffusion statt und kann mit Hilfe von Diffusionsmechanismen mathematisch erklärt werden.

Liegt in einem System mit Atomen und Molekülen ein örtlicher Konzentrationsgradient vor, so tritt unter Einfluss einer virtuellen Kraft ein Teilchenstrom auf, um den Konzentrationsunterschied auszugleichen (Honig et al. 1992, Michenkova et al. 2021).

Der Diffusionsvorgang kann durch eine phänomenologische Beziehung, als 1. Ficksches Gesetz siehe (1.1) mathematisch dargestellt werden:

$$J_i = -D_i \frac{\partial N_i}{\partial x} \quad (1.1)$$

Die Teilchenströmung J_i , gibt die Zahl der Teilchen N der Atomsorte i an, die in einer bestimmten Zeiteinheit durch die Einheitsfläche x in eine Richtung strömt. D_i bezeichnet die Diffusionskonstante und fungiert als Proportionalitätsfaktor. Bei stationären Strömungen besteht das Prinzip der Massenerhaltung und wird als Kontinuitätsgleichung angegeben. Kontinuität beschreibt das in einem Modell weder neue Teilchen hinzukommen noch Teilchen vernichtet werden.

Bezieht man die Teilchenströmung J_i auf die Kontinuitätsgleichung erhält man eine partielle Differentialgleichung siehe (1.2). Diese beschreibt eine zeitabhängige Diffusion in einem eindimensionalen Modell mit einem ortsabhängigen Diffusionskoeffizienten:

$$\frac{\partial N_i}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D_i(x) \frac{\partial N_i}{\partial x} \right) \quad (1.2)$$

Das zweite Ficksche Gesetz siehe (1.3) beschreibt einen ortsunabhängigen Diffusionskoeffizienten bei Vorliegen einer geringen Menge an Fremdatomkonzentrationen in einem homogenen Medium und kann mit folgender Gleichung bestimmt werden.

$$\frac{\partial N_i}{\partial t} = D_i \frac{\partial^2 N_i}{\partial x^2} \quad (1.3)$$

1.3.2 Hypoxie im Gewebe

Liegt in einem Gewebe ein Sauerstoffmangelzustand, eine Hypoxie vor, wird von einer Ischämie gesprochen. In Folge eines Myokardinfarktes resultiert beispielsweise durch die Okklusion einer versorgenden Arterie eine Ischämie im entsprechenden Areal.

Zellen reagieren unterschiedlich auf Hypoxie. Wird in Chemorezeptorzellen des Glomus caroticum ein verminderter Sauerstoffpartialdruck (pO_2) (Prabhakar and Semenza 2015) sowie ein Anstieg von Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO_2) registriert, wird die Atmung zum einen über die afferenten Fasern des N. glossopharyngeus (IX) und des N. vagus (X) und zum anderen über die Hirnnerven Kerne der dorsalen respiratorischen Gruppe der Medulla oblongata mit einer Steigerung des zentralen Atemzentrums reguliert (Gourine and Funk 2017). Hypoxämie beschreibt die verminderte Sauerstoffsättigung im Blut und führt zum Schluss von sauerstoffsensiblen Kalium-Kanälen, als Folge depolarisiert die Zelle. Hypoxie hat ebenfalls Einfluss auf Rezeptoren im Zellkern. Akute schwere Hypoxien oder chronische Sauerstoffmangelzustände führen zur Herabregulation von Stoffwechselprozessen und Verminderung der Proteinbiosynthese (D'Arcy 2019). Zum Schluss resultiert ein irreversibler Zelluntergang in Form von Nekrose. Pathophysiologisch kommt es in Folge einer Hypoxie zur Ansammlung saurer Stoffwechselprodukte durch die Inaktivität der Ionenpumpen, welche eine Denaturierung und Präzipitation von Proteinen induzieren. Die Zellkerne schrumpfen durch die Kernpyknose, die Kondensation des Chromatin mit folgender Karyorrhexis, die Fragmentierung des Chromatins und abschließender Karyolyse und die Auflösung der Zellkerne mit anschließender Zellmembran Zerstörung (Majno and Joris 1995). Das Gewebe wird im Bereich der Nekrose irreversibel gestört und funktionslos, was bei einem Myokardinfarkt eine insuffiziente Herzleistung zur Folge hat.

Als Gegenregulator hypoxischer Zustände gilt Erythropoetin (EPO). EPO zählt zu den Glykoprotein-Hormonen und wirkt als Wachstumsfaktor für die Bildung von Erythrozyten, die als Zellen für den Sauerstofftransport verantwortlich sind. Die Expression der Gene für EPO wird über den Hypoxie-induzierte-Faktor-1-alpha (HiF-1-alpha) reguliert (Jelkmann 2011). Dieser wird bei Normoxie vom Enzym Ubiquitin gebunden und im Proteasom der Zelle abgebaut (Ke and Costa 2006). Liegt eine Hypoxie vor, fusioniert HiF-1-alpha mit HiF-1-beta im Zellkern und aktiviert die Transkription der Gene für, u.a. Erythropoetin und VEGF-alpha (Datta Chaudhuri et al. 2021).

2 Fragestellung

Ziel dieser Forschungsarbeit ist aufzuzeigen, wie durch geometrische Optimierung ein ideales Volumen-Oberflächen-Verhältnis in künstlichem Herzgewebe geschaffen werden kann. Dies ist notwendig um ein größtmögliches hiPS-Kardiomyozyten Überleben im EHT zu gewährleisten.

1. Mathematische Herleitung einer Geometrie mit einem optimalen Oberflächen-Volumen-Verhältnis. Mit dem Ziel der Erhöhung des Sauerstoffangebotes durch kürzere Diffusionsstrecken.
2. Die Validierung der human induzierten pluripotenten Stammzellen und der differenzierten Kardiomyozyten. Sowie die Optimierung der Zelldifferenzierung zu funktionsfähigen Kardiomyozyten aus human induzierten Stammzellen.
3. Die quantitative Untersuchung von Kardiomyozyten spezifischer Gene in Korrelation auf Hypoxie und Nekrose.
4. Das Zellüberleben der modifizierten drei-dimensionalen künstlichen Herzgewebe aus Kardiomyozyten wird auf Genexpressionsebene, auf Proteinebene und mittels Biolumineszenz Imaging verglichen und dargestellt. Zur qualitativen Analyse werden Querschnittshistologien der künstlichen Herzgewebe aufgezeigt.

3 Material und Methoden

3.1 Hilfsmittel und Geräte

Tabelle 1: Hilfsmittel und Geräte

Bezeichnung	Firma
200µl Eppendorfgefäße PCR getestet	Eppendorf, Deutschland
196-well Multiply-PCR-Platten	Sarstedt, Deutschland
T-175 Flasche	Sarstedt, Deutschland
T-75 Flasche	Sarstedt, Deutschland
6-Well Zellkulturplatte	Sarstedt, Deutschland
12-well Zellkulturplatte	Sarstedt, Deutschland
Autoklav	MediTech Deutschland
Bildverarbeitungs-Software Fiji	Image J.2
Biolumineszenz Kamera-IVIS	Perkin Elmer Precisely
Digitalwaage	Sartorius
Deckgläser	Marienfeld, Deutschland
Eismaschine	Hoshizaki
Falkon-Röhrchen (15/30ml)	Greiner
Gewebezerkleinerer/ Tissuelizer	Qiagen
Glasgefäße	Schott, Deutschland
Glasschalen	Roth, Leica
Heissblock	Leica, Deutschland
Kühlschrank (4°C-8°C)	Liebherr
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Deutschland
Latexhandschuhe	Supermax Healthcare Inc. USA
Lichtmikroskop für Zellkultur	Zeiss

Material und Methoden

Mikrozentrifuge	Eppendorf Mini Spin
Mikroskop	Carl Zeiss, Deutschland
Mikrotom	Leica, Deutschland
Mikrowelle	Samsung
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Fischer, USA
Neubauerzählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Deutschland
Objektträger superfrost	Menzelgläser, Deutschland
Objektträgerboxen	Roth, Deutschland
Objektträgermappe	Roth, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tip (10/100/1000 µl)	Sarstedt, Deutschland
qPCR-System	Light Cycler 96 Instruments
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt, Deutschland
Sterilwerkbank LaminAir	Heraeus, Deutschland
Tiefkühltruhe (-20°C)	Liebherr
Tiefkühltruhe (-80°C)	Thermo Scientific
Tischzentrifuge	Eppendorf, Deutschland
Vortexer	Scientific Industries
Wärmeschrank (37°C)	Binder
Wasserbad	Medax Nagel GmbH, Deutschland
Zentrifuge	Sigma

3.2 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 2: Chemikalien und Lösungen

Substanz	Firma	Katalognummer
10x DMEM	Gibco	52100-21
2-Isopropanol	Sigma-Alderich	278475
Adesil®Blau 9:1	Siladent	14356 – Typ 2
Agarose	Invitrogen	16500-100
Aprotinin	Sigma-Alderich	M6145
B-27® Minus Insulin	Thermo Fischer	A1895601
B-27® Supplement	Thermo Fischer	17504044
Bluring Reagent Ventana	Roche	760-2037
Cell Conditioning Solution 2 (CC2-Buffer)	Ventana®	05279798001
CHIR-99021	SelleckChem	S1263
DMEM	Life Technologies	10829-018
DMEM/F-12 without glutamine	Gibco	21331-046
DMSO	Sigma-Alderich	D4540
EDTA	Roth	8043.2
Essentiel 8 Flex-Media	Thermo Fischer	A2858501
FACS Buffer/Stain Buffer	BD Pharmingen™	554657
FACS Perm/Wash Buffer I	BD Phosflow™	557895
Fetal Calf Serum	Gibco	10437028
Fixationslösung	BD Cytofix™	554655
Hematoxylin Ventana	Roche	760-2021

Material und Methoden

Horse Serum HI	Thermo Fischer	26050088
Human Fibrinogen	EVICEL™/©Ethicon	60CZ01R0-0
Human Thrombin	EVICEL™/©Ethicon	60TZ01M0-0
Insulin	Sigma-Alderich	11061-68-0
IWR1	SelleckChem	S7086
KaryoMAX™KCL	Gibco	10575090
L-Glutamine	Gibco	25030-081
Matrigel®	BD	356231
Nuklease free H ₂ O	Invitrogen	10977-035
Opti-MEM™	Gibco	115203856
PBS	Gibco	10010-015
Penicillin/ Streptomycin	Gibco	15140
Pluronic F-127 solution	Sigma-Alderich	P2443
Polybren Infektions-/ Transfektionsreagenz	Sigma-Alderich	32160801
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74104
Rotigel	Roth	3865.1
RPMI 1640	Gibco	21875
RPMI 1640 + GlutaMAX™-I	Thermo Fischer	61870010
RPMI 1640 without Glucose 11879	Life Technologie	11879
TAE	Invitrogen	24710-030
Tyrodellösung	Thermofisher	J67593.K2
UltraView Universal DAB Detection Kit	Roche	05269806001

Versene	Life Technologies	15040066
---------	-------------------	----------

3.3 Zellkulturmedien

Tabelle 3: Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
10x DMEM	670 mg 10x DMEM 5 ml ddH ₂ O
2x DMEM	1ml 10x DMEM 1 ml Horse-Serum
DMEM	3,7 g/L NAHCO ₃ 1,0 g/L D-Glucose L-Glutamine
EHT Medium	500 ml DMEM 50 ml Horse-Serum 500 µl Aprotinin 500 µl Insulin
Einfriermedium	10 ml DMSO 90 ml FCS
Essential 8 Flex Basal Medium	DMEM/ F12 (HAM) (1:1) 15 mM HEPES L-Glutamine 1,743 g/L Natrium Bicarbonat
hiPSC-Medium	500 ml Essential 8 Flex® Basal Medium 10 ml Essential 8 Flex® Supplement
Kardiomyozyten Differenzierungsmedium- Hungermedium	500 ml RPMI 1640 10 ml B27® Supplement

Material und Methoden

Kardiomyozyten Differenzierungsmedium- Tag 0	500 ml RMPI 1640 + GlutaMAX TM -I 10 ml B27® minus Insulin 300 µl CHIR 99021
Kardiomyozyten Differenzierungsmedium- Tag 2/5	500 ml RMPI 1640 + GlutaMAX TM -I 10 ml B27® minus Insulin
Kardiomyozyten Differenzierungsmedium- Tag 3	500 ml RMPI 1640 + GlutaMAX TM -I 10 ml B27® minus Insulin 500 µl IWR-1
Kardiomyozyten Differenzierungsmedium- Tag 7	500 ml RMPI 1640 + GlutaMAX TM -I 10 ml B27® Supplement
Nicht-Kardiomyozyten-Medium	500 ml DMEM 57 ml Fecal-Calf-Serum 5,7 ml Penicilin/Streptomycin 5,7 ml Glutamin

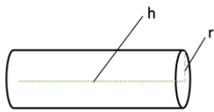
3.4 Primer

Table 4: Primerliste

	Gen	Gen-ID	Produktlänge	Primer forward	Primer reverse
Alpha MHC	MYH6	4624	170	TTCATTGACTTTGGCATGGA	GGCTTCTGGAAATTGTTGGA
c-Myc	c-Myc	4609	128	CCTGGTGCTCCATGAGGAGAC	CAGACTCTGACCTTTTGCCAGG
Cardiac troponin T ₂ (total)	TNNT2	7139	163	TTCGACCTGCAGGAGAAGTT	GAGCGAGGAGCAGATCTTTG
Gapdh	Gapdh	2597	153	GTGGACCTGACCTGCCGTCT	GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT
Glucuronidase beta	GUSB	2990	171	AAACGATTGCAGGGTTTCAC	CTCTCGTCGGTGACTGTTC
Hif-1 α	Hif-1 α	3091	134	GAACCCATTCTCATCCATCAAAC	TCTTCTGGCTCATAACCCATCAAC
Islet	ISL1	3670	181	GTTACCAGCCACCTTGGA	GGACTGGCTACCATGCTGTT
KDR-Rezeptor /VEGFR2	VEGF2	3791	171	GCGATGGCCTCTTCTGTAAG	ACACGACTCCATGTTGGTCA
Luciferase	Luc	-	721	CAGTATGGGCATTTTCGAGC	ATCCCCCTCGGGTGTAAATCA
Myosin Light Chain2	MLC2	4633	247	ACATCATCACCCACGGAGAAGAGA	ATTGGAACATGGCCTCTGGATGGA
Nanog	Nanog	79923	480	TGCTCGGTTTTCTAGTCCCCACCT	AGGCAAGCTTTGGGACAAGCT
Oct4 POU class 5 homebox 1	Oct4	5462	154	CGAAAGAGAAAGCGAACCA	GCCGGTTACAGAACCACACT
Sox2	Sox2	6657	135	GCTACAGCATGATGCAGGACCA	TCTGCGAGCTGGTCATGGAGTT

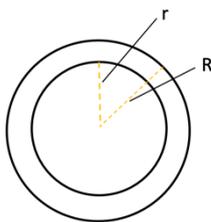
3.5 Mathematische Herleitung von Oberflächen-Volumen-Verhältnissen

Mathematisch wurden drei geometrische Formen entworfen und rechnerisch das Volumen-Oberflächen-Verhältnis bestimmt. Dazu wurde die Geometrie eines Zylinders als etablierte Standardgeometrie gegen die Geometrie eines Rings und einer Infinity-Form verglichen. In der Literatur werden künstliche Herzgewebe häufig in Form eines Streifens generiert, die der Geometrie eines Zylinders mathematisch gleicht. Die Oberfläche der Streifenform (A_S) siehe (3.1), der Ringform (A_R) siehe (3.2) und der Infinityform (A_I) siehe (3.3.) wurde jeweils wie folgt berechnet:



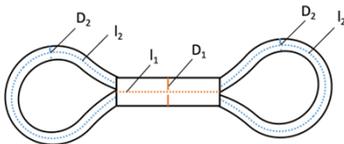
$$\begin{aligned}
 A_S &= 2\pi * r * h \\
 &= 2\pi * 0,385\text{mm} * 8\text{mm} \\
 &= \underline{19\text{mm}^2}
 \end{aligned}$$

(3.1)



$$\begin{aligned}
 A_R &= (R - r) * \left(\frac{R+r}{2}\right) \pi^2 \\
 &= (6,2496\text{mm} - 5,568\text{mm}) * \left(\frac{6,2496\text{mm}+5,568\text{mm}}{2}\right) \pi^2 \\
 &= \underline{39,75\text{mm}^2}
 \end{aligned}$$

(3.2)



$$\begin{aligned}
 A_I &= (\pi * D_1 * l_1) + (2 * (\pi * D_2 * l_2)) \\
 &= (\pi * 0,9298\text{mm} * 3,22\text{mm}) + \\
 &\quad (2 * (\pi * 0,3016\text{mm} * 8,68\text{mm})) \\
 &= \underline{25,86 \text{mm}^2}
 \end{aligned}$$

(3.3)

Das einzusetzende Volumen wurde vor Beginn der Arbeit festgesetzt. Das Volumen in einer Streifengeometrie wurde mit $110\mu\text{l}^3$ festgelegt. Beim Ring und Infinity wurde jeweils dem 4-fachen Volumen von $440\mu\text{l}^3$ standardmäßig gearbeitet.

Rechnerisch wurde das Oberflächen-Volumen-Verhältnis in (3.4) ermittelt.

$$\frac{A}{V} = \frac{\text{mm}^2}{\text{mm}^3} = \text{mm}^{-1} \quad (3.4)$$

Oberflächen-Volumen Verhältnis:

$$\frac{A}{V_S} = \frac{19\text{mm}^2}{110\mu\text{l}^3} = 0,172\text{mm}^{-1} \quad (3.5)$$

$$\frac{A}{V_R} = \frac{39,75\text{mm}^2}{440\mu\text{l}^3} = 0,090\text{mm}^{-1} \quad (3.6)$$

$$\frac{A}{V_I} = \frac{25,86\text{mm}^2}{440\mu\text{l}^3} = 0,058\text{mm}^{-1} \quad (3.7)$$

Die Forschungsleistung bezieht sich dabei auf die Untersuchung des Oberflächen-Volumen-Verhältnis in Bezug auf das Überleben der Kardiomyozyten. Es wurden Konstrukte hergestellt mit einem optimalen Oberflächen-Volumen-Verhältnis, um möglichst viele Zellen in Geweben mit möglichst großer Gewebedicke in-vitro zu kultivieren und im Anschluss zu transplantieren. Dabei wurde insgesamt das Ziel einer Optimierung des arbeits- und finanziellen Aufwands und einer Verbesserung der Effizienz der transplantierten Zellen verfolgt.

3.6 Methoden der Zellkultur

3.6.1 Kultivierung von hiPSC Zellen

Alle Arbeiten mit verwendeten Zellen erfolgten unter einer sterilen Werkbank. Die Experimente erfolgten mit folgender Zelllinie: Gibco® Episomal hiPSC Line (A18945). Die Kultivierung von hiPSC Zellen erfolgte in Kulturschalen, welche vor der Passage für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Matrigel® beschichtet wurden. Die Standardkultivierung der Stammzellen in Suspension erfolgte in 6-well Zellkulturplatten. Nach Entfernung des Matrigel® erfolgte die Kultivierung der hiPSC Zellen mit IPS Medium, Essential 8 Flex Medium Kit plus Essential 8 Flex Supplement, im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂, 5% O₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Der Mediumwechsel erfolgte an Werktagen täglich, mit der Ausnahme von Mittwoch. Bei einer Konfluenz von 90% wurde mit dem Differenzierungsprotokoll zu Kardiomyozyten begonnen.

3.6.1.1 Einfrieren und Auftauen von hiPSC Zellen

Zum Einfrieren von hiPSC Zellen wurden die Zellen zunächst für 10 Minuten bei 37°C mit Versene inkubiert und anschließend dissoziiert. Nach dem Auswaschen von Versene wurden die Zellen mit 1ml Einfriermedium (DMSO und FCS) vermischt. Zum Einfrieren wurden die Zellen in einem Isopropanol-Einfriergefäß bei -80°C gelagert. Durch die kontinuierliche Senkung der Temperatur um 1°C/Minute wurde gewährleistet, dass die Zellen nicht zu Schaden kommen. Zum erneuten Kultivieren wurden die Zellen im ThawStar® automated thawing system aufgetaut und mit 10ml gewünschtem Medium resuspendiert und in 15ml Falcon-Röhrchen bei 800g für 4 min zentrifugiert, um DMSO auszuwaschen. Zum erneuten Kultivieren wurden die Zellen auf mit Matrigel® beschichtete Kulturflaschen ausplattiert. Zur Verhinderung einer spontanen Differenzierung, erfolgte die Passage vor Erreichen der Konfluenz.

3.6.2 Lentivirale Transduktion von hiPSC Zellen mit Firefly Luciferase

Um mit hiPS Kardiomyozyten Biolumineszenz-Versuche durchführen zu können, muss eine permanente stabile genomische Integration mit dem Reporter gen Firefly Luciferase bestehen. Die genomische Integration kann durch eine lentivirale Transduktion erfolgen. (Landvogt 2009, Peng et al. 2018). Die lentivirale Transduktion von hiPSC erfolgte mit EF-1-alpha Luciferase firefly Gtarget der Firma amsbio (Cat. No.: LVP434).

Der schematische Aufbau des lentiviral transduzierten DNA-Komplexes ist Abbildung 3 zu entnehmen.

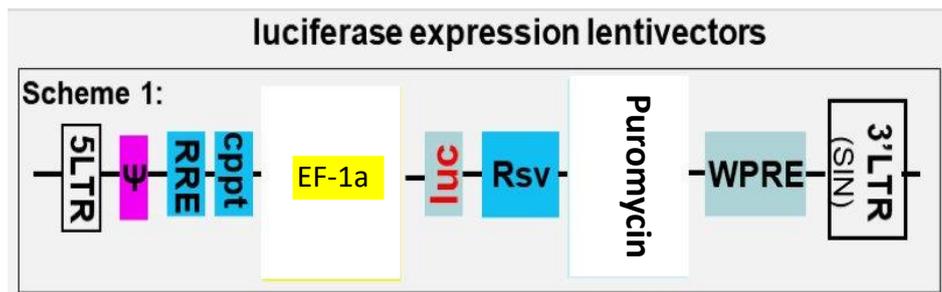
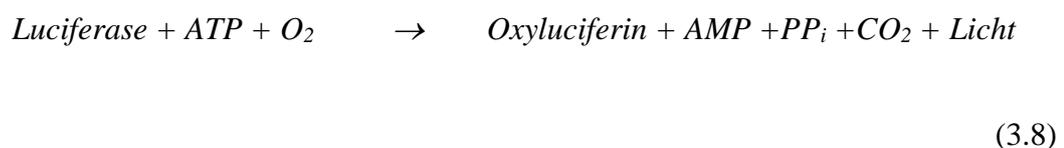


Abbildung 3: Schema der EF1a-Luciferase Firefly, <https://resources.amsbio.com/Datasheets/Luc-LVP-man.pdf>

Durch die lentivirale Transduktion erfolgt die Expression der firefly Luciferase unter dem humanen Elongationsfaktor (EF-1-alpha). Zur Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen wird zusätzlich ein Puromycin Resistenzgen unter der Kontrolle des RSV-Promotors exprimiert. Für die Transduktion wurden 1×10^5 hiPSC Zellen pro Well in Matrigel® beschichtete 6-well Suspensionsplatten ausplattiert und in IPS Medium kultiviert. Am Folgetag erfolgte die Abnahme des IPS Kulturmediums und die Zugabe von 200µl des Lentiviralen Virus in 1,5 ml Opti-Mem™ und 5µl Polybrene. Nach 4 Stunden Inkubation wurden 2,5ml IPS Medium hinzugegeben. Anschließend war darauf zu achten, dass die Kulturplatte für 24 Stunden nicht bewegt wurde. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit IPS Medium. Am darauffolgenden Tag begann die Selektion der Zellen mit Puromycin, zur Überprüfung der viralen Transduktion. Zur Kontrolle der erfolgreichen viralen Luciferase Gen Expression wurden Biolumineszenzmessungen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mit PBS und Luciferase im Verhältnis 1:10 vermischt.

Nach Zugabe von Luciferin emittieren Luciferase klonierte hiPSC-Zellen Licht mit einer Wellenlänge von 562nm. Für die Reaktion ist die Bereitstellung von Sauerstoff und ATP obligat.

Die Reaktion siehe (3.8) läuft wie folgt ab:



3.6.3 Mycoplasmentest

Zur Testung einer möglichen Mycoplasmeninfektion wurde mit dem MycoSPY® Mastermix gearbeitet. Hierbei handelt es sich um einen lyophilisierten Master Mix mit integriertem Loading Buffer und Tracking Farbstoffen zur Detektion einer möglichen Mykoplasmen Kontamination in der Zellkultur. Dabei wurden 100µl vom Nährmedium der Zellkultur entnommen und in ein PCR Tube überführt. Daneben war darauf zu achten, dass die Wachstumsfläche des Zellkulturgefäßes bei Entnahme des Zellüberstandes ca. 90% bedeckt war. Zusätzlich war die Zellkultur zuvor für mindestens 24 Stunden in dem Nährmedium inkubiert. Die Probe wurde für 5 Minuten im Thermalblock bei 94°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 13.000 x g für 1 Minuten zentrifugiert. Die Testung basiert auf der Anwesenheit einer internen Kontrolle, ein entsprechender Mycoplasmen DNA Abschnitt. Die Methode bringt den Vorteil, dass die Abwesenheit von PCR-Inhibitoren bestätigt werden kann und falsch-Negativergebnisse ausgeschlossen werden. Eine Negativkontrolle ohne Template war zur Kontrolle obligat.

Folgende Komponenten wurden in PCR-geeignete Reaktionsgefäße pipettiert:

Tabelle 5: Standardpipettierprotokoll für die Testung auf Mycoplasmen

Komponenten	Menge in µL (Testprobe mit interner Kontrolle)	Menge in µL (Kontrollreaktion)
Mastermix	22	22
Interne Kontrolle	1	1
Testprobe	2	-
H ₂ O	-	2
Summe	25	25

Die PCR Reaktion erfolgt im direkten Anschluss im Mastercycler.

Tabelle 6: Thermo-Cycler Profil für die Testung auf Mycoplasmen

Zyklus	Zeit (t)	°C	Zyklenzahl
Initiation	60 Sekunden	94	1
Denaturierung	30 Sekunden	94	
Hybridisierung	30 Sekunden	62	35
Elongation	30 Sekunden	72	
Finale Elongation	180 Sekunden	72	1
Ende	∞	4	

Nach Abschluss der Reaktion wurde das Produkt auf einem 2% Agarose-Gel analysiert. Die zu erwartenden Produkte sollten bei 200bp interne Kontrolle und bei 500bp Amplifikat des Mycoplasmengenoms aufgetrennt zu sehen sein.

3.6.4 Behandlung von Mycoplasmeninfektionen

Bei einer vorliegenden Infektion mit Mycoplasmen wurde eine antibiotische Therapie mit BIOMYC-1 und 2 eingeleitet. Bei Kontamination wurde BIOMYC-1 für vier Tage den Kulturmedien zugefügt und anschließend BIOMYC-2 für weitere drei Tage angewendet. Zur Vermeidung von Antibiotikaresistenzen wurden zwei Behandlungszyklen durchgeführt. BIOMYC-1 enthält den antibiotischen Wirkstoff Tiamutin und bindet die 50S-Untereinheit von Ribosomen. Es wird zu Gruppe der Pleuromutiline gezählt. BIOMYC-2 enthält das Antibiotikum Minozyklin, ein Derivat des intrazellulär wirksamen Tetrazyklin und wirkt bakteriostatisch (Schmitt et al. 1988).

3.6.5 Differenzierung der hiPSC-Zellkultur zu hiPSC-Kardiomyozyten

Zur Differenzierung von hiPSC in zu hiPSC Kardiomyozyten, im folgenden hiPSC-CM sind in der Literatur mehrere Protokolle aufgezeigt. Allen publizierten Differenzierungsprotokollen liegen sechs Differenzierungsstufen zu Grunde: Epitheliale-mesenchymale Transition, Mesoderm Differenzierung, Mesoderm Spezifizierung, Kardiale Spezifizierung, Kardiomyozyten Differenzierung und elektrische Reifung (Breckwoldt 2014, Burridge et al. 2011). Primär werden hiPSC in eine der drei Keimschichten: Ektoderm, Mesoderm und Endoderm differenziert. Zur Gewinnung von hiPSC-CM ist die Differenzierung zu embryonalem Mesoderm unerlässlich (Breckwoldt

et al. 2017), (Hescheler et al. 1997). Verantwortlich für die mesodermale Differenzierung ist der Wnt-Signalaktivator- CHIR99021 (Lian et al. 2013). In weiteren Differenzierungsprotokollen werden in der Literatur folgende alternative Wachstumsfaktoren BMP4, Activin A, bFGF, DKK-1 und VEGF hinzugefügt die auch entscheidend sind für die Einleitung der kardialen Differenzierung.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach erfolgreicher Kultivierung und Passagierung der hiPSC-Zellen bei einer Koloniekonfluenz von 70-90% die Differenzierung zu Kardiomyozyten eingeleitet. An Tag 0 werden die Kulturen in einem Medium aus RMPI 1640+GlutaMAX™ mit B27 Minus Insulin Supplement und IWR-1 als Wnt-Inhibitor für 48h kultiviert. An Tag 2 wird das Medium abgenommen und durch Tag-2 Differenzierungsmedium, bestehend aus RMPI 1640+GlutaMAX™ mit B27 Minus Insulin Supplement für weitere 24h hinzugegeben. Ziel dieses Prozesses ist die Differenzierung zu mesodermalen Progenitorzellen. An Tag 3 der Differenzierungsperiode wird das Medium abgenommen und durch RMPI 1640+GlutaMAX™ mit B27 Minus Insulin Supplement plus CHIR 99021, einen Wnt-Aktivor ersetzt. Die Zellkultur wird für 48h inkubiert und die kardiale Differenzierung induziert. Weitere 48h später, wird das Medium durch RMPI 1640+GlutaMAX™ plus B27 Supplement gewechselt und bis zum 7. Differenzierungstag inkubiert. Die Induktion der kardialen Differenzierung ist an Tag 7 abgeschlossen. Anschließend reifen die differenzierten Kardiomyozyten weiter aus. Als Kardiomyozyten-Medium wird RMPI 1640+GlutaMAX™ plus B27 Supplement. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Zur Aufreinigung der Zellkultur werden die Zellen von Tag 9-11 für 48h im Hungermedium bestehend aus RMPI 1640 plus B27 Supplement inkubiert. Dieser Prozess wird von Tag 15-17 wiederholt.

3.6.6 Kultivierung der hiPSC-Kardiomyozyten

Alle Arbeiten mit verwendeten Zellen erfolgten unter einer sterilen Werkbank. Die Kultivierung von hiPSC-Kardiomyozyten erfolgte in Kulturschalen, welche vor der Passage für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Matrigel® beschichtet wurden. Die Standardkultivierung der hiPSC-Kardiomyozyten erfolgte in T-75 Zellkulturflaschen. Nach Entfernung des Matrigel® erfolgte die Kultivierung der hiPSC-Kardiomyozyten mit den entsprechenden Differenzierungsmedien im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂, 40% O₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Der Mediumwechsel erfolgte an Tag null, zwei, drei fünf

und sieben der Differenzierungsperiode. Wenn die Differenzierungsperiode abgeschlossen war, erfolgte der Mediumwechsel Montag, Mittwoch und Freitag.

3.6.6.1 Einfrieren und Auftauen von hiPSC-Kardiomyozyten

Zum Einfrieren von hiPSC-Kardiomyozyten wurden die Zellen zunächst für 10 Minuten bei 37°C mit Versene inkubiert und anschließend dissoziiert. Nach dem Auswachsen von Versene wurden die Zellen mit 1ml Einfriermedium (DMSO und FCS) vermengt. Zum Einfrieren wurden die Zellen in einem Isopropanol-Einfriergefäß bei -80°C gelagert. Durch die kontinuierliche Senkung der Temperatur um 1°C/Minute wird gewährleistet, dass die Zellen nicht zu Schaden kommen. Zum erneuten Kultivieren wurden die Zellen im ThawStar® automated thawing system aufgetaut und mit 10ml gewünschten Medium resuspendiert und in 15ml Falcon-Röhrchen bei 800g für 4 min zentrifugiert, um DMSO auszuwaschen. Zum erneuten Kultivieren wurden die Zellen auf mit Matrigel® beschichtete Kulturflaschen ausplattiert.

3.7 Zellzahl und Zellgrößenbestimmung

Die Randleisten der Zählkammer wurden vor dem Aufschieben des Deckgläschen leicht befeuchtet. Die Zählkammer bestehend aus neun Quadranten, mit einer Fläche von je 1 mm. Zur Vorbereitung der Zellzählung wurden der Zellsuspension 10 µl entnommen und mit 10 µl Tryphanblau (1:1) gut vermengt. Beim Vorliegen eines großen Zellpellets können 10µl der Zellen zunächst mit 90 µl PBS Medium vorverdünnt werden, um Zählfehler durch Zellüberlagerung zu vermeiden. Anschließend wurde die Pipettenspitze an den Rand des Deckgläschens angesetzt und vorsichtig entleert. Die Füllung der Zählkammer entsteht durch einwirkende Kapillarkräfte. Dabei war das gleichmäßige Pipettieren obligat, um eine Über- oder Unterfüllung zu vermeiden. Unter dem Lichtmikroskop wurden die äußeren vier der neun Quadranten ausgezählt. Diese sind nochmals in sechzehn Quadrate unterteilt. Um auf Linien liegende Zellen dabei nicht doppelt zu zählen, wurden nur Zellen gezählt, die auf einer der beiden inneren Linien lagen. Die Zellzahl pro ml wurde dann nachfolgender Formel siehe (3.8) berechnet, der Verdünnungsfaktor wird als V_d ($V_d=2$) abgegeben:

$$\text{Zellzahl} = \text{gezählte Zellen} * V_d * 10 * 10^4 / \mu\text{l}$$

(3.8)

3.8 Karyotypisierung

Unsere hiPSC Zellen ließen wir im Zentrum für Humangenetik am UKE zur Qualitätskontrolle karyotypisieren. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. Sigrid Fuchs wurden die immortalisierten pluripotenten Stammzellen nach Erreichen der nötigen Koloniekonfluenz durch Colcemidzugabe in der Metaphase arretiert. Dafür wurde 10µg/ml Colcemid (Gibco, 15210040) verwendet. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 0,005M hypotoner KaryoMAX™-Kaliumchloridlösung (Gibco, 10575090). Fixiert wurden die aufgequollenen Zellen mit Methanol in einer 3:1 Verdünnung.

3.9 Zubehör für die EHT Generierung

Für die Generierung verschiedener EHT-Formen wurden mit Hilfe unseres hauseigenen 3D-Laser Druckers der Firma Sinterit, Abbildung 5 (Sinterit sp. z o.o., 30-741 Kraków, Poland) Schablonen hergestellt.



Abbildung 4: A) Laser sintering 3D Drucker, <https://www.sinterit.com/wp-content/uploads/2020/05/Sinterit-LISA-PRO-SPECIFICATION-1.pdf>.

Die Herstellung der dreidimensionalen Schablonen erfolgte mit der Software SolidWorks® (Dassault Systèmes, VélizyVillacoublay, France) aus dem Hause Dassault Systems, siehe Abbildung 6-8. SolidWorks® (CAD-Software), ist ein parametrisches featurebasierendes Volumenmodelliersystem basierend auf einem Parasolid Rechenkern und stellt eine Software der neueren Generation dar.

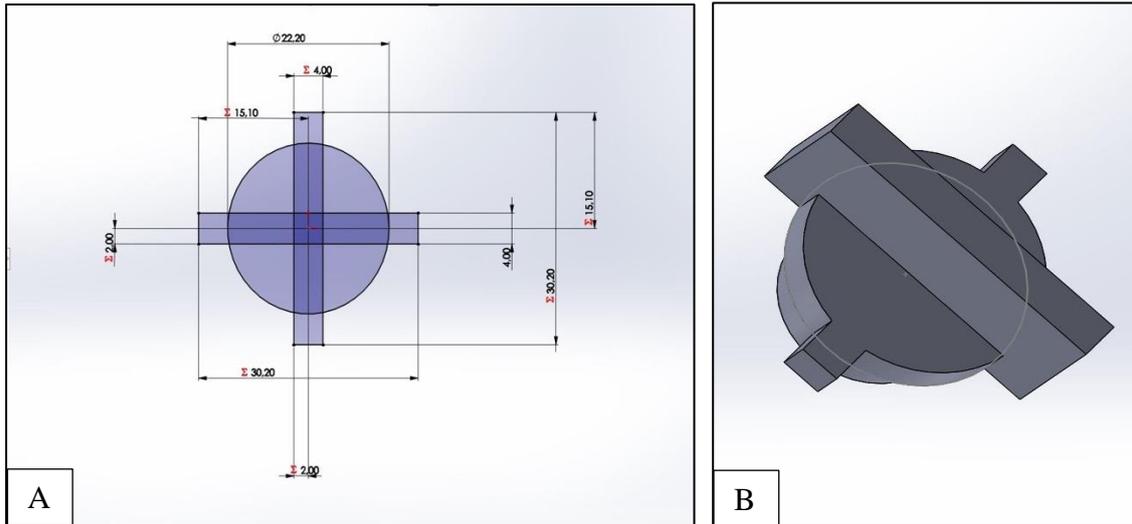


Abbildung 5: Basis Konstruktion für 12-well Kulturplatten, A- Skizze, B- Konstruktion

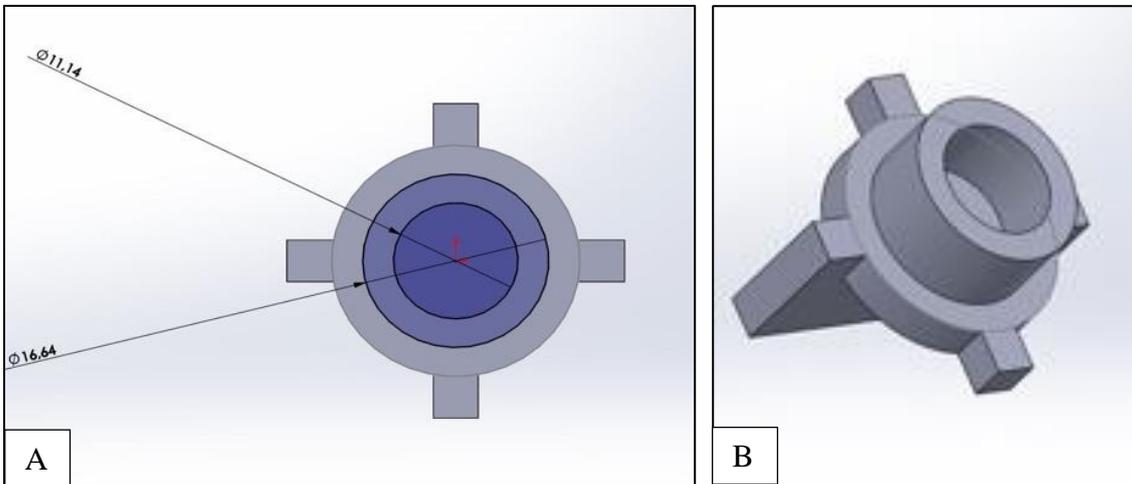


Abbildung 6: Konstruktion "12-well-Ring"; A-Skizze, B-Konstruktion

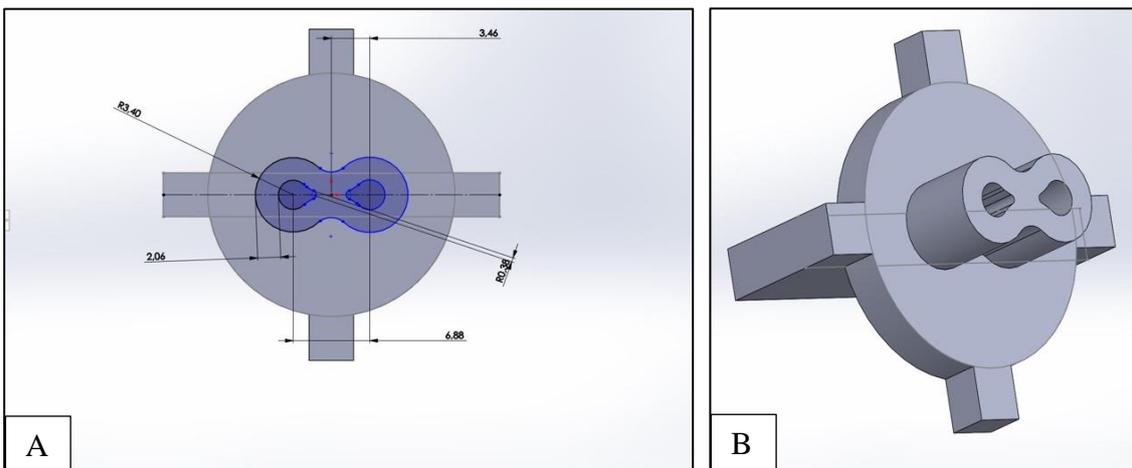


Abbildung 7: Konstruktion "12-well-Infinity", A-Skizze, B-Konstruktion

3.9.1 Herstellung des Zubehörs für Infinity-EHTs und des Ring-EHTs

Mit Hilfe der Negativformen aus dem 3D Drucker, wurden Formen aus Silikon (Adesil® Blau 9:1, Siladent 14356-Typ2) geformt, siehe Abbildung 9. Dafür wurde flüssiges Silikon in 6-well oder 12-well Zellkulturplatten gegossen. Die Negativformen haben den Zweck der Vertiefung des Silikons und wurden nach Aushärtung des Silikons entfernt.

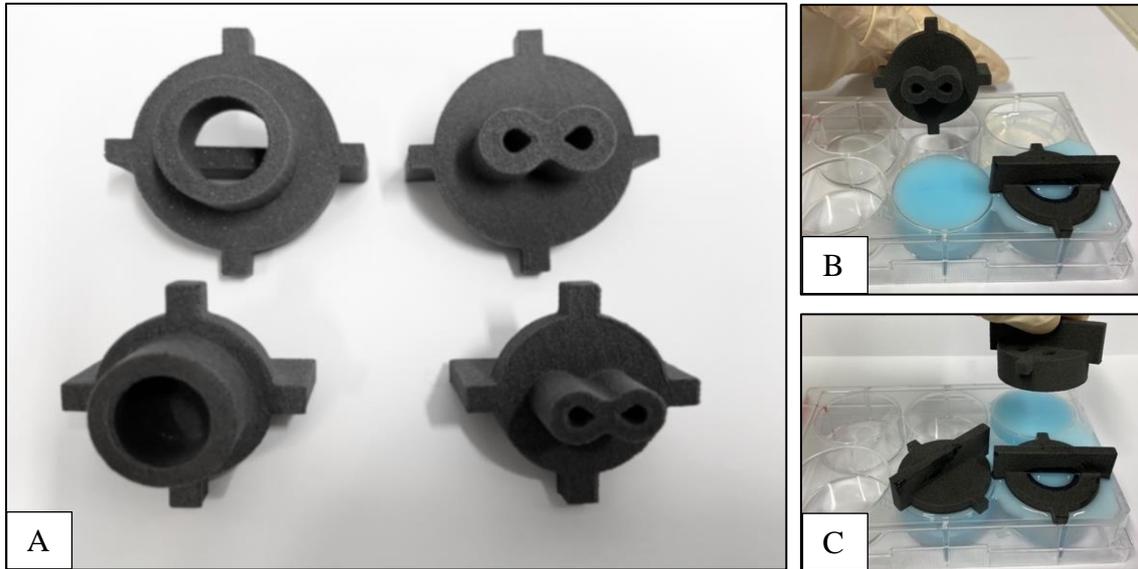


Abbildung 8: Herstellung der EHT-Formen A- Schablonen aus hauseigenem 3D Drucker B und C- Herstellung der Silikonformen für die EHT-Generierung

Die hergestellten Silikonformen dienten als Gussform der EHTs und wurden in 6-well oder 12-well-Zellkulturplatten kultiviert. Zur Wiederverwendung der Silikonhalterungen wurden die Instrumente mit zweifach demineralisiertem Wasser aufgekocht und autoklaviert.

3.9.2 Herstellung des Zubehörs für Streifen-EHTs

Das 2%ige Agarosegel auf PBS Basis wurde zur Herstellung der Gussformen der EHTs verwendet. 1,6 ml 60°C warme Agarose wurde in 24-well-Platte pipettiert. Anschließend wurden die Silikonplatzhalter in der Agarose platziert und 10 Minuten gewartet, bis die Agarose ausgehärtet war. Nach Entfernung der Silikonplatzhalter entfernt wurden die Silikonhalterungen (Abbildung 11) mittig platziert.

3.9.2.1 Silikonplatzhalter

Silikonplatzhalter haben den Zweck der Agarosevertiefung für die Formung flüssiger und warmer Agarose, Abbildung 10. Zur Wiederverwendung, sowohl der Silikonhalterungen als auch der Silikonhalterung wurden die Instrumente mit zweifach demineralisiertem Wasser aufgekocht und autoklaviert.

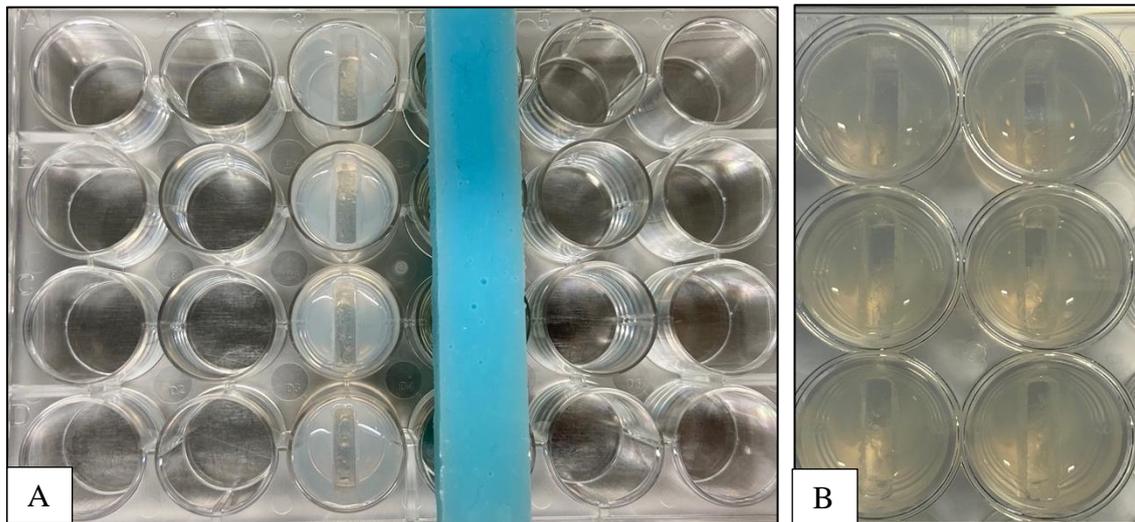


Abbildung 9: A-Teflonplatzhalter (blau) in Agarose, B-Agaroseform nach Aushärtung

3.9.2.2 Silikonhalterung

Zur Aufhängung der EHTs dienen die Silikonhalterungen, Abbildung 11.

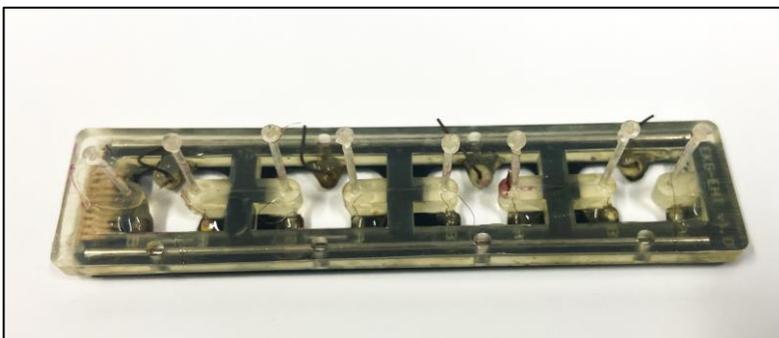


Abbildung 10: Silikonhalterung für Streifen-EHTs

3.10 Herstellung von EHTs

Zur Kultivierung von EHTs wurden differenzierte Kardiomyozyten unter Zuhilfenahme von Versene den Kulturflächen entnommen und in 15ml Falcon Röhrchen auf Eis aufgenommen. Dabei wurde stets unter einer sterilen Werkbank gearbeitet. In autoklavierten 200µl Eppendorf-Gefäßen wurde jeweils eine entsprechende Menge an Thrombin vorpipettiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt (s. 3.7.8). Entsprechend der Zellzahl wurde das entsprechende Volumen an NKM Medium, zweifach konzentriertem DMEM, Fibrinogen, sowie Rho Kinase Inhibitor (Y-27632) hinzugegeben. Wichtig war ein regelrechtes auf- und abpipettieren um alle Komponenten gut zu vermengen. Aus dem hergestellten Mastermix wurde entsprechend der errechneten Menge an Zellen das Volumen entnommen und in die 200µl Eppendorf-Gefäße mit dem vorgelegten Thrombin drei bis viermal auf- und ab pipettierten, um Thrombin ebenfalls aufzunehmen. Ein schnelles Überführen des Mastermix in die vorgelegten Zellkulturplatten mit Silikonhalterungen war obligat, um ein vorzeitiges „clotting“ (aushärten in einer dreidimensionalen Form) des Zellmixes in der Eppendorf Pipette zu vermeiden, siehe Abbildung 12-14. Für die Streifen-EHTs war das Volumen auf 110µl mit $1-1,5 \cdot 10^6$ Zellen festgelegt. Die Ring- und Infinity EHTs wurden standardmäßig mit einem Volumen von 440µl mit $4 \cdot 10^6$ Zellen hergestellt. Anschließend wurden die angefertigten EHT in den Zellkulturplatten für 90 Minuten im Inkubator bei 37°C, 40% O₂ und 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach diesem Inkubationsintervall wurden die EHTs mit EHT-Medium bedeckt und für weitere 30 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurden für die Streifen-EHTs in einer neuen 24-well Kulturplatte je 1,5ml EHT-Medium pipettiert und für 15 Minuten vorgewärmt. Unterdessen wurden 300 µl DMEM für 10 min auf den Streifen-EHTs inkubiert. Die nun polymerisierten EHTs wurden vorsichtig aus den Gussformen genommen und in die neue 24-well Platte überführt.

Die Die Infinity- und Ring EHTs welche in den Silikonformen verblieben wurden nach 90 Minuten mit EHT-Medium bedeckt.

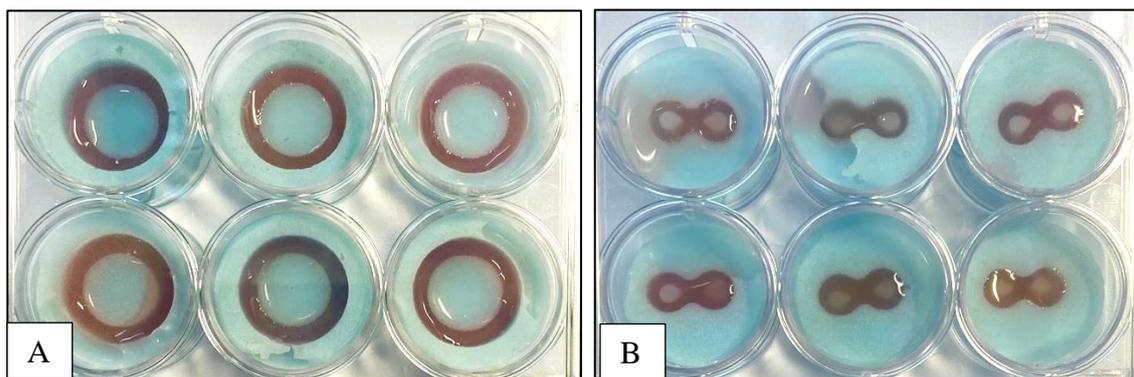


Abbildung 11: EHTs in Silikonformen; A- „Ring“-EHT, B- „Infinity“-EHT

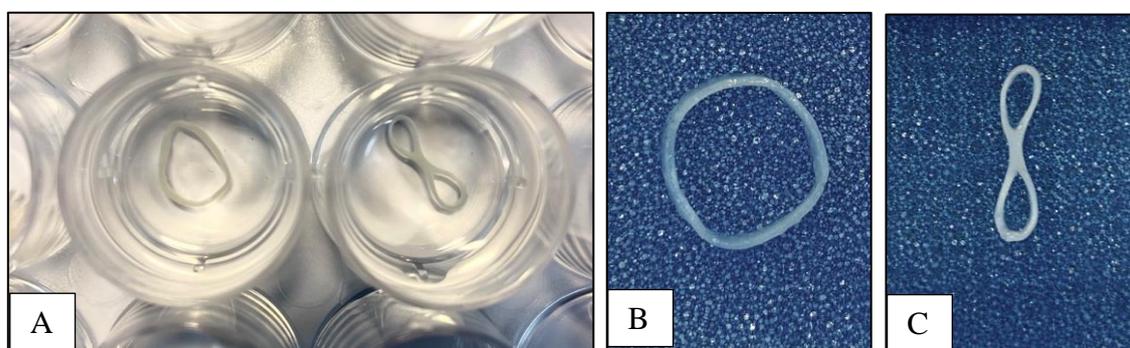


Abbildung 12: A-Ring- und Infinity EHT in 4%igem-PFA, B- fixiertes Ring-EHT, C- fixiertes Infinity EHT

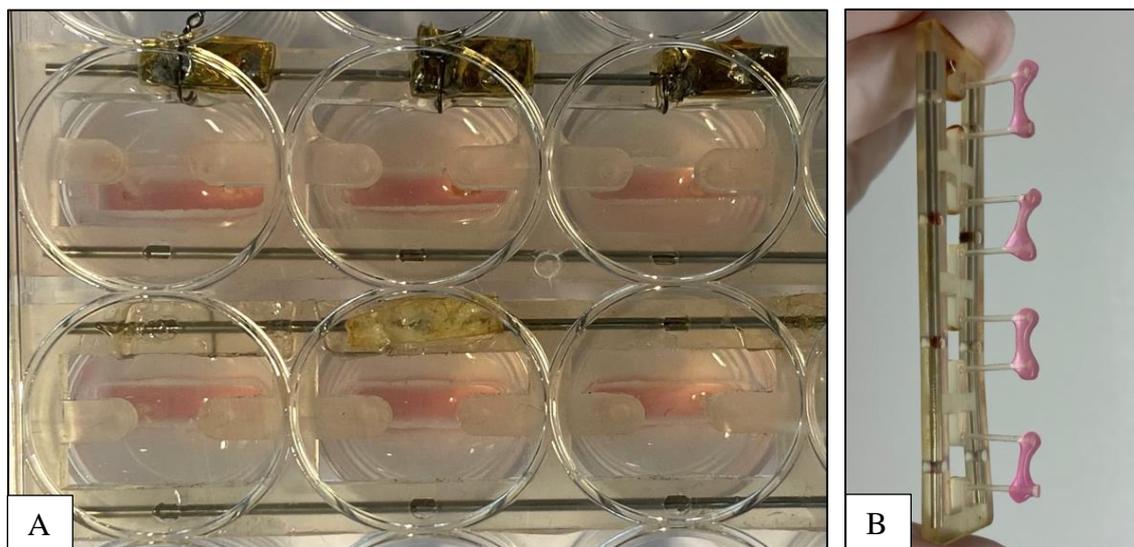


Abbildung 13: A-Aufsicht auf Streifen-EHTs an Silikonposts, B-Hängende EHTs an Silikonposts

3.10.1 Kultivierung der EHTs

In den ersten drei Tagen wurde das Nährmedium täglich gewechselt. Anschließend erfolgte der Mediumwechsel Montag, Mittwoch und Freitag. Das EHT-Medium wurde für den Wechsel für fünfzehn Minuten im 37°C Inkubator vorgewärmt. Der Mediumwechsel erfolgte unter der sterilen Werkbank. Zum Mediumwechsel wurde das bestehende Medium vorsichtig abpipettiert und anschließend je 1,5ml neues EHT-Medium mittig pipettiert. Anschließend wurde die 24-well Platten mit den kultivierten EHTs in den Inkubator gestellt.

3.11 Hypoxieexperiment

Zur Untersuchung des Einflusses von Hypoxie auf Kardiomyozyten wurden nach Abschluss der Differenzierung an Tag 18 die Zellkulturen in einer Plexiglaskammer bei 0,5% Luftsauerstoff gehalten. Zur Analyse wurden mindestens zwei identische Zellkulturen in Zellkulturflaschen vorbereitet. Durch die hermetische Konstruktion der Kammer mit Hilfe von Ringklemmen, fand kein Austausch zwischen Kammer- und Raumluft statt. Während des gesamten Experimentes wurden Sauerstoffkonzentration, Temperatur und Luftfeuchtigkeit kontinuierlich überwacht. Während die Ringklemmen geöffnet waren, wurde die Kammer mit entsprechenden Anteilen an Stickstoff und Kohlenstoffdioxid geflutet, um den Sauerstoffanteil in der Kammer zu verdrängen. Die Durchflussrate wurde an einem kugelförmigen Schwimmer abgelesen. Stickstoff (N₂) wurde mit einer Durchflussrate von 12 l/min und Kohlenstoffdioxid (CO₂) mit 6 cc/min*100 insuffliert. Das Zielgasgemisch war wie folgt zusammengesetzt: 94% N₂, 5% CO₂ und 0,5-1% O₂, daher wurde Stickstoff 20mal schneller in die Kammer eingeleitet. Bei Inkubationszeiten von über 24 Stunden war es ratsam erneut Gas in die Kammer einzubringen, um die Hypoxie langanhaltend zu gewährleisten.

Die Probe mit hypoxischen Kardiomyozyten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 3h, 6h, 12h, 24h und 48h) der Hypoxiekammer entnommen und analysiert. Eine weitere Zellkultur wurde über den gleichen Zeitraum im Brutschrank unter Normoxie (20% O₂) als Kontrolle kultiviert.

Zur Reinigung der Kammer wurde mit 70%iges Ethanol sterilisiert. Der Metallring der Hypoxiekammer wurde in regelmäßigen Abständen gereinigt, um eine ordnungsgemäße Abdichtung zu sichern. Der Durchflussmesser wurde durch Abnehmen der Schläuche inklusive der Filter und Demontage des Körpers mit reinem Wasser und Seife gereinigt.

3.12 Molekularbiologie

3.12.1 RNA Isolation

Die RNA Isolation dient als Basismethode zur Analyse der Genexpression und umfasst biochemische Methoden zur Extraktion von mRNA aus Zellen, um Information über die aktuelle Proteinbiosynthese der Zellen zu gewinnen. Zur Aufreinigung einer RNA wurde das RNeasy Kit (Qiagen) unter Herstellerbedingungen verwendet. Zunächst wurde das zu untersuchende Gewebe und Kardiomyozytenkulturen mit PBS gewaschen, eine maximale Größe vom Hersteller wurde mit 30mg angegeben. Bei größeren Gewebeproben wurden diese entsprechend portioniert. Die RNA Aufreinigung nach oben genanntem Verfahren beruht auf dem Prinzip der Lyse der Zellen und der Bindung der RNA an eine Silica-Gel-Membran. Diese ist als Filter im vom Hersteller gestellten RNeasy Spin Column enthalten. Ein Gemisch aus RLT-Puffer und β -Mercaptoethanol wurde dem EHT hinzugeben und lysierte die EHTs. Zur vollständigem Gewebeauflösung der EHTs wurde mechanisch mit einem Homogenisator gearbeitet und die Probe anschließend für 30 Sekunden gevortext. Im Anschluss wurde das Lysat über ein 100 μ m Zellsieb filtriert. Das Lysat wurde mit 70%igem Ethanol gemischt, auf eine RNeasy Spin Column überführt und für 15 Sekunden bei 8000g zentrifugiert. Die Reinigungssäule besteht aus einer Membran, die bis zu 100 μ g Gesamt-RNA adsorbieren kann. Es erfolgte der erste Waschschriff mit RW1- Puffer. Anschließend wurde mit dem RNase-Free DNase Set (50) von Qiagen nach Herstellerangaben die DNA eliminiert. Dazu wurden 10 μ l DNase I mit 70 μ l RDD DNA Digest Buffer vermengt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur mittig auf der Silica Gel-Membran inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Waschung mit 350 μ l RW1 Buffer. Nach den abschließenden Waschschriffen mit 500 μ l RPE-Puffer (Zentrifugation für 15 Sekunden bei > 8000 x g), wurde die Membran mit 30 μ l RNase freiem Wasser benetzt. Nach letztem Zentrifugieren für eine Minute bei 8000g wurde das Eluat in einem 1,5 ml V-Eppendorf Tube aufgenommen. Die Säule wird verworfen und die isolierte RNA bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren.

3.12.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Ermittlung der RNA-Konzentration wurde ein NanoDrop-1000-Spektrometer verwendet (Thermo Fischer Scientific Inc.) Bei einer optischen Dichte (OD) von 1, entsprach die Konzentration der RNA 40ng/μl. Hierfür wurde entsprechend der Herstellerangaben das Messungsverfahren mit RNase free water auf 0 ng/μl eingestellt. Anschließend wurden die Konzentrationen der Proben jeweils durch den Einsatz von 1,0μl Eluat im NanoDrop bestimmt und protokolliert.

3.12.3 Reverse Transkription

Zur Umwandlung einer Sequenzabfolge einer RNA in eine DNA (cDNA) wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Enzymatisch wird die Reaktion von einer reversen Transkriptase (RT) katalysiert. Die RT als retrovirales Schlüsselenzym diente ursprünglich zur Transkription des viralen Genoms in die DNA. Für die Umwandlung in die cDNA wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem) verwendet. Das Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Wir verwendeten für die Reaktion 100ng RNA und Oligonukleotide. Random Primer der High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits wurden hinzugegeben. Die Transkription erfolgte im RNA Cycler. Während der Initialphase von 10 Minuten betrug die Temperatur 25°C. Für weitere 120 min. folgte die reverse Transkription bei 37°C. Abschließend erfolgte die Denaturierung für 5 min. bei 85°C. Der Endvolumen der cDNA lag bei 20μl.

Tabelle 7: Standardpipettierprotokoll der reversen Transkription

Reagenzien	Menge
10x RT Puffer	2.0 μl
25x dNTP Mix (100mM)	0.8 μl
10 RT Random Primers	2.0 μl
MultiScribe Reverse Transcripase	1.0 μl
Nuclease-free H ₂ O	4.2 μl
RNA	10 μl
Total Volumen	20,0 μl

Tabelle 8: Thermo-Cycler Profil für die reverse Transkription

Zyklus	Temperatur	Zeit
Annealing des RT-Primers	25°C	10 min
Erststrangsynthese	37°C	120 min
Denaturierung der reversen Transkriptase	85°C	5 min
RNAse H-Behandlung	4°C	∞

3.12.4 PCR

Die PCR stellt eine Vervielfältigungsmethode von DNA dar. Dabei wurde zunächst RNA aus entsprechendem Zellmaterial gewonnen, in cDNA umgeschrieben und mittels PCR-Reaktion vervielfältigt. Die PCR lief mit Primern gegen humane Gensequenzen: α -MHC, c-Myc, cardiac Troponin T, Gapdh, GUSB, Hif-1 α , Islet, VEGF-2 Rezeptor, Luciferase, MLC-2, Nanog, Oct-4 und Sox-2 ab. Die Primer wurden über Primer-BLAST entworfen. Dabei werden zielspezifische Primer für die Polymerase Kettenreaktion entworfen. Zunächst werden Primer manuell oder mit Hilfe eines Software Tools ausgewählt, die die interessierte DNA Region flankieren. Anschließend wird über Primerblast eine geeignete Nukleotidsequenz aus einer Datenbank gesucht, um die potentiellen Zielgene zu untersuchen (Ye et al. 2012). Die Reaktion lief mit Ansätzen von 20 μ l in einem Thermo-Cycler der Firma Eppendorf ab.

Tabelle 9: Standardpipettierprotokoll für PCR

Reagenzien	Menge
10x Puffer	2,0 μ l
MgCl ₂ (25mM)	2,0 μ l
Primer foreword (10pM)	2,0 μ l
Primer reverse (10pM)	2,0 μ l
dNTP's (10mM)	1,0 μ l
Polymerase (5U/ml)	0,5 μ l

Material und Methoden

DNA-Probe	1,0 µl
H ₂ O	9,5 µl
Summe	20,0 µl

Tabelle 10: Standard Thermo-Cycler Profil für PCR

Zyklus	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiation	94°C	3min	1
Denaturierung	94°C	30sek	30
Hybridisierung	56°C	30sek	
Extension	72°C	1min	
Extension	72°C	10min	
Ende	4°C	∞	

Tabelle 11: Thermo-Cycler Profil für PCR mit Primern gegen humanes NANOG

Zyklus	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiation	95°C	7min	1
Denaturierung	95°C	30sek	15 touchdown je Zyklus -0,4°C
Hybridisierung	68°C	30sek	
Extension	72°C	45sek	
Denaturierung	95°C	30sek	25
Hybridisierung	62°C	30sek	
Extension	72°C	45sek	
Ende	4°C	∞	

Abschließend wurden die PCR Produkte in einer 1% Agarose Gelelektrophorese analysiert.

3.12.5 Gelelektrophorese

Zur Analysierung einer zuvor amplifizierten DNA kann das Verfahren der Gelelektrophorese Anwendung finden. Das angefertigte Agar Gel, bestehend aus 1g Agarose vermischt mit 100ml TAE Buffer wurde erwärmt, bis die Agarose gelöst war. Die Lösung wurde mit weiteren 20µl Roti Gel-Stain vermischt. Ein Kamm mit 20 Zähnen wurde in das noch flüssige Gel positioniert. Das Agarosegel härtete für ca. 30 min aus und wurde anschließend in die Elektrophoresekammer eingebettet und mit TAE Buffer übergossen. Ein Marker wurde aus 1µl DNA ladder, 1µl DNA loading dye (6x) und 4µl deionized water hergestellt. Die DNA-Probe von 5µl wurde mit 2µl (6x) loading dye und 5µl H₂O vermischt. Es wurden je 10µl der Probe in die entsprechenden Taschen pipettiert. Am Gleichstrom-Transformator wurde eine Spannung von 120Volt und eine Stromstärke von 100mA angelegt. Abschließend erfolgte die Darstellung eines UV-Fotos mit Hilfe des Programms Azure Biosystems.

3.12.6 Quantitative Echtzeit-PCR (RT-PCR)

Neben der Vervielfältigung der DNA konnte bei einer quantitativen PCR die DNA mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen in Echtzeit quantifiziert werden. Die Fluoreszenz nahm proportional mit der Menge der amplifizierten PCR-Produkte zu.

Die RT-PCR wurde mit FastStart Essential DNA SYBR-Green Master der Firma Roche gemäß der Herstellerangaben in 10µl Ansätzen angesetzt. Ein Referenz-Gen Glucuronidase-β wurde als interner Standard in jeder Messung mitbestimmt, um einen relativen Mengenvergleich zur relativen Quantifizierung durchzuführen. Zur Auswertung wurde die Differenz zwischen dem CT-Wert des Ziel-Gens und des Referenz-Gens (Δ CT-Wert) neben der Differenz vom Δ CT-Wert der Probe (differenzierte Kardiomyozyten) und einer Kontrollprobe ($\Delta\Delta$ CT-Wert) berechnet. Als Kontrollprobe dienten hiPSC Zellen, die im undifferenzierten Stadium isoliert wurden. Aus dem $\Delta\Delta$ CT-Wert wurde der Faktor (F) der Veränderung nach folgender Formel siehe (3.9) berechnet:

$$F = 2^{\Delta\Delta CT} \quad (3.9)$$

Dabei wurde pro Zyklus eine korrekte Amplifikation um den Faktor 2 angenommen. Die Messung erfolgte im LightCycler® 96 Instrument. Die Proben wurden über 45 Zyklen amplifiziert. Die Erstellung einer Schmelzkurve wurde zur Qualitätskontrolle durchgeführt. Der verwendete LightCycler® 480 SYBR Green I Mastermix setzt sich aus einer FastStart Taq DNA Polymerase, einem DNA double-strand-specific SYBR Green I-Farbstoff, dNTPs und dUTP und einem optimierten Puffer zusammen.

Tabelle 12: Standardpipettierprotokoll für qPCR

Reagenzien	Menge
SYBR-Green PCR Mastermix	5,0 µl
Primer forward (5pM)	1,0 µl
Primer reverse (5pM)	1,0 µl
DNA-Probe	2,0 µl
Nuclease-free-H ₂ O	1,0 µl
Summer	10,0 µl

Tabelle 13: Thermo-Cycler Profil für qPCR

Zyklus	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiation	95°C	10min	1
Denaturierung	95°C	15sek	
Hybridisierung	56°C	30sek	45
Extension	72°C	30sek	
Ende	4°C	∞	

3.12.7 DNA Isolation

Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit Phenol-Chloroform-Isopropanol. Zunächst wurden die EHTs mit Hilfe des Tissue Lyser (Qiagen) mit 20x für 2 min wurden die Zellwandbestandteile zerstört. Die Probe wurde anschließend bei Raumtemperatur für 1 min bei 3.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in 2 ml-

Eppendorf Tubes überführt. Das Lysat wurde mit einem 1:1-Gemisch aus Phenol-Chloroform vermengt. Anschließend wurde erneut bei Raumtemperatur für 10 min bei 13.000g zentrifugiert. Die DNA-haltige wässrige Phase wurde über eine Säule gegeben und erneut bei Raumtemperatur für 1 min bei 13.000g zentrifugiert. Unter der Zugabe von 800µl Isopropanol erfolgte die Präzipitation der DNA. Die Proben wurden erneut zentrifugiert, der Überstand vorsichtig verworfen und die Säule mit den DNA Anteilen in neue 2ml-Eppendorf V-tubes gegeben. Abschließend wurde das DNA-Pellet mit 50µl EB-Puffer resuspendiert und für 5 min inkubiert. Zum Schluss wurde das DNA-Pellet bei Raumtemperatur für 1 min bei 13.000g zentrifugiert. Die abschließende Konzentrationsbestimmung erfolgte im NanoDrop-1000-Spektrometer wie in (3.9.2).

3.13 Durchflusszytometrie

Die zu analysierenden Zellen wurden zunächst aus den Kulturflaschen entnommen und mit 1ml PBS vermengt. Bei der Untersuchung der 2D-Kardiomyozten Kulturen und der EHTs wurden die zu untersuchenden Zellen zunächst in PBS aufgenommen. Mit Hilfe eines Homogenisators wurden die EHTs mechanisch aufgelöst. Anschließend wurden die Zellen über einem 100µm Zellsieb vereinzelt und in PBS resuspendiert. Es erfolgte die Zählung der Zellen wie in Abschnitt 3.7.8 beschrieben. Das Lysat wurden in 150µl FACS-Buffer pipettiert und für 5 min. auf Eis mit einer 0,1 µl FC-Block-Lösung (Anti-A,B Mono-Type ES-4, ES-15, Grifols, Cat.No.: 213509) inkubiert. Dieser Prozess diente zum Nachweis membranständiger Proteine, welche an unspezifische Bindungsstellen binden. Die Zellen wurden anschließend mit dem primären Antikörper im FACS Buffer (Stain Buffer) für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Wir verwendeten 1,7µl PE Mouse Anti-Cardiac-TroponinT-Antikörper (BD Pharmingen™, Cat.No.: 564767)/ 1,7 µl PE Rat Anti-SSEA-3 Klon: MC-631/ 1,7 µl (BD Pharmingen™, Cat.No.: 560879)/ FITC Mouse Anti-Human TRA-1-60 Klon: Tra-1-60 (BD Pharmingen™, Cat.No.: 560876) in 100µl FACS-Wash und Perm Buffer und als Isotypkontrolle wurde PE Mouse IgG₁ (BD Pharingen™, Cat.No.: 554680) benutzt. Die verwendeten Antikörper dienen zum Nachweis intrazellulärer Proteine. Die Zellen wurden einmalig mit einem FACS-Wash-Buffer (Perm-/Wash Buffer) gewaschen und anschließend zur Analyse in 500µl FACS -Buffer (Stain Buffer) aufgenommen. Die Klassifizierung der Zellen erfolgte mit dem Cytometer: NovoCyte Quanteon 6212008115117 und LSR Fortessa (BD). Die Daten

wurden mit der Software Novo Express 1.4.1 und der BD FACSDiva™ Software analysiert. Die beispielhafte graphische Darstellung erfolgte mittels FlowJo™-10.

3.14 Histologie

3.14.1 Fixierung, Paraffineinbettung und Schneiden

Am Inkubationstag 7 und 14 wurden die EHTs mit PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C in 4%igem PFA fixiert, um ein gleichmäßiges Einbetten zu erzielen. Am Folgetag wurden die EHTs im Entwässerungsautomat entwässert. Die Dehydrierung der aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte nach Standardprotokoll wie folgt:

Tabelle 14: Dehydrierungszyklus

Reagenzien	Zeit
Formalin 3,8%	60 min
Formalin 3,8%	60 min
70% Ethanol	30min
80% Ethanol	30min
96% Ethanol	75min
100% Ethanol	120min
100% Ethanol	120min
100% Ethanol	120min
Xylol	240min
Paraffin	60min
Paraffin	∞

Es erfolgte zur Entwässerung des Gewebes die Einbettung in 41°C warmes Paraffin. Die Gewebestücke wurden in einem entsprechend großen Metallbehälter platziert, während das warme Paraffin auf der Kühlplatte der Paraffingießstation (Leica EG1150H) auskühlte. Die Platzierung erfolgte senkrecht für Querschnitt Übersicht und waagrecht für die Übersicht im Längsschnitt. Abgedeckt mit einem Einbettring wurde die gesamte Metallform mit Paraffin übergossen und zur Abkühlung auf einer Eisplatte gelagert. Das

Gewebe, eingebettet im Paraffinblock, konnte trocken über mehrere Wochen gelagert werden. Zur Aufarbeitung 3µm dicker Schnitte wurden die Paraffinblöcke mit der Schneidefläche auf einer Kühlplatte bei -5°C durchgekühlt und anschließend mit dem Rotationsmikrotom (Leica CM 2145) geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte in ein 45°C warmes Streckbad gelegt, wobei das Paraffin langsam schmilzt und das Auflegen auf einen SuperFrost Plus Objektträger faltenfrei gelingt.

3.14.2 Deparaffinierung und Antigendemaskierung

Zur Färbung eines in Paraffin eingebetteten Gewebes muss zunächst die Deparaffinierung in absteigender Alkoholreihe erfolgen.

Tabelle 15: Standardprotokoll zur Deparaffinierung

Reagenzien	Zeit
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min
100% Alkohol	5 min
100% Alkohol	5 min
96% Alkohol	3 min
80% Alkohol	3 min
70% Alkohol	3 min
Aqua dest.	Spülen

Im Anschluss an die Deparaffinierung erfolgte die Antigen Demaskierung. Dazu wurden die Objektträger in Antigen Retrieval Solution in einem Steamer der Firma Braun für 20 Minuten inkubiert. Die Abkühlung erfolgte bei Raumtemperatur für 45 Minuten. Vor Durchführung der Färbung wurden die Präparate 3mal mit PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen.

3.14.3 Hämatoxylin-Eosin (HE)

Als Hämatoxylin-Eosin-Routinefärbung, im Folgenden als HE-Färbung abgekürzt wird die Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin verwendet. Sie dient als Übersichtsfärbung zur histologischen Darstellung von EHTs. Hämatoxylin stammt aus dem natürlichen Farbstoff des Blauholzbaum und wird zu Hämalaun aufgearbeitet, welches basisch reagiert. Saure bzw. basophile Strukturen, wie beispielsweise die Ribosomen vom rauen endoplasmatischen Retikulum und Zellkerne werden blau angefärbt. Eosin ist ein synthetisch hergestellter saurer Farbstoff und färbt basische bzw. acidophile Strukturen, vor allem das Cytoplasma und extracytoplasmatische Strukturen (z.B. Kollagen) rosa-rot.

Zur Färbung der EHTs mit HE wurden die Paraffinblöcke zunächst mit Xylol entparaffiniert und bei absteigender Alkoholreihe bei Raumtemperatur rehydriert. Die Färbung erfolgte nach Standardprotokoll.

Tabelle 16: Hämatoxylin-Eosin-Färbeprotokoll

Reagenzien	Zeit
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min
100% Ethanol	5 min
100% Ethanol	5 min
96% Ethanol	3 min
80% Ethanol	3 min
70% Ethanol	3 min
Aqua dest.	spülen
Hämalaun nach Böhmer	15 min
Unter fließendem Wasser bläuen	15 min
HCL-Ethanol (70%)	dippen
Fließendes Wasser	2 min

0,5% Eosin in 0,5% Essigsäure	3 min
Aqua dest.	dippen (2-3x)
96% Ethanol	dippen (2-3x)
100% Ethanol	spülen
100% Ethanol	2 min
100% Ethanol	10 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Eukitt	eindecken

Zur Betrachtung und Auswertung der histologischen Schnitte wurde das Lichtmikroskop (Leica DM-IRE 2) verwendet.

3.14.4 Immunzytochemie

Für die Zellkultur wurden spezielle Nunc-Objektträger, 4-well chamber slides verwendet. Diese sind mit einem abnehmbaren Kompartimentaufbau aus Plexiglas versehen, um die Kultivierung von Zellen mit Nährmedien auch auf den Objektträgern zu garantieren. Die Objektträger werden vor der Zellkultivierung mit 400µl Matrigel® beschichtet und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Matrigel® entfernt und durch 300µl Nährmedium ersetzt. Nach steriler Isolation der Zellen aus den Kulturflaschen wurden unter der sterilen Werkbank ca. 3×10^5 Zellen auf die Objektträger mit dem vorgelegten Kulturmedium pipettiert. Die Zellen werden für 2-3 Tage bei 37°C mit 5% CO₂, 40% O₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschank inkubiert. Der erste Mediumwechsel erfolgte drei Stunden nach Ausplattierung der Zellen. Dabei wurden nur 100µl des Kulturmediums ausgetauscht, um ein Absaugen der ausplattierten Zellen zu umgehen. In der weiteren Kulturperiode wurde das Medium alle zwei Tage durch 250µl Kulturmedium ersetzt.

3.14.4.1 Antikörper

Grundlage immunzytochemischer und immunhistochemischer Untersuchungen ist die Darstellung der zellulären Proteine mit Hilfe eines gegen das Protein spezifisch gerichteten Antikörpers.

Primäre Antikörper

Zur Färbung wurde in der Arbeit sowohl mit monoklonalen und als auch polyklonalen Antikörpern gearbeitet. Dabei unterscheiden sich monoklonale Antikörper von polyklonalen Antikörpern durch eine höhere Spezifität, da sie antigen- und epitopspezifisch binden.

Der Vorteil von polyklonalen Antikörpern ist die Ausrichtung gegen verschiedene Epitope eines Antikörpers, wodurch eine Variabilität in der Spezifität und Affinität besteht (Leenaars and Hendriksen 2005).

Tabelle 17: Primärantikörper für Immunzytochemie und Immunhistochemie

Name	Klon	Wirt	Konz.	Firma
alpha-Actinin	-	Hase	1:1000	Invitrogen
Anti-Troponin T	13-11	Maus	1:400 1:100 (Paraffingewebe)	Thermo Fischer
Roti®Mount FluorCare DAPI	-	-	-	Roth
SSEA-3-PE	MC-631	Ratte	1:400	BD Bioscience

Die Oberflächen Antikörper gegen SSEA-3 wurde zur Identifizierung der Stammzellen gefärbt. Dabei wurde der Antikörper gegen kardiales Troponin T als Sarkomer-Marker zur Analyse differenzierter Kardiomyozyten verwendet. Für die Färbung von nativem Myokard wurde zusätzlich zum kardialen Troponin T auch alpha-Actinin gefärbt.

Sekundäre Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurde mit verschiedenen Sekundärantikörpern gearbeitet. Beide Sekundärantikörper waren mit Farbstoffen (GFP-488nm und Rhodamin-647nm) konjugiert und fanden in der indirekten Färbemethode Anwendung.

Für die Färbungen wurden ausschließlich indirekte Methoden durchgeführt. Der primäre Antikörper, der an das Antigen bindet, ist dabei unkonjugiert. Der primäre Antikörper wurde durch einen sekundären, gegen ihn gerichteten und konjugierten Antikörper nachgewiesen.

Tabelle 18: Sekundärantikörper für Immunzytochemie und Immunhistochemie

Name	Wirt	Konz.	Firma
Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	Esel	1:900	Abcam
Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 647)	Hase	1:900	Abcam

3.14.4.2 Färbeprotokoll*Tabelle 19: Färbeprotokoll für Immunzytochemie und Immunhistochemie*

Nr.	Arbeitsschritte	Reagenzien	Menge	Temperatur	Zeit
1	Spülung	PBS	300µl	RT	3 x 3 min
2	Fixierung	4%PFA (4°C)	1ml	RT	10 min
3	Spülung	PBS	300µl	RT	3 x 3min
4	Permeabilisierung	0,05% Triton-X	1ml	RT	10 min
5	Blockierung	10% Normal Donkey Serum	1ml	RT	40 min
6	Spülen	PBS	300µl	RT	3 x 5min
7	Inkubation	Primärer Antikörper	200µl	4°C	24 h
8	Spülen	PBS	300µl	RT	3 x 5 min
9	Inkubation	Sekundärer Antikörper	200µl	RT	2h
10	Spülen	PBS	300µl	RT	3 x 5 min
11	Eindecken	Rotimount®	50µl	RT	

Fixierung mit 4% PFA (Paraformaldehyd)

Aldehydfixierung führte zu einer Quervernetzung von Aminogruppen, somit wurde ein guter Strukturerehalt gesichert.

Permeabilisierung mit 0,05% Triton-X

Für die Diffusion von Antikörpern zur Zellstrukturfärbung in die Zelle müssen Zellmembranen durchlässig gemacht werden. Dazu wurde Triton-X verwendet. Zusätzlich verhinderte das Reagenz hydrophobe Interaktionen zwischen Antikörpern und Zellen.

Verhinderung unspezifischer Bindungen mit 0,1% BSA

BSA bindet freie reaktive Gruppen, um unspezifische Bindungen auszuschließen, damit eindeutige Antikörperbindungen nicht gestört wurden, um klare Ergebnisse zu erzielen.

Inkubation der ausplattierten Zellen mit dem Primärantikörper

Alle verwendeten Primärantikörper wurden in 10%-igem Normal Donkey Serum (NDS) verdünnt. Für die Färbung wurden die ausplattierten Kardiomyozyten mit 100 µl der Lösung inkubiert.

Inkubation der ausplattierten Zellen mit dem Sekundärantikörper

Zur Verdünnung der Sekundärantikörper wurden in 10%-igem Normal Donkey Serum (NDS) vermengt. 100 µl wurden auf die ausplattierten Zellen pipettiert.

Eindecken der Präparate

Das zu verwendende Deckglas wurde mit einem Tropfen Rotimount® beschichtet und anschließend auf den Objektträger gelegt. Zur Entweichung etwaiger Luftblasen wurde das Deckglas vorsichtig auf den Objektträger gedrückt. Rotimount® verhindert das Ausbleichen der Präparate, sodass die Objektträger bei 4°C gelagert werden können.

Negativkontrolle:

Zur Überprüfung der Färbemethode wurde eine Negativkontrolle durchgeführt. Die ausplattierten Kardiomyozyten wurden gleichermaßen behandelt, jedoch ohne die Verwendung des primären Antikörpers. Die Zellen wurden ausschließlich mit PBS für denselben Zeitraum inkubiert.

3.14.5 Dystrophinfärbung

Zum Nachweis des sarkolemmalen Proteins Dystrophin, welches in Kardiomyozyten vorkommt wurden indirekte immunhistochemische Färbungen mit Hilfe von Kristin Hartmann im Institut der Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die Färbung erfolgte in einem Vollautomaten (Ventana BenchMark XT, Roche). Die EHTs wurden zuvor in 3%-iger Agarose eingebettet und paraffiniert. Nach anschließender Entparaffinierung und Rehydrierung folgte eine 60ig minütige Vorinkubation in Cell Conditioning 2 Solution zur Antigen Demaskierung. Für die Färbung wurde das UltraView Universal DAB Detection Kit (Roche) für 60 Minuten inkubiert. Dystrophin (MAB1645) wurde dafür in einer Verdünnung von 1:200 angesetzt.

Die Gegenfärbung erfolgte mit Hilfe von Hematoxylin Ventana Roche (760-2021) und Bluing Reagent Ventana Roche (760-2037) für jeweils 4 Minuten. Nach erfolgreicher Färbung wurden die Präparate in aufsteigender Ethanolreihe dehydriert und mit Eukitt® unter Vermeidung von Luftblasen mit einem Deckgläschen eingeschlossen.

3.14.6 Mikroskope

Während der Kultivierung der ausplattierten Kardiomyozyten wurde ein Phasenmikroskop (Zeiss) verwendet, um die Zellmorphologie zu beurteilen. Für die Bewertung der immunhistochemischen Färbungen wurden die Präparate mit einem Zeiss-Fluoreszenz-Mikroskop begutachtet. Folgende Anregungswellen wurden für die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe verwendet: DAPI- 350nm, GFP- 488nm und Rhodamine- 647nm. Die daraus resultierenden Bildaufnahmen wurden mit der ImageJ/Fiji Software prozessiert.

3.15 Biolumineszenz Imaging

Biolumineszenz Imaging zählt zu den bildgebenden Verfahren, dass auf der Detektion von Lichtemission basiert. Zur Detektion wurden unsere Stammzellen speziell mit dem Gen Luciferase transduziert. Nach der Zugabe des Substrates Luciferin produzieren ausschließlich die transduzierten Zellen Lichtemission. Mit Hilfe einer sensitiven CCD-Kamera kann die Lichtemission selektiv detektiert werden. Die Messung wurde verblindet durchgeführt.

3.16 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung sämtlicher Experimente ist in Mittelwerten +/- Standardabweichungen (SD) dargestellt. Der ungepaarte Student t-Test wurde zur Signifikanzberechnung, unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen der Stichproben durchgeführt. Entsprechend gängigen Kriterien gilt ein Unterschied als signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $<5\%$ (* $p < 0,05$ und n.s. $p > 0,05$) ist. Die statistische Auswertung und graphische Darbietung wurde mit MS Excel und Graph Pad Prism 8 durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Mathematische Herleitung verschiedener Geometrien mit einem optimalen Oberflächen-Volumen-Verhältnis

Das Oberflächen-Volumen-Verhältnis von Streifenformen liegt bei $19\text{mm}^2/110\mu\text{l}^3$, Ringformen zeigen ein Oberflächen-Volumen-Verhältnis von $39,75\text{mm}^2/440\mu\text{l}^3$ und Infinityformen zeigen rechnerisch ein Oberflächen-Volumen-Verhältnis von $25,86\text{mm}^2/440\mu\text{l}^3$. Somit zeigt die Ringgeometrie das mathematisch berechnete bessere Volumen-Oberflächen-Verhältnis im Vergleich zur Infinityform. Die Streifengeometrie wird als etablierte Standard EHT Geometrie vergleichend mitaufgeführt, aber eignet sich auf Grund des kleineren Volumens nur bedingt im direkten Vergleich zu den etablierten Ring- und Infinity-Formen. Im Vordergrund der Arbeit steht die Etablierung größerer kardialer Ersatzgewebe mit möglichst vielen Zellen. Dafür wird die Geometrie des Rings mit der Geometrie einer Infinityform verglichen, die ein 4-fach größeres Volumen als die Streifengeometrie aufzeigen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Kreation eines Konstruktes mit optimierten Oberflächen-Volumen-Verhältnis und möglichst vielen Zellen für langanhaltendes Zellüberleben in künstlich hergestellten Herzgewebe. In der Forschungsarbeit wird hypothetisch angenommen, dass die Geometrie mit einer größeren Oberfläche im Verhältnis zum Volumen ein längeres Zellüberleben durch eine bessere Nährstoffversorgung bei kürzeren Diffusionsstrecken bedingt.

4.2 Ergebnisse der Zellkultur

4.2.1 Zellkultur human induzierter pluripotenter Zellen (hiPSC)

Unter dem täglichen Mediumwechsel zeigte sich nach Anwachsen der Zellen eine starke Proliferation. Typisch ist das Wachstum der human induzierten Stammzellen in Zellverbänden, bzw. in Kolonien. Undifferenzierte Stammzellen wurden täglich unter einem Lichtmikroskop morphologisch beurteilt. Bei Erreichen einer kritischen Koloniekonfluenz wurden die Zellen durch Passagierung im undifferenzierten pluripotenten Stadium gehalten.

Zur erfolgreichen Differenzierung der human induzierten Stammzellen zu hiPSC-Kardiomyozyten war eine Konfluenz der hiPSC Zellen in den Kulturflaschen von 75-

90% Voraussetzung. Für den einen optimalen Differenzierungserfolg müssen alle hiPSC Zellen vollständig undifferenziert vorliegen.

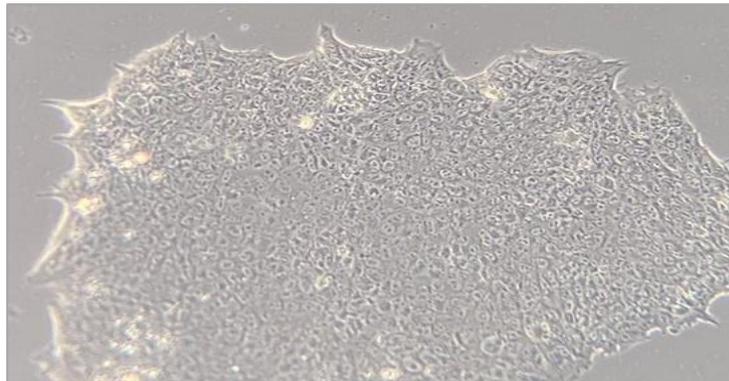


Abbildung 14: Lichtmikroskopische Aufnahme von human induzierten pluripotenten Stammzellen

Regelmäßig wurden vor Beginn der Differenzierung Qualitätskontrollen durchgeführt. Diese beinhalteten neben der täglichen lichtmikroskopischen Beurteilung, siehe Abbildung 15, die Verifizierung der Stammzellkulturen, durch die regelrechte Karyotypisierung, sowie die Kulturüberprüfung auf Reinheit von Mycoplasmen. Abbildung 16 demonstriert das weibliche Karyogramm unserer verwendeten hiPSC Zellen. Hier lassen sich keine numerischen Aberrationen feststellen.

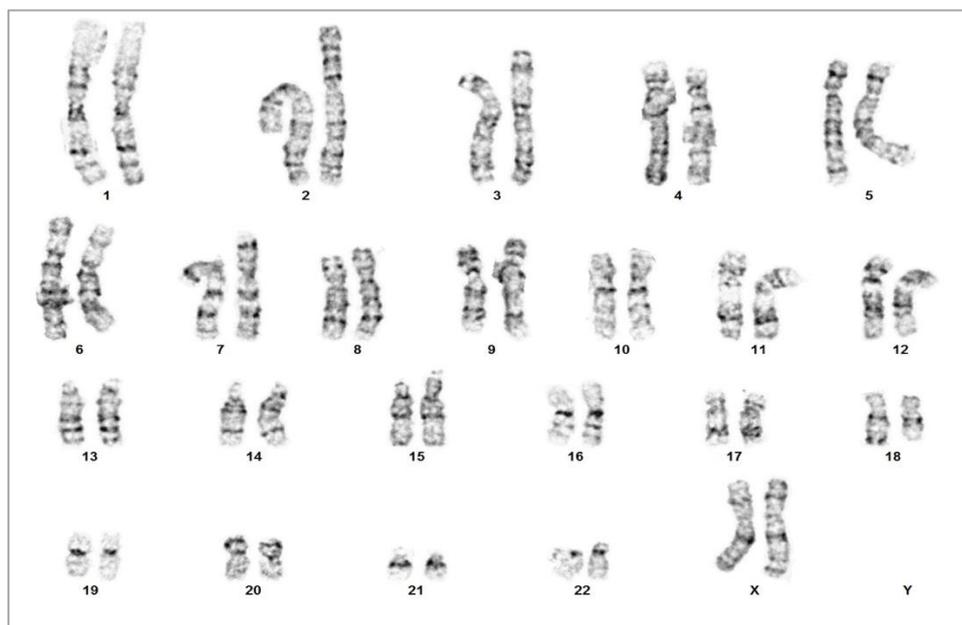


Abbildung 15: Karyogramm der hiPSC Zellen (Gibco® Episomal hiPSC Line, A18945), in Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer.nat.Sigrid Fuchs, Zentrum für Humangenetik UKE

Zusätzlich erfolgte die Überprüfung der quantitativen Analyse auf Pluripotenzcharakter der hiPSC Zellen mittels Durchflusszytometrie und die Überprüfung der Pluripotenz auf Genexpressionsebene mittels qPCR Analysen.

Dafür wurden die hiPSC-Zellen während der Expansionsphase auf ihre Pluripotenz vor der kardialen Differenzierung quantitativ mittels Durchflusszytometrie untersucht. Eine Stage-specific-embryonic Antigen 3 (SSEA-3) und Podocalyxin (Tra-1-60) basierte Oberflächen Strukturanalyse ist standardmäßig etabliert. Die Antikörper binden dabei extrazellulär, SSEA-3 ist mit PE gekoppelt. Tra-1-60 bindet ebenfalls Oberflächenproteine und ist zur Auswertung mit FITC gekoppelt. Sowohl SSEA-3 als auch Tra-1-60 sind humane stammzellspezifische Epitope, die einen Untergang während einer beginnenden Zelldifferenzierung kennzeichnet, und die nur im undifferenzierten Stammzellstadium exprimiert werden.

Abbildung 17 ist die Gating Strategie zur Auswertung der durchflusszytometrische Daten zu entnehmen, die graphische Darstellung wurde mit der Software FlowJo™10 durchgeführt. Zusätzlich sind die Histogramme zur Darstellung der Negativkontrolle und der positiv gefärbten Zellen auf PEA-A/SSEA-3 und FITC-A/Tra-1-60 zu entnehmen.

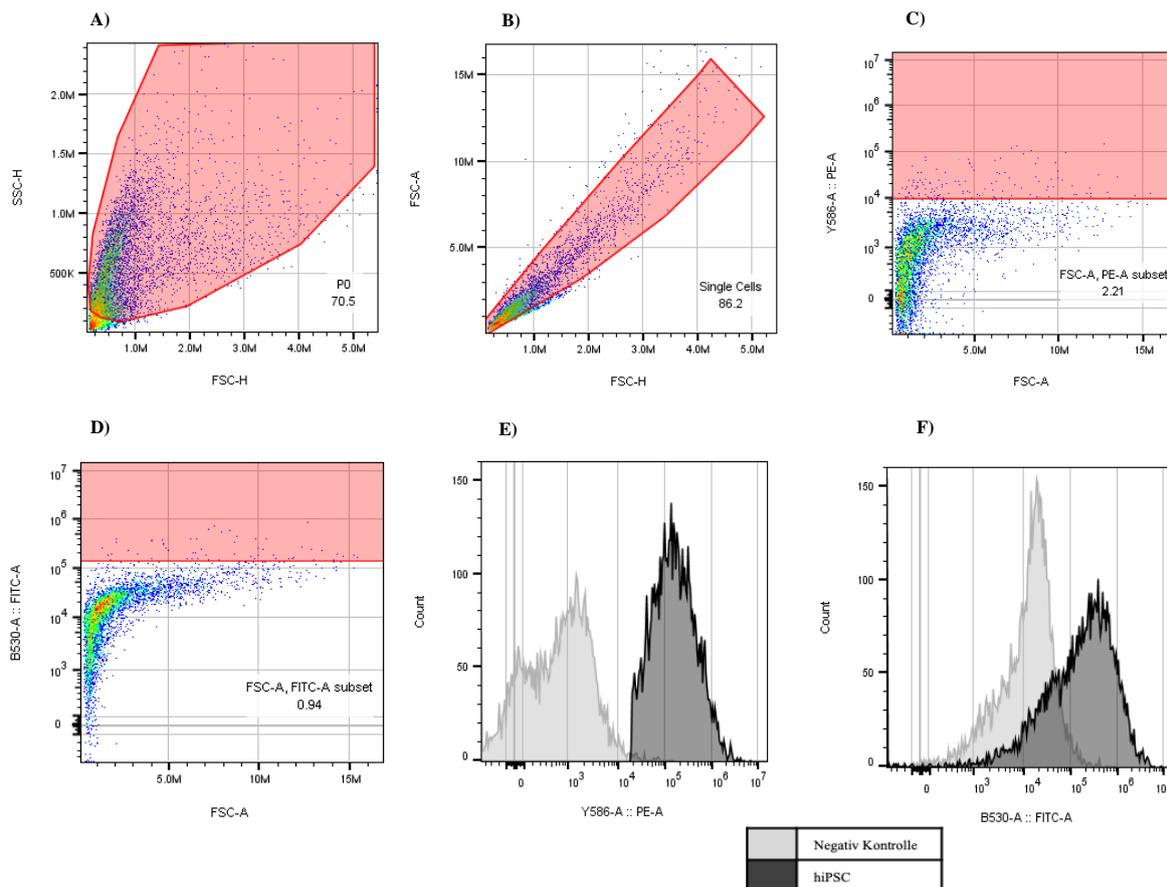


Abbildung 16: Gating Strategie zur Auswertung der FACS Daten mit FlowJo™. A) Darstellung der Gesamtpopulation (P0) B) Darstellung der Einzelzellen (P2) C) Gate für PE-A/ SSEA-3, D) Gate für FITC-A/ Tra-1-60, D) Histogramm PE-A/ SSEA-3, grau=neg. Kontrolle, schwarz=gefärbte Zellen F) Histogramm FITC-A/ Tra-1-60, grau=neg. Kontrolle, schwarz=gefärbte Zellen

Abbildung 18 veranschaulicht die Expression des Pluripotenzmarkers SSEA-3 und Tra-1-60 unserer hiPSC Zellen.

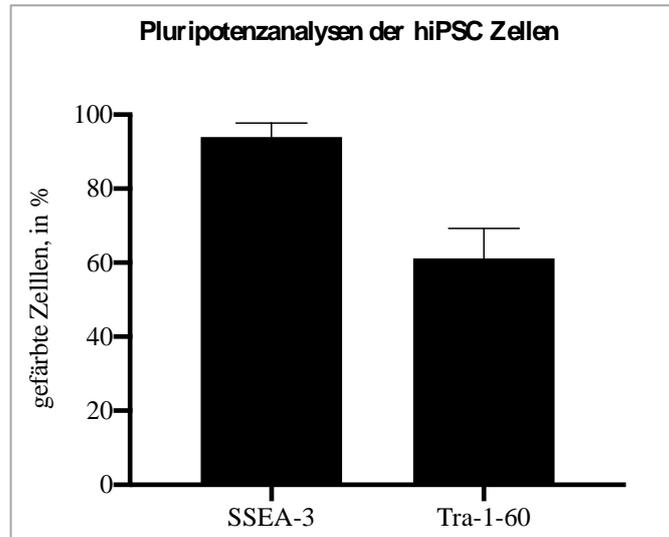


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse von hiPSC Zellen, SSEA-3 gefärbte Zellen 93,96% und Tra-1-60 gefärbte Zellen lagen bei 61,1%, n=6.

Durchschnittlich sind 93,96% der human induzierten pluripotenten Zellen positiv für SSEA-3, die Expression liegt zwischen 88,92% und 97,25% bei einer SD von $\pm 3,74\%$, n=6. Tra-1-60 wird bei durchschnittlich 61,1% der human induzierten Kardiomyozyten exprimiert, die Werte liegen zwischen 48,61 und 71,75% bei einer SD von $\pm 8,11\%$, n=6. Beide Marker zusammen werden von 61,48% der Zellen zeitgleich exprimiert, die SD liegt bei $\pm 7,71\%$, n=6.

Die Expression von stammzellspezifischen Genen wurde mittels PCR Analyse vor Beginn der Differenzierung zu Kardiomyozyten überprüft. Dabei wurden Expressionsanalysen auf humane Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Gapdh), Octamer Binding Transcription Factor 4 (Oct4), Sex Determining Region Y-Box2 (Sox-2) analysiert. Das Protoonkogen c-Myc als wichtiger Regulator von Zellwachstum und Zelldifferenzierung und das Homöoboxprotein NANOG, welches in der Steuerung der Selbsterneuerung von Stammzellen involviert ist, wurde ebenfalls durchgeführt.

Abbildung 19 zeigt die PCR Analyse als Auswertung einer 1%igen Agarosegels mit den entsprechenden Banden für Gapdh, Oct-4, Sox-2, c-Myc und Nanog.

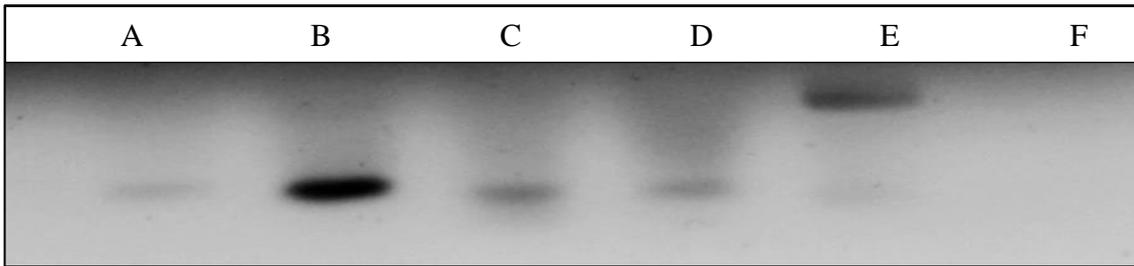


Abbildung 18: PCR Analyse von hiPSC Zellen vor Beginn der Differenzierung in Kardiomyozyten; A-Gapdh, B-Oct-4, C-Sox-2, D-c-Myc, E-Nanog, F-H2O Kontrollprobe

Ebenfalls erfolgte die Immunhistologiedetektion vom Pluripotenzmarker für das Stage-specific-embryonic Antigen 4 (SSEA-4). Zeigt sich insgesamt ein homogenes und hoch verknüpftes Netzwerk an pluripotenten hiPSC-Zellkolonien, wird die kardiale Differenzierung eingeleitet, siehe beispielhaft Abbildung 20.

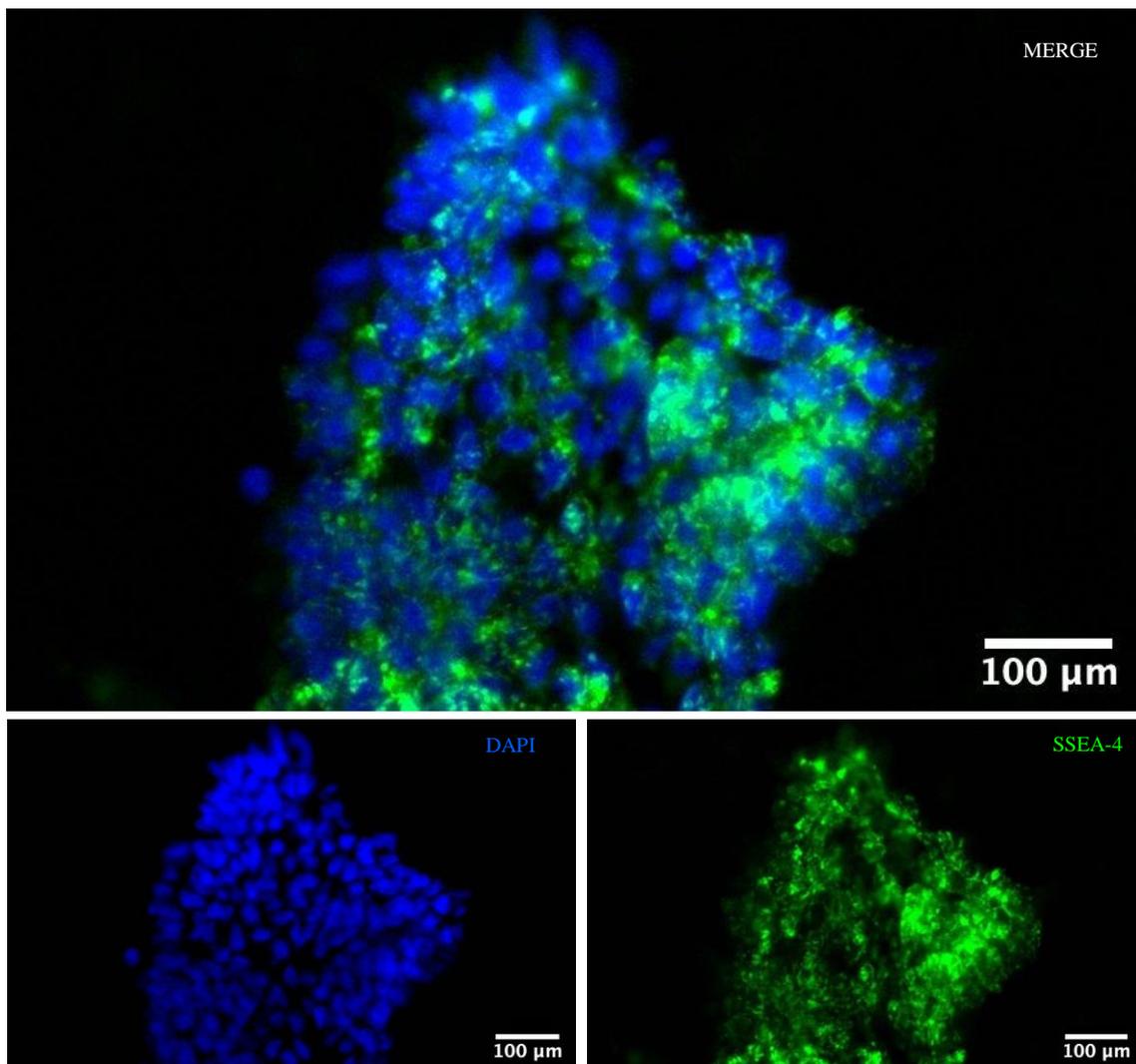


Abbildung 19: Immunhistochemische Färbung auf SSEA-4 bei hiPSC Zellen

4.2.2 Lentivirale Transduktion von hiPSC Zellen mit Firefly Luciferase

Der Erfolg der lentiviralen Transduktion unserer hiPSC Zellen mit einer Firefly Luciferase wurde durch Biolumineszenzmessungen überprüft, siehe Abbildung 21. Die Photonenemission wurde in ROIs erhoben, um den Transduktionserfolg zu sichern.

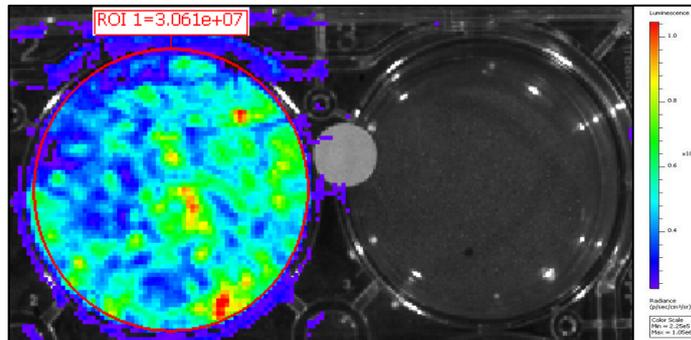


Abbildung 20: Kontrolle der Luciferase Gen Transduktion (rechts), Negativkontrolle (links) mittels Biolumineszenzmessungen

Zusätzlich zur visuellen Qualitätsprüfung wurden die PCR Analysemethode verwendet, um die Luciferase Gen Transduktion auf Genexpressionslevel zu validieren. Abbildung 22 veranschaulicht die genomische Integrität von Luciferase in den transduzierten hiPSC Zellen. Der Nachweis erfolgt für direkt isolierte DNA unserer transduzierten hiPSC Zellen, sowie für cDNA nach der Isolation und reversen Transkription der mRNA. Als Kontrolle ist die Genexpression in nicht transduzierten hiPSC Zellen und eine Wasserprobe zusätzlich dargestellt.

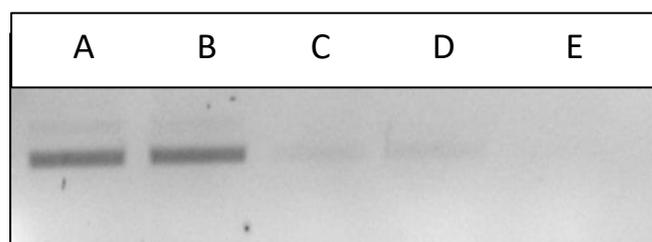


Abbildung 21: Validierung der Luciferase Gen Transduktion mittels PCR; A- DNA der Luc+ Kardiomyozyten, B- cDNA der Luc+ Kardiomyozyten, C- DNA der Luc negativen Kardiomyozyten, D- cDNA der Luc negativen Kardiomyozyten, E- H2O Kontrolle

4.2.3 Differenzierung von hiPSC zu Kardiomyozyten

In der Literatur wird eine Reihe verschiedener Differenzierungsprotokolle aufgezeigt. Für die Differenzierung zu Kardiomyozyten hat man sich an Schlüsselschritte der kardialen Entwicklung an Embryonen orientiert. Die Entwicklung wird durch die Aktivierung und Inhibierung von Molekülen, die Einfluss auf verschiedene Signaltransduktionswege haben, gesteuert. Die Differenzierung der hiPSC Zellen erfolgte in 2D-Kulturen unter Optimierung von Passage Methoden.

Abbildung 23 zeigt eine Gesamtübersicht über das Wachstumsfaktor-basierte-Differenzierungsprotokoll. Dieses ist in unserem Institut etabliert und wurde 2015 von Batalov veröffentlicht (Batalov and Feinberg 2015). Die Zellkultur wurde in Matrigel®-basierten Suspensionskulturflaschen als zweidimensionale Kultur kultiviert.

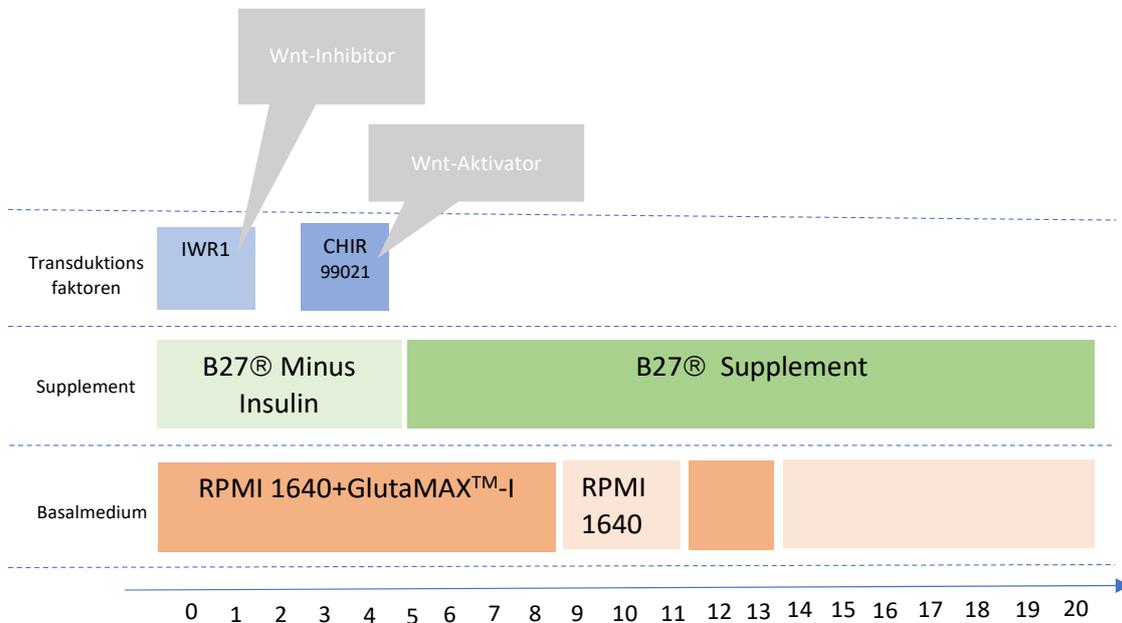


Abbildung 22: Differenzierungsprotokoll von hiPSC zu Kardiomyozyten

4.2.3.1.1 Induktion mesodermaler Vorläuferzellen

Als Basismedium wurde RMPI 1640 GlutaMax™-I verwendet. 10 ml B-27 Supplement wurden zeitgerecht hinzugegeben. Da die Qualität der Proteine im zeitlichen Verlauf Schwankungen unterliegen, wurde das Nährmedium frisch angesetzt und nicht länger als zwei Wochen verwendet.

Die Induktion von mesodermalen Progenitorzellen erfolgte durch eine Beeinflussung im Wnt-Signalweg. Entscheidend für die mesodermale Differenzierung ist die Hinzugabe von CHIR-99021 als kleinmolekularer Wnt-Signalweg Aktivator (Kim et al. 2013). Die Differenzierungseffizienz der Experimente war sehr variabel. Alternativ werden in der Literatur Experimente mit weiteren Wachstumsfaktoren wie BMP4, Aktivin A und bFGF durchgeführt, welche als Protein-Wachstumsfaktoren Einfluss auf den Wnt-Signalweg nehmen (Mummery et al. 2012).

Während der mesodermalen Induktion zeigte sich ein negativer Einfluss von Insulin auf die Differenzierung. Daher wurde bis Tag 7 das B-27 Supplement minus Insulin verwendet.

4.2.3.2 Kardiale Differenzierung

Der Einfluss durch die Inhibierung des Wnt-Signalwegs führte zur erfolgreichen und vielversprechenden Induktion der kardialen Differenzierung. Als Wnt-Inhibitor wurde IWR-1 zu den Differenzierungsmedien hinzugegeben. Ab Tag 7 wurden die Nährmedien mit Insulin versetzt. Insulin zeigte eine hohe Differenzierungseffizienz bei der Entwicklung kardialer Vorläuferzellen.

Für eine effiziente Differenzierung war die Standardisierung des Differenzierungsprotokolls obligat. Dennoch zeigen sich große Schwankungen, welche einer Optimierung des Differenzierungsprotokolls bedürfen.

Zur Optimierung der kardialen Differenzierung und Eliminierung anderer ungewollter Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten wurden die Zellkulturen mit Hungermedien versetzt. Als Hungermedium wurde PRMI 1640™-I ohne Glucose als Basalmedium verwendet und mit B-27 Supplement plus Insulin verwendet. Die Inkubationszeit lag bei 72h. Das Hungermedium wurde standardisiert von Tag 9-11 und von Tag 15-17 verwendet. Abbildung 24 zeigt lichtmikroskopisch die Differenzierung von hiPSC Zellen zu hiPSC-Kardiomyozyten in den ersten 14 Tagen.

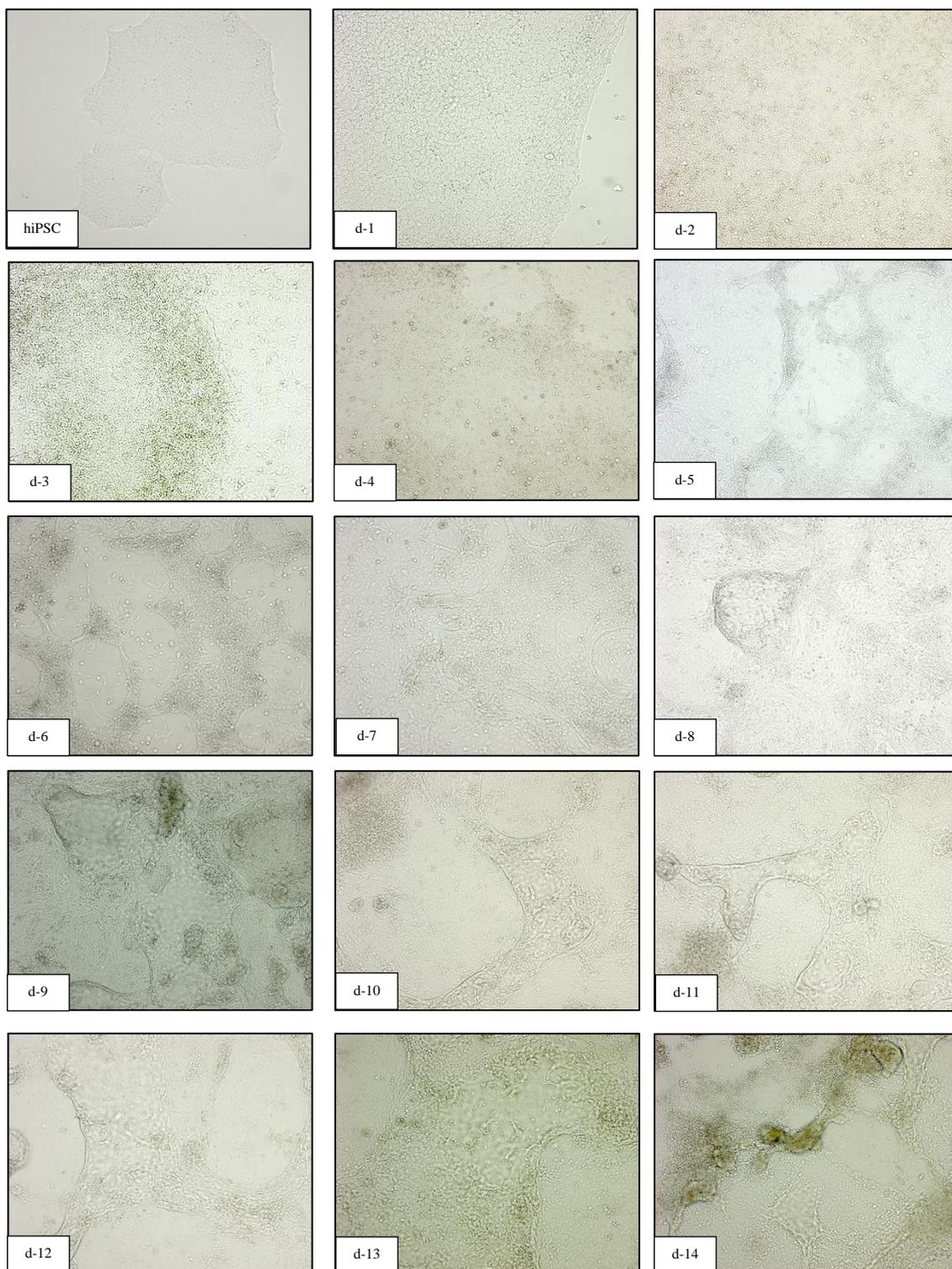


Abbildung 23: Differenzierung der hiPSC Zellen zu Kardiomyozyten, 14 Tage

Nach Abschluss der Kardiomyozytdifferenzierung wurden regelmäßig Qualitätskontrollen durchgeführt. Neben der lichtmikroskopischen Beurteilung wurden quantitative Analyse mittels Durchflusszytometrie etabliert. Die Untersuchung basiert auf der Verwendung von kardialen Troponin T, welches zu den Tropomyosin bindenden Untereinheiten des Troponin Komplexes zählt. Tropomyosin befindet, sich auf den dünnen Filamenten der quergestreiften Muskeln (Pavadai et al. 2020). Troponin T ist dabei wichtig für die Muskelkontraktion und beteiligt an der Bildung von Myofibrillen. Im menschlichen Herz werden vier Isoformen des kardialen Troponin T entwicklungsabhängig exprimiert, die in-vitro nachweisbar sind (Anderson et al. 1995, Chu et al. 2020).

Abbildung 25 veranschaulicht beispielhaft die Gating Strategie zur Datenauswertung der FACS Messungen. Außerdem ist das Histogramm der Antikörperfärbung mit kardialen Troponin T (PE-A/c-TNT) zu entnehmen.

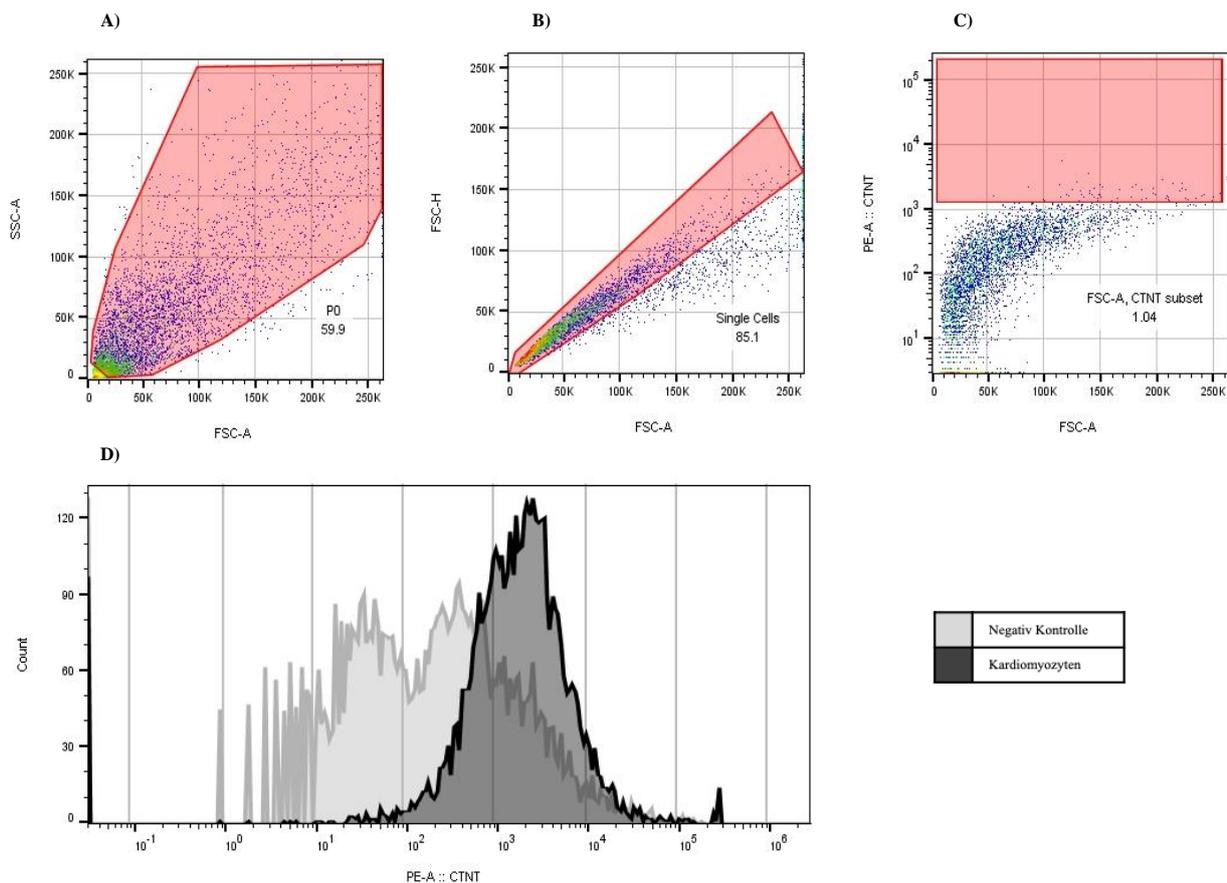
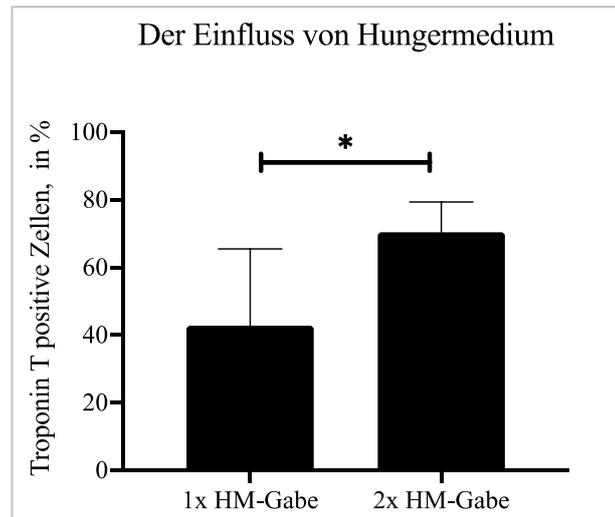


Abbildung 24: Gating Strategie zur Auswertung der FACS Daten mit FlowJo™. A) Darstellung der Gesamtpopulation (P0) B) Darstellung der Einzelzellen (P2) C) Gate für PE-A/ cTNT, D) Histogramm PE-A/ cTNT, grau=neg. Kontrolle, schwarz=gefärbte Zellen

Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten durchschnittlich 70,42% (n=6, SD \pm 8,93) Troponin T positive Zellen nach Abschluss der Differenzierung von human induzierten pluripotenten Stammzellen zu Kardiomyozyten.

Unter der Differenzierungsperiode wurden durchflusszytometrische Analysen nach einmaliger Hungermediumgabe mit Analysen nach zweimaliger Hungermediumgabe verglichen. Die Experimente wurden an Tag 14 und Tag 18 durchgeführt.



*Abbildung 25: Der Einfluss von Hungermedium nach einmaliger und zweimaliger Gabe bei ausdifferenzierten Kardiomyozyten, n=6, *=p-Wert <0,019*

42,7% der Zellen waren an Tag 14 nach Abschluss der Differenzierung und einmaliger Hungermediumgabe positiv für Troponin T. An Tag 18, nach zweimaliger Verabreichung unsers etablierten Hungermediums, waren 70,42% der Zellen positiv für Troponin T und sind in Abbildung 26 beispielhaft dargestellt. Wir konnten einen signifikanten Unterschied mit einem p-Wert <0,019 zwischen der einmaligen und zweimaligen Hungermediumgabe zeigen. Auf Grund des positiven Einflusses unseres etablierten Hungermediums auf die Differenzierungseffizienz wurden alle kultivierten Zellen standardmäßig zweimal mit Hungermedium inkubiert und erst ab den 18. Differenzierungstag für weitere Experimente verwendet.

Zum Nachweis einer erfolgreichen Differenzierung von human induzierten pluripotenten Stammzellen zu Kardiomyozyten wurden regelmäßig PCR Analysen zum Nachweis kardial spezifischer Genexpressionen durchgeführt. Dabei wurde die Expression von kardialem Troponin T angewendet und zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien untersucht, siehe Abbildung 27.

PCR Endpunktanalysen der Troponin T Expression wurden zu den Zeitpunkten Tag 6 und Tag 20 der kardialen Differenzierung durchgeführt. Vergleichend wurden human induzierte undifferenzierte Stammzellen auf die Troponin T Expression aufgeführt, die Ergebnisse sind Abbildung 27 zu entnehmen.



Abbildung 26: PCR Titrations-Analyse auf kardiales Troponin T unter der Differenzierung zu den Zeitpunkten Tag 6 und Tag 20 vergleichend mit human induzierten pluripotenten Stammzellen

Zur Quantifizierung des mRNA Gehaltes wurden die Experimente mit unterschiedlichen cDNA Konzentrationen 800ng/μl, 80ng/μl und 8ng/μl wiederholt.

Die Immunhistologiedetektion von Kardiomyozyten basierte auf der Färbung von kardialem Troponin T. Zur Qualitätsbeurteilung war eine homogene Verteilung Troponin T positiver Zellen mit typischer Querstreifung obligat. Abbildung 28 zeigt die typische Querstreifung, durch die Anfärbung von Troponin T, sowie die Darstellung der Zellkerne mit Hilfe von DAPI.

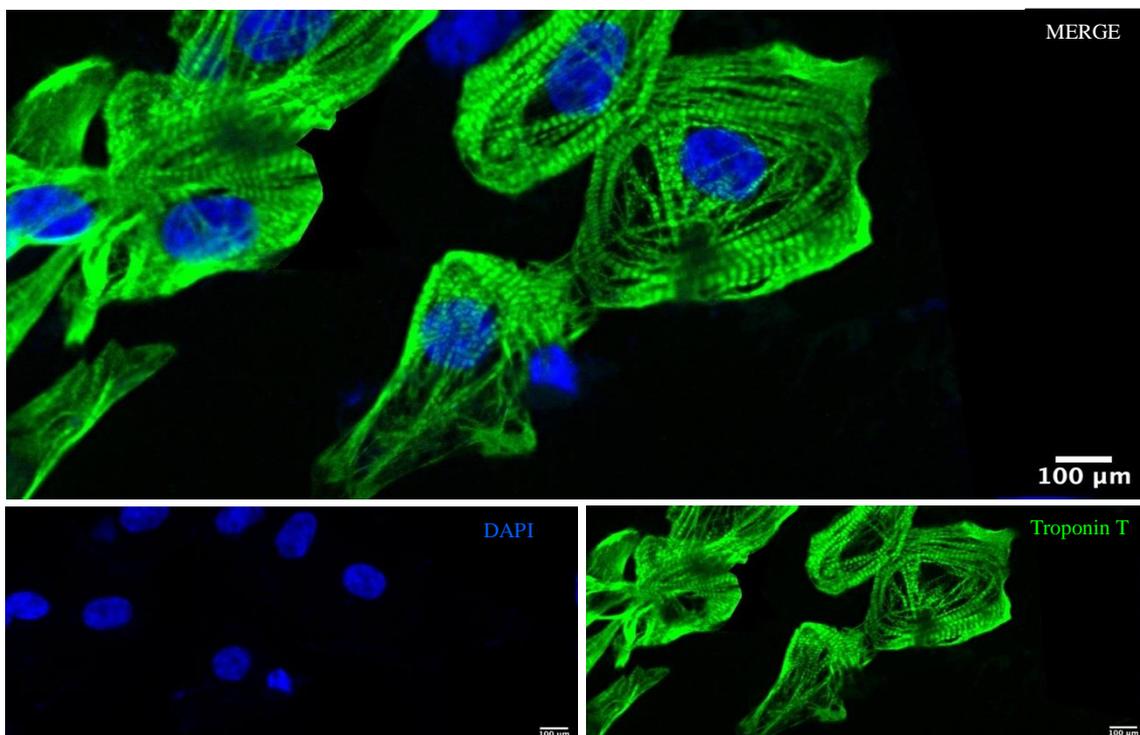


Abbildung 27: Immunzytochemische Färbung auf DAPI und kardiales Troponin T bei enddifferenzierten Kardiomyozyten

4.2.4 Analyse der differenzierten Kardiomyozyten-Genexpression

Nach erfolgreicher Proliferation der hiPSC Zellen wurde die Differenzierung zu Kardiomyozyten durch verschiedene Nährmedien eingeleitet. Zur Analyse der einzelnen Differenzierungsstadien wurde die Expression verschiedener Gene untersucht, siehe Abbildung 29.

Zunächst wurden während des Reifeprozesses Proben genommen und die RNA extrahiert. Es wurde zu den Differenzierungszeitpunkten Tage 0 (hiPSC Zellen), 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 das Expressionslevel untersucht. Als Referenz-Transkript wurde die Expression von Glucuronidase- β (GUSB) analysiert und die relative Expression anderer Gene ausgewertet. Undifferenzierte Stammzellen, hiPSC Zellen, entsprechen der Kontrollprobe an Tag 0. Die Genexpression der differenzierten Kardiomyozyten zwischen Tag 2 und Tag 20 wurde in entsprechender Relation auf das Genexpressionsmuster der hiPSC Zellen bezogen. Insgesamt wurden vier Differenzierungsansätze jeweils im Duplikat untersucht.

Als Marker für undifferenzierte Zellen dient neben Nanog, Sox2 und c-Myc das Oct-4. Oct-4 wurde dabei nach Beginn der Differenzierung von hiPSC zu Kardiomyozyten zunehmend runterreguliert. An Tag 16 zeigte sich in der Untersuchung ein minimales Expressionslevel (Kattman et al. 2011). Oct-4 spielt eine große wissenschaftliche Rolle in der künstlichen Reprogrammierung von somatischen Zellen zu pluripotenten Stammzellen unter Zuhilfenahme von Retroviren (Okita et al. 2007, Takahashi and Yamanaka 2006).

VEGF-Rezeptor-2 werden an der Zelloberfläche kardialer Zellen exprimiert (Braile et al. 2020). Die Bindung von VEGF-A an den VEGF-Rezeptor-2 führt zum Überleben und zur Differenzierung von Endothelzellen. Wird die Expression der Gene für VEGF-Rezeptor 2 inaktiviert, kommt es zum Zelluntergang von embryologischen Zellen durch das Fehlen von ausdifferenzierten Endothelzellen (Matsumoto and Claesson-Welsh 2001). In der frühkardialen Differenzierung wird die Coexpression von VEGF-Rezeptor-2 (KDR/ FLK-1) zusammen mit Pdgf-Rezeptor-a beschrieben (Hirata et al. 2007, Kataoka et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Hochregulierung bis Tag 6, wo das Maximum erreicht wird. In der weiteren Differenzierungsperiode fällt die VEGF-Rezeptor-2 Expression. Islet wurde von kardialen Progenitorzellen exprimiert und induziert die

Differenzierung sowohl von Herzmuskelzellen, als auch von glatten Muskelzellen und Endothelzellen (Moretti et al. 2006). Bis Tag 8 zeigte sich eine deutliche Zunahme, die bis zum Zeitpunkt Tag 18 nahezu konstant gehalten wurde. An Tag 20 zeigte sich eine abnehmende Tendenz.

Troponin T ist ein sakrometrisches Protein von Herzmuskelzellen, wie auch alpha-Myosin Heavy Chain und Myosin-Light Chain 2. Die entsprechenden Gene lauten TNT, MYH-6 und MLC-2. Im Fall der vorliegenden Arbeit zeigte Troponin T einen eindeutigen Anstieg an Tag sechs mit einem Maximum an Tag 8. Es zeigte sich ein minimaler Abfall mit einer anschließenden konstanten Expression ab Tag 14. Alpha-Myosin Heavy Chain zeigte einen ähnlichen Verlauf, mit einem Maximum an Tag 10. Ab Tag 16 war die Expression konstant. Myosin-Light-Chain-2 zeigte hingegen zu einem späteren Zeitpunkt einen deutlichen Anstieg, ab Tag 14 mit einem Maximum an Tag 20. Zum Zeitpunkt der Expression der sakrometrischen Proteine wurden lichtmikroskopisch Konaktionen der Kardiomyozyten, wie in der Literatur beschrieben gesehen (Gonzalez et al. 2011, Yamaoka et al. 2017).

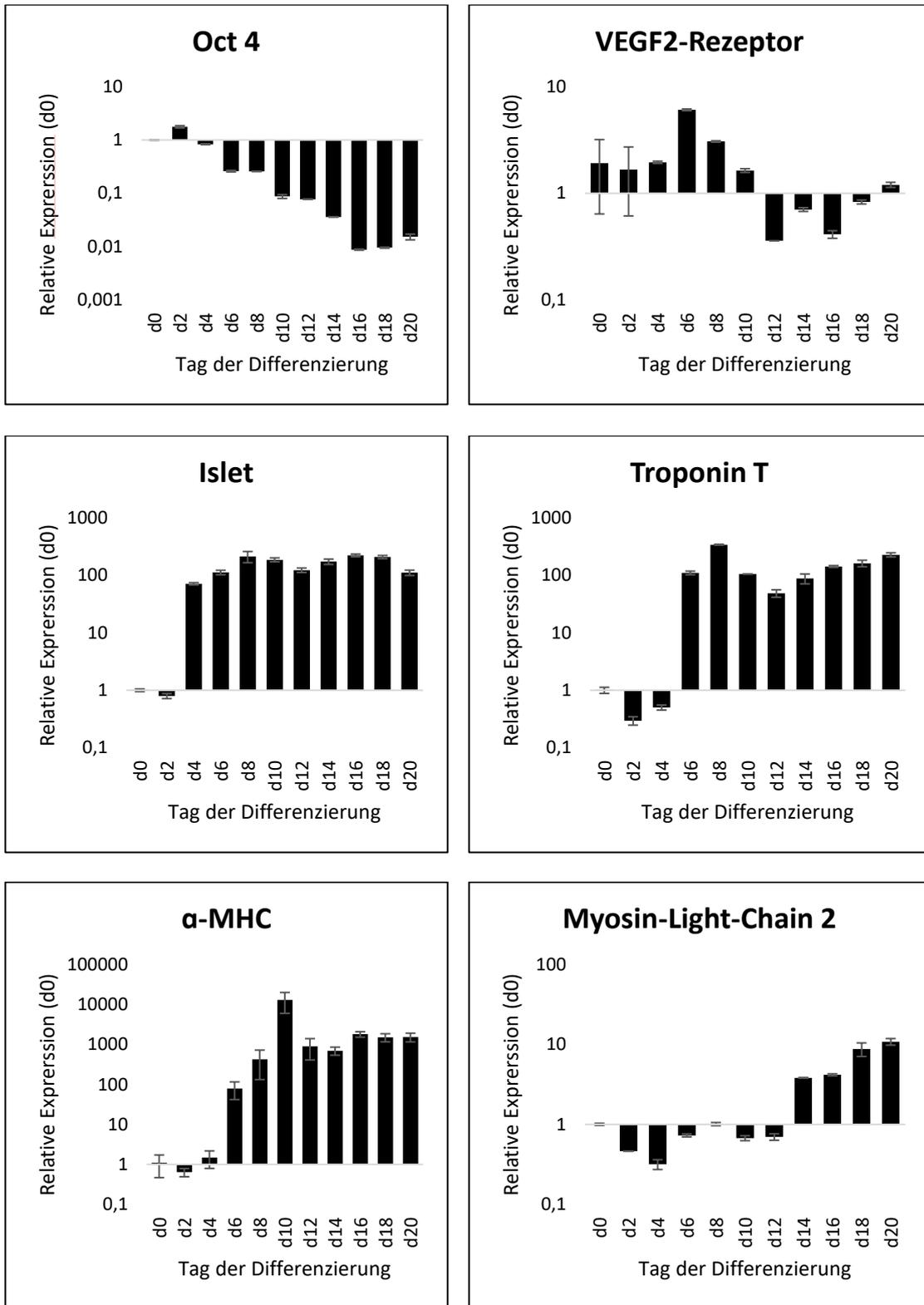


Abbildung 28: Analyse der Kardiomyozytendifferenzierung auf Genexpressionslevel, n=4

4.3 Der Einfluss von Hypoxie auf hiPSC-Kardiomyozyten

In künstlich hergestelltem Herzgewebe sind die Gewebe in-vitro nicht vaskularisiert. Die Nährstoffversorgung wird per Diffusion aufrechterhalten. Gelangt nicht genügend Sauerstoff in das Gewebe, resultiert eine Hypoxie mit anschließendem Zelluntergang. Der Einfluss einer Hypoxie auf in-vitro differenzierte Kardiomyozyten aus human induzierten Stammzellen wurde mit Hilfe einer Hypoxiekammer untersucht. Der Einfluss der Hypoxie wurde auf Genexpressionslevel dargestellt. Dabei wurde die RNA mittels RT-PCR-Methode quantifiziert. Die Kardiomyozyten wurden für jeweils 3h, 6h, 12h, 24h und 48h in einer Hypoxiekammer inkubiert. Als Referenzprobe wurden Kardiomyozyten genommen, die zu keinem Zeitpunkt einer Hypoxie ausgesetzt waren. Der Verlauf der Expression von GUSB (Glucoronidase β) als Housekeeping Gen und Troponin T als Kardiomyozyten spezifischer Marker wurde betrachtet, siehe Abbildung 30, 31. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten einen Anstieg der Ct-Werte unter anhaltender Hypoxie. Ein steigender Ct- Wert spricht für eine abnehmende Expression des zu untersuchenden Gens.

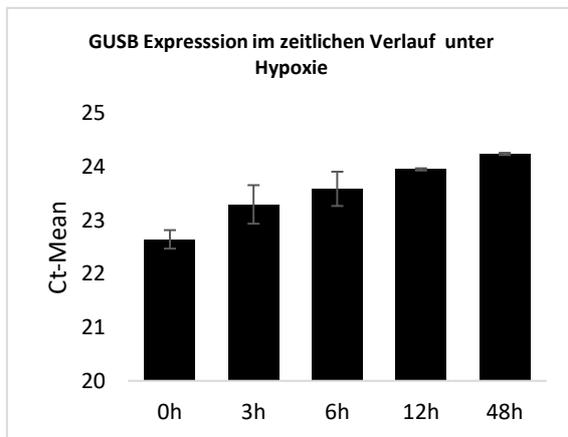


Abbildung 29: GUSB Expression in Kardiomyozyten unter Hypoxie, n=4

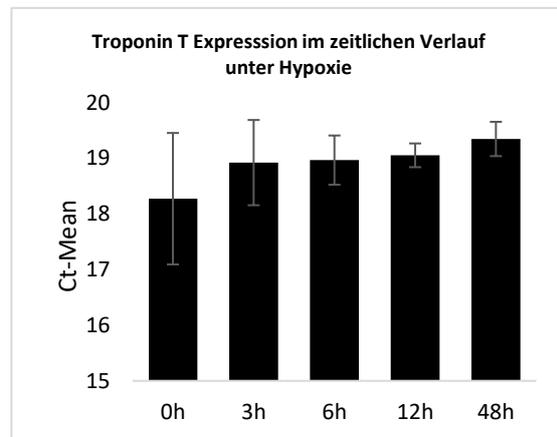


Abbildung 30: Troponin T Expression in Kardiomyozyten unter Hypoxie, n=4

Zur Darstellung der Abnahme der Genexpression sind die Differenzen der Ct-Werte gemittelt und in Abbildung 32 dargestellt.

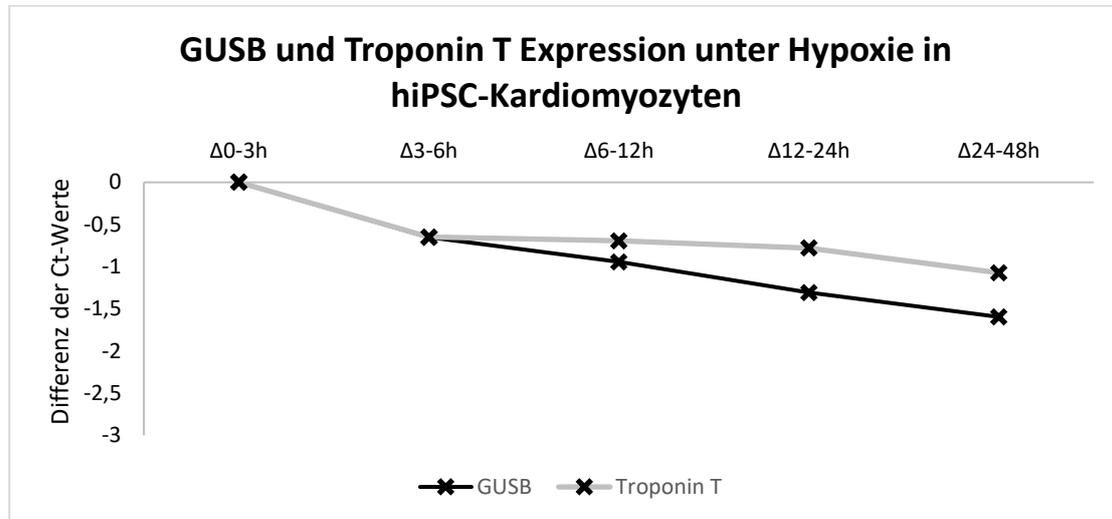


Abbildung 31: Veränderung der GUSB und Troponin T Expression unter Hypoxie in hiPSC-Kardiomyozyten, n=4

Sowohl GUSB als auch Troponin T zeigten eine abnehmende Expression im zeitlichen Verlauf. In den ersten 6 Stunden zeigte sich der stärkste Abfall in der Genexpression von GUSB und Troponin T, die Abnahme war bei GUSB und Troponin T gleichermaßen stark. Nach 12h, 24h und 48h war der Abfall der Genexpression beider Gene pro Zeitintervall geringer. Dabei war die Abnahme von GUSB gegenüber Troponin T stärker.

Anschließend wurde die Expression von HiF-1 α , als Reaktion einer einwirkenden Hypoxie untersucht. Abbildung 33 zeigt die relative Genexpression von HiF-1 α auf GUSB im Zeitintervall von 3h, 6h, 12h, 24h und 48h Hypoxie.

Hif-1 α dient dabei als Faktor, der die Anpassungsmechanismen an die Verfügbarkeit von Sauerstoff steuert und bei Hypoxie in den Zellkern transloziert, um dort Gene wie beispielsweise Erythropoetin reguliert, um den Sauerstoffbedarf der Zelle aufrecht zu erhalten.

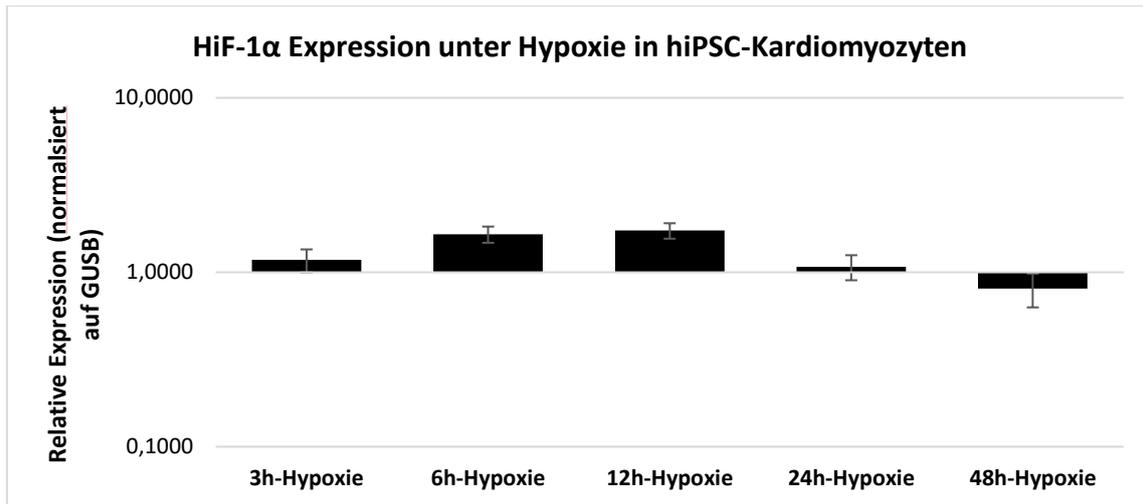


Abbildung 32: Relative Genexpression von *HiF-1α* unter Hypoxie in hiPSC-Kardiomyozyten, $n=4$

Die Expression von Hypoxie zeigte in den ersten 6 Stunden einen Anstieg auf das 1,6-fache. Zwischen 6 und 12 Stunden unter Hypoxie zeigte sich keine signifikante Änderung. Die Expression von *HiF-1α* lag nach zwölf Stunden bei dem 1,7-fachen im Vergleich zur *GUSB* Expression. Nach 24 und 48 Stunden war keine Hochregulation der *HiF-1α* Gene nachweisbar. Die Expression unter 48h Hypoxie war im Verhältnis von *GUSB* um das 0,8-fache kleiner.

4.4 Engineered Heart Tissue (EHT)

Für die Generierung von EHTs wurden die aus hiPSC Zellen enddifferenzierten Kardiomyozyten in einem Fibrinogen-Thrombin-Mastermix in verschiedene Formen gegossen. Zum einen wurden EHT-Streifen im 24-well Format mit $1-1,5 \times 10^6$ hiPSC-Kardiomyozyten mit einem initialen Volumen von 110 μl kultiviert. Nach ein bis drei Tagen der Kultivierung konnten Kontraktionen kleiner Zellareale beobachtet werden. Kohärente Kontraktionen des gesamten EHTs wurde an Tag 5 bis 14 beobachtet.

Für experimentelle Untersuchungen, die das Überleben der Zellen in verschiedenen EHT Geometrien zeigten, wurden größere EHTs mit einem größeren Volumen und einer maximalen Zellzahl generiert. Die EHTs enthielten 4×10^6 hiPSC Zellen in einem initialen Volumen von 440 μl . Die Kultivierung der Ring und Infinity EHTs wurde in Silikonhalterungen in 12-well Kulturplatten durchgeführt. Zur Qualitätskontrolle wurden die EHTs täglich unter einem Lichtmikroskop beurteilt.

4.4.1 RNA Quantifizierung der EHT Geometrien mittels RT-PCR-Methode

Mit Hilfe der RT-PCR Methode konnte der RNA Gehalt in den EHTs quantifiziert werden. Dabei wurde untersucht, wie stark sich der RNA Gehalt für die Proteinbiosynthese im zeitlichen Verlauf verändert. Das Volumen der EHTs war zur jedem Untersuchungszeitpunkt festgelegt und betrug im Streifen-EHT 110 μl , während 440 μl für das Ring- und Infinity EHT standardisiert wurden.

Die RNA wurde auf Glucuronidase-beta (GUSB), eine Housekeeping Marker, und Troponin T einem kardialen Marker untersucht. Die Analyse erfolgte jeweils 2 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und sieben Tage nach Generierung der EHTs. Die drei unterschiedlichen EHT Formen wurden untereinander im zeitlichen Verlauf verglichen. Dabei wurden die Ring- und Infinityform verglichen. Die Ergebnisse der Streifengeometrie wurden zur tendenziellen Überprüfung der Hypothese mitaufgeführt.

Ein steigender Ct-Wert veranschaulicht eine abnehmende Expression des zu untersuchenden Gens. Über den Zeitraum von sieben Tagen zeigte sich ein negativer Einfluss auf die Expression von GUSB mit einem steigendem CT-Wert, siehe Abbildung 34.

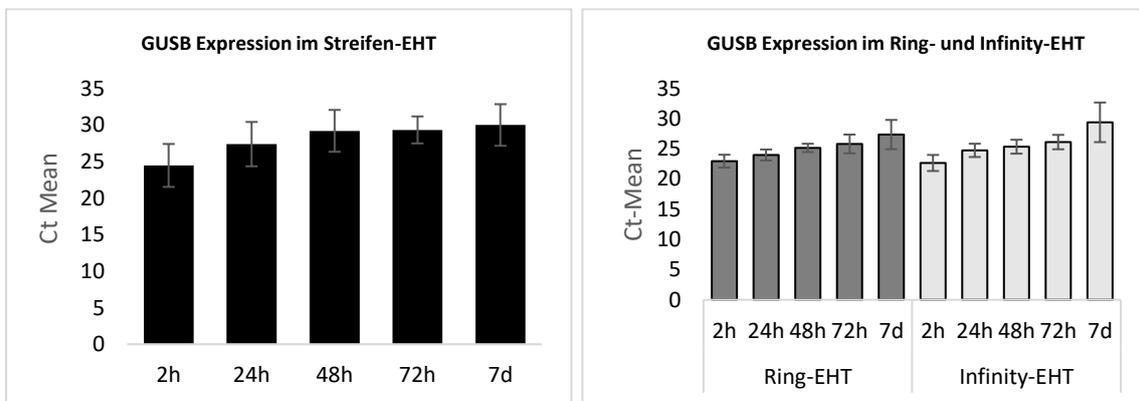


Abbildung 33: GUSB Expression im zeitlichen Verlauf von sieben Tagen im standardisierten Streifen-EHT (links) und im Ring- und Infinity-EHTs (rechts), n=8

In Streifen-EHTs stieg der Ct-Wert von 24,47 auf 29,98 an. Bei Ring-EHTs lag der Ct-Wert am Tag der EHT Generierung bei 22,96 und stieg auf 27,37 an. Vergleichend zeigt sich beim Infinity-EHT ein Ct-Wert Anstieg von 22,66 auf 29,39.

Zur besseren Darstellung der Ct-Wert Abnahme wurde die Differenz der Ct-Werte im zeitlichen Verlauf bestimmt, Abbildung 35.

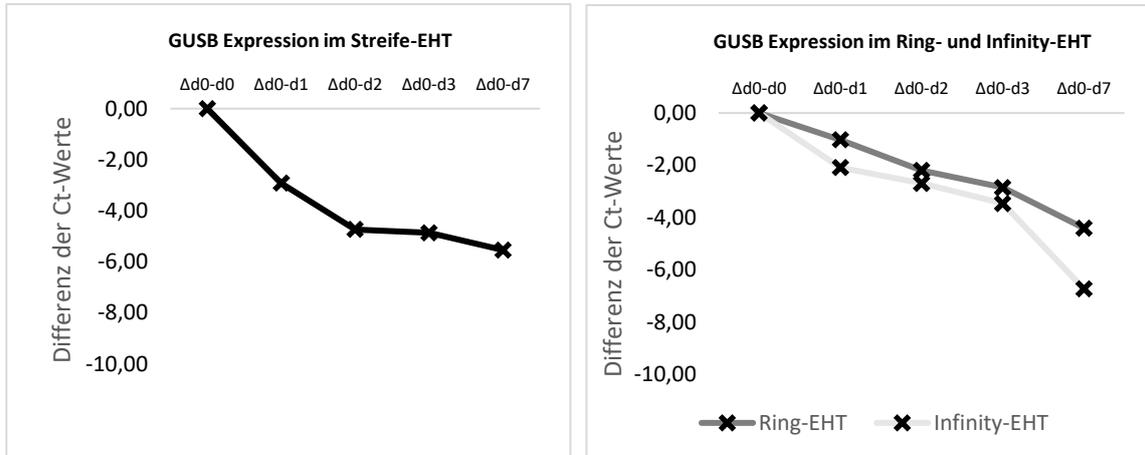


Abbildung 34: GUSB Expression im zeitlichen Verlauf von sieben Tagen der standardisierten Streifen-EHTs (links) und der Ring- und Infinity-EHTs (rechts), n=8

Im gesamten Verlauf zeigte sich in allen drei Formen ein negativer Einfluss auf die Expression von GUSB. Dabei war die Expressionsabnahme im Infinity-EHT stärker als im Ring-EHT. Zum Zeitpunkt Tag 7 zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem Ring- und Infinity-EHTs. Ein stärkerer Expressionsverlust war in den Infinity-EHTs sichtbar. Der Unterschied war am 7. Tag für die Expression von GUSB mit einem p-Wert von 0,200 nicht hoch signifikant zeigt aber einen Trend.

Wie sich der zeitliche Verlauf der Genexpression in Kardiomyozyten verändert, wurde anhand der Expression vom herzspezifischen Gen Troponin T ermittelt, siehe Abbildung 36. Dabei zeigte sich auch in allen drei Formen ein Anstieg der Ct-Werte über den Zeitraum von einer Woche. Aus diesen Ergebnissen ließ sich auch ein negativer Einfluss auf die Genexpression ziehen.

Ergebnisse

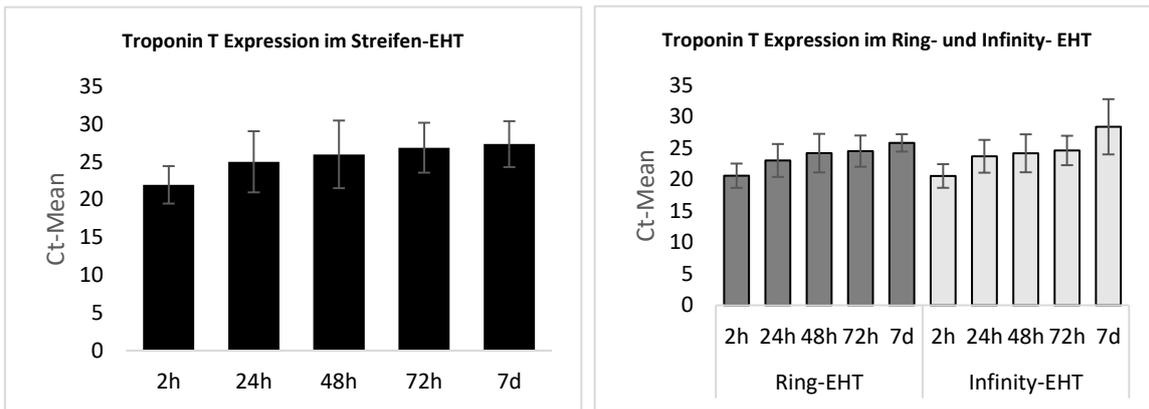


Abbildung 35: Troponin T Expression im zeitlichen Verlauf von sieben Tagen der standardisierten Streifen-EHTs (links) und der Ring- und Infinity-EHTs (rechts), n=8

In Streifen-EHTs wurde ein Ct Wert Anstieg von 21,96 auf 27,35 gesehen. Im Ring-EHT war ein Anstieg von 20,63 auf 25,85 zu sehen, im Vergleich zum Infinity-EHT wo der Ct Wert von 20,58 auf 28,41 stieg.

Der negative Einfluss auf die Genexpression ist in Abbildung 37 veranschaulicht.

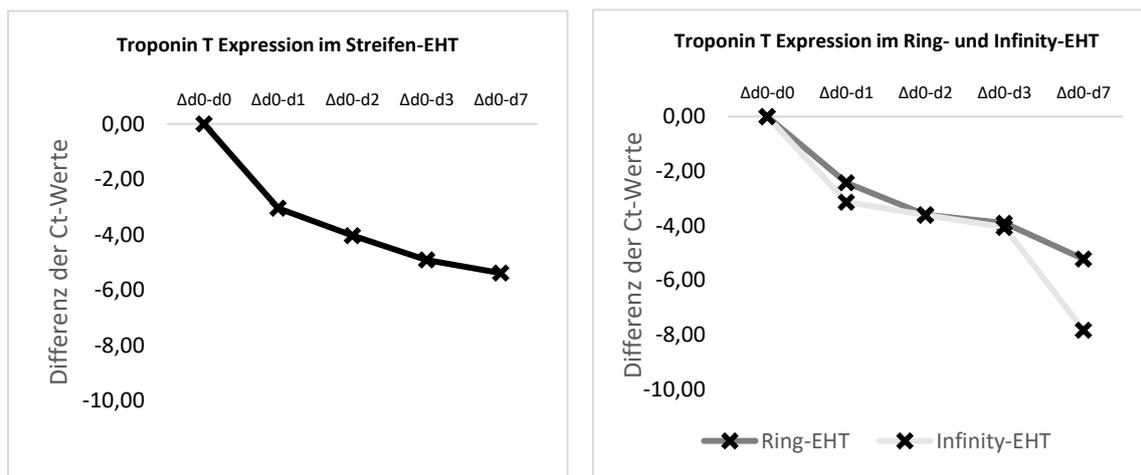


Abbildung 36: Troponin T Expressionsabnahme im zeitlichen Verlauf von sieben Tagen der standardisierten Streifen-EHTs (links) und der Ring- und Infinity-EHTs (rechts), n=8

Im zeitlichen Verlauf war die Abnahme der Troponin T Expression im Infinity EHT mit leichter Tendenz stärker als im Ring-EHT, siehe Abbildung 38.

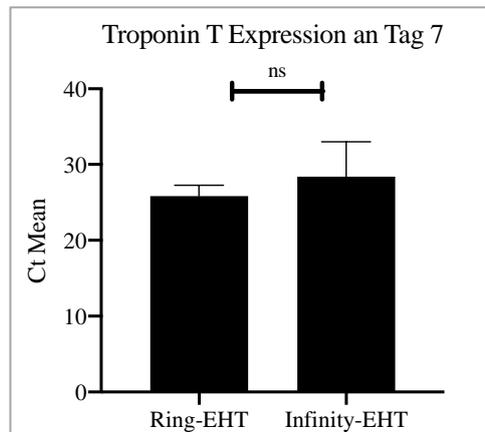


Abbildung 37: Die Expression von GUSB und Troponin T im Ring und Infinity EHT im zeitlichen Verlauf von 7 Tagen, n=8, Für Troponin T Ring: Ct Mean=25.85±1.37 und Infinity: Ct Mean= 28.41 ±2.34, p-Wert=0,152

Zum Zeitpunkt des siebten Tages war der Unterschied zwischen den Ring-EHTs und Infinity-EHTs nicht signifikant unterschiedlich, mit einem p-Wert von 0,1542. Jedoch zeigte sich, dass der negative Einfluss auf die Troponin T Expression im Infinity-EHT stärker war als im Ring-EHT.

4.4.2 Durchflusszytometrische Analysen der EHT Geometrien

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden Troponin T positive Zellen ausgewertet. Dabei wurde der Verlauf der Troponin T positiven EHTs über sieben Tage ausgewertet und der zeitliche Verlauf der unterschiedlichen EHT Formen untereinander verglichen. In allen drei Geometrien war eine konstante Abnahme der Troponin T positiven Zellen zu erkennen, siehe Abbildung 39.

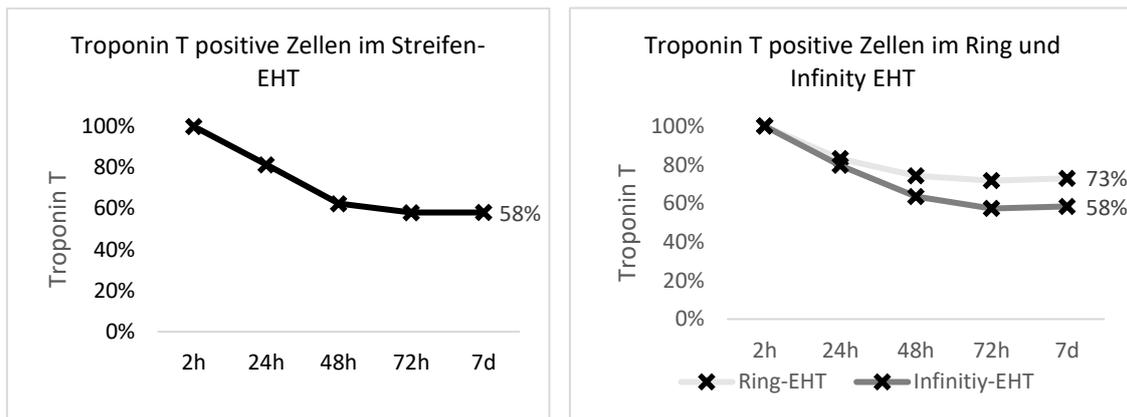


Abbildung 38: Troponin T positive Zellen in standardisierten Streifen-EHTs (links) und in Ring- und Infinity-EHTs (rechts) im zeitlichen Verlauf von 7 Tagen, n=6

Dabei war die Abnahme in Streifen-EHTs am stärksten, zum Zeitpunkt Tag 7 waren nur noch 58% der Zelle Troponin T positiv, im Vergleich zum Ausgangswert am Tag der EHT Generierung. Die Ring- und Infinity-EHTs zeigten ebenfalls eine konstante Abnahme an Troponin T positiven Zellen im zeitlichen Verlauf von einer Woche. 73% ($\pm 12\%$) der Zellen in Ring-EHTs waren am 7. Tag Troponin T positiv 15% mehr im Vergleich zum Infinity EHT mit 58% ($\pm 11\%$) Troponin T positiven Zellen.

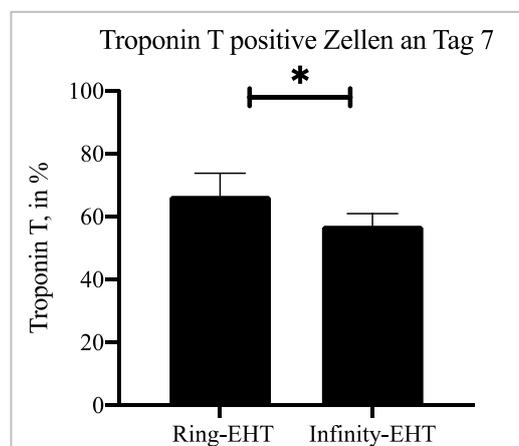


Abbildung 39: Die Expression von Troponin T im Ring und Infinity EHT im zeitlichen Verlauf von 7 Tagen, Ring: 73% ($\pm 12\%$) und Infinity: 58% ($\pm 11\%$) n=6, *p-Wert 0,04.

Es zeigte sich zu diesem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,04 beider Formen, dass nach sieben Tagen in Ring-EHT's 15% mehr Troponin T positive Zellen beinhalten, als im Infinity-EHT, siehe Abbildung 40.

4.4.3 Spontan kontrahierende EHTs

Zwei bis drei Tage nach der Herstellung von EHTs konnten bereits erste isolierte kontrahierende Zellverbände Lichtmikroskopisch in Tyrodelösung objektiviert werden. Ausschlaggebend für die Generierung eines spontan schlagenden EHTs war der Anteil an differenzierten Kardiomyozyten aus den hiPSC Zellen. Als bester Marker ergab sich das kardiale Troponin T. Regelmäßige FACs Analysen der differenzierten Zellkulturen in denen mindestens 60% der Zellen positiv für kardiales Troponin T waren, konnten EHT mit spontaner Kontraktionsfähigkeit generieren. Im weiteren Kultivierungsprozess konnte eine Intensitätszunahme der Kontraktionen lichtmikroskopisch visualisiert werden. Im Rahmen von Remodelingprozessen im EHT konnte eine Verschmälerung durch den Abbau von Fibrin gesichtet werden. Die durchschnittliche Frequenz der kontrahierenden EHTs lag bei 68 Kontraktionen/min. Unter der Hinzugabe von Adrenalin konnte eine Frequenzzunahme objektiviert werden. Hier ergaben sich durchschnittlichen Frequenzen von 80 Kontraktionen/min.

4.4.4 Biolumineszenz Analysen der EHT Geometrien

Zur Untersuchung des Zellüberlebens wurden über einen zeitlichen Verlauf von einer Woche Biolumineszenzsignale ermittelt. Dabei wurde die Messung an Tag null, d(0)/2 Stunden nach der Herstellung der EHTs, d(1)/24 Stunden, d(2)/48 Stunden, d(3)/72 Stunden und d(7)/sieben Tage nach EHT Herstellung ermittelt.

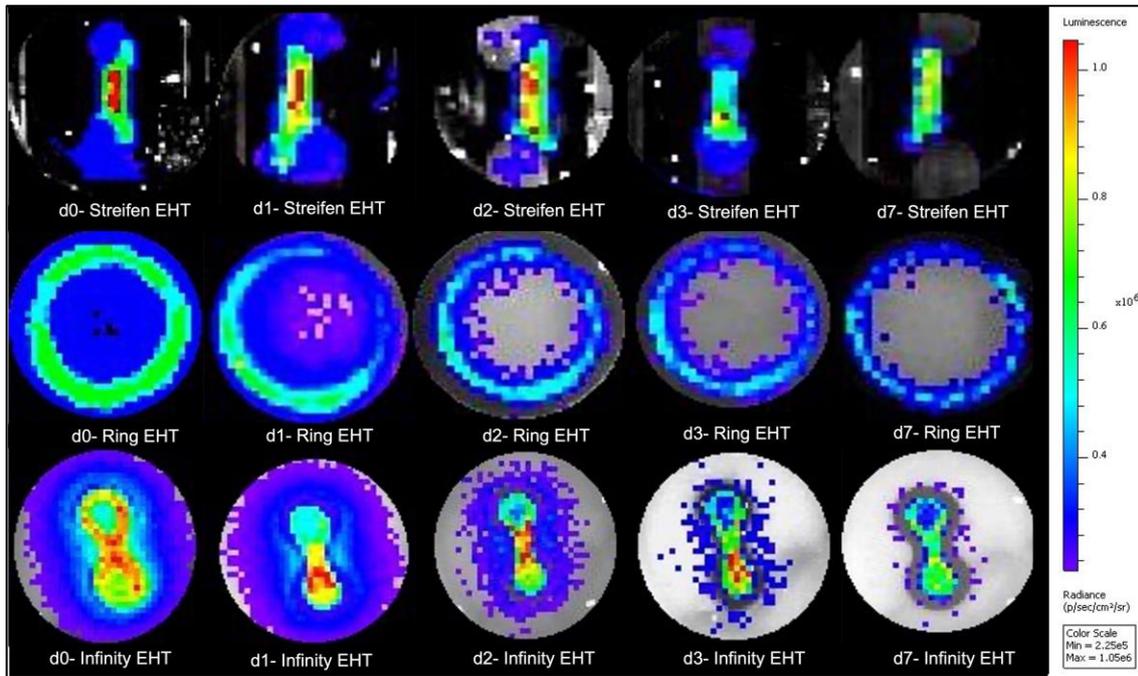
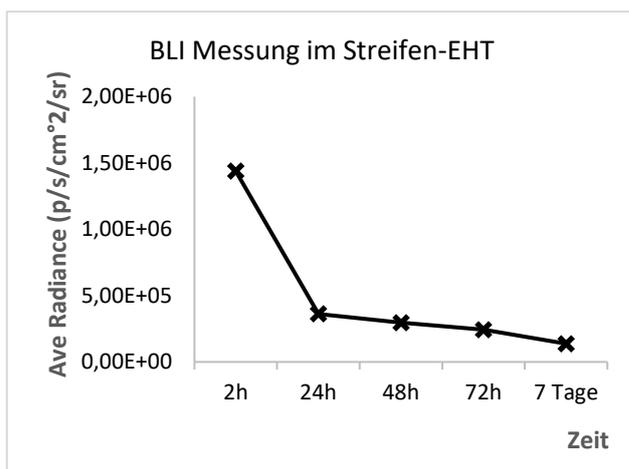


Abbildung 40: Biolumineszenzsignale der verschiedenen EHT Formen im zeitlichen Verlauf

Abbildung 41 zeigt einen Gesamtüberblick der Biolumineszenzsignale aller drei Formen, der Streifen-, Ring- und Infinity-EHTs über einen Zeitraum von sieben Tagen. Visuell zeigte sich in allen drei Formen eine konstant abnehmende Photonemission. Zur Differenzierung der Unterschiede in den einzelnen Formen, wurden entsprechend große ROI's entworfen und die Photonemission im abgegrenzten Bereich gemessen und im zeitlichen Verlauf untereinander verglichen.

Die Aufnahme vom Infinity-EHT am Tag der EHT Generierung (d0) zeigte eine deutliche Photonemission im zentralen Bereich, dort wo das Volumen der Infinity-EHTs größer ist und sich im Verhältnis eine höhere Anzahl an Zellen ansiedeln. Anhand der Fotodokumentation ließ sich in diesem Bereich ein stärker abnehmendes Signal erkennen, als im Bereich der EHT Ränder, wo das Volumen des Gewebes deutlich kleiner war. Abbildung 42 zeigt den Verlauf der Photonemission im Verlauf von einer Woche im Streifen-EHT.

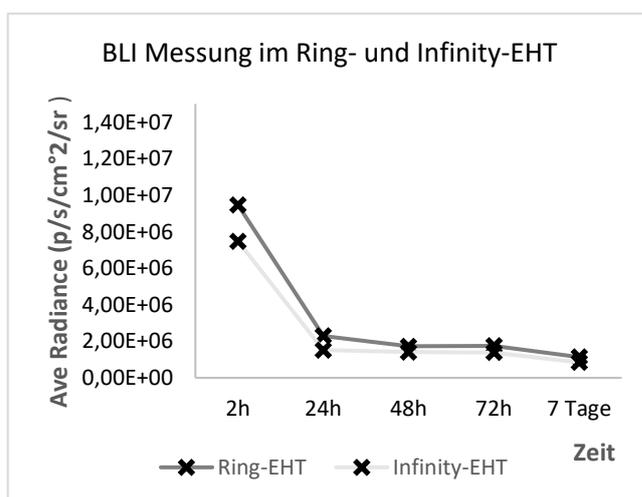


Zeit	Photonenemission in %	
	Streifen-EHT	
2h	100	
24h	25,18	
48h	20,58	
72h	16,85	
7d	9,55	

Abbildung 41: Photonenemission im Streifen-EHT über den Zeitraum von einer Woche, n=8

Im Streifen-EHT war die Abnahme der Biolumineszenzsignale innerhalb der ersten 24 Stunden am höchsten. Dabei wurde eine Photonenemission von 25,18% im Verhältnis zur Ausgangsemission von 100% detektiert. Im weiteren Verlauf war der Abfall der Biolumineszenzsignale schwächer. An Tag zwei wurden 20,58% gemessen, Tag drei zeigte einen weiteren Abfall auf 16,85%. An Tag sieben wurde ein Signal mit 9,55% im Vergleich zum Startpunkt erhoben.

Abbildung 43 ist der Verlauf der Biolumineszenzsignale vom Ring- und Infinity-EHT zu entnehmen.



Zeit	Photonenemission in %	
	Ring-EHT	Infinity-EHT
2h	100	100
24h	24,29	20,27
48h	18,23	18,92
72h	18,54	18,56
7d	12,04	11,32

Abbildung 42: Photonenemission über den Zeitraum von einer Woche im Ring- und Infinity-EHT, n=8, ROI an Tag 7. im Ring EHT=1.14*10⁶ p/s und im Infinity-EHT=8.47*10⁵ p/s, *p-Wert<0,001

Bei den Messungen der Biolumineszenzsignale im zeitlichen Verlauf von einer Woche zeigte sich sowohl im Ring-, als auch im Infinity-EHT ein abnehmendes Signal. Dabei war der deutlichste Abfall nach 24h zu erkennen. Vergleichend zwischen beiden Formen

war die Abnahme des Biolumineszenzsignals im Infinity-EHT ca. 5% stärker, von 100% auf 20,27% als im Ring-EHT, vom 100% auf 24,29%. Die weitere Veränderung zwischen Tag 2 und 3 war minimal. Zum Zeitpunkt Tag 7 betrug die Photonenemission im Ring-EHT 11,32% vom der Ausgangswert. Beim Infinity-EHT war der Abfall minimal stärker, das Signal wurde mit 12,04% vergleichend zum Ausgangswert gemessen. Nach sieben Tagen zeigte sich ein signifikanter Unterschied, p-Wert <0,001 zwischen der Emission an Photonen im Ring-EHT mit $1,14 \cdot 10^6$ p/s und im Infinity-EHT mit einer durchschnittlichen Intensität von $8,47 \cdot 10^5$ p/s, siehe Abbildung 43.

4.4.5 Histologische Charakterisierung der EHT Geometrien

Zur qualitativen Analyse der generierten EHTs in unterschiedlichen Formen wurden an Tag 7 und Tag 14 histologische Analysen durchgeführt. Alle EHTs wurden im Querschnitt histologisch aufgearbeitet und auf HE angefärbt. Mit Hilfe einer analogen Messmethode konnte der Durchmesser der einzelnen EHT Formen vermessen werden und mit Hilfe der oben genannten Formeln siehe, (3.1, 3.2, 3.3), die Oberfläche mathematisch bestimmt werden.

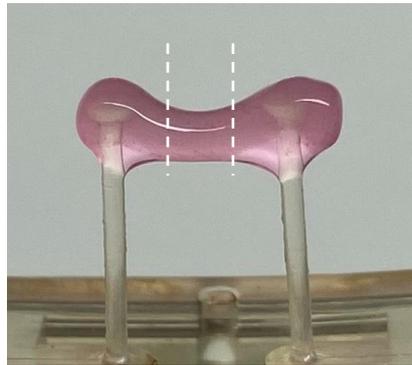


Abbildung 43: Streifen-EHT auf Teflonhalterung



Abbildung 44: Querschnittshistologie, H-E, Streifen-EHT/ D=778μm

Die Oberfläche des Streifen-EHT beträgt 19mm^2 . Das Oberflächen-Volumen-Verhältnis wurde mit $19\text{mm}^2/110\mu\text{l}^3$ bestimmt.

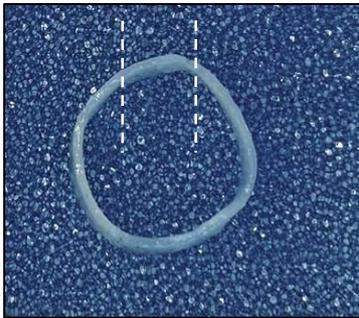


Abbildung 45: 4%-PFA Fixiertes Ring-EHT

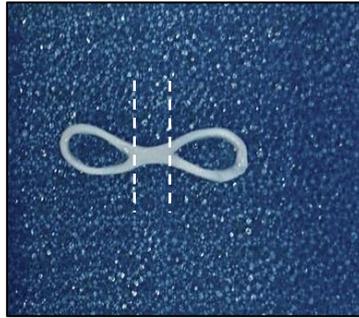


Abbildung 46: 4%-PFA fixiertes Infinity-EHT



Abbildung 47: 4%-PFA fixiertes Infinity-EHT

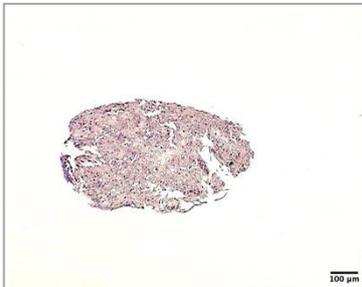


Abbildung 48: Ring-EHT, Querschnitt, H-E/ D=682µm

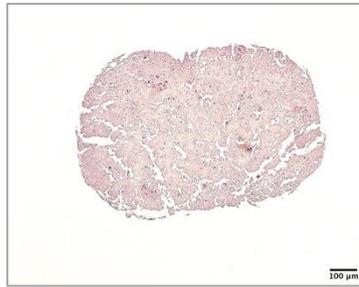


Abbildung 49: Infinity-EHT (Mitte), Querschnitt, H-E/ D=929µm



Abbildung 50: Infinity-EHT (Rand), Querschnitt, H-E/ D=302µm

Die Oberfläche von Ring-EHTs umfasst $29,75\text{mm}^2$, das Oberflächen-Volumen-Verhältnis liegt bei $29,97\text{mm}^2/440\mu\text{l}^3$. Das Infinity EHT zeigt eine Oberfläche von $25,86\text{mm}^2$ in einem Oberflächen-Volumen-Verhältnis von $25,86\text{mm}^2/440\mu\text{l}^3$. Wir etablierten Formen mit einer möglichst großen Zellzahl und großen Gewebefläche um Unterschiede in Bezug auf Gewebeerfläche und Gewebivolumen visualisieren zu können.

In den H-E Färbungen konnte bereits die Anordnung der Zellkerne im Gewebe bestimmt werden, auch zeigte sich in Abbildung 4, im Vergleich zur Abbildung 50 eine homogenere Zellkernverteilung mit konzentrierteren Zellkernen auch im Zentrum des Gewebes. Zur qualitativen Darstellung der Zellart- und Zellkernverteilung wurden immunhistochemische Färbungen auf Troponin T und gegen das sarkolemmale Protein Dystrophin durchgeführt.

Abbildung 52 zeigt die immunhistochemische Färbung der Zellkernverteilung (DAPI) im EHT Gewebe, sowie die Anordnung der Troponin T positiven Kardiomyozyten. Die Aufnahme der EHTs erfolgte im Querschnitt.

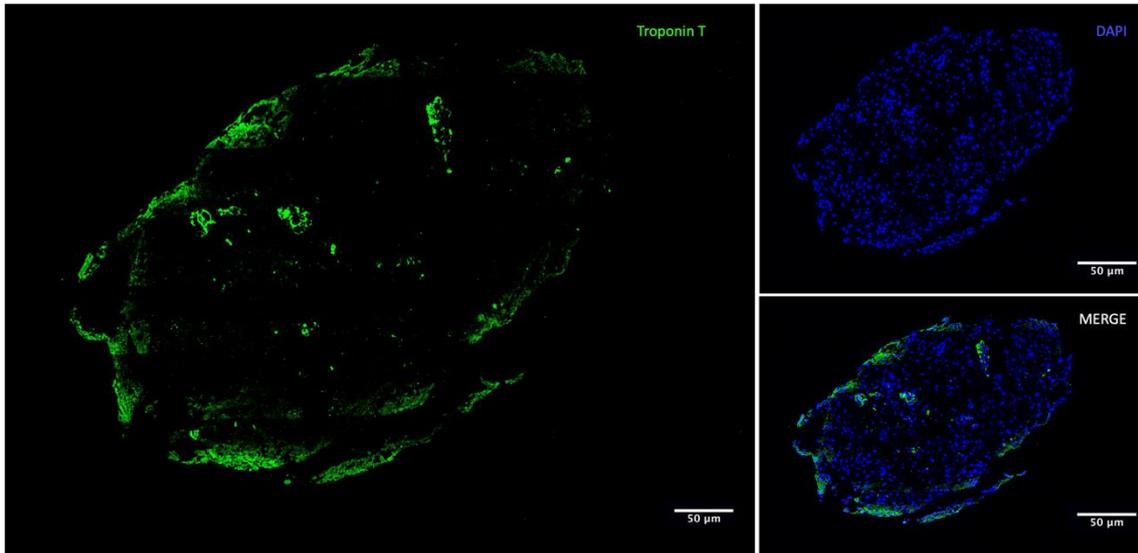


Abbildung 51: Zellanordnung im EHT an Tag 7, IHC Färbung auf DAPI und Troponin T, Querschnitt Aufnahme

Dabei ist deutlich zu erkennen, dass sich die Troponin T positiven Kardiomyozyten an den oberflächlichen Randbereichen gruppieren und im Gewebeinneren kaum Troponin T positiven Zellen zu sehen sind. DAPI zeigt eine homogenere Verteilung im gesamten Gewebe. Dies verdeutlicht das während der Differenzierung auch weitere Zellarten ausdifferenzieren, die nicht Troponin T positiv sind. Sie siedeln sich ubiquitär im Gewebe an mit zum Teil ausgesparten Bereichen im Zentrum des Gewebes.

Zur weiteren Quantifizierung der Zelldichte und Zellverteilung wurden Dystrophin-gefärbte Querschnitte der EHTs verwendet. Histologisch sichtbar zeigten sich Dystrophin-gefärbte Zellen im EHT im Querschnitt, die insbesondere in den Randbereichen zu finden waren. Im Zentrum der EHTs zeigten sich nur vereinzelt Dystrophin-gefärbte Zellen, siehe Abbildung 53.

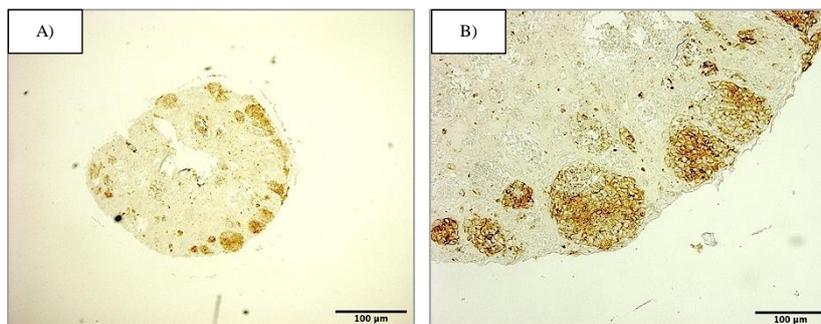


Abbildung 52: Dystrophin gefärbtes EHT im Querschnitt, A) Gesamtübersicht zur Quantifizierung der Zellverteilung im EHT B) 10x Vergrößerung der Dystrophin gefärbten Randbereiche

4.5 Histologische Charakterisierung von nativem Myokard

Die histologische Aufarbeitung von nativem Myokard, zur Kontrolle der nativen Zellverteilung, präsentiert sich als organisierte Struktur mit einer hohen Anzahl an Troponin T positiv gefärbter Zellen, siehe Abbildung 54. Durch die organisierte Quervernetzung der Kardiomyozyten untereinander wird das funktionelle Synzytium gebildet.

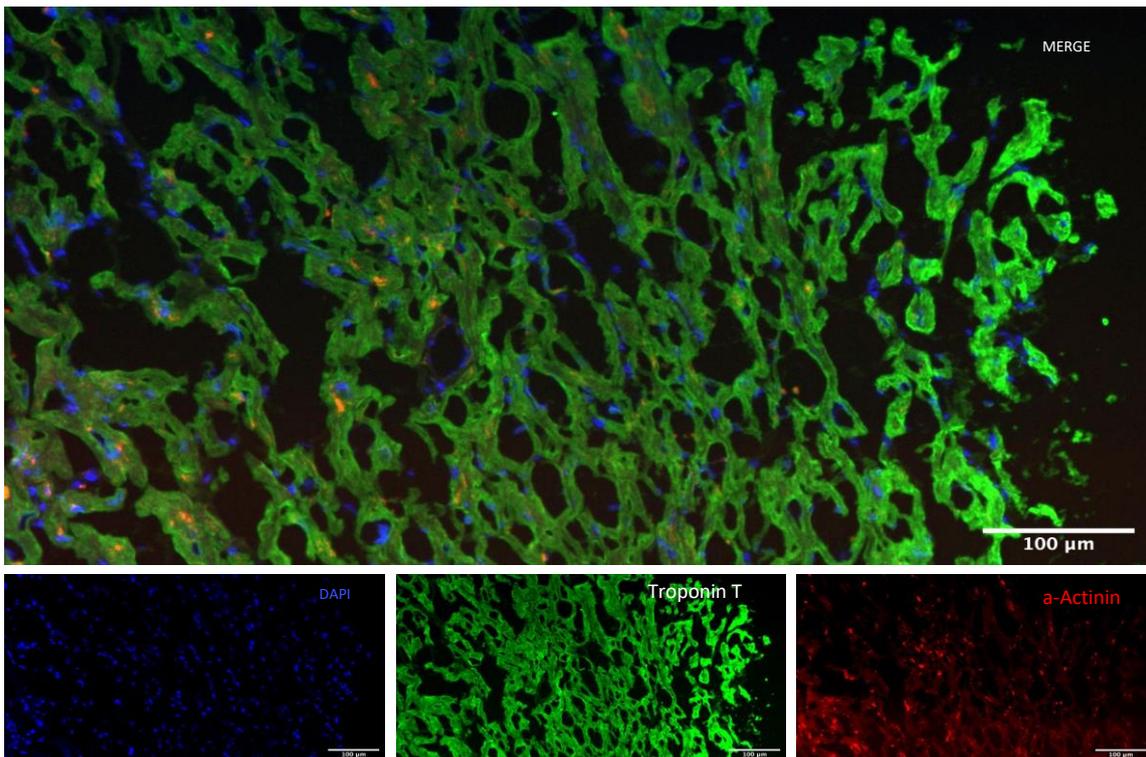


Abbildung 53: Natives Myokard, Immunhistochemische Färbung auf DAPI, Troponin T und alpha-Actinin

Diese hoch strukturierte Einheit erlaubt die elektrische und metabolische Kopplung, sowie eine regelrechte autonome Kontraktion im nativen Myokard. Vergleichend wurden Immunhistochemische Färbungen gegen das sarkolemmale Protein Dystrophin angefertigt. Auch hier zeigt sich ein hoch strukturiertes Netzwerk Dystrophin gefärbter Kardiomyozyten, siehe Abbildung 55.

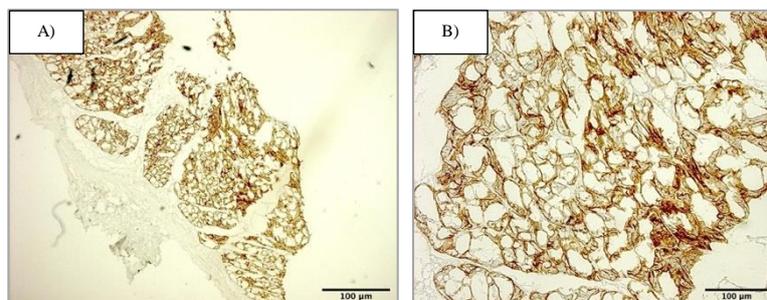


Abbildung 54: Dystrophin gefärbtes Myokard nativ A) Übersichtsaufnahme
B) 10x Vergrößerung

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend können wir folgende Ergebnisse aufzeigen:

- I. Mathematische Berechnungen zeigen, dass die Ringgeometrie der Infinitygeometrie im Oberflächen-Volumen-Verhältnis überlegen ist:
 $A/V\text{-Ring}=39,75\text{mm}^2/440\mu\text{l}^3$ und $A/V\text{-Infinity}= 25,85\text{mm}^2/440\mu\text{l}^3$.
- II. Für eine regelrechte Kultivierung unserer hiPSC Zellen war die Gabe der Nährmedien zu standardisierten Zeitpunkten obligat. Die Pluripotenzanalyse auf SSEA-3 ergab 93,96% positive hiPSC Zellen, für Tra-1-60 waren 61,1% der Zellen positiv. Die Differenzierung zu Kardiomyozyten zeigte die besten Ergebnisse, bei 70-90% Koloniekonfluenz und vollständiger Undifferenziertheit.
- III. Während der Differenzierungsperiode der Kardiomyozyten war die Gabe von entsprechenden Nährmedien und Transduktionsfaktoren zu festgesetzten Zeitpunkten erfolgsentscheidend. Ein signifikanter Unterschied mit positiven Einfluss auf die Differenzierungseffizienz mit der zweifachen Gabe unseres Hungermediums evaluiert werden (Abb.26, *p-Wert 0,019).
- IV. Während der Differenzierungsperiode zeigten sich große Veränderungen der untersuchten Gene, je nach Differenzierungsstadium. Ein konstantes Expressionslevel konnte ab Tag 14 bei der Expression des kardialen Troponin T gesehen werden. Daher wurden alle weiterführenden Experimente mit Kardiomyozyten durchgeführt, die den 18. Tag der Differenzierung erreichten. Die durchschnittliche Differenzierungseffizienz lag bei 70,42% Troponin T positiven hiPSC-Kardiomyozyten in der Zellkultur.
- V. Hypoxie zeigte einen negativen Einfluss, in der Genexpression von Glucuronidase- β und vom kardialen Troponin T in unseren differenzierten Kardiomyozyten. Deutlich war der Expressionsabfall innerhalb der ersten 24h zu erkennen. Auch HiF-1-alpha zeigt Expressionsveränderungen unter der induzierten Hypoxie. Innerhalb der ersten 6h wurde es hochreguliert, in dem Zeitraum zwischen 6 und 12 Stunden unter induzierter Hypoxie zeigte sich keine Änderung der Expressionslevel. Nach 24 und 48 Stunden unter Hypoxie konnte keine Hochregulation von HiF-1alpha mehr ermittelt werden.
- VI. Die Generierung der EHTs erfolgte standardisiert nach etabliertem Protokoll. Bei der Quantifizierung der RNA mittels RT-PCR konnte innerhalb der ersten sieben Tage ein negativer Einfluss auf die Genexpression sowohl für GUSB, als auch

für Troponin T ermittelt werden. Der Expressionsabfall war in den ersten 24 Stunden in allen drei Formen am stärksten. Der Expressionsabfall von GUSB und Troponin T war zu jedem untersuchten Zeitpunkt in den Infinity EHTs stärker als in den Ring-EHTs. Am 7. Tag der EHT Kultivierung ließ sich ein Unterschied zwischen Ring EHT mit einem Ct-Wert von 25,85 und Infinity EHT mit einem Ct-Wert von 28,41 erkennen, der statistisch nicht signifikant ist (Abb. 38, Für Troponin T: Ring: Ct Mean=25.85±1.37 und Infinity: Ct Mean= 28.41 ±2.34, ns=p-Wert 0,1542).

- VII. In den FACS Analysen zeigte sich in allen drei Formen eine konstante Abnahme der Troponin T Expression in den ersten sieben Tagen der Kultivierungsperiode. An Tag 7 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen dem Ring- und Infinity EHT aufgezeigt werden, dass im Ring-EHT mit 83%, 15% mehr Troponin T positive Zellen nach einer Woche vorliegen als im Infinity EHT (Abb. 40, Ring: 73% (±12%) und Infinity: 58% (±11%) n=6, *p-Wert 0,04).
- VIII. Spontan kontrahierende EHTs konnten generiert werden. Insgesamt war der Anteil der Troponin T positiven Zellen entscheidet für die Herstellung von spontan schlagenden EHT's. Waren in einer differenzierter Zellkultur nach Tag 18 >60% der Zellen in den FACs Analysen positiv für kardiales Troponin T, ließen sich spontan schlagende EHTs in-vitro generieren.
- IX. In den Biolumineszenzmessungen war die Abnahme der Photonenemission in allen drei Formen über den zeitlichen Verlauf visuell sichtbar (Abb. 38). Der stärkste Abfall der Photonenemission wurden in den ersten 24 Stunden evaluiert. Der Photonenemissionsabfall war in der Untersuchung in Infinity-EHTs stärker als bei Ring-EHTs (Abb.40). Ein signifikanter Unterschied konnte hier an Tag 7 mit einer deutlich höheren Photonenemission im Ring EHT, als im Infinity EHT aufgezeigt werden (Abb. 43 ROI an Tag 7. im Ring EHT=1.14*10⁶ p/s und im Infinity-EHT=8.47*10⁵ p/s, *p-Wert<0,001).

- X. In der Aufarbeitung von Querschnittshistologien zeigen sich deutliche Unterschiede im Durchmesser der verschiedenen EHT Geometrien. Der größte Gewebedurchmesser wurde mit 929 μ m im zentralen Abschnitt der Infinity-EHTs aufgezeigt (Abb. 50), was eine größere Diffusionsdistanz zur Nährstoffversorgung nach sich zieht. Immunhistochemische Färbungen zeigten die Anordnung der Zellen im EHT Gewebe (Abb. 52, 53) mit deutlicher Ansiedelung Troponin T positiver Kardiomyozyten und Dystrophin gefärbter Zellen in den oberflächlichen Randbereichen und einer Zelldichteabnahme im Gewebeinneren.
- XI. Immunhistochemisch ließ sich im nativen Myokard ein hoch strukturiertes Netzwerk an Troponin T, alpha-Actinin und Dystrophin Zellen präsentieren.

5 Diskussion

5.1 Ziele der Dissertation

Koronare Herzkreislauf Erkrankungen stellt die häufigste Todesursachen in den westlichen Ländern dar (Timmis et al. 2022). Nach irreversibler Schädigung des Myokards durch koronare Herzkreislaufkrankungen sind die Therapiemöglichkeiten sehr begrenzt. Besonders die Versorgung durch Spenderorgane ist aufgrund der mangelnden Organspende stark eingeschränkt. Daher werden alternative Therapieansätze benötigt.

In der Forschung stellt die Etablierung von künstlichem Herzgewebe in Form von Engineered Heart Tissue eine elegante Möglichkeit dar, verlorenes Myokard morphologisch und funktionell zu ersetzen (Eschenhagen and Zimmermann 2005). Im Tiermodell konnte 2019 in einer Arbeit von Pecha der kardiale Therapieersatz durch künstliches Herzgewebe mit Verbesserung der Myokardfunktion gezeigt werden (Pecha et al. 2019). Da für die Versorgung eines menschlichen Herzens größere kardiale Ersatzgewebe benötigt werden, ist es wichtig in-vitro Gewebe mit entsprechender Gewebedicke zu etablieren, um einen therapeutischen Vorteil zu gewinnen. Eine Limitation des kardialen Ersatzgewebes stellt insbesondere die Nährstoffversorgung des generierten Gewebes dar. In-vitro sind die Gewebe nicht vaskularisiert, was zur Folge hat, dass die Nährstoffversorgung ausschließlich per Diffusion aufrechterhalten wird (Radisic et al. 2006). Die Diffusionstiefe verschiedener Moleküle, insbesondere von Sauerstoff ist begrenzt und wird in der Literatur mit 80-100µm angegeben (Eschenhagen and Zimmermann 2005, Michenkova et al. 2021, Radisic et al. 2005, Shimizu et al. 2006). Wird die Nährstoffversorgung durch einen Sauerstoffmangel in der Gewebetiefe nicht gewährleistet, resultiert eine Gewebenekrose (Majno and Joris 1995). In der Forschung sind überwiegend Arbeiten publiziert die mit Engineered Heart Tissue in Form eines Gewebestreifen arbeiten und insbesondere in der in-vitro Wirkstofftestung Anwendung finden (Hansen et al. 2010). Diese umfassen ein Gewebe mit einer Zellzahl von $1-1,5 \cdot 10^6$ Zellen und einer Größe von ca. 8mm*0,5mm. Eine Arbeit von Yildirim et al. 2007 zeigte vielversprechende Ergebnisse mit der Etablierung sphäroid-geformter EHTs, als erste komplexe Form von künstlichen Herzersatzgewebe. Implantationsversuche dieser Forschungsarbeit zeigen den Nutzen sphäroider EHTs im Sinne eines biologischen Ventrikel Unterstützungssystems (Yildirim et al. 2007).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, EHTs mit einer optimalen geometrischen Form in Bezug auf Volumen-Oberflächen-Verhältnis zu etablieren. Dadurch soll die Nährstoffversorgung über die limitierte Diffusion optimiert werden, um ein verbessertes Zellüberleben zu erreichen. Mathematisch wurden Geometrien hergeleitet, die sich insbesondere im Oberflächen-Volumen Verhältnis unterscheiden. Ziel war es große EHTs mit einem möglichst günstigen Volumen/ herzustellen um das Zellüberleben und den Therapieerfolg bei einer anschließenden Transplantation zu maximieren.

Um eine Aussage über das Zellüberleben der verschiedenen EHT Geometrien zu evaluieren, wurden verschiedene Analysen etabliert, die im zeitlichen Verlauf von einer Woche durchgeführt wurden. Der RNA Gehalt wurde mittels RT-PCR Methoden quantifiziert und bringt Aufschluss über die aktuelle Proteinbiosynthese der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Auf Proteinebene wurde die Anzahl an kardialen Troponin T positiven Zellen im zeitlichen Verlauf mittels Durchflusszytometrische Analyse bewertet. Als weitere Methode dient die Verlaufsbeurteilung von Biolumineszenzsignalen an Luciferase transduzierten Kardiomyozyten in verschiedenen EHT Formen. Abschließend wurden Histologien durchgeführt, um quantitative Aussagen der Gewebemorphologie treffen zu können.

5.2 Zellkultur human induzierter pluripotenter Zellen (hiPSC)

Für eine erfolgreiche Differenzierung der human induzierten pluripotenten Stammzellen zu Kardiomyozyten muss die Kultivierung der Stammzellen hoch standardisiert ablaufen. Wichtig ist insbesondere, den Status der Undifferenziertheit durch zeitgerechte Passagiermethoden zu erhalten, um eine spontane Differenzierung zu verhindern. In der Literatur werden verschiedene Kultivierungsprotokolle aufgezeigt (Chen et al. 2011, Ulloa-Montoya et al. 2005, Zhou and Ding 2010).

Die Kultivierung unserer hiPSC Zellen erfolgte in Essential-8™ Flex Medium nach einem Protokoll was 2020 von Giacomelli publiziert wurde (Giacomelli et al. 2020). Das Essential-8™ Flex Medium ist ein Xeno-freies Medium für die Kultivierung von pluripotenten Stammzellen. Vor der Nährmediumgabe wird das Essential-8™ Flex Supplement zeitnah hinzugegeben. Die Kultivierung erfolgte in Matrigel® beschichteten 6-well Kulturplatten. Die Proliferation erfolgt in Kolonien, unter Pluripotenzerhalt wurden die Zellen bei fortschreitender Expansion in T-75 Kulturflaschen kultiviert oder durch Ein- und Auftauzyklen im undifferenzierten Stadium gehalten. Die Dissoziation

unserer Stammzellen erfolgte mit Enzym-basierten Techniken mit Versene oder EDTA basiert. Wir konnten keinen Qualitätsunterschied unserer hiPSC Zellen durch die Dissoziation beider Techniken evaluieren. Da die Zellen sehr empfindlich sind gegenüber der Zellproliferation wurden die Passagierungen mit Aufteilungsraten von 1:4 bis 1:6 konstant durchgeführt und bei einer Konfluenz von max. 75% passagiert.

Entscheidend für den Pluripotenzerhalt von hiPSC Zellen sind Nährmedien, die Einfluss auf die Aktivierung des FGF-Rezeptors aufweisen (Bendall et al. 2007, Lanner and Rossant 2010, Levenstein et al. 2006). Welche Rolle FGF in Stammzellen hat, ist bis heute noch unklar, da FGF Signalübertragungen deutlich mehrere und zum Teil gegensätzliche Wirkungen aufzeigt. Eine Arbeit von Niwa zeigt, dass die parallele LIF-Signalisierung durch Jak/Stat- und PI3K-Signalwege den pluripotenten Stammzellzustand aufrechterhält, während die Erk-Signalisierung diesen zu destabilisieren scheint (Niwa et al. 2009). Neben FGF spielt die Kombination der Faktoren TGF- β , Activin A und BMP eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Pluripotenz von hiPSC Zellen (Breckwoldt et al. 2017, Frank et al. 2012).

Die für die vorliegenden Experimente verwendeten hiPSC Zellen wurden zur Qualitätskontrolle täglich lichtmikroskopisch überwacht. Dabei wurde anhand der Morphologie entschieden, ob eine Kultivierung zur anschließenden Differenzierung zu Kardiomyozyten sinnvoll war. Mögliche Mykoplasmen Kontaminationen wurden regelmäßig per PCR Analyse ausgeschlossen und bei Vorliegen einer Mycoplasmen Infektion entsprechend antibiotisch therapiert. Das Karyogramm zeigte keine numerischen Abnormalitäten und entsprach den Herstellerangaben der Firma Gibco®. Wir etablierten die regelmäßige FACS Untersuchung auf SSEA-3 und Tra-1-60, sowie die Analyse auf Genexpressionslevel mit den Pluripotenzmarkern Oct-4, c-Myc, Sox-2 und Nanog. Diese Nachweise dienten der Pluripotenz Verifizierung.

Abschließend ist zu beurteilen, dass eine effiziente Proliferation von undifferenzierten hiPSC Zellen nach genannten Verfahren möglich ist, dennoch Schwankungen in der Proliferationszeit und in der Morphologie der Zellen auftraten. Für die Kultivierung großer Mengen könnte in Zukunft eine Standardisierung für große Zellzahlen etabliert werden, beispielweise mit Hilfe von Bioreaktoren (Kehoe et al. 2010, Serra et al. 2012). Vorteil und Zukunft der Generierung von human induzierten pluripotenten Stammzellen liegt darin für jeden Patienten individuelle Zelllinien zu züchten, um eine Immunsuppression umgehen zu können (Breckwoldt 2014, Edgar et al. 2020, Zhang et

al. 2018). Aussichtsreiche Ansätze der Methode konnten bereits in-vitro aufgezeigt werden. Nachteilig ist die Dauer der Reprogrammierung patienteneigener adulter somatischer Zellen und die sich anschließende Differenzierung in die jeweilige Zellart, weshalb es für eine regelmäßige klinische Anwendung noch weiterer Forschung bedarf (Haraguchi et al. 2012). Desweiteren stellen die Bildung von Teratomen in vivo und eine mögliche Überexpression des Tumorgens c-Myc Hürden für die Implementierung im therapeutischen Alltag dar (Yu et al. 2007, Zhao et al. 2011).

5.3 Differenzierung von hiPSC Zellen zu hiPSC-Kardiomyozyten

Zur Differenzierung von Kardiomyozyten aus human induzierten pluripotenten Stammzellen ist es essenziell, undifferenzierte Stammzellen zu verwenden. Da bereits die Kultivierung von Stammzellen sehr sensibel ist und sich große Variationen in der Proliferation und Morphologie der hiPSC Zellen zeigen, ist es wichtig standardisiert vorzugehen. Grundlegend sollte eine Konfluenz der Zellkolonien zwischen 70-90% für den Beginn der Differenzierung vorliegen. In einer Arbeit von Balafkan wurde die Differenzierungseffizienz mit Unterschieden basierend auf der Konfluenz von hiPSC Zellen analysiert. In der Arbeit wurden die besten Ergebnisse bei einer Konfluenz von 60-70% erzielt (Balafkan et al. 2020). In der Literatur sind diverse Protokolle für die Differenzierung von hiPSC Zellen zu Kardiomyozyten aufgezeigt, die Variabilität dieser Protokolle unterliegt großer Diversität (Breckwoldt et al. 2017, Burridge et al. 2014).

Für die Etablierung von Differenzierungsprotokollen hat man sich an embryologischen Entwicklungsschritten orientiert. Dabei wurde untersucht welche Transduktionsfaktoren bei der Gastrulation zu welchem Zeitpunkt freigesetzt werden (Kempf et al. 2014, Nakajima et al. 2009). Durch die Zugabe der verschiedenen Transduktionsfaktoren zu verschiedenen Zeitpunkten wird die Differenzierung der Kardiomyozyten eingeleitet.

Wir entschieden uns auf Grund von Kosten und Effizienzgründen für ein Differenzierungsprotokoll welches in der Literatur 2020 von Balafkan veröffentlicht wurde und mit einem RPMI 1640+Glutamax™-I als Basismedium durchgeführt wird (Balafkan et al. 2020). In der mesodermalen Phase wurde zeitgerecht ein B-27-Minus Insulin Supplement hinzugegeben. Ab Differenzierungstag 7 wurden das B-27 Supplement verwendet, welches Insulin enthält.

5.3.1 Induktion mesodermaler Vorläuferzellen

Für die Induktion mesodermaler Progenitoren können kleinmolekulare Substanzen effektiv eingesetzt werden (Chen et al. 2015). In unserem Labor zeigte die Verwendung vom kleinmolekularen Wnt-Signalweg Aktivator CHIR9901 gute Differenzierungsergebnisse der hiPSC Zellen zu mesodermalen Progenitorzellen. Neben der mesodermalen Induktion durch kleinmolekulare Substanzen gibt es diverse Veröffentlichungen über die Verwendung von Protein-Wachstumsfaktoren wie BMP4, Aktivin A und bFGF (Chen et al. 2015, Fonoudi et al. 2015, Frank et al. 2012). In einer Arbeit von Breckwoldt, die die Differenzierungseffizienz zwischen der Nutzung von kleinmolekularen Substanzen und der Verwendung von Protein-Wachstumsfaktoren untersucht hat, zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei der mesodermalen Induktion. Der Unterschied in der Generierung von Kardiomyozyten in der Veröffentlichung von Breckwoldt und dem Prozedere in unserem Labor besteht darin, dass wir 2D Zellkulturen in Matrigel® beschichteten Kulturflaschen generiert. Hingegen wurden in der Arbeit von Breckwoldt die hiPSC Zellen nach Spinner Flask Protokoll differenziert, unter der Bildung von Embryoidkörperchen.

Als Basismedium verwendeten wir RPMI+GlutamaxTM-I in Kombination mit dem Supplement B-27-Minus Insulin. Insulin hindert die mesodermale Differenzierung von hiPSC Zellen und wird in unserem Differenzierungsprotokoll von Tag 0 bis Tag 6 unterlassen (Freund et al. 2008).

5.3.2 Entwicklung kardial differenzierter Zellen

Die kardiale Differenzierung schließt sich der mesodermalen Phase an und wird primär durch kleinmolekulare Wnt-Antagonisten (Breckwoldt 2014) induziert. Dazu etablierten wir in unseren Differenzierungsprotokoll das IWR-1. Mit einer Konzentration von 10 μ M zeigt IWR-1, als Tankyrase-Inhibitor eine Wirkung am Axin und beeinflusst den β -Catenin Signalweg (Lu et al. 2009). Der Wnt/ β -Catenin Signalweg fördert Transkriptionsprogramme, die für die Beibehaltung einer Multipotenz von Stammzellen essenziell sind. Wird dieser Signaltransduktionsweg inhibiert, folgt eine Differenzierung der Stammzellen (Martins-Neves et al. 2018). Als alternative Wnt-Antagonisten sind in Publikationen die Analoga DS-I-6 und DS-I-7 aufgeführt, welche eine ähnliche Differenzierungseffizienz von hiPSC bewirken (Willems et al. 2011).

Als weiterer entscheidender Faktor für die kardiale Differenzierung gilt das Insulin. Ab dem siebten Differenzierungstag wird das B27-Supplement mit Insulin versetzt und fördert die kardiale Ausdifferenzierung.

Kontrahierende 2D Kardiomyozytenkulturen konnten ab Tag 7-9 in unserem Differenzierungsprotokoll beobachtet werden. Die Morphologie der differenzierten Kardiomyozyten, sowie die Anzahl der ausdifferenzierten Kardiomyozyten unterlag starken Schwankungen. Wir beobachteten neben den differenzierten Kardiomyozyten einen großen Anteil an Fibroblasten und nicht differenzierten Stammzellen. Zur Reinheit der Kardiomyozytenkulturen wurden die Kulturen mit Hungermedium kultiviert. Wir konnten einen positiven Effekt nach zweimaliger Hungermediumgabe in unserem Labor etablieren.

Jedoch ist es unwahrscheinlich mit Kardiomyozyten als einzige Zellart ein funktionales künstliches Ersatzgewebe zu kreieren. Der Anteil an Nicht-Kardiomyozyten in nativen Herzmuskelgewebe, zeigt positive parakrine Wirkungen auf die Kardiomyozyten und scheint unerlässlich für die autonome Funktion zu sein (Naito et al. 2006, Yildirim et al. 2007). In anschließenden Arbeiten konnte der Anteil und der Vorteil des Vorhandenseins weiterer wichtiger Nicht-Kardiomyozyten Zellarten evaluiert werden, um die Vitalität und Kontraktilität langfristig zu verbessern.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Differenzierung von hiPSC Zellen zu Kardiomyozyten technisch äußerst anspruchsvoll ist, jedoch durch gründliche Arbeit und standardisierte Kultivierung Kardiomyozyten differenziert werden können, die kontraktionsfähige EHTs generieren.

5.3.3 Analyse der differenzierten Kardiomyozyten

Über den Zeitraum der Differenzierung wurden Analysen auf Genexpressionsebene durchgeführt. Die Expression von Oct-4, Sox-2 und NANOG zeigte sich bei undifferenzierten hiPSC Zellen in PCR und RT-PCR Untersuchungen. Im zeitlichen Verlauf wurde die Expression von Oct-4 bei voranschreitender Entwicklung der Kardiomyozyten herunterreguliert. Dabei konnten insgesamt die Ergebnisse in der Arbeit von Breckwoldt 2014 reproduziert und bestätigt werden (Breckwoldt 2014). Zeitlich folgte eine Expression des VEGF-2-Rezeptors und von Islet, die als frühkardiale Marker beschrieben werden (Kattman et al. 2011). Die Expression von sarkometrischen Proteinen, wie Troponin T, alpha-MHC und MLC-2 wurde gegen Ende der

Differenzierungsperiode ab Tag 6 bzw. ab Tag 8 hochreguliert. Während der gesteigerten Expression der sarkometrischen Proteine wurden die ersten autonom kontrahierenden Kardiomyozyten in den Kulturflaschen beobachtet. Troponin T zeigt eine konstante Expression ab dem 14. Differenzierungstag. Bis einschließlich Differenzierungstag 20 wurden vernachlässigbare Expressionsänderungen gesehen. Für die Erhebung weiterer Daten bezüglich Veränderungen der Genexpression in EHTs wurden Zellen verwendet, die den 18. Differenzierungstag erreichten.

Zur Qualitätskontrolle unserer Differenzierungseffizienz führten wir standardisierte FACS Färbungen gegen kardiales Troponin T durch. Wir konnten durchschnittlich 70% der Kardiomyozyten in unseren Kulturen als Troponin T positiv werten. Damit erreichten wir eine deutlich bessere Differenzierungseffizienz als im Protokoll von Yang, die nach Spinner Flask Protokoll vorgingen (Yang et al. 2008). Eine Umstellung auf die Differenzierung mittels Spinner Flask Protokoll könnte jedoch trotzdem in Erwägung gezogen werden, da Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Eschenhagen im Institut für experimentelle Pharmakologie am UKE 60-90% Troponin T, bzw. alpha-Aktinin positive Kardiomyozyten (Breckwoldt et al. 2017) mit dieser Methode generieren.

Neben der quantitativen Analyse zeigten immunhistochemische Färbungen qualitativ hochwertige Kardiomyozyten mit typischer Querstreifung. Insgesamt ist zur Generierung kontraktionsfähiger EHTs eine hohe Anzahl an Kardiomyozyten in Kultur entscheidend.

5.4 Der Einfluss von Hypoxie auf hiPSC-Kardiomyozyten

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer induzierten Hypoxie mit molekularbiologischen Methoden untersucht. Wir evaluierten einen negativen Einfluss auf die Expression von GUSB und Troponin T in Kardiomyozyten bei anhaltender Hypoxie. Eine verminderte mRNA Synthese der jeweiligen Gene, welche mittels RT-PCR Methode quantifiziert wurde, lässt auf eine reduzierte Proteinbiosynthese in den Zellen schließen.

In der Literatur wurden 2019 Versuche durchgeführt, wie sich eine induzierte Hypoxie während der Differenzierung auf die Kardiomyozyten Proliferation auswirkt. Dabei wurden die Zellen bei einer Sauerstoffkonzentration von 10%, anstatt 21% O₂ für eine Woche kultiviert. Es wurde ein Unterschied zwischen fetalen und neonatalen Ratten-Kardiomyozyten evaluiert. Die Proteinexpression von Troponin T Zellen in fetalen Zellen wurde herunterreguliert, im Vergleich zu neonatalen Zellen, bei denen sich eine

Überexpression von Troponin T unter Hypoxie zeigte. Für die Versuchsreihe wurden H9C2 Ratten Zellen kultiviert. Die Expressionsveränderung von Troponin T in unterschiedlichen Entwicklungsstadien wird auf die stadienspezifische Sarkomerkomponente von Troponin T zurückgeführt (Sun et al. 2019). Für unsere Versuchsreihe wurden daher hiPSC-Kardiomyozyten verwendet, welche die Differenzierungsperiode abgeschlossen hatten und den 18. Differenzierungstag erreichten, da die Expression zu diesem Zeitpunkt der Differenzierung der Kardiomyozyten konstant war. Wir inkubierten unsere Zellen bei 0,5% Sauerstoff. Dabei war eine deutliche Expressionsabnahme sowohl von GUSB, als auch von Troponin T zu erkennen. Dies lässt auf eine verminderte Proteinbiosynthese und Aktivität der hiPSC-Kardiomyozyten schließen.

Während einer bestehenden Hypoxie wird der Stoffwechsel auf eine anaerobe Glykolyse umgestellt. Dieser Effekt wird als „Pasteur Effekt“ bezeichnet (Gross 2005). Induziert wird die Umstellung des Stoffwechsels, u.a. durch HiF-1-alpha. HiF-1-alpha folgert die Steigerung der AMP-aktivierten Proteinkinase, welches zu den glykolysierenden Proteine gezählt wird (Minchenko et al. 2003).

HiF-1-alpha wurde auf Grundlage einer Arbeit von Greijer et al. 2005 als Hypoxiemarker gewählt. In der Arbeit wurde aufgezeigt, dass HiF-1-alpha an der Regulation von 89% der untersuchten Gene unter Hypoxie beteiligt ist (Greijer et al. 2005).

Wie HiF-1-alpha in Kardiomyozyten reguliert wird, ist bis heute noch unklar. Wir konnten in unseren Experimenten innerhalb der ersten sechs Stunden eine Steigerung der HiF-1-alpha Gene nachweisen. Die Überexpression blieb bei Kardiomyozyten, die für 12 Stunden unter induzierter Hypoxie inkubiert wurden, bestehen. Bei länger anhaltender Hypoxie (>24 Stunden) war die HiF-1-alpha Expression herunterreguliert. Wir führten den Effekt der herabgeregelten Protein Expression von HiF-1-alpha auf ein zunehmendes Zellsterben durch Nekrose zurück. Eine Arbeit von Loor und Schumacker 2008 zeigt die Ischämietoleranz in Zellen, die durch die Regulation von HiF-1-alpha bedingt wird. Während der Hypoxie löst HiF-1-alpha die Expression von Genen aus, die am Sauerstofftransport, der Sauerstoffverwertung, dem glykolytischen Stoffwechsel, dem Zelltod, dem Zellüberleben und anderen Prozessen beteiligt sind und die eine positiven Einfluss auf das Überleben der Zellen bei Ischämie haben können (Loor and Schumacker 2008). Wird der kritische Ischämiezeitpunkt aber überschritten resultiert im Gewebe eine Nekrose mit folgendem totalen Gewebeuntergang.

Da die Proteinexpressionssteigerung nicht signifikant war, wurden ausschließlich Experimente auf die HiF-1-alpha Regulation in hiPSC-Kardiomyozyten durchgeführt. In nachfolgenden Forschungsarbeiten könnte der Einfluss der HiF-1-alpha Expression im zeitlichen Verlauf der hergestellten EHTs untersucht werden, um eine validierte Aussage über den Einfluss einer möglichen Hypoxie zu gewinnen. Diese Versuchsreihe wurde bisher nicht durchgeführt, da die gewonnenen Erkenntnisse der HiF-1-alpha Regulation in Kardiomyozyten nicht signifikant war und in Hinblick auf die HiF-1-alpha Expressionsänderungen in EHTs begrenzt schienen.

5.5 Engineered Heart Tissue (EHT)

Künstliches Herzgewebe, in Form von Engineered Heart Tissue verfolgt neben der Etablierung in der in-vitro Wirkstofftestung am humanen Modell auch das Ziel der regenerativen Therapie bei Patient:innen mit geschädigtem Myokard. Die Herstellung von Engineered Heart Tissue unterliegt großer Variation. In den Anfängen der EHT-Herstellung fanden tierische Zellen, zunächst embryonale Hühner Zellen Anwendung (Eschenhagen et al. 1997). Im Folgenden wurde mit neonatalen Rattenzellen gearbeitet, die aber den Nachteil einer Abstoßungsreaktion im humanen Empfänger nach sich ziehen und daher im klinischen Alltag schwer übertragbar sind (Yildirim et al. 2007, Zimmermann et al. 2004). Darüber hinaus wurden humane Zellen generiert, dabei wurden embryonale Stammzellen aus adulten Stammzellen aus Blut- und Knochenmarkzellen verwendet, um Kardiomyozyten für künstliches Herzgewebe zu generieren (Lü et al. 2010). Diese Konstrukte fanden bereits klinische Anwendung im Bereich der Injektion von Myoblasten (Henning, R. J. 2012). Als Problem wird bei dem Gebrauch von embryonalen Stammzellen vor allem die Bildung von Teratomen und die ethischen Konflikte konnotiert (Bargehr et al. 2019, Caspi et al. 2007). Zuletzt wurden Arbeiten zur Differenzierung von Kardiomyozyten aus human induzierten pluripotenten Stammzellen publiziert. Ethisch ist die Arbeit mit human induzierten pluripotenten Stammzellen deutlich einfacher zu vertreten und stellt somit aktuell den elegantesten Ansatz in der Forschung dar. Die Herstellung von Engineered Heart Tissue basiert auf verschiedenen Methodiken, die zu verschiedenen Formen und Größen führen. Eine gängige Methode stellt die Generierung von EHTs mit Hilfe von Hydrogelbildnern, wie Kollagen und Fibrin dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden Fibrin basierte EHTs hergestellt und für anschließende Experimente verwendet. Den Vorteil der Fibrin basierten Technik stellt die schnelle Polymerisierung mit Hilfe von Thrombin dar. Innerhalb kurzer Zeit (<60 sek.) kommt es zum sogenannten „Clotting“ (Aushärten in einer dreidimensionalen Form). Dieser Prozess ist entscheidend für die Herstellung verschiedener Formen, die nach dem „Clotting“ beibehalten wird. Insgesamt erweist sich die Methode als geeignet im Hinblick auf den arbeits- und finanziellen Aufwand.

Für die Generierung von Streifen-EHTs wurde eine besondere Art der Aufspannung an speziellen Silikonhalterungen in der Forschungsgruppe der Pharmakologie am UKE, Hamburg Eppendorf, entwickelt (Hansen et al. 2010). Die Morphologie der generierten EHTs zeigt eine Veränderung über einen kurzen Zeitraum. Zu Beginn sind die EHTs relativ dick und instabil, und hängen an einer parallel ausgerichteten Silikonhalterung. Durch Remodelingprozesse der Kardiomyozyten und den Abbau von Fibrin kommt es zur Verschmälerung und Verkürzung des gesamten EHT Gewebes. Als Folge zeigen sich leicht aufeinander zugebogene Silikonhalter (Breckwoldt 2014).

Die Generierung von Ring- und Infinity-EHTs erfolgte mit Hilfe zuvor hergestellter Silikonhalterungen, die als Gussformen dienten. Nach Überführung des Fibrin-Thrombin-Zellmastermixes polymerisierten die EHTs unter Beibehaltung der Form. Auch hier zeigten sich kurz nach der Herstellung dicke und instabile EHTs, die bereits nach kurzer Zeit durch die Anordnung der Kardiomyozyten im EHT Gewebe eine Verschmälerung der verschiedenen Formen zeigten.

In der vorliegenden Arbeit wurden die EHTs morphologisch untersucht. Immunhistochemische Analysen zeigen die Anordnung der Kardiomyozyten vor allem an den oberflächlichen Randbereichen mit einer deutlichen Dichteabnahme im Gewebeinneren. Als Begründung sehen wir die reduzierte Nährstoffversorgung. Insbesondere durch die Versorgung mit Sauerstoff, die ausschließlich per Diffusion gewährleistet wird und auf eine Diffusionstiefe von 80-100µm begrenzt ist. Des Weiteren konnte durch histologische Aufarbeitung des Gewebes eine klare Organisation der Kardiomyozyten mit sarkomerischen Zellanteilen von Troponin T aufgezeigt werden. Dieser Zellverband erscheint unerlässlich für die Bildung eines elektrischen Synzytiums, ähnlich einem nativen Herzmuskelgewebe. Die beobachtete Zellanordnung und Verteilung der Troponin T positiven Zellen im EHT Gewebe verdeutlicht, dass eine große

Gewebeoberfläche im Vergleich zum Gewebevolumen für das Zellüberleben im Gewebe entscheidend ist.

In Zukunft ist es wichtig eine Geometrie zu etablieren, die ein optimales Oberflächen-Volumen-Verhältnis aufweist, um langfristig autonom kontrahierende EHTs für den funktionellen Ersatz von dysfunktionalem Myokard zu entwickeln. In der vorliegenden Arbeit wurde das Überleben der verschiedenen EHT Geometrien über den Zeitraum von einer Woche verglichen. Dabei wurde das Streifen-EHT als Standardgeometrie verwendet und die Ring- und Infinitygeometrie untereinander verglichen. Hierbei zeigten sich aufgrund des günstigsten Oberflächen-Volumen-Verhältnisses der Ring EHTs ein signifikant höheres Kardiomyozytenüberleben im Vergleich zum Infinity EHT.

5.5.1 RNA Quantifizierung der EHT Geometrien mittels RT-PCR

Ziel einer quantitativen PCR ist, auf die zu Reaktionsbeginn eingesetzte Konzentration an DNA und deren Vervielfältigung zu jedem Zeitpunkt rückschließen zu können. Für die Durchführung der RT-PCR Methoden wurden im Wesentlichen zwei Modelle entwickelt, die auf unterschiedlichen Methoden basieren. Grundlegend wird bei einer Real-Time PCR (RT-PCR) die Messung von Fluoreszenz bestimmt, die Rückschlüsse auf die DNA Konzentration liefert (Udvardi et al. 2008). Unterschieden werden die TaqMan Real-Time-PCR-Assays (ThermoFischer Scientific) Methode und die LightCycler Technologie (Roche Diagnostics). Ersteres Verfahren basiert auf der Detektion von Fluoreszenzsignalen, die durch die Spaltung einer markierten Sonde während der Extensionsphase entstehen. Die Sonde ist dabei entsprechend der Targetsequenz komplementär und spezifisch. Am 5'-Ende befindet sich eine Oligonukleotidsequenz, z.B. FAM (6-carboxy-fluorescin), die als Reporter fungiert. Am 3'-Ende liegt ein Quencher, z.B. TAMPA (6-carboxytetramethylrhodamine) (Bustin 2002, Gibson et al. 1996). Die Funktion des Quenchers liegt in der Unterdrückung der fluoreszierenden Lichtemission, wenn die Sonde ungebunden vorliegt (Nazarenko et al. 2002). Die Unterdrückung wird gewährleistet durch die Nähe zwischen Quencher und Reporter. Kommt es also zu einer Bindung der Sonde an die Targetsequenz des DNA Moleküls, so wird die 5'-Exonukleaseaktivität der TaqPolymerase aktiviert und die Sonde wird gespalten (Lyamichev et al. 1993). Die Nähe zwischen Quencher und Reporter erlischt und es wird fluoreszierendes Licht frei. Die detektierte Lichtemission ist proportional zur

Anzahl an freigesetzten Reportern, welche wiederum der Zahl der neu amplifizierten DNA Stränge entspricht (Lee et al. 1993).

Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode mit dem LightCycler®480 SYBR Green I Mastermix interkaliert der SYBR Green I Farbstoff unspezifisch in der kleinen Furche der DNA Helix. Durch die Bindung an die DNA-Abschnitte wird ein Fluoreszenzsignal emittiert, welches detektiert und ausgewertet werden kann. Die gemessene Lichtemission ist dabei proportional zur Konzentration des entsprechenden Targets. Unterdessen kommt es zu einem Temperaturanstieg, die Fluoreszenz wird so lange gemessen, bis diese am Target gebunden haben. Kommt es zum Erreichen einer entsprechend hohen Temperatur löst sich die Oligosequenz vom gesuchten Target und der Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) ist beendet. Dieser Schritt wird als melting bezeichnet. Bei der Aufzeichnung der Fluoreszenzsignale entstehen entsprechende Schmelzkurven (melting curve analysis) (Nauck et al. 2000).

Beide Methoden erlauben den Aufschluss einer DNA Quantifizierung in Echtzeit. Der Vorteil der RT-PCR gegenüber einer herkömmlichen PCR ist die Bestimmung des genauen DNA Gehalt zu jedem beliebigen Amplifikationszeitpunkt. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass der Arbeitsschritt wie die Agarosegelelektrophorese, die sich einer herkömmlichen PCR anschließt, entfallen. Somit besteht eine geringere Gefahr für Kontaminationen (Bustin 2002). Außerdem können bis zu 96 Proben zum gleichen Zeitpunkt analysiert werden, was einen zeitlichen Vorteil bringt.

Die Reliabilität und Validität der quantitativen RT-PCR ist nicht allein abhängig von der Genauigkeit und Verlässlichkeit der RT-PCR Reaktion. Entscheidend für die Aussage einer RT-PCR Methode sind die Aufreinigung und Kultivierung der Proben, die Handhabung der Proben, die Zellisolierung und vor allem die RNA Extraktion, sowie die Umschrift in cDNA als Template der RT-PCR (Bustin et al. 2005). Dabei darf das Target möglichst wenig manipuliert werden (Jenkins 1994). Eine Limitation stellt dabei der Verlust der mRNA Moleküle dar, da diese besonders empfindlich sind gegen den Verdau durch RNAsen oder gegen Wärmeeinwirkung (Udvardi et al. 2008). Kleinste Abweichungen der mRNA beispielsweise haben durch die exponentielle Amplifikation der PCR enorme Auswirkungen.

Die regelmäßige Durchführung der RT-PCR Methode wurde von mir in unserm Forschungslabor etabliert. In der vorliegenden Arbeit wurde der Expressionsverlauf der

hergestellten Streifen-, Ring- und Infinity-EHTs im Verlauf von einer Woche untersucht. Die Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen aller drei Geometrien haben gezeigt, dass die Konzentration der mRNA über den Kulturverlauf abnimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine RT-PCR Analyse zur Quantifizierung der mRNA von Glucuronidase-beta (GUSB) und von kardialen Troponin T aus in-vitro hergestellten EHTs entwickelt. Die Expressionsveränderung war insbesondere in den ersten 24 Stunden zu erkennen. Über den Zeitraum von einer Woche zeigte sich, dass die Expressionsabnahme sowohl für GUSB als auch für Troponin T im Infinity EHT stärker war, als im Ring-EHT. Wir konnten in unseren Experimenten nachweisen, dass die Detektion kleinster RNA-Mengen erfolgreich gelingt. So ist es möglich über die Quantifizierung der mRNA bereits unmittelbare Zusammenhänge über die aktuelle Proteinbiosynthese und die Zellvitalität zu schließen. Eine verstärkte Expressionsabnahme steht in unmittelbarem Zusammenhang mit herabregulierter Zellaktivität und einem möglichen Zelltod, da nur vitale Zellen Proteinbiosynthese betreiben.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten unterliegen einer Methode zur Validierung eines Zellüberlebens im longitudinalen Verlauf und sollten durch weitere Untersuchungen validiert werden. Darunter könnte die mRNA beispielsweise durch alternative Methoden wie der Nuclease Protection Assays in anschließenden Forschungsprojekten quantifiziert und geprüft werden (Qu and Boutjdir 2007).

5.5.2 Durchflusszytometrische Analysen der EHT Geometrien

Die Untersuchung zur Analyse der lebenden Zellen im EHT Gewebe im zeitlichen Verlauf stellt einige Herausforderungen dar. Ergänzend zur quantitativen Untersuchung der Zellzahl wurde zusätzlich die durchflusszytometrische Analysemethode (FACS) gewählt. Ein Vorteil dieser Methode besteht in der einfachen Durchführung der Fluoreszenzmarkierung. Sowohl der Nachweis von immunphänotypischen Mustern auf der Oberfläche von Zellen als auch der Nachweis von intranukleären Bestandteilen, der Zytoplasmatischen sarkolemmalen Proteine gelang in der vorliegenden Arbeit gut. Wir entschieden uns für die Verlaufsbeurteilung von kardialen Troponin T positiv markierten Zellen unserer hergestellten EHTs. Dabei war zur Anfärbung der zytoplasmatischen sarkolemmalen Anteile vom kardialen Troponin T die Herausforderung ins Zellinnere zu gelangen. Vitale Zellen besitzen eine undurchdringliche Doppellipidschicht als Zellmembran, die zunächst mit entsprechenden Puffern permeabilisiert und fixiert wurde.

Im Anschluss konnte die Färbung auf kardiales Troponin T durchgeführt werden. Eine stetige Abnahme von Troponin T positiv markierten Kardiomyozyten im zeitlichen Verlauf von sieben Tagen wurde evaluiert. Ein Unterschied der beiden Geometrien konnte ebenfalls gezeigt werden. Über den Verlauf von einer Woche zeigte sich eine positive Tendenz für die Ringgeometrie mit einem höheren Anteil Troponin T positiver Zellen gegenüber der Infinitygeometrie. Als Nachteil dieser Methode evaluierten wir das Problem, das sich Zellen, die bereits kurz vor der Durchführung der Färbung starben, möglicherweise noch anfärben lassen, da der Abbau der Zellbestandteile und Proteine durch die intrazelluläre Proteolyse durch zelleigene Proteasomen mit Verzug erfolgen (Taylor et al. 1995).

5.5.3 Biolumineszenzanalysen der EHT Geometrien

Ein vielversprechendes Verfahren zur nicht invasiven Visualisierung der lebenden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten ist das Biolumineszenz Imaging. Das Verfahren findet häufig Anwendung zum Nachweis einer Wirksamkeit verschiedener Therapieformen bei beispielsweise Tumorzellen und deren Absterben unter verschiedenen Therapien (Edinger et al. 1999, Kim et al. 2010).

2014 zeigte Lepperhof et al. das Zellüberleben von Luciferase transduzierten iPSC-Kardiomyozyten nach in vivo Transplantation von differenzierten Kardiomyozyten zur Versorgung von ischämisch verändertem Myokard. Die Lichtemission konnte im Verlauf von 28 Tagen in vivo detektiert werden (Lepperhof et al. 2014).

Auch wir konnten zeigen, dass sich das Enzym Luciferase des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*, Lampyridae) gut genomisch in unsere hiPSC Zellen integrieren ließ und auch bei der Differenzierung zu hiPSC-Kardiomyozyten genomisch bestehen blieb. Nachweisen konnten wir die erfolgreiche Transduktion durch die Hinzugabe des Substrates Luciferin, welche unter ATP- und O₂ Verbrauch Licht mit einer Wellenlänge von 562nm emittiert. Die Lichtemission durchdringt das Gewebe und kann mit Hilfe einer hochempfindlichen Kamera erfasst werden (Rice et al. 2001). Zur Sicherung der genomischen Integrität wurde mRNA aus hiPSC Zellen gewonnen und mittels PCR Analysen quantifiziert. Conradi publizierte 2015 das longitudinale Monitoring Fibrin basierter EHTs aus Lewis-Ratten-Zellen, dabei konnten stabile Signale bis Tag 110 nach Transplantation detektiert werden (Conradi et al. 2015).

Sowohl bei den hergestellten Streifen-EHTs mit einer Zellzahl von $1-1,5 \cdot 10^6$ Zellen als auch bei den größeren Ring- und Infinity-EHTs mit einer Zellzahl von $4 \cdot 10^6$ Zellen war das emittierte Licht intensiv genug, um dieses mit der vorhandenen CCD-Kamera mit sinnvollen Belichtungszeiten (<60 Sek.) zu detektieren. In den Biolumineszenzaufnahmen konnten Unterschiede der Lichtintensität im zeitlichen Verlauf von sieben Tagen mit dem bloßen Auge deutlich erkannt werden. Rein optisch konnte jedoch der Unterschied zwischen den einzelnen EHT Geometrien nicht sicher verifiziert werden. Um einen Unterschied nachzuweisen, mussten daher die Lichtintensitäten in Regions of Interest (ROIs), die über die EHT Geometrien gelegt wurden, gemessen und verglichen werden. Die entworfenen ROIs wurden immer identisch verwendet und genau über das Zentrum der EHTs gelegt, um reproduzierbare Ergebnisse zu generieren. Dabei zeigte sich in allen drei Geometrien ein stetig abnehmendes Signal mit dem stärksten Signalverlust innerhalb der ersten 24 Stunden. Innerhalb dieses Zeitraums war der Intensitätsverlust in Infinity-EHTs um ca. 10% stärker als in den Ring-EHTs. Im weiteren Verlauf war der Lichtintensitätsabfall deutlich geringer. Möglicherweise ist das auf die Reorganisation und Anordnung der Zellen zurückzuführen, die sich nach und nach an den oberflächlichen Randbereichen finden. Da das emittierte Licht dann weniger Gewebe durchdringen muss, ist die Abnahme der Lichtintensität zwischen 48h und 7 Tagen schwächer. Nur lebendige Zellen können das Substrat Luciferin umsetzen und Licht emittieren, sodass eine abnehmende Lichtintensität auf eine geringere Zellzahl rückschließen lässt und offensichtlich mit der Zahl der abgestorbenen Zellen korreliert.

Zusammenfassend war mit dem hier verwendeten Versuchsaufbau für die Biolumineszenzaufnahme ein longitudinales Monitoring über das Zellüberleben in den verschiedenen EHT Geometrien möglich. Insgesamt konnte unter idealen Bedingungen eine hervorragende Sensitivität der Messung erreicht werden und optisch visualisiert werden. So war es möglich die Lichtintensität auch an unterschiedlichen Lokalisationen im EHT Gewebe zu beurteilen. Wir stellten fest, dass im zentralen EHT Bereich der Infinityform ein stärkerer Signalverlust zu erkennen war als in Randbereich dieser Geometrie. Als Grund sehen wir das größere Gewebevolumen im zentralen Abschnitt der Infinityform bei kleinerer Gewebeoberfläche. Daraus resultiert eine eingeschränkte Nährstoffversorgung in diesem Bereich mit in Folge stärkerem Zellsterben. Somit überwiegt das Zellüberleben in der Ringgeometrie dem in der Infinitygeometrie.

Ebenso mussten die EHTs für die Untersuchung nicht manipuliert werden und damit kann die beste Aussagekraft bezüglich der Zellzahl über den zeitlichen Verlauf von einer Woche getroffen werden.

Da wir mit Luciferase positiven hiPSC-Zellen arbeiten, welche zu Kardiomyozyten differenziert werden, ist es schwer, eine genaue Aussage über die exakte Zellzahl an Luciferase positiven Kardiomyozyten zu treffen, da während der Differenzierungsperiode auch weitere Zelltypen entstehen und aktuell eine Differenzierungseffizienz von 100% Kardiomyozyten nicht gelingt. In anschließenden Forschungsprojekten sollte die Differenzierungseffizienz der Luciferase positiven hiPSC Zellen zu Luciferase positiven Kardiomyozyten untersucht werden, um die Aussagekraft der vorliegenden Arbeit zu verstärken.

5.5.4 Histologische Charakterisierung der EHT Geometrien

Bei den histologischen Strukturanalysen wurde ein Fokus auf den funktionellen Aufbau von EHTs gelegt, bei dem durch immunhistochemische Färbungen mittels DAPI und kardialem Troponin T die Anordnung der Zellen im Gesamtgewebe veranschaulicht wurde. Insbesondere bei einer geringeren Anzahl an Troponin T positiven Kardiomyozyten zeigt sich eine deutliche Verteilung der Zellen in den oberflächlichen Randbereichen.

Im menschlichen Herzen zeigt sich eine Kapillardichte von 2000-2500 Kapillaren/mm². Vergleichsweise ist in Skelettmuskeln die Kapillardichte auf etwa 400 Kapillaren/mm² definiert, was den hohen Bedarf an Sauerstoff für Kardiomyozyten bedingt (Stoker et al. 1982).

In-vitro hergestelltes EHT Gewebe ist nicht vaskularisiert und stellt die Sauerstoffversorgung ausschließlich per Diffusion bereit. In anderen Forschungsarbeiten wurde gezeigt, dass die zeitgleiche Kultivierung und Differenzierung von Endothelzellen und Kardiomyozyten die Vaskularisierung und Nährstoffversorgung von künstlichem Herzgewebe verbessert (Sekine et al. 2008). So könnte in anschließenden Projekten neben der Optimierung der Geometrie an EHTs auch eine Ko-Kultivierung von Kardiomyozyten und Endothelzellen in Erwägung gezogen werden, um das Überleben und die Nährstoffversorgung der Zellen zu verbessern.

5.6 Ausblick

Durch standardisierte und sorgfältige Kultivierung der human induzierten pluripotenten Stammzellen konnten spontan kontrahierende Kardiomyozyten differenziert werden. Jedoch unterlag die Kultivierung der hiPSC Zellen, sowie die Differenzierung zu hiPSC-Kardiomyozyten, Schwankungen. Auch zeigten sich Unterschiede bei der Qualität der Zellen, die unter anderem auf die Nährmediengabe zurückzuführen sind. Daher könnte als Alternative eine Kultivierung in Bioreaktoren in Erwägung gezogen werden, die durch die Möglichkeit eines ständigen Mediumwechsels möglicherweise weniger Schwankungen der Kultivierungs- und Differenzierungseffizienz unterliegen.

Gerade für die Herstellung von EHTs ist eine hohe Zahl an Kardiomyozyten nötig, um eine homogene Zelldichte im gesamten EHT Gewebe zu gewährleisten. Für den Erhalt des EHT Gewebes mit vitalen Kardiomyozyten sollten Geometrien mit großer Gewebeoberfläche und möglichst kleinen Volumen generiert werden. Die positive Auswirkung einer großen Gewebeoberfläche mit kürzeren Diffusionsstrecke konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Hier überwog das Zellüberleben in der Ringgeometrie gegenüber dem Zellüberleben in den Infinity EHTs in allen durchgeführten Analysen. Für die Validierung unserer Hypothese könnten auch EHTs mit noch größerer Zellzahl und Gewebegröße generiert werden, um dem Unterschied zu verifizieren und um die Validierung der Ausgangshypothese zu verdeutlichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der größte Zellverlust insbesondere in den ersten 24 Stunden nach Herstellung der EHTs evaluiert. Die Zellzahl nahm im weiteren Verlauf weiter ab, jedoch zeigte sich ein deutlich geringerer Zellverlust. Bisher war der Beobachtungszeitraum mit sieben Tagen relativ kurz. Interessant wäre der Verlauf des Zellüberlebens über einen Zeitraum von 30 Tagen oder länger zu evaluieren, um das Ziel der langfristigen regenerativen Therapie mittels künstlichen Herzgewebe für Patient:innen mit Myokardschäden zu verfolgen. Außerdem wäre die Evaluation von Kontraktionsanalysen zur Validitätsprüfung der vorliegenden Hypothese wünschenswert.

In anschließenden Tierversuchen wäre es interessant zu beobachten, inwieweit die hier in-vitro gezeigten Unterschiede zwischen den Geometrien in-vivo zum Tragen kommen. Es stellt sich die Frage inwieweit die geometrischen Formen das Zellüberleben, die elektrische Kopplung sowie die Funktionalität in-vivo beeinflussen.

Da es sich insgesamt in-vitro um ein nicht vaskularisiertes Gewebe handelt, gehen wichtige Forschungsansätze auf die Entwicklung von primitiven Kapillar/Gefäßsystemen, welche eine in-vitro bzw. in-vivo Vaskularisierung der Konstrukte ermöglichen. Forschungsansätze hierzu gab es in einem Rattenmodell, hier wurden in eine arterio-venöse Fistel im Bereich der Epigastrischen Gefäße Kardiomyozyten eingebracht. So war es möglich ein vaskularisiertes künstliches Herzgewebe zu kreieren. Im Folgenden konnte das nun vaskularisierte künstliche Herzgewebe in-vitro über einen arteriellen Zugang transfundiert und über einen venösen Abfluss drainiert werden. Zu klinischen Etablierung dieser Methode bestehen allerdings große Hürde, die nach aktuellem Forschungsstand schwer umsetzbar erscheinen (Matsusaki et al. 2019, Sekine and Okano 2021, Sekine et al. 2013).

Bis zur regelmäßigen Implantation eines in-vitro hergestellten künstlichen Herzgewebes ist es noch ein weiter Weg. Eine erst klinische Erprobung wird aktuell im Herzzentrum der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) in Zusammenarbeit mit der Pharmakologie in der klinischen Studie BioVAT-HF-DZHK20 zur „Sicherheit und Wirksamkeit von aus induzierten pluripotenten Stammzell-abgeleitetem menschlichem Herzmuskelgewebe bei terminaler Herzinsuffizienz“ durchgeführt (Grunert 2021, Stiefelhagen 2022).

Hier bleiben die Ergebnisse abzuwarten um dann auf deren Basis, weitere Studien zu initiieren, bevor eine routinemäßige klinische Anwendbarkeit von IPS-Zell Konstrukten zur kardialen Regenerationstherapie ein realistisches Szenario werden könnte.

6 Zusammenfassung

Künstliches Herzgewebe wird heutzutage effizient aus human induzierten pluripotenten Stammzellen generiert und stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung von Patient:innen mit terminaler Herzinsuffizienz dar. Ebenfalls findet es Anwendung in der in-vitro Wirkstofftestung. Um die Nährstoffversorgung im EHT in-vitro zu verbessern, ist die Optimierung der Geometrien obligat und war Ziel der vorliegenden Studie. Die Nährstoffversorgung erfolgt in-vitro ausschließlich per Diffusion, welche in kardialen Ersatzgeweben auf 80-100µm begrenzt ist. Das Oberflächen-Volumen-Verhältnis unterschiedlicher Formen wurde in der vorliegenden Studie mathematisch hergeleitet. Mathematisch wurden drei Geometrien mit unterschiedlichen Oberflächen-Volumen-Verhältnissen errechnet. Im Rahmen der Untersuchungen wurde eine Ring- und Infinityform mit gleichem Volumen aber unterschiedlicher Oberflächengröße verglichen. Als Standardform wurde eine Streifenform verwendet, welche als Kontrollstruktur mitanalysiert wurde. Das Zellüberleben wurde in einer Kultivierungsperiode quantitativ mittels RT-PCR-Assays und durchflusszytometrischen Analysen im Intervall von einer Woche überprüft. Darüber hinaus wurde das Zellüberleben in BLI Messungen nach lentiviraler Transduktion visualisiert. Histologien wurden zur qualitativen Beurteilung der Zelldichte und Zellverteilung angefertigt. In der vorliegenden Studie zeigte sich entsprechend der Ausgangshypothese ein besseres Zellüberleben in der Ringform. In RT-PCR Methoden (n=8) wurde eine höhere Expression von kardialen Troponin T in der Ringform mit Ct-Wert von 25.85 ± 1.37 ermittelt, vergleichend lag der Ct-Wert der Infinity-EHTs bei 28.41 ± 2.34 . In FACS Analysen (n=6) wurden 15% mehr kardiales Troponin T positiven Zellen im Ring EHT, mit $73\% \pm 12\%$, im Vergleich zum Infinity EHT mit $58\% \pm 11\%$, *p=0,04 evaluiert. Auch visuell konnte ein höheres Zellsterben in der Infinityform wahrgenommen werden. Die Photonenemission (n=8) lag an Tag sieben im Ring EHT bei $1,14 \cdot 10^6$ p/s, im Infinity EHT bei $8,47 \cdot 10^5$ p/s, *p<0,001. In der Histologie konnte die Zellverteilung von Troponin T- und Dystrophin-gefärbter Zellen in den Randbereichen des Gewebes präsentiert werden, mit einer Dichteabnahme im Gewebeinneren.

Insgesamt zeigt sich, dass eine Optimierung des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses einen positiven Einfluss auf das Zellüberleben im künstlichen Herzgewebe hat. Für eine routinemäßige klinische Anwendbarkeit bestehen jedoch noch signifikante Hürden

welche durch weitere Forschungsarbeiten adressiert werden müssen. So stellen eine in-vitro- sowie in-vivo Vaskularisierung eine große Hürde dar, um Konstrukte von größerer Dicke, unabhängig von Diffusionsbarrieren herstellen zu können. Des Weiteren stellt sich die Frage des idealen Verfahrens der Kardiomyozytengenerierung. Ein autologer Ansatz mit patienten-spezifischen IPS-Zellen wäre aus immunologischer Sicht wünschenswert, scheint aber aufgrund von großen regulatorischen, zeitlichen und kostentechnischen Einschränkungen als nicht realisierbar. Eine HLA-kompatible IPS-Zell Kardiomyozytentransplantation inklusive Immunsuppression erscheint aus aktueller Sicht als eine realistischere Option.

7 Summary

Engineered Heart Tissue (EHT) is a promising tool to repair heart muscle defects in-vivo and can additionally be used for pharmacological testing in-vitro. Due to the absence of an in-vitro vascularization, the geometry of EHTs crucially impacts nutrient and oxygen supply by diffusion capacity. We analyzed the surface-area-to-volume-ratio (AS/V) of different geometric forms to determine the ideal EHT shape in terms of cell survival in-vitro. Different geometries with varying mathematically derived AS/V ratios were calculated, a standard cylinder structure $AS/V=19\text{mm}^2/110\mu\text{l}^3$, a ring structure $AS/V=40\text{mm}^2/440\mu\text{l}^3$ and an infinity structure (figure of eight) $AS/V=26\text{mm}^2/440\mu\text{l}^3$. Custom-made casting molds were generated using 3D printing technologies. Cardiomyocytes were differentiated from human induced pluripotent stem cells (hiPSC) by modulating Wnt/ β -Catenin pathways. For EHT generation, cardiomyocytes were combined with fibrin and thrombin to create three-dimensional constructs. Cell viability was evaluated by a longitudinal cultivation process of one week. EHTs were analyzed by histology, quantitative Real Time-PCR assays and cytometric studies. Cell survival was additionally visualized using bioluminescence imaging (BLI) after lentiviral transduction of hiPS cells.

Using 3D-printed casting molds, spontaneously beating EHTs can be generated in various geometric shapes. Histological experiments showed a higher cell survival for the ring structure compared to the infinity structure. In both shapes, a dense network of Troponin-T positive cells was observed near the tissue surface while there was a lower cell number at the core of the EHT. The quantitative RT-PCR analyses (n=8) showed a higher Troponin-T gene expression in ring-shape, (Ct Mean=25.85 \pm 1.37) compared to infinity-shape (Ct Mean= 28.41 \pm 2.34). In cytometric studies (n=6) we evaluated 15% more Troponin-T cells in the ring-structure with 73% (\pm 12%), compared to infinity structure with 58% (\pm 11%), *p=0.04. BLI (n=8) visualized significantly higher cell death in the infinity-structure (ROI= ring:1.14*10⁶ p/s and infinity:8.47*10⁵ p/s, p<0.001) compared to the ring-structure.

3D-printing allows to create EHTs in all desired geometric shapes. Due to the absence of an in-vitro vascularization, surface-area-to-volume-ratio crucially impacts cell survival. Optimizing the geometry with a better surface-area-to-volume-ratio in structure A

demonstrated a significantly higher cell survival measured by RT-PCR, Bioluminescence imaging and cytometric studies.

However, there are still significant hurdles for routine clinical application which need to be addressed by further research. For example, in vitro as well as in vivo vascularization is a major hurdle to produce constructs of greater thickness, independent of diffusion barriers. Furthermore, the question of the ideal method of cardiomyocyte generation arises. An autologous approach using patient-specific IPS cells would be desirable from an immunological point of view, but seems to be unfeasible due to major regulatory, time, and cost constraints. HLA-compatible IPS cell cardiomyocyte transplantation including immunosuppression appears to be a more realistic option from the current perspective.

Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
A.	Arteria, Arterie
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintri-phosphat

B

BLI	Bioluminescence Imaging, Biolumineszenz Messungen
Bzw.	beziehungsweise

C

°C	Grad Celsius
cDNA	complementary-desoxyribonucleic acid, Komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	Cycle threshold, Schwellenwert

D

DAPT	Dual Antiplatelet herapie. duale Plättchentherapie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukelinsäure
dNTP	Desoxyribonukleintri-phosphat

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHT	Engineered heart tissue, künstliches Herzgewebe
Et al.	und weitere

F

FCS	Fetal calf serum, Fetales Kälberserum
-----	---------------------------------------

G

g	Gramm
G	x-fache Erdbeschleunigung
GUSB	Glucoronidase β

H

H.E.	Hämatoxylin/Eosin
------	-------------------

Abkürzungsverzeichnis

H ₂ O	Wasser
HiF-1 α	Hypoxie induzierbarer Faktor 1-alpha
HiF-1 β	Hypoxie induzierbarer Faktor 1-beta
hiPSC	human induzierte pluripotente Stammzelle
K	
KCL	Kaliumchlorid
KHK	koronare Herzkrankheit
KM	Kardiomyozyten
L	
l	Liter
Luc	Luciferase
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M	
M	Molmasse
mA	Milliampere
Min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	messenger-ribonuclein acid, Boten-Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
N	
n	Anzahl der untersuchten Proben, Replikate
N ₂	Stickstoff
NKM	Nicht-Kardiomyozyten-Medium
O	
O ₂	Sauerstoff
Oct-4	Octamer Binding Transcription Factor 4
P	
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCI	Perkutane coronar Intervention
pCO ₂	Partialdruck von Kohlenstoffdioxid
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyde
p.o.	per os
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangiographie
Q	
qPCR	quantitative real time polymerase chain reaction, quantitative Echtzeit-PCR
R	
RNA	ribonuclein acid, Ribonukleinsäure
Rpm	rounds per minute, Umdrehung pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-quantitative Echtzeit PCR
S	
s, sek	Sekunde
s.	siehe
SD	Standard deviation, Standardabweichung
T	
Tab.	Tabelle
TM	Trademark, eingetragenes Warenzeichen
U	
U	Unit, Einheit
u.a.	unter anderem
V	
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor, Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
W	
w	well, Mulde in Inkubationsplatte
X	
x	Multiplikationszeichen
Z	
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Generierung von Engineered Heart Tissue, erstellt mit BioRender.....	11
Abbildung 2: Differenzierung embryonaler Stammzellen.....	12
Abbildung 3: Schema der EF1a-Luciferase Firefly, https://resources.amsbio.com/Datasheets/Luc-LVP-man.pdf	28
Abbildung 5: A) Laser sintering 3D Drucker, https://www.sinterit.com/wp-content/uploads/2020/05/Sinterit-LISA-PRO-SPECIFICATION-1.pdf ,.....	33
Abbildung 6: Basis Konstruktion für 12-well Kulturplatten, A- Skizze, B- Konstruktion.....	34
Abbildung 7: Konstruktion "12-well-Ring"; A-Skizze, B-Konstruktion.....	34
Abbildung 8: Konstruktion "12-well-Infinity", A-Skizze, B-Konstruktion.....	34
Abbildung 9: Herstellung der EHT-Formen A- Schablonen aus hauseigenem 3D Drucker B und C- Herstellung der Silikonformen für die EHT-Generierung.....	35
Abbildung 10: A-Teflonplatzhalter (blau) in Agarose, B-Agaroseform nach Aushärtung.....	36
Abbildung 11: Silikonhalterung für Streifen-EHTs.....	36
Abbildung 12: EHTs in Silikonformen; A- „Ring“-EHT, B- „Infinity“-EHT.....	38
Abbildung 13: A-Ring- und Infinity EHT in 4%igem-PFA, B- fixiertes Ring-EHT, C- fixiertes Infinity EHT	38
Abbildung 14: A-Aufsicht auf Streifen-EHTs an Silikonposts, B-Hängende EHTs an Silikonposts	38
Abbildung 15: Lichtmikroskopische Aufnahme von human induzierten pluripotenten Stammzellen.....	57
Abbildung 16: Karyogramm der hiPSC Zellen (Gibco® Episomal hiPSC Line, A18945), in Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer.nat.Sigrid Fuchs, Zentrum für Humangenetik UKE.....	57
Abbildung 17: Gating Strategie zur Auswertung der FACS Daten mit FlowJo™: A) Darstellung der Gesamtpopulation (P0) B)Darstellung der Einzelzellen (P2) C) Gate für PE-A/ SSEA-3, D) Gate für FITC-A/ Tra-1-60, D) Histogramm PE-A/ SSEA-3, grau=neg. Kontrolle, schwarz=gefärbte Zellen F) Histogramm FITC-A/ Tra-1-60, grau=neg. Kontrolle, schwarz=gefärbte Zellen	58
Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse von hiPSC Zellen, SSEA-3 gefärbte Zellen 93,96% und Tra-1-60 gefärbte Zellen lagen bei 61,1%, n=6.	59
Abbildung 19: PCR Analyse von hiPSC Zellen vor Beginn der Differenzierung in Kardiomyozyten; A-Gapdh, B-Oct-4, C-Sox-2, D-c-Myc, E-Nanog, F-H2O Kontrollprobe.....	60
Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung auf SSEA-4 bei hiPSC Zellen	60
Abbildung 21: Kontrolle der Luciferase Gen Transduktion (rechts), Negativkontrolle (links) mittels Biolumineszenzmessungen	61

Abbildung 22: Validierung der Luciferase Gen Transduktion mittels PCR; A- DNA der Luc+ Kardiomyozyten, B- cDNA der Luc+ Kardiomyozyten, C- DNA der Luc negativen Kardiomyozyten, D- cDNA der Luc negativen Kardiomyozyten, E- H2O Kontrolle.....	61
Abbildung 23: Differenzierungsprotokoll von hiPSC zu Kardiomyozyten.....	62
Abbildung 24: Differenzierung der hiPSC Zellen zu Kardiomyozyten, 14 Tage.....	64
Abbildung 25: Gating Strategie zur Auswertung der FACS Daten mit FlowJo™-10 A) Darstellung der Gesamtpopulation (P0) B) Darstellung der Einzelzellen (P2) C) Gate für PE-A/ cTNT, D) D) Histogramm PE-A/ cTNT, grau=neg. Kontrolle, schwarz=gefärbte Zellen.....	65
Abbildung 26: Der Einfluss von Hungermedium nach einmaliger und zweimaliger Gabe bei ausdifferenzierten Kardiomyozyten, n=6, *=p-Wert <0,019	66
Abbildung 27: PCR Titrations-Analyse auf kardiales Troponin T unter der Differenzierung zu den Zeitpunkten Tag 6 und Tag 20 vergleichend mit human induzierten pluripotenten Stammzellen.....	67
Abbildung 28: Immunzytochemische Färbung auf DAPI und kardiales Troponin T bei enddifferenzierten Kardiomyozyten.....	67
Abbildung 29: Analyse der Kardiomyozytendifferenzierung auf Genexpressionslevel,n=4	70
Abbildung 30: GUSB Expression in Kardiomyozyten unter Hypoxie, n=4.....	71
Abbildung 31: Troponin T Expression in Kardiomyozyten unter Hypoxie, n=4	71
Abbildung 32: Veränderung der GUSB und Troponin T Expression unter Hypoxie in hiPSC-Kardiomyozyten, n=4.....	72
Abbildung 33: Relative Genexpression von HiF-1 α unter Hypoxie in hiPSC-Kardiomyozyten, n=4	73
Abbildung 34: GUSB Expression im zeitlichen Verlauf von sieben Tagen im standardisierten Streifen-EHT (links) und im Ring- und Infinity-EHTs (rechts), n=8	74
Abbildung 35: GUSB Expression im zeitlichen Verlauf von sieben Tagen der standardisierten Streifen-EHTs (links) und der Ring- und Infinity-EHTs (rechts), n=8.....	75
Abbildung 36: Troponin T Expression im zeitlichen Verlauf von sieben Tagen der standardisierten Streifen-EHTs (links) und der Ring- und Infinity-EHTs(rechts), n=8.....	76
Abbildung 37: Troponin T Expressionsabnahme im zeitlichen Verlauf von sieben Tagen der standardisierten Streifen-EHTs (links) und der Ring- und Infinity-EHTs (rechts), n=8.....	76
Abbildung 38: Die Expression von GUSB und Troponin T im Ring und Infinity EHT im zeitlichen Verlauf von 7 Tagen, n=8 , Für Troponin T Ring: Ct Mean=25.85 \pm 1.37 und Infinity: Ct Mean= 28.41 \pm 2.34, p-Wert=0,152.....	77
Abbildung 39: Troponin T positive Zellen in standardisierten Streifen-EHTs (links) und in Ring- und Infinity-EHTs (rechts) im zeitlichen Verlauf von 7 Tagen, n=6.....	78

Abbildung 40: Die Expression von Troponin T im Ring und Infinity EHT im zeitlichen Verlauf von 7 Tagen, Ring: 73% ($\pm 12\%$) und Infinity: 58% ($\pm 11\%$) n=6, *p-Wert 0,04.	78
Abbildung 41: Biolumineszenzsignale der verschiedenen EHT Formen im zeitlichen Verlauf	80
Abbildung 42: Photonenemission im Streifen-EHT über den Zeitraum von einer Woche, n=881	
Abbildung 43: Photonenemission über den Zeitraum von einer Woche im Ring- und Infinity-EHT, n=8, ROI an Tag 7. im Ring EHT=1.14*10 ⁶ p/s und im Infinity-EHT=8.47*10 ⁵ p/s, *p-Wert<0,001.....	81
Abbildung 44: Streifen-EHT auf Teflonhalterung.....	82
Abbildung 45: Querschnittshistologie, H-E, Streifen-EHT/ D=778 μ m	82
Abbildung 46: 4%-PFA Fixiertes Ring-EHT.....	83
Abbildung 47: 4%-PFA fixiertes Infinity-EHT	83
Abbildung 48: 4%-PFA fixiertes Infinity-EHT	83
Abbildung 49: Ring-EHT, Querschnitt, H-E/ D=682 μ m.....	83
Abbildung 50: Infinity-EHT (Mitte), Querschnitt, H-E/ D=929 μ m	83
Abbildung 51: Infinity-EHT (Rand), Querschnitt, H-E/ D=302 μ m	83
Abbildung 52: Zellanordnung im EHT an Tag 7, IHC Färbung auf DAPI und Troponin T, Querschnitt Aufnahme	84
Abbildung 53: Dystrophin gefärbtes EHT im Querschnitt, A) Gesamtübersicht zur Quantifizierung der Zellverteilung im EHT B) 10x Vergrößerung der Dystrophin gefärbten Randbereiche.....	84
Abbildung 54: Natives Myokard, Immunhistochemische Färbung auf DAPI, Troponin T und alpha-Actinin.....	85
Abbildung 55: Dystrophin gefärbtes Myokard nativ A) Übersichtsaufnahme B) 10x Vergrößerung	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hilfsmittel und Geräte	18
Tabelle 2: Chemikalien und Lösungen	20
Tabelle 3: Zellkulturmedien	22
Tabelle 4: Primerliste	24
Tabelle 5: Standardpipettierprotokoll für die Testung auf Mycoplasmen.....	29
Tabelle 6: Thermo-Cycler Profil für die Testung auf Mycoplasmen	30
Tabelle 13: Standardpipettierprotokoll der reversen Transkription	41
Tabelle 14: Thermo-Cycler Profil für die reverse Transkription	42
Tabelle 15: Standardpipettierprotokoll für PCR.....	42
Tabelle 16: Standard Thermo-Cycler Profil für PCR.....	43
Tabelle 17: Thermo-Cycler Profil für PCR mit Primern gegen humanes NANOG.....	43
Tabelle 18: Standardpipettierprotokoll für qPCR.....	45
Tabelle 19: Thermo-Cycler Profil für qPCR	45
Tabelle 7: Dehydrierungszyklus.....	47
Tabelle 8: Standardprotokoll zur Deparaffinierung	48
Tabelle 9: Hämatoxylin-Eosin-Färbeprotokoll.....	49
Tabelle 10: Primärantikörper für Immunzytochemie und Immunhistochemie	51
Tabelle 11: Sekundärantikörper für Immunzytochemie und Immunhistochemie	52
Tabelle 12: Färbeprotokoll für Immunzytochemie und Immunhistochemie.....	53

Literaturverzeichnis

Al-Khatib S. M., Granger C. B., Huang Y., Lee K. L., Califf R. M., Simoons M. L., Armstrong P. W., Van de Werf F., White H. D., Simes R. J., Moliterno D. J., Topol E. J. and Harrington R. A. Sustained ventricular arrhythmias among patients with acute coronary syndromes with no ST-segment elevation: incidence, predictors, and outcomes. *Circulation*. 2002;106(3):309-12.

Anderson P. A., Greig A., Mark T. M., Malouf N. N., Oakeley A. E., Ungerleider R. M., Allen P. D. and Kay B. K. Molecular basis of human cardiac troponin T isoforms expressed in the developing, adult, and failing heart. *Circ Res*. 1995;76(4):681-6.

Anzai T. Inflammatory Mechanisms of Cardiovascular Remodeling. *Circ J*. 2018;82(3):629-35.

Arieli R., Ben-Haim S. A., Hayam G. and Edoute Y. Heart energetic efficiency in O₂-exposed rats studied in isolated working heart. *J Appl Physiol* (1985). 1992;73(6):2289-96.

Balafkan N., Mostafavi S., Schubert M., Siller R., Liang K. X., Sullivan G. and Bindoff L. A. A method for differentiating human induced pluripotent stem cells toward functional cardiomyocytes in 96-well microplates. *Scientific Reports*. 2020;10(1):18498.

Bargehr J., Ong L. P., Colzani M., Davaapil H., Hofsteen P., Bhandari S., Gambardella L., Le Novère N., Iyer D., Sampaziotis F., Weinberger F., Bertero A., Leonard A., Bernard W. G., Martinson A., Figg N., Regnier M., Bennett M. R., Murry C. E. and Sinha S. Epicardial cells derived from human embryonic stem cells augment cardiomyocyte-driven heart regeneration. *Nat Biotechnol*. 2019;37(8):895-906.

Batalov I. and Feinberg A. W. Differentiation of Cardiomyocytes from Human Pluripotent Stem Cells Using Monolayer Culture. *Biomark Insights*. 2015;10(Suppl 1):71-6.

Bay B., Goßling A., Blaum C. M., Kroeger F., Koppe L., Lorenz T., Koester L., Clemmensen P., Westermann D., Kirchhof P., Blankenberg S., Zeller T., Seiffert M., Waldeyer C. and Brunner F. J. Association of High-Sensitivity Troponin T and I Blood Concentrations With All-Cause Mortality and Cardiovascular Outcome in Stable Patients-Results From the INTERCATH Cohort. *J Am Heart Assoc*. 2022;11(17):e024516.

Bendall S. C., Stewart M. H., Menendez P., George D., Vijayaragavan K., Werbowetski-Ogilvie T., Ramos-Mejia V., Rouleau A., Yang J., Bossé M., Lajoie G. and Bhatia M. IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature*. 2007;448(7157):1015-21.

Benner A., Patel A. K., Singh K. and Dua A. Physiology, Bohr Effect. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.

Bhatt D. L., Lopes R. D. and Harrington R. A. Diagnosis and Treatment of Acute Coronary Syndromes: A Review. *Jama*. 2022;327(7):662-75.

Braile M., Marcella S., Cristinziano L., Galdiero M. R., Modestino L., Ferrara A. L., Varricchi G., Marone G. and Loffredo S. VEGF-A in Cardiomyocytes and Heart Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15).

Breckwoldt K. Kardiologie Gewebeersatztherapie mittels künstlichem Herzgewebe aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen. 2014.

Breckwoldt K., Letuffe-Brenière D., Mannhardt I., Schulze T., Ulmer B., Werner T., Benzin A., Klampe B., Reinsch M. C., Laufer S., Shibamiya A., Prondzynski M., Mearini G., Schade D., Fuchs S., Neuber C., Krämer E., Saleem U., Schulze M. L., Rodriguez M. L., Eschenhagen T. and Hansen A. Differentiation of cardiomyocytes and generation of human engineered heart tissue. *Nat Protoc*. 2017;12(6):1177-97.

Breckwoldt K., Weinberger F. and Eschenhagen T. Heart regeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(7 Pt B):1749-59.

Burrige P. W., Matsa E., Shukla P., Lin Z. C., Churko J. M., Ebert A. D., Lan F., Diecke S., Huber B., Mordwinkin N. M., Plews J. R., Abilez O. J., Cui B., Gold J. D. and Wu J. C. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nature Methods*. 2014;11(8):855-60.

Burrige P. W., Thompson S., Millrod M. A., Weinberg S., Yuan X., Peters A., Mahairaki V., Koliatsos V. E., Tung L. and Zambidis E. T. A universal system for highly efficient cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells that eliminates interline variability. *PLoS One*. 2011;6(4):e18293.

Bustin S. INVITED REVIEW Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*. 2002;29:23-39.

Bustin S., Benes V., Nolan T. and Pfaffl M. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of molecular endocrinology*. 2005;34(3):597-601.

Caspi O., Huber I., Kehat I., Habib M., Arbel G., Gepstein A., Yankelson L., Aronson D., Beyar R. and Gepstein L. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(19):1884-93.

Chaulin A. M. and Duplyakov D. V. On the potential effect of circadian rhythms of cardiac troponins on the diagnosis of acute myocardial infarction. *Signa Vitae*. 2021;17(3):79-84.

Chen G., Gulbranson D. R., Hou Z., Bolin J. M., Ruotti V., Probasco M. D., Smuga-Otto K., Howden S. E., Diol N. R., Propson N. E., Wagner R., Lee G. O., Antosiewicz-Bourget J., Teng J. M. and Thomson J. A. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods*. 2011;8(5):424-9.

Chen O. and Qian L. Direct Cardiac Reprogramming: Advances in Cardiac Regeneration. *Biomed Res Int*. 2015;2015:580406.

Chen V. C., Ye J., Shukla P., Hua G., Chen D., Lin Z., Liu J. C., Chai J., Gold J., Wu J., Hsu D. and Couture L. A. Development of a scalable suspension culture for cardiac differentiation from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*. 2015;15(2):365-75.

Chesnaye N. C., Szummer K., Bárány P., Heimbürger O., Magin H., Almquist T., Uhlin F., Dekker F. W., Wanner C., Jager K. J. and Evans M. Association Between Renal Function and Troponin T Over Time in Stable Chronic Kidney Disease Patients. *J Am Heart Assoc*. 2019;8(21):e013091.

Chu A. J., Zhao E. J., Chiao M. and Lim C. J. Co-culture of induced pluripotent stem cells with cardiomyocytes is sufficient to promote their differentiation into cardiomyocytes. *PLoS One*. 2020;15(4):e0230966.

Collet J. P., Thiele H., Barbato E., Barthélémy O., Bauersachs J., Bhatt D. L., Dendale P., Dorobantu M., Edvardsen T., Folliguet T., Gale C. P., Gilard M., Jobs A., Jüni P., Lambrinou E., Lewis B. S., Mehilli J., Meliga E., Merkely B., Mueller C., Roffi M., Rutten F. H., Sibbing D. and Siontis G. C. M. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2021;42(14):1289-367.

Collinson P. O. and Gaze D. C. Biomarkers of cardiovascular damage. *Med Princ Pract*. 2007;16(4):247-61.

Conradi L., Schmidt S., Neofytou E., Deuse T., Peters L., Eder A., Hua X., Hansen A., Robbins R. C., Beygui R. E., Reichenspurner H., Eschenhagen T. and Schrepfer S. Immunobiology of fibrin-based engineered heart tissue. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(6):625-31.

Curtis M. W. and Russell B. Cardiac tissue engineering. *J Cardiovasc Nurs*. 2009;24(2):87-92.

D'Arcy M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-92.

Datta Chaudhuri R., Banik A., Mandal B. and Sarkar S. Cardiac-specific overexpression of HIF-1 α during acute myocardial infarction ameliorates cardiomyocyte apoptosis via differential regulation of hypoxia-inducible pro-apoptotic and anti-oxidative genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;537:100-8.

Devang R. A., Sink E., Narayan S. P., Abdel-Hafiz M., Mestroni L. and Peña B. Nanomaterials for Cardiac Tissue Engineering. *Molecules.* 2020;25(21).

Edgar L., Pu T., Porter B., Aziz J. M., La Pointe C., Asthana A. and Orlando G. Regenerative medicine, organ bioengineering and transplantation. *Br J Surg.* 2020;107(7):793-800.

Edinger M., Sweeney T. J., Tucker A. A., Olomu A. B., Negrin R. S. and Contag C. H. Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models. *Neoplasia.* 1999;1(4):303-10.

Elbadawi A., Elgendy I. Y., Mahmoud K., Barakat A. F., Mentias A., Mohamed A. H., Ogunbayo G. O., Megaly M., Saad M., Omer M. A., Paniagua D., Abbott J. D. and Jneid H. Temporal Trends and Outcomes of Mechanical Complications in Patients With Acute Myocardial Infarction. *JACC Cardiovasc Interv.* 2019;12(18):1825-36.

Eschenhagen T. and Zimmermann W. H. Engineering myocardial tissue. *Circ Res.* 2005;97(12):1220-31.

Fan D., Wu H., Pan K., Peng H. and Wu R. Regenerating Damaged Myocardium: A Review of Stem-Cell Therapies for Heart Failure. *Cells.* 2021;10(11).

Finklea F. B., Tian Y., Kerscher P., Seeto W. J., Ellis M. E. and Lipke E. A. Engineered cardiac tissue microsphere production through direct differentiation of hydrogel-encapsulated human pluripotent stem cells. *Biomaterials.* 2021;274:120818.

Flora G. D. and Nayak M. K. A Brief Review of Cardiovascular Diseases, Associated Risk Factors and Current Treatment Regimes. *Curr Pharm Des.* 2019;25(38):4063-84.

Fonoudi H., Ansari H., Abbasalizadeh S., Larijani M. R., Kiani S., Hashemizadeh S., Zarchi A. S., Bosman A., Blue G. M., Pahlavan S., Perry M., Orr Y., Mayorchak Y., Vandenberg J., Talkhabi M., Winlaw D. S., Harvey R. P., Aghdami N. and Baharvand H. A Universal and Robust Integrated Platform for the Scalable Production of Human Cardiomyocytes From Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(12):1482-94.

Frank S., Zhang M., Schöler H. R. and Greber B. Small molecule-assisted, line-independent maintenance of human pluripotent stem cells in defined conditions. *PLoS One.* 2012;7(7):e41958.

Freund C., Ward-van Oostwaard D., Monshouwer-Kloots J., van den Brink S., van Rooijen M., Xu X., Zweigerdt R., Mummery C. and Passier R. Insulin redirects differentiation from cardiogenic mesoderm and endoderm to neuroectoderm in differentiating human embryonic stem cells. *Stem cells* (Dayton, Ohio). 2008;26(3):724-33.

Furuta A., Miyoshi S., Itabashi Y., Shimizu T., Kira S., Hayakawa K., Nishiyama N., Tanimoto K., Hagiwara Y., Satoh T., Fukuda K., Okano T. and Ogawa S. Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo. *Circ Res.* 2006;98(5):705-12.

Garbern J. C. and Lee R. T. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell.* 2013;12(6):689-98.

Gell D. A. Structure and function of haemoglobins. *Blood Cells Mol Dis.* 2018;70:13-42.

Giacomelli E., Meraviglia V., Campostrini G., Cochrane A., Cao X., van Helden R. W. J., Krotenberg Garcia A., Mircea M., Kostidis S., Davis R. P., van Meer B. J., Jost C. R., Koster A. J., Mei H., Míguez D. G., Mulder A. A., Ledesma-Terrón M., Pompilio G., Sala L., Salvatori D. C. F., Sliker R. C., Sommariva E., de Vries A. A. F., Giera M., Semrau S., Tertoolen L. G. J., Orlova V. V., Bellin M. and Mummery C. L. Human-iPSC-Derived Cardiac Stromal Cells Enhance Maturation in 3D Cardiac Microtissues and Reveal Non-cardiomyocyte Contributions to Heart Disease. *Cell Stem Cell.* 2020;26(6):862-79.e11.

Gibson U. E., Heid C. A. and Williams P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome research.* 1996;6(10):995-1001.

Goldfracht I., Efraim Y., Shinnawi R., Kovalev E., Huber I., Gepstein A., Arbel G., Shaheen N., Tiburcy M., Zimmermann W. H., Machluf M. and Gepstein L. Engineered heart tissue models from hiPSC-derived cardiomyocytes and cardiac ECM for disease modeling and drug testing applications. *Acta Biomater.* 2019;92:145-59.

Gonzalez R., Lee J. W. and Schultz P. G. Stepwise chemically induced cardiomyocyte specification of human embryonic stem cells. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011;50(47):11181-5.

Göbwald A., Schienkiewitz A., Nowossadeck E. and Busch M. A. Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* 2013;56(5):650-5.

Gourine A. V. and Funk G. D. On the existence of a central respiratory oxygen sensor. *J Appl Physiol* (1985). 2017;123(5):1344-9.

Greijer A. E., van der Groep P., Kemming D., Shvarts A., Semenza G. L., Meijer G. A., van de Wiel M. A., Belien J. A., van Diest P. J. and van der Wall E. Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J Pathol.* 2005;206(3):291-304.

Gross J. Molekulare Grundlagen von Hypoxie und Asphyxie. *Molekularmedizinische Grundlagen von fetalen und neonatalen Erkrankungen*: Springer; 2005. p. 573-605.

Grunert D. Klinische Forschung: ÑPflasterè aus Stammzellen. *Dtsch Arztebl International.* 2021;118(15):[14].

Hansen A., Eder A., Bönstrup M., Flato M., Mewe M., Schaaf S., Aksehirlioglu B., Schwoerer A. P., Uebeler J. and Eschenhagen T. Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circ Res.* 2010;107(1):35-44.

Haraguchi Y., Shimizu T., Yamato M. and Okano T. Concise review: cell therapy and tissue engineering for cardiovascular disease. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(2):136-41.

Hescheler J., Fleischmann B. K., Lentini S., Maltsev V. A., Rohwedel J., Wobus A. M. and Addicks K. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res.* 1997;36(2):149-62.

Hirata H., Kawamata S., Murakami Y., Inoue K., Nagahashi A., Tosaka M., Yoshimura N., Miyamoto Y., Iwasaki H., Asahara T. and Sawa Y. Coexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha and fetal liver kinase 1 enhances cardiogenic potential in embryonic stem cell differentiation in vitro. *J Biosci Bioeng.* 2007;103(5):412-9.

Honig C. R., Connett R. J. and Gayeski T. E. O₂ transport and its interaction with metabolism; a systems view of aerobic capacity. *Med Sci Sports Exerc.* 1992;24(1):47-53.

Javier M., Javier Delmo E. M. and Hetzer R. Evolution of heart transplantation since Barnard's first. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2021;11(1):171-82.

Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol.* 2011;589(Pt 6):1251-8.

Jenkins F. J. Basic methods for the detection of PCR products. *PCR Methods Appl.* 1994;3(5):S77-82.

Jobs A. ESC-Leitlinie 2020: akutes Koronarsyndrom ohne persistierende ST-Strecken-Hebungen. *Herz.* 2021;46(1):3-13.

Kapur N. K., Alkhouli M. A., DeMartini T. J., Faraz H., George Z. H., Goodwin M. J., Hernandez-Montfort J. A., Iyer V. S., Josephy N., Kalra S., Kaki A., Karas R. H., Kimmelstiel C. D., Koenig G. C., Lau E., Lotun K., Madder R. D., Mannino S. F., Meraj P. M., Moreland J. A., Moses J. W., Kim R. L., Schreiber T. L., Udelson J. E., Witzke C., Wohns D. H. W. and O'Neill W. W. Unloading the Left Ventricle Before Reperfusion in Patients With Anterior ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *Circulation*. 2019;139(3):337-46.

Kataoka H., Takakura N., Nishikawa S., Tsuchida K., Kodama H., Kunisada T., Risau W., Kita T. and Nishikawa S. I. Expressions of PDGF receptor alpha, c-Kit and Flk1 genes clustering in mouse chromosome 5 define distinct subsets of nascent mesodermal cells. *Dev Growth Differ*. 1997;39(6):729-40.

Kattman S. J., Witty A. D., Gagliardi M., Dubois N. C., Niapour M., Hotta A., Ellis J. and Keller G. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell*. 2011;8(2):228-40.

Ke Q. and Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006;70(5):1469-80.

Kedhi E., Fabris E., Van Der Ent M., Buszman P., Von Birgelen C., Roolvink V., Zurakowski A., Schotborgh C. E., Hoorntje J. C. and Eek C. H. Six months versus 12 months dual antiplatelet therapy after drug-eluting stent implantation in ST-elevation myocardial infarction (DAPT-STEMI): randomised, multicentre, non-inferiority trial. *bmj*. 2018;363.

Kehoe D. E., Jing D., Lock L. T. and Tzanakakis E. S. Scalable stirred-suspension bioreactor culture of human pluripotent stem cells. *Tissue Engineering Part A*. 2010;16(2):405-21.

Kempf H., Olmer R., Kropp C., Rückert M., Jara-Avaca M., Robles-Diaz D., Franke A., Elliott D. A., Wojciechowski D., Fischer M., Roa Lara A., Kensah G., Gruh I., Haverich A., Martin U. and Zweigerdt R. Controlling expansion and cardiomyogenic differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture. *Stem Cell Reports*. 2014;3(6):1132-46.

Kim H., Wu J., Ye S., Tai C. I., Zhou X., Yan H., Li P., Pera M. and Ying Q. L. Modulation of β -catenin function maintains mouse epiblast stem cell and human embryonic stem cell self-renewal. *Nat Commun*. 2013;4:2403.

Kim J. B., Urban K., Cochran E., Lee S., Ang A., Rice B., Bata A., Campbell K., Coffee R., Gorodinsky A., Lu Z., Zhou H., Kishimoto T. K. and Lassota P. Non-invasive detection of a small number of bioluminescent cancer cells in vivo. *PLoS One*. 2010;5(2):e9364.

Laflamme M. A., Chen K. Y., Naumova A. V., Muskheli V., Fugate J. A., Dupras S. K., Reinecke H., Xu C., Hassanipour M., Police S., O'Sullivan C., Collins L., Chen Y., Minami E., Gill E. A., Ueno S., Yuan C., Gold J. and Murry C. E. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol.* 2007;25(9):1015-24.

Landvogt N. Nicht-invasive Darstellung der Peritonealkarzinose im Mausmodell mittels PET und Biolumineszenz – Imaging sowie Bewertung der beiden Methoden hinsichtlich ihrer Sensitivität. 2009.

Lanner F. and Rossant J. The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development.* 2010;137(20):3351-60.

Lee L. G., Connell C. R. and Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(16):3761-6.

Leenaars M. and Hendriksen C. F. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *Ilar j.* 2005;46(3):269-79.

Lepperhof V., Polchynski O., Kruttwig K., Brüggemann C., Neef K., Drey F., Zheng Y., Ackermann J. P., Choi Y. H., Wunderlich T. F., Hoehn M., Hescheler J. and Sarić T. Bioluminescent imaging of genetically selected induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes after transplantation into infarcted heart of syngeneic recipients. *PLoS One.* 2014;9(9):e107363.

Levenstein M. E., Ludwig T. E., Xu R. H., Llanas R. A., VanDenHeuvel-Kramer K., Manning D. and Thomson J. A. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells.* 2006;24(3):568-74.

Li R. K., Yau T. M., Weisel R. D., Mickle D. A., Sakai T., Choi A. and Jia Z. Q. Construction of a bioengineered cardiac graft. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000;119(2):368-75.

Lian X., Zhang J., Zhu K., Kamp T. J. and Palecek S. P. 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.* 2013;31(3):447-57.

Libby P. and Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation.* 2005;111(25):3481-8.

Loewe A., Wülfers E. M. and Seemann G. Cardiac ischemia-insights from computational models. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol.* 2018;29(1):48-56.

- Löffler G. Elektronentransport und oxidative Phosphorylierung. *Biochemie und Pathobiochemie*: Springer; 1998. p. 494-518.
- Loor G. and Schumacker P. T. Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia–reperfusion. *Cell Death & Differentiation*. 2008;15(4):686-90.
- Lu J., Ma Z., Hsieh J. C., Fan C. W., Chen B., Longgood J. C., Williams N. S., Amatruda J. F., Lum L. and Chen C. Structure-activity relationship studies of small-molecule inhibitors of Wnt response. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19(14):3825-7.
- Lü S., Li Y., Gao S., Liu S., Wang H., He W., Zhou J., Liu Z., Zhang Y., Lin Q., Duan C., Yang X. J. and Wang C. Engineered heart tissue graft derived from somatic cell nuclear transferred embryonic stem cells improve myocardial performance in infarcted rat heart. *J Cell Mol Med*. 2010;14(12):2771-9.
- Lyamichev V., Brow M. A. and Dahlberg J. E. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science*. 1993;260(5109):778-83.
- Magdy T., Schuldt A. J., Wu J. C., Bernstein D. and Burridge P. W. Human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived cells to assess drug cardiotoxicity: opportunities and problems. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2018;58:83.
- Majid Q. A., Fricker A. T. R., Gregory D. A., Davidenko N., Hernandez Cruz O., Jabbour R. J., Owen T. J., Basnett P., Lukasiewicz B., Stevens M., Best S., Cameron R., Sinha S., Harding S. E. and Roy I. Natural Biomaterials for Cardiac Tissue Engineering: A Highly Biocompatible Solution. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:554597.
- Majno G. and Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995;146(1):3-15.
- Martins-Neves S. R., Paiva-Oliveira D. I., Fontes-Ribeiro C., Bovée J., Cleton-Jansen A. M. and Gomes C. M. F. IWR-1, a tankyrase inhibitor, attenuates Wnt/ β -catenin signaling in cancer stem-like cells and inhibits in vivo the growth of a subcutaneous human osteosarcoma xenograft. *Cancer Lett*. 2018;414:1-15.
- Matsumoto T. and Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*. 2001;2001(112):re21.
- Matsusaki M., Ikeguchi H., Kubo C., Sato H., Kuramochi Y. and Takagi D. Fabrication of Perfusable Pseudo Blood Vessels by Controlling Sol–Gel Transition of Gellan Gum Templates. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2019;5(11):5637-43.

McKavanagh P., Zawadowski G. and Cantor W. J. Utilization of PCI After Fibrinolysis. In: Watson TJ, Ong PJL, Tchong JE, editors. Primary Angioplasty: A Practical Guide. Singapore: Springer

Copyright 2018, The Author(s). 2018. p. 53-67.

Medvedev S. P., Shevchenko A. I. and Zakian S. M. Molecular basis of Mammalian embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Acta Naturae*. 2010;2(3):30-46.

Meyers H. P., Bracey A., Lee D., Lichtenheld A., Li W. J., Singer D. D., Kane J. A., Dodd K. W., Meyers K. E., Thode H. C., Shroff G. R., Singer A. J. and Smith S. W. Comparison of the ST-Elevation Myocardial Infarction (STEMI) vs. NSTEMI and Occlusion MI (OMI) vs. NOMI Paradigms of Acute MI. *J Emerg Med*. 2021;60(3):273-84.

Michenkova M., Taki S., Blosser M. C., Hwang H. J., Kowatz T., Moss F. J., Occhipinti R., Qin X., Sen S., Shinn E., Wang D., Zeise B. S., Zhao P., Malmstadt N., Vahedi-Faridi A., Tajkhorshid E. and Boron W. F. Carbon dioxide transport across membranes. *Interface Focus*. 2021;11(2):20200090.

Minchenko O., Opentanova I. and Caro J. Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett*. 2003;554(3):264-70.

Miyagawa S., Sawa Y., Sakakida S., Taketani S., Kondoh H., Memon I. A., Imanishi Y., Shimizu T., Okano T. and Matsuda H. Tissue cardiomyoplasty using bioengineered contractile cardiomyocyte sheets to repair damaged myocardium: their integration with recipient myocardium. *Transplantation*. 2005;80(11):1586-95.

Moreira Rde C., Haddad A. F., Silva S. A., Souza A. L., Tuche F. A., Oliveira M. A., Mesquita C. T., Rochitte C. E., Borojevic R. and Dohmann H. F. Intracoronary stem-cell injection after myocardial infarction: microcirculation sub-study. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(5):420-6.

Moretti A., Caron L., Nakano A., Lam J. T., Bernshausen A., Chen Y., Qyang Y., Bu L., Sasaki M., Martin-Puig S., Sun Y., Evans S. M., Laugwitz K.-L. and Chien K. R. Multipotent Embryonic *Isl1*⁺ Progenitor Cells Lead to Cardiac, Smooth Muscle, and Endothelial Cell Diversification. *Cell*. 2006;127(6):1151-65.

Müller-Esterl W. Oxidative Phosphorylierung–Elektronentransport und ATP-Synthese. *Biochemie*: Springer; 2018. p. 615-30.

Mummery C. L., Zhang J., Ng E. S., Elliott D. A., Elefanty A. G. and Kamp T. J. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ Res*. 2012;111(3):344-58.

Naito H., Melnychenko I., Didié M., Schneiderbanger K., Schubert P., Rosenkranz S., Eschenhagen T. and Zimmermann W. H. Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I72-8.

Nakajima Y., Sakabe M., Matsui H., Sakata H., Yanagawa N. and Yamagishi T. Heart development before beating. *Anat Sci Int*. 2009;84(3):67-76.

Nauck M., Hoffmann M. M., Wieland H. and März W. Evaluation of the apo E genotyping kit on the LightCycler. *Clin Chem*. 2000;46(5):722-4.

Nazarenko I., Lowe B., Darfler M., Ikonomi P., Schuster D. and Rashtchian A. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(9):e37.

Neumann J. T., Twerenbold R., Ojeda F., Sörensen N. A., Chapman A. R., Shah A. S. V., Anand A., Boeddinghaus J., Nestelberger T., Badertscher P., Mokhtari A., Pickering J. W., Troughton R. W., Greenslade J., Parsonage W., Mueller-Hennesen M., Gori T., Jernberg T., Morris N., Liebetrau C., Hamm C., Katus H. A., Münzel T., Landmesser U., Salomaa V., Iacoviello L., Ferrario M. M., Giampaoli S., Kee F., Thorand B., Peters A., Borchini R., Jørgensen T., Söderberg S., Sans S., Tunstall-Pedoe H., Kuulasmaa K., Renné T., Lackner K. J., Worster A., Body R., Ekelund U., Kavsak P. A., Keller T., Lindahl B., Wild P., Giannitsis E., Than M., Cullen L. A., Mills N. L., Mueller C., Zeller T., Westermann D. and Blankenberg S. Application of High-Sensitivity Troponin in Suspected Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2019;380(26):2529-40.

Niwa H., Ogawa K., Shimosato D. and Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*. 2009;460(7251):118-22.

O'Gara P. T., Kushner F. G., Ascheim D. D., Casey D. E., Jr., Chung M. K., de Lemos J. A., Ettinger S. M., Fang J. C., Fesmire F. M., Franklin B. A., Granger C. B., Krumholz H. M., Linderbaum J. A., Morrow D. A., Newby L. K., Ornato J. P., Ou N., Radford M. J., Tamis-Holland J. E., Tommaso C. L., Tracy C. M., Woo Y. J. and Zhao D. X. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(4):e78-e140.

Okita K., Ichisaka T. and Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007;448(7151):313-7.

Orlando G., Wood K. J., Stratta R. J., Yoo J. J., Atala A. and Soker S. Regenerative medicine and organ transplantation: past, present, and future. *Transplantation*. 2011;91(12):1310-7.

Ott H. C., Matthiesen T. S., Goh S.-K., Black L. D., Kren S. M., Netoff T. I. and Taylor D. A. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*. 2008;14(2):213-21.

Papadaki M., Bursac N., Langer R., Merok J., Vunjak-Novakovic G. and Freed L. E. Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(1):H168-78.

Park K. C., Gaze D. C., Collinson P. O. and Marber M. S. Cardiac troponins: from myocardial infarction to chronic disease. *Cardiovasc Res*. 2017;113(14):1708-18.

Parker W. A. and Storey R. F. Long-term antiplatelet therapy following myocardial infarction: implications of PEGASUS-TIMI 54. *Heart*. 2016;102(10):783-9.

Pavadai E., Rynkiewicz M. J., Ghosh A. and Lehman W. Docking Troponin T onto the Tropomyosin Overlapping Domain of Thin Filaments. *Biophys J*. 2020;118(2):325-36.

Pecha S., Yorgan K., Röhl M., Geertz B., Hansen A., Weinberger F., Sehner S., Ehmke H., Reichenspurner H., Eschenhagen T. and Schwoerer A. Human iPS cell-derived engineered heart tissue does not affect ventricular arrhythmias in a guinea pig cryo-injury model. *Scientific Reports*. 2019;9.

Peng Y., Xie M., Duan X., Hu L., Yu J., Zeng S., Wang Y., Ouyang Q., Lu G., Lin G. and Sun Y. Generation of a luciferase-expressing human embryonic stem cell line: NERCe002-A-2. *Stem Cell Res*. 2018;28:172-6.

Perron A. D. and Sweeney T. Arrhythmic complications of acute coronary syndromes. *Emerg Med Clin North Am*. 2005;23(4):1065-82.

Piccini J. P., White J. A., Mehta R. H., Lokhnygina Y., Al-Khatib S. M., Tricoci P., Pollack C. V., Jr., Montalescot G., Van de Werf F., Gibson C. M., Giugliano R. P., Califf R. M., Harrington R. A. and Newby L. K. Sustained ventricular tachycardia and ventricular fibrillation complicating non-ST-segment-elevation acute coronary syndromes. *Circulation*. 2012;126(1):41-9.

Pomeroy J. E., Helfer A. and Bursac N. Biomaterializing the promise of cardiac tissue engineering. *Biotechnol Adv*. 2020;42:107353.

Prabhakar N. R. and Semenza G. L. Oxygen Sensing and Homeostasis. *Physiology (Bethesda)*. 2015;30(5):340-8.

Qu Y. S. and Boutjdir M. RNase protection assay for quantifying gene expression levels. *Methods in molecular biology*. 2007;366:145-58.

Radisic M., Deen W., Langer R. and Vunjak-Novakovic G. Mathematical model of oxygen distribution in engineered cardiac tissue with parallel channel array perfused with culture medium containing oxygen carriers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(3):H1278-89.

Radisic M., Malda J., Epping E., Geng W., Langer R. and Vunjak-Novakovic G. Oxygen gradients correlate with cell density and cell viability in engineered cardiac tissue. *Biotechnol Bioeng*. 2006;93(2):332-43.

Reinecke H., Zhang M., Bartosek T. and Murry C. E. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation*. 1999;100(2):193-202.

Rice B. W., Cable M. D. and Nelson M. B. In vivo imaging of light-emitting probes. *J Biomed Opt*. 2001;6(4):432-40.

Rony I. K., Baten A., Bloomfield J. A., Islam M. E., Billah M. M. and Islam K. D. Inducing pluripotency in vitro: recent advances and highlights in induced pluripotent stem cells generation and pluripotency reprogramming. *Cell Prolif*. 2015;48(2):140-56.

Rubini Gimenez M., Thiele H. and Pöss J. Management des akuten Koronarsyndroms ohne ST-Strecken-Hebung. *Herz*. 2022;47(4):381-92.

Schmitt K., Däubener W., Bitter-Suermann D. and Hadding U. A safe and efficient method for elimination of cell culture mycoplasmas using ciprofloxacin. *J Immunol Methods*. 1988;109(1):17-25.

Sekine H. and Okano T. Capillary Networks for Bio-Artificial Three-Dimensional Tissues Fabricated Using Cell Sheet Based Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(1):92.

Sekine H., Shimizu T., Hobo K., Sekiya S., Yang J., Yamato M., Kurosawa H., Kobayashi E. and Okano T. Endothelial cell coculture within tissue-engineered cardiomyocyte sheets enhances neovascularization and improves cardiac function of ischemic hearts. *Circulation*. 2008;118(14 Suppl):S145-52.

Sekine H., Shimizu T. and Okano T. Cell Sheet Tissue Engineering for Heart Failure. 2016. p. 19-24.

Sekine H., Shimizu T., Sakaguchi K., Dobashi I., Wada M., Yamato M., Kobayashi E., Umezumi M. and Okano T. In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nat Commun*. 2013;4:1399.

Senyo S. E., Lee R. T. and Kühn B. Cardiac regeneration based on mechanisms of cardiomyocyte proliferation and differentiation. *Stem Cell Res*. 2014;13(3 Pt B):532-41.

Serra M., Brito C., Correia C. and Alves P. M. Process engineering of human pluripotent stem cells for clinical application. *Trends in biotechnology*. 2012;30(6):350-9.

Shimizu T., Sekine H., Yang J., Isoi Y., Yamato M., Kikuchi A., Kobayashi E. and Okano T. Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *Faseb j*. 2006;20(6):708-10.

Simonenkov A. P. and Fedorov V. D. [Current conception of stress and adaptation subject to new data of tissue hypoxia genesis]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2008(5):7-15.

Steffel J., Eikelboom J. W., Anand S. S., Shestakovska O., Yusuf S. and Fox K. A. A. The COMPASS Trial: Net Clinical Benefit of Low-Dose Rivaroxaban Plus Aspirin as Compared With Aspirin in Patients With Chronic Vascular Disease. *Circulation*. 2020;142(1):40-8.

Stiefelhagen P. Das "Herzpfaster" geht erstmals in die klinische Prüfung. *CardioVasc*. 2022;22(2):22-.

Stoker M. E., Gerdes A. M. and May J. F. Regional differences in capillary density and myocyte size in the normal human heart. *Anat Rec*. 1982;202(2):187-91.

Sun Y., Jiang C., Hong H., Liu J., Qiu L., Huang Y. and Ye L. Effects of hypoxia on cardiomyocyte proliferation and association with stage of development. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;118:109391.

Surani M. A., Hayashi K. and Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*. 2007;128(4):747-62.

Szumner K., Oldgren J., Lindhagen L., Carrero J. J., Evans M., Spaak J., Edfors R., Jacobson S. H., Andell P. and Wallentin L. Association between the use of fondaparinux vs low-molecular-weight heparin and clinical outcomes in patients with non-ST-segment elevation myocardial infarction. *Jama*. 2015;313(7):707-16.

Tadevosyan K., Iglesias-García O., Mazo M. M., Prósper F. and Raya A. Engineering and Assessing Cardiac Tissue Complexity. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3).

Takahashi K. and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.

Tanaka T., Tohyama S., Murata M., Nomura F., Kaneko T., Chen H., Hattori F., Egashira T., Seki T. and Ohno Y. In vitro pharmacologic testing using human induced

pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;385(4):497-502.

Taylor R. G., Tassy C., Briand M., Robert N., Briand Y. and Ouali A. Proteolytic activity of proteasome on myofibrillar structures. *Molecular biology reports*. 1995;21(1):71-3.

Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S. and Jones J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.

Timmis A., Vardas P., Townsend N., Torbica A., Katus H., De Smedt D., Gale C. P., Maggioni A. P., Petersen S. E., Huculeci R., Kazakiewicz D., de Benito Rubio V., Ignatiuk B., Raisi-Estabragh Z., Pawlak A., Karagiannidis E., Treskes R., Gaita D., Beltrame J. F., McConnachie A., Bardinet I., Graham I., Flather M., Elliott P., Mossialos E. A., Weidinger F. and Achenbach S. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *Eur Heart J*. 2022;43(8):716-99.

Tuka V., Holub J. and Bělohávek J. Secondary Prevention after Myocardial Infarction: What to Do and Where to Do It. *RCM*. 2022;23(6).

Udvardi M. K., Czechowski T. and Scheible W.-R. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*. 2008;20(7):1736-7.

Ulloa-Montoya F., Verfaillie C. M. and Hu W.-S. Culture systems for pluripotent stem cells. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2005;100(1):12-27.

Velicka D., Kairiukstiene Z., Poderiene K., Vainoras A. and Poderys J. Interaction between Cardiac Functional Indices during Incremental Exercise Test Reveals the Peculiarities of Adaptation to Exercising. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(7).

von Schacky C. Kardiovaskuläre Prävention und Rehabilitation. *Der Internist*. 2004;45(2):182-8.

Vunjak-Novakovic G., Tandon N., Godier A., Maidhof R., Marsano A., Martens T. P. and Radisic M. Challenges in cardiac tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(2):169-87.

Weinberger F., Mannhardt I. and Eschenhagen T. Engineering Cardiac Muscle Tissue: A Maturing Field of Research. *Circ Res*. 2017;120(9):1487-500.

Willems E., Spiering S., Davidovics H., Lanier M., Xia Z., Dawson M., Cashman J. and Mercola M. Small-molecule inhibitors of the Wnt pathway potently promote cardiomyocytes from human embryonic stem cell-derived mesoderm. *Circ Res*. 2011;109(4):360-4.

Yamaoka T., Hirata M., Dan T., Yamashita A., Otaka A., Nakaoki T., Miskon A., Kakinoki S. and Mahara A. Individual evaluation of cardiac marker expression and self-beating during cardiac differentiation of P19CL6 cells on different culture substrates. *J Biomed Mater Res A*. 2017;105(4):1166-74.

Yang L., Soonpaa M. H., Adler E. D., Roepke T. K., Kattman S. J., Kennedy M., Henckaerts E., Bonham K., Abbott G. W., Linden R. M., Field L. J. and Keller G. M. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR⁺ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature*. 2008;453(7194):524-8.

Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S. and Madden T. L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13(1):134.

Yildirim Y., Naito H., Didié M., Karikkineth B. C., Biermann D., Eschenhagen T. and Zimmermann W. H. Development of a biological ventricular assist device: preliminary data from a small animal model. *Circulation*. 2007;116(11 Suppl):I16-23.

Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J. L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G. A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin, II and Thomson J. A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-20.

Zeymer U., Kastrati A., Rassaf T., Scholz K. H., Thiele H. and Nienaber C. A. Kommentar zu den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Therapie des akuten Herzinfarkts bei Patienten mit ST-Streckenhebung (STEMI). *Der Kardiologe*. 2013;7(6):410-22.

Zhang J., Zhu W., Radisic M. and Vunjak-Novakovic G. Can We Engineer a Human Cardiac Patch for Therapy? *Circ Res*. 2018;123(2):244-65.

Zhao T., Zhang Z. N., Rong Z. and Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;474(7350):212-5.

Zhou H. and Ding S. Evolution of induced pluripotent stem cell technology. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(4):276-80.

Zimmermann W. H., Melnychenko I. and Eschenhagen T. Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts. *Biomaterials*. 2004;25(9):1639-47.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Reichenspurner für die Überlassung des Themas, sowie für die Möglichkeit der Absolvierung meiner Dissertation in seiner Klinik für Herzchirurgie am UHZ, Hamburg-Eppendorf und dem mir damit entgegengebrachten Vertrauen. Ich bin dankbar im Rahmen meiner Dissertation molekularbiologische Methoden und wissenschaftliches Arbeiten gelernt zu haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Simon Pecha, der mir als Betreuer meiner experimentellen Forschungsarbeit stets mit positiver Einstellung zur Seite stand. Ebenfalls gilt ein besonderer Dank Dr. Yalin Yildirim, der durch seine Begeisterung für Grundlagenforschung mir unentwegt neue Ideen und Möglichkeiten aufzeigte und die Zeit während meiner Experimente bereicherte. Ich bin dankbar, dass ich durch meine Forschungsarbeit meinen akademischen Horizont erweitern durfte.

Christiane Pahrman danke ich besonders für die tägliche Unterstützung im Labor bei diversen Experimenten und auf ihre Hilfe ich mich immer verlassen konnte. An ihre fröhliche Art und ihre positive Energie werde ich noch lange zurückdenken.

Außerdem danke ich meinem Mitdoktoranden Lukas Reuter für die unermüdliche Zusammenarbeit und die vertrauensvolle Unterstützung. Ich danke zusätzlich Lilian Gabel für die Hilfestellung mit der Software Solidworks® und der Bedienung unseres Haus-eigenen 3D Druckers. Vielen Dank zudem an Julia Mienert, Julia Hagenstein, dem Team der FACS Core Facility, dem Team der Microscopy Imaging Facility (UMIF) und dem Team der Humangenetik des UKE. Ich danke auch Kristin Hartmann der Mauspathologie, am UKE bei der Unterstützung meiner histologischen Aufarbeitungen.

Zu einem besonderen Dank bin ich der Deutschen Herzstiftung e.V. verpflichtet, die mein Projekt finanziell gefördert haben und die Arbeit im Anschluss an mein abgeschlossenes Humanmedizinstudium für mich ermöglicht haben.

Meinen Eltern und meiner Schwester Clara danke ich für den seelischen Beistand und die nie endende Liebe! Ich bin sehr dankbar euch an meiner Seite zu haben und kann mir keine liebevollere Unterstützung wünschen.

Zu guter Letzt gilt mein großer Dank meinen engen und langjährigen Freunden, für das Zusammendurchstehen der Up's and Down's während meiner Forschungsarbeit. Und zum Schluss: Maximilian, vielen Dank für alles!

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: