

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen

Optimierung von künstlichem humanen Herzgewebe als Gewebeersatz

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von:

Deniz Köse
aus Hamburg

Hamburg 2023

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 06.09.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Hermann Reichensperner
Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klinische Relevanz des Myokardinfarkts	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie	1
1.2	Pathophysiologie des Myokardinfarkts	4
1.2.1	Pathogenese der Atherosklerose	4
1.2.2	Pathogenese der Myokardischämie	5
1.2.3	Pathogenese des Myokardinfarkts	6
1.2.4	Infarktheilung	6
1.3	Ansätze regenerativer Medizin	8
1.3.1	Stimulierung der Kardiomyozytenproliferation	9
1.3.2	Transdifferenzierung von Nicht-Myozyten zu Kardiomyozyten	10
1.3.3	Transplantation von Kardiomyozyten	11
1.4	Künstliches Herzmuskelgewebe – Engineered Heart Tissue	13
1.5	Fragestellung und Zielsetzung	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Materialien	16
2.2	Geräte	17
2.3	Chemikalien, Substanzen und Lösungen	18
2.3.1	Primärantikörper	19
2.3.2	Sekundärantikörper und Kernfarbstoffe	19
2.4	Human Engineered Heart Tissue (EHT)	20
2.4.1	Humane induzierte pluripotente Stammzellen und kardiale Differenzierung	20
2.4.2	Optimierung der EHT-Geometrie	22
2.4.3	Kultivierung von EHTs	23
2.4.4	Kontraktionsanalyse der EHTs	24
2.4.5	Quantifizierung des EHT-Remodellings	26
2.5	Transplantation der EHTs	27
2.6	Histologie	29
2.6.1	Herstellung histologischer Präparate	29

2.6.2	Entparaffinieren	29
2.6.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	29
2.6.4	Masson-Goldner-Trichrom-Färbung	30
2.6.5	Immunhistochemie.....	30
2.6.6	Immunfluoreszenz	30
2.6.6.1	α-Actinin	31
2.6.6.2	Connexin-43	32
2.6.6.3	Phalloidin.....	32
2.7	Infarktgrößenbestimmung	33
2.8	Graftgrößenbestimmung	34
2.9	Analyse der transplantierten Kardiomyozyten	35
2.10	Statistische Auswertung	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Optimierung der EHT-Geometrie zur Transplantation	38
3.1.1	Technische Zeichnungen und 3D Modellierungen.....	38
3.1.2	Generierung der EHT-Patches	41
3.1.3	Bestimmung des E-Moduls	46
3.2	Kulturoptimierung	48
3.2.1	Optimierung der hiPSCs Kulturbedingungen	48
3.2.2	Optimierung der EHT-Kulturbedingungen.....	48
3.2.3	Standardkultur	48
3.2.4	Serumfreie Kultur.....	50
3.2.4.1	Statische serumfreie Kultur.....	52
3.2.4.2	Dynamische serumfreie Kultur.....	57
3.3	Transplantationsstudie	62
3.3.1	Histologische Analyse der transplantierten Herzen	62
3.3.2	Analyse der Graftstruktur.....	65
4	Diskussion	70
4.1	Engineered Heart Tissue - EHT	70
4.2	Etablierung der EHT-Patches.....	72
4.3	Etablierung von GMP-kompatiblen Kulturbedingungen.....	75
4.4	Auswirkung einer serumhaltigen Kultur	80
4.5	Auswirkung einer dynamischen Kultur	82
4.6	Transplantationsstudie	84

4.6.1	Limitationen des Studiendesigns	84
4.6.2	Transplantatüberleben	85
4.6.3	Analyse der transplantierten Kardiomyozyten.....	87
4.7	Ausblick.....	89
5	Zusammenfassung.....	91
6	Summary	93
7	Literaturverzeichnis	95
8	Abkürzungsverzeichnis	107
9	Veröffentlichungen.....	110
10	Finanzielle Förderung	111
11	Danksagung	112
12	Lebenslauf	113
13	Eidesstattliche Versicherung	114

1 Einleitung

1.1 Klinische Relevanz des Myokardinfarkts

1.1.1 Epidemiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit die häufigsten Todesursachen dar. Im Zeitraum von 1990 bis 2019 hat sich die globale Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen fast verdoppelt. So betrug die absolute Anzahl der Erkrankten im Jahr 1990 271 Millionen und im Jahr 2019 523 Millionen. Auch die Anzahl der an kardiovaskulären Erkrankungen verstorbenen Menschen war in diesem Zeitraum von 12,1 Millionen auf 18,6 Millionen angestiegen. Für diesen seit Dekaden registrierten dynamischen Anstieg war vor allem die ischämische Herzkrankheit verantwortlich, an der im Jahr 2019 weltweit 197 Millionen erkrankten und 9,14 Millionen verstarben (Roth et al. 2020). In Deutschland waren Krankheiten des Kreislaufsystems im Jahr 2019 mit 331.211 Verstorbenen für ca. 35% aller Todesfälle verantwortlich, wovon 73.459 auf die chronische ischämische Herzkrankheit und 44.282 auf den akuten Myokardinfarkt zurückzuführen waren (Statistisches Bundesamt 2021).

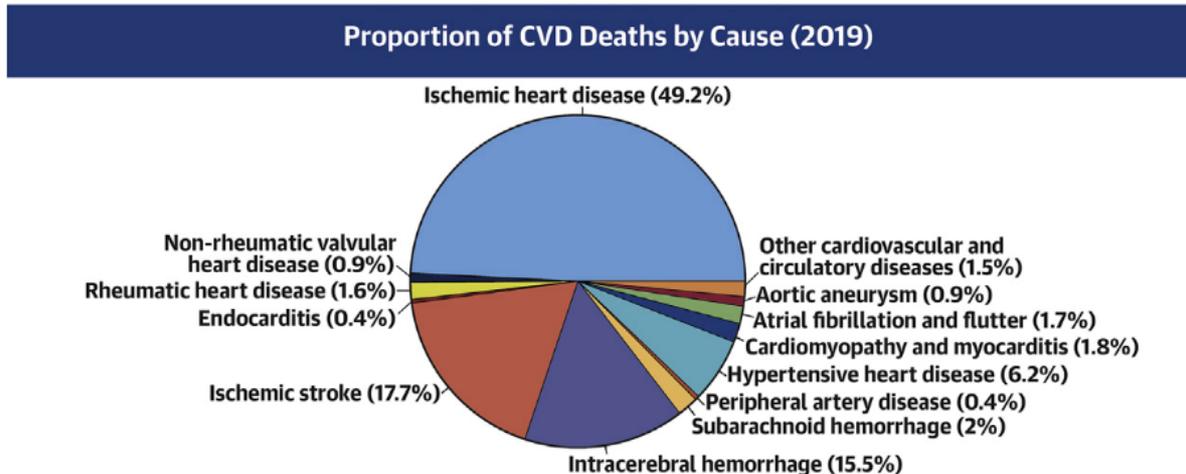


Abbildung 1: Verteilung kardiovaskulär bedingter Tode nach Ursachen weltweit im Jahr 2019. Abbildung aus “*Global Burden of Cardiovascular Diseases (CVD) and Risk Factors, 1990–2019*” (Roth et al. 2020).

1.1.2 Ätiologie, Klinik, Diagnostik und Therapie

Der akute Myokardinfarkt beschreibt ein Krankheitsbild, bei dem es infolge einer akuten Myokardischämie zum Absterben von Kardiomyozyten kommt. Dabei bezeichnet die Myokardischämie jegliche Reduktion der koronaren Perfusion, welche

Einleitung

eine funktionale und/oder metabolische Konsequenz für das betroffene Myokard hat (Heusch 2019). Ursächlich für einen Myokardinfarkt ist in den meisten Fällen eine atherosklerotisch bedingte Plaqueruptur mit nachfolgender Thrombosierung, welche folglich zu einer Okklusion der Koronararterien führen kann (DeWood et al. 1980).

Die Klinik des Myokardinfarkts kann sich variabel präsentieren. Zu den somatischen Symptomen gehören retrosternalen Schmerzen, welche auch als Druck, Enge oder Brennen empfunden werden können. Eine Schmerzausstrahlung in den linken Arm ist typisch, wobei auch andere Schmerzlokalisationen (z.B. Epigastrium, Unterkiefer) möglich sind. Die vegetativen Symptome stellen sich als Angst, Unruhe, Kaltschweißigkeit, Schwindel und Erbrechen dar. Im Rahmen eines kardiogenen Schocks kann es zu einer hypodynamischen Kreislaufsituation kommen, welche sich durch einen Abfall des Blutdrucks und einem gleichzeitigen Anstieg der Herzfrequenz darstellt und klinisch mit Dyspnoe vergesellschaftet sein kann.

Für die Diagnose eines akuten Myokardinfarkts sind laut den Leitlinien der *European Society of Cardiology* neben einer Dynamik kardialer Biomarker, vorzugsweise des hochsensitiven kardialen Troponins (hs-cTn) T oder I, mit einem Wert oberhalb der 99. Perzentile des Referenzwerts, mindestens einer der folgenden Faktoren notwendig:

1. Symptome myokardialer Ischämie,
2. neue Anzeichen myokardialer Ischämie im Elektrokardiogramm (EKG),
3. Entwicklung pathologischer Q-Wellen im EKG,
4. bildgebender Beweis des Verlusts vitalen Myokards oder neuauftretene regionale Wandbewegungsstörungen,
5. Intrakoronare Thromben, detektiert mittels Angiographie oder Autopsie (Thygesen et al. 2019).

Bei der leitliniengerechten Therapie des akuten Myokardinfarkts wird zwischen der akuten Notfallversorgung des akuten Koronarsyndroms (ACS) und der weiterführenden Therapie im stationären Verlauf differenziert. Im Rahmen der Akuttherapie sind neben den allgemeinen Maßnahmen wie dem Einsatz von kurzwirksamen Opioiden, Nitraten und der Sauerstoffgabe bei hypoxämischen Patienten mit einer Sauerstoffsättigung (SaO_2) $<90\%$ besonders die spezifische pharmakologische Therapie essentiell. Der akute Myokardinfarkt wird bereits

Einleitung

präklinisch antithrombozytär und antikoagulatorisch behandelt. Im Verlauf ist eine Erweiterung auf eine duale Thrombozytenaggregationshemmung (DAPT) sinnvoll. Für die weiterführende klinische Therapie ist die mittels EKG diagnostizierte Unterscheidung eines ST-Strecken-Hebungsinfarkts (STEMI) und eines Nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkts (NSTEMI) erforderlich. Die Differenzierung ermöglicht es Rückschlüsse über die Ausdehnung des Infarktgeschehens zu ziehen. Beim STEMI handelt es sich um ein transmurales Infarktgeschehen, was im Kontrast zum NSTEMI steht, bei dem sich das Infarktgeschehen oft auf das subendokardiale Myokard begrenzt. Als kausale Therapie wird bei ST-Hebungsinfarkten die Koronarangiographie mit primärer perkutaner Koronarintervention (PCI) als Mittel der ersten Wahl angestrebt, welche innerhalb von 120 min erfolgen sollte. Wird dieser Zeitrahmen nicht eingehalten, sollte überbrückend eine medikamentöse Fibrinolyse durchgeführt werden. Die Durchführung einer Koronarangiographie ist beim NSTEMI abhängig von der Risikostratifizierung. Grundsätzlich sollte die PCI früh-elektiv innerhalb von 2-72 h mit dem Ziel der Reperfusion der betroffenen Koronararterien und dem davon versorgten Myokard erfolgen (Ibanez et al. 2018; Collet et al. 2021).

Durch den Fortschritt in der Therapie des Myokardinfarkts überleben zwar immer mehr Patienten das Akutereignis, jedoch steigt damit auch die Anzahl an Patienten, die an einer Herzinsuffizienz erkranken (Velagaleti et al. 2008). Die Pharmakotherapie der Herzinsuffizienz zielt darauf ab, die verbleibenden Kardiomyozyten zu schützen. Die leitliniengerechte Pharmakotherapie setzt sich zusammen aus der Gabe von ACE-Hemmern, β -Blockern, Diuretika und Mineralokortikoidrezeptorantagonisten (Nationale Versorgungsleitlinie „Chronische Herzinsuffizienz“ 2019). Die kombinierte Gabe der Pharmaka ist effektiv und führt zu einer deutlichen Verbesserung der Lebenserwartung (Weinberger und Eschenhagen 2021). Dennoch besteht eine hohe Mortalität bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz (Crespo-Leiro et al. 2016). Die einzige kurative Therapieoption ist die orthotope Herztransplantation. In Anbetracht des steigenden Spendermangels, insbesondere in Europa, stellt dies ein Problem dar (Castro et al. 2019). Aus diesen Gründen sind innovative Behandlungsstrategien erforderlich, weshalb aktuell an regenerativen Therapieansätzen geforscht wird (Laflamme und Murry 2011; Weinberger und Eschenhagen 2021). Die Transplantation von künstlichem Herzgewebe als regenerativer Ansatz soll im Verlauf dieser Arbeit näher beleuchtet werden.

1.2 Pathophysiologie des Myokardinfarkts

1.2.1 Pathogenese der Atherosklerose

In den meisten Fällen sind atherosklerotische Veränderungen der Koronararterien mit nachfolgender Thrombosierung für die Pathologie des Myokardinfarkts verantwortlich (DeWood et al. 1980). Dies geschieht durch die Ruptur der fibrösen Kappe eines vulnerablen Plaques, infolge dessen der nekrotische Kern des Plaques mit dem Blut in Verbindung tritt und eine thrombogene Antwort initiiert (Bentzon, Otsuka, Virmani, und Falk 2014).

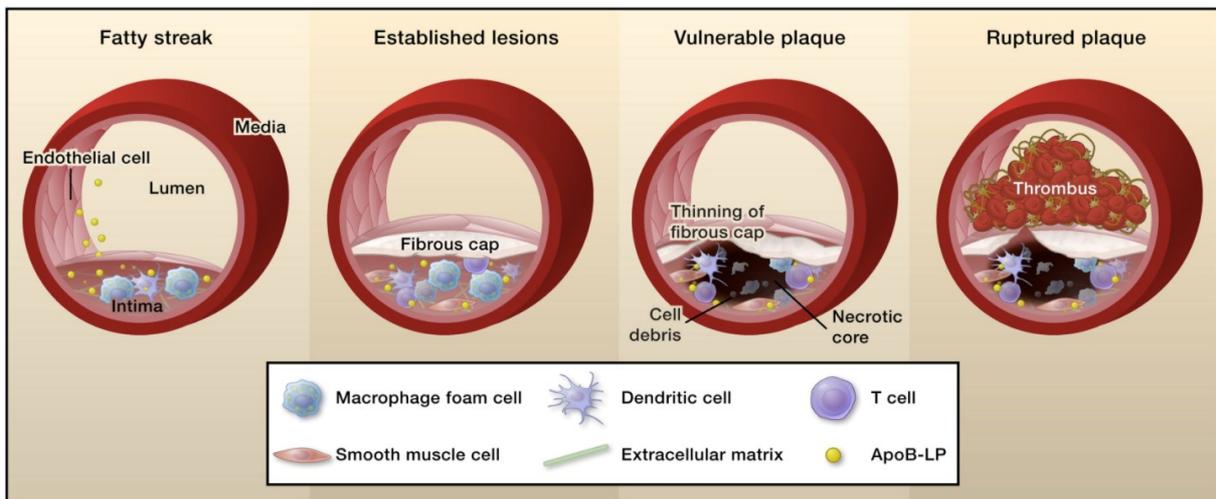


Abbildung 2: Progression einer atherosklerotischen Läsion. Abbildung aus „Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis“ (Moore und Tabas 2011).

Initial kommt es durch die subendotheliale Akkumulation und Retention von Apolipoprotein B beinhaltenen Lipoproteinen (apoB-LPs; Williams und Tabas 1995) zur inflammatorischen Aktivierung der betroffenen Endothelzellen (Mestas und Ley 2008), welche durch die Sekretion von Chemokinen wie dem CC-Chemokinligand 2 (CCL2) monozytäre Leukozyten zur Chemotaxis anregen (Libby 2002). Durch eine gesteigerte endotheliale Expression variabler Leukozyten Adhäsionsmolekülen wie dem vaskulären Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) kommt es zu einer erhöhten Monozytendiapedese in die Intima der Arterien (Cybulsky und Gimbrone 1991). Im Rahmen der endothelialen Migration differenzieren die Monozyten zu bindegewebsständigen Makrophagen, welche eine erhöhte Expression von Scavenger Rezeptoren aufweisen, die modifizierte Lipoproteine binden, internalisieren und damit die Bildung der sog. Schaumzellen ermöglichen. Diese sezernieren proinflammatorische Zytokine, steigern die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und sezernieren die für die Thrombosierung verantwortlichen Matrix-

Metalloproteinasen (MMPs). Die MMPs degradieren extrazelluläre Matrix, was u.a. zur Ruptur der fibrösen Kappe der Plaque führen kann. In Folge der Plaqueruptur tritt der von den Makrophagen sezernierte pro-koagulatorische Gewebefaktor (*tissue factor*) in Kontakt mit dem Blut und initiiert so die thrombogene Antwort (Libby 2002).

1.2.2 Pathogenese der Myokardischämie

Durch die Thrombosierung kann es zur totalen oder partiellen Okklusion der betroffenen Koronararterie kommen und im Rahmen der verminderten Perfusion zum Myokardinfarkt. Bei der initialen Myokardischämie nimmt bereits nach einer Ischämiezeit von 60 Sekunden die Kontraktilität des Herzens ab. Dies führt zu einer verminderten systolischen Funktion (Sayen et al. 1958; Jennings 2013). Hierfür sind mehrere Faktoren entscheidend. Zum einen kommt es durch den rapiden Verbrauch der Kreatinphosphatreserven und des Adenosintriphosphats (ATP) (Braasch et al. 1968) zu einer Inhibition der kardialen Kraftentwicklung (Kentish 1986). Zum anderen kommt es auf Grund der anaeroben Stoffwechsellage vermehrt zur anaeroben Glykolyse (Kübler und Spieckermann 1970), welche durch die Akkumulation von Laktat zu einer intrazellulären Azidose führt. Durch das verminderte Angebot an Glukose werden die intrazellulären Glykogenspeicher aufgebraucht, welche im Vergleich zur oxidativen Phosphorylierung nur ineffizient zur ATP-Produktion beitragen. Zusätzlich führt die Azidose zu einer Inhibition der an der Glykogenolyse beteiligten Enzyme, sodass trotz vorhandener Glykogenspeicher innerhalb der Kardiomyozyten keine regelrechte Metabolisierung stattfinden kann. Es wird mehr ATP verbraucht als hergestellt werden kann und die physiologische Homöostase kann nicht aufrecht erhalten werden (Frangogiannis 2015). Die Azidose führt außerdem zu einer Inhibition der Kontraktilität, indem die Calciumsensitivität der an der Kontraktion beteiligten Strukturproteine vermindert wird (Steenbergen et al. 1977; Solaro et al. 1988). Gleichzeitig wird durch die azidotische Stoffwechsellage und der insgesamt ineffizienten ATP-Produktion auch die diastolische Funktion als energieverbrauchenden Prozess beeinträchtigt. Durch die vermehrte Bildung von Laktat entsteht ein hyperosmolares Zellmilieu, wodurch vermehrt Wasser ins Interstitium aufgenommen wird. Daraus resultiert eine Reduktion der myokardialen Compliance (Steenbergen et al. 1985). Elektrophysiologisch kommt es schon bei der Myokardischämie zu einer Erhöhung des extrazellulären Kaliums sowie des

intrazellulären Natriums und Calciums, was in der Zusammenschau ein arrhythmogenes Potenzial fördert (Frangogiannis 2015).

1.2.3 Pathogenese des Myokardinfarkts

Bei einer anhaltenden Unterbrechung der koronaren Perfusion kommt es zu einem Myokardinfarkt, welcher histopathologisch durch den irreversiblen Untergang vitaler Kardiomyozyten definiert ist. Bei einem hämodynamisch fulminant verlaufenden Myokardinfarkt können innerhalb weniger Stunden bis zu 1 Milliarde Kardiomyozyten absterben (Laflamme und Murry 2011). Die endgültige Infarktgröße ist abhängig von der Größe des ischämisch betroffenen Bereichs, der Dauer und Ausprägung der koronaren Okklusion, das Ausmaß der Kollateralisation und der koronaren mikrovaskulären Dysfunktion (Heusch und Gersh 2017). Dabei breitet sich der Infarkt mit zunehmender Dauer der Koronarokklusion von den subendokardialen zu den subepikardialen Schichten des Myokards aus (Reimer, Lowe, Rasmussen und Jennings 1977; Reimer und Jennings 1979; Jennings 2013). Die Progression des Myokardinfarkts ist speziesabhängig. So sind beim Menschen nach Analysen von Magnetresonanztomographie (MRT) Datensätzen noch 30-50% des ischämisch betroffenen Bereichs lebensfähig, wenn eine Reperfusion 4-6 Stunden nach Beginn der Symptome erfolgt (Ibáñez et al. 2015).

Bereits wenige Minuten nach dem Infarkt zeigen sich auf zellulärer Ebene Hyperkontraktionsbänder der Myofibrillen, geschwollene oder rupturierte Mitochondrien und Sarkolemmrupturen, welche Merkmale eines irreversiblen Kardiomyozytenuntergangs sind (Jennings und Reimer 1981; Ibáñez et al. 2015). In welchem Verhältnis dabei die Nekrose und Apoptose am Zelltod beteiligt sind, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Fest steht, dass beide Formen eine wesentliche Rolle am Kardiomyozytenuntergang haben. Da die Nekrose ein mit Inflammation einhergehender Prozess ist, kommt es im Infarktareal zu einer Leukozyteninfiltration (Mallory et al. 1939; Burke und Virmani 2007).

1.2.4 Infarktheilung

Erwachsene Kardiomyozyten besitzen eine Mitoserate von etwa 1% pro Jahr (Bergmann et al. 2009). Diese Erkenntnis hat zwar die über Jahrzehnte vorherrschende Ansicht des adulten Herzens als terminal differenziertes Organ

Einleitung

aufgelöst, zeigt aber auch, dass das erwachsene Herz nur über eine ineffiziente Regenerationskapazität verfügt. Der hohe Verlust von Kardiomyozyten im Rahmen eines Myokardinfarkts resultiert also nicht in der Neubildung von Herzmuskelzellen. Stattdessen kommt es zur Bildung eines nicht-kontraktiles kollagenen Narbengewebes, welches die Integrität des Myokards aufrechterhält. Die Infarktheilung kann in drei überlappende Phasen differenziert werden:

1. Die inflammatorische Phase, in der durch die Kardiomyozytennekrose immunologische Signalkaskaden in kardialen Fibroblasten (Kawaguchi et al. 2011), Immunzellen (Frangogiannis et al. 2000; Yan et al. 2013) und Endothelzellen (Bujak et al. 2009) aktiviert werden, welche insgesamt das Leukozytenrekrutement fördern.
2. Die proliferative Phase, in der proinflammatorische Signalkaskaden inhibiert werden und der Infarkt durch mesenchymale Zellen zum erneuten Aufbau der extrazellulären Matrix infiltriert wird (Frangogiannis 2012).
3. Die Regenerationsphase, in der das Kollagen quervernetzt (Zimmerman et al. 2001) und die Expression matrizellulärer Proteine vermindert wird, sowie die zur Infarktheilung beitragenden Zellen apoptotisch abgebaut werden (Frangogiannis 2014).

Es kommt letztlich zu einem kollagenbasierten Remodelling und der Bildung einer Infarktnarbe. Bei großen Myokardinfarkten kommt es durch das ventrikuläre Remodelling zur Ventrikeldilatation, welche mit einer rapiden Progression der systolischen Dysfunktion, erhöhter Mortalität und einer höheren Inzidenz für Arrhythmien assoziiert ist (Sutton et al. 1997; Sutton et al. 2003). Weiterhin nimmt die Wanddicke im Bereich des Infarkts ab. Gleichzeitig führt der Verlust funktionalen Myokardgewebe zu einer erhöhten Vorlast im gesunden Myokardgewebe. Dies führt im nicht-infarzierten Myokard zur Hypertrophie (Pfeffer und Braunwald 1990). Als Resultat des hohen Verlusts vitaler Herzmuskulatur, der funktionalen Veränderungen, des pathologischen ventrikulären Remodellings und der damit einhergehenden verminderten linksventrikulären Funktion des Herzens entsteht eine Herzinsuffizienz.

1.3 Ansätze regenerativer Medizin

Das erwachsene Herz besitzt eine ineffiziente Regenerationsfähigkeit, weshalb der durch einen Myokardinfarkt verursachte Gewebeerlust nicht durch neu gebildete Herzmuskelzellen kompensiert werden kann. Es fehlt eine Progenitorzellpopulation und die Kardiomyozyten verlassen den Zellzyklus kurz nach der Geburt (Weinberger und Eschenhagen 2021). Auch nach einem Myokardinfarkt treten die $2-4 \times 10^9$ Kardiomyozyten, die ein menschliches Herz besitzt (Bergmann et al. 2015), nicht in den Zellzyklus ein, welches schlussendlich zur Entstehung bzw. Progression einer Herzinsuffizienz beiträgt (Weinberger und Eschenhagen 2021). Der aktuelle Goldstandard in der Therapie des Myokardinfarkts stellt, wie bereits beschrieben, die PCI dar, welche durch die Reperfusion der okkludierten Koronararterie versucht eine Nekrose des distal der Läsion gelegenen Myokardgewebes zu verhindern. Dadurch überleben zwar immer mehr Patienten das Akutereignis, jedoch nimmt gleichzeitig auch die Anzahl an Patienten zu, die an einer Herzinsuffizienz erkranken (Velagaleti et al. 2008). Das primäre Ziel der regenerativen Therapieansätze besteht deshalb darin die (Re-)Generation neuer Kardiomyozyten zu fördern, um das verletzte Herz zu remuskularisieren und stellt damit eine potenziell ergänzende Therapiestrategie zur etablierten Pharmakotherapie der Herzinsuffizienz dar. Das neue Myokardgewebe muss dabei nicht nur funktional integriert, sondern auch elektrisch an das Empfängermyokard gekoppelt sein. Die Restrukturierung des fibrotischen Narbengewebes und die Neoangiogenese sind weitere essentielle Faktoren, um die Regeneration des verletzten Myokardgewebes zu gewährleisten und die linksventrikuläre Funktion zu verbessern (Weinberger und Eschenhagen 2021). Aktuell wird vor allem an drei therapeutischen Ansätzen geforscht:

1. Stimulierung der Kardiomyozytenproliferation
2. Transdifferenzierung von Nicht-Myozyten zu Kardiomyozyten
3. Transplantation von pluripotenten Stammzellen abgeleiteten Kardiomyozyten

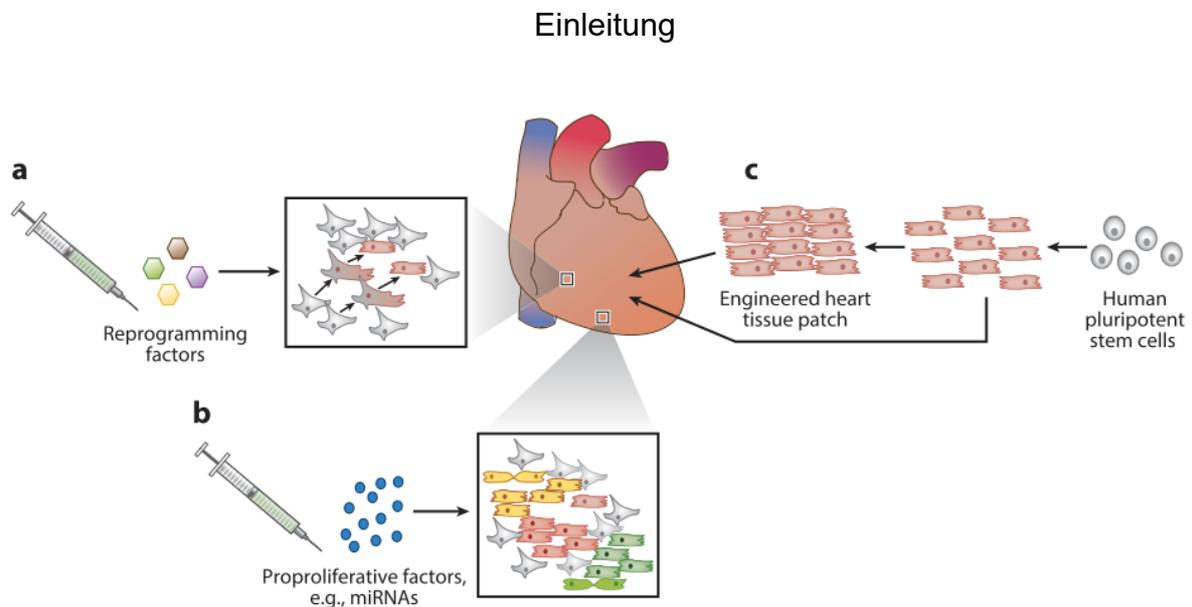


Abbildung 3: Therapeutische Strategien das verletzte Herz zu remuskularisieren. (a) Reprogrammierung von Nicht-Myozyten (z.B. Fibroblasten) zu Kardiomyozyten, (b) Stimulierung der Kardiomyozytenproliferation (z.B. mit Hilfe von Mikro-Ribonukleinsäuren; miRNAs), (c) Transplantation von pluripotenten Stammzellen-abgeleiteten Kardiomyozyten (entweder als Einzelzellinjektion oder als künstlich hergestelltes Herzmuskelgewebe). Abbildung aus „*Cardiac Regeneration: New Hope for an Old Dream*“ (Weinberger und Eschenhagen 2021).

1.3.1 Stimulierung der Kardiomyozytenproliferation

Der Ansatz die Proliferation von Kardiomyozyten zu stimulieren, stellt eine klinisch attraktive Strategie dar, weil sie autolog ist und damit immunologische Hürden der Zelltransplantation umgeht. Die Stimulierung der Kardiomyozytenproliferation kann durch diverse Methoden erreicht werden. Zum einen kann dies durch die Überexpression von Cyclinen, welche mit den Cyclin-abhängigen Kinasen den Zellzyklus regulieren, erreicht werden. Hierbei sind besonders die drei Subtypen des D Cyclins (D1, D2, und D3; Ccnd1/2/3) und das Cyclin A2 hervorzuheben. Die Überexpression von Ccnd1/2/3 führte im gesunden Herzen zur erhöhten DNA-Synthese. Ccnd2 verblieb nach einer Myokardverletzung als einziger der drei Subtypen im Zellkern und förderte die Genese neuen Myokardgewebes und ersetzte innerhalb von 180 Tagen partiell das Narbengewebe (Pasumarthi et al. 2005; Hassink et al. 2008). Die Überexpression des Cyclins A2, welches im erwachsenen Herzen normalerweise nicht exprimiert wird, verbesserte im verletzten Herzen die linksventrikuläre Funktion durch eine erhöhte Kardiomyozytenproliferation (Cheng et al. 2007; Shapiro et al. 2014).

Einleitung

Zum anderen kann durch die gezielte Modifikation der Hippo-Signalkaskade die Proliferation von Kardiomyozyten stimuliert werden. Die Hippo-Signalkaskade reguliert als zentraler molekularer Knotenpunkt die Kardiomyozytenproliferation und die Herzgröße während der Entwicklung. YAP (*Yes-associated protein*) und TAZ (*transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*) sind transkriptionelle Koaktivatoren und stellen die molekularen Effektoren des Hippo-Signalwegs dar. Ihre Phosphorylierung, welche bei der Aktivierung der Signalkaskade auftritt, fördert die zytoplasmatische Degradation und verhindert die Translokation in den Zellkern und damit auch die Proliferation der Kardiomyozyten (Weinberger und Eschenhagen 2021). Demnach stimuliert eine Inhibition der Signalkaskade die Kardiomyozytenproliferation. Dies kann durch eine Inhibition bzw. eine Kardiomyozyten-spezifische Deletion einer an der Phosphorylierungskaskade beteiligter Kinasen, wie dem *scaffold protein salvador homolog 1* (Salv1), erreicht werden. Die Deletion bzw. der herzspezifische-Salv1 Knockout oder eine konstitutive Aktivierung von YAP führen beide zu einer Stimulierung der Kardiomyozytenproliferation und zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion nach erfolgter Myokardverletzung (Xin et al. 2013; Leach et al. 2017). Neben der Verhinderung der YAP-Phosphorylierung kann auch durch den Einsatz von miRNAs ein proproliferativer Effekt erzielt werden. Die miRNAs erzielen diesen Effekt, indem sie die Expression von YAP-abbauenden Proteinen inhibieren (Torrini et al. 2019). Außerdem führt eine erhöhte nukleare YAP-Konzentration durch gezielte Modifikation des Zytoskeletts (Stimulierung von Agrin, Knockout von α -Catenin) zur Stimulierung der Kardiomyozytenproliferation (Li et al. 2015; Bassat et al. 2017).

1.3.2 Transdifferenzierung von Nicht-Myozyten zu Kardiomyozyten

Die direkte Reprogrammierung stellt eine elegante Methode dar, um Fibroblasten zu Kardiomyozyten transdifferenzieren zu lassen. Nach einem Myokardinfarkt werden, wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, immunologische Signalkaskaden in kardialen Fibroblasten aktiviert, sodass diese zur Proliferation angeregt werden (Kawaguchi et al. 2011). Im Prozess der Infarktheilung tragen sie im Zusammenspiel mit der extrazellulären Matrix maßgeblich zur Genese der Infarktnarbe bei. Die Transdifferenzierung kardialer Fibroblasten zu Kardiomyozyten könnte den Ersatz des fibrotischen Narbengewebes durch kontraktiles Myokardgewebe und somit gleichzeitig eine Verkleinerung des Infarktareals zur Folge haben. Eine Methode der Transdifferenzierung erfolgt durch die Überexpression ausgewählter

Transkriptionsfaktoren. Diese wurden mittels viraler Vektoren in die Zielzellen geschleust. Die Transdifferenzierung muriner Fibroblasten zu Kardiomyozyten konnte durch den Einsatz der drei Transkriptionsfaktoren Gata4, Mef2c und Tbx5 (GMT) in vitro (Ieda et al. 2010) als auch in vivo (Qian et al. 2012) nachgewiesen werden. Die induzierten Kardiomyozyten zeigten bei diesen Studien morphologische Charakteristiken unreifer Zellen. Dennoch konnten die induzierten Kardiomyozyten im Tierversuch die linksventrikuläre Funktion nach einem Myokardinfarkt verbessern. Die direkte Reprogrammierung humaner Zellen stellte sich hingegen komplexer dar. Einerseits benötigen humane Zellen zur Transdifferenzierung wesentlich mehr Faktoren (Nam et al. 2013; Mohamed et al. 2017). Andererseits ist die Reprogrammierung, besonders adulter Fibroblasten, ineffizienter und die humanen induzierten Kardiomyozyten entwickelten keine (Miyamoto et al. 2018) oder nur eine geringe Kontraktilität (Nam et al. 2013).

1.3.3 Transplantation von Kardiomyozyten

Den durch einen Myokardinfarkt resultierenden Gewebeverlust direkt durch die Transplantation von Kardiomyozyten zu ersetzen, erscheint naheliegend. Da im menschlichen Herzen im Rahmen eines Myokardinfarkts eine erhebliche Anzahl an Kardiomyozyten absterben können, wird für die Regeneration eine entsprechende Menge an neuen Kardiomyozyten benötigt. Die Transplantation von externen aus pluripotenten Stammzellen (PSC) abgeleiteten Kardiomyozyten bietet die Möglichkeit eine große Zahl von Kardiomyozyten in das verletzte Herz zu transplantieren. Es werden für den Zelltransfer methodisch zwei Strategien differenziert: die direkte intramyokardiale Injektion und die Transplantation von künstlich hergestellten Gewebekonstrukten.

PSC-abgeleitete Kardiomyozyten weisen überwiegend Charakteristiken unreifer Zellen auf (Weinberger und Eschenhagen 2021). Dies erhöht ihre Resistenz gegenüber hypoxischen Bedingungen und ermöglicht das Überleben nach der Transplantation (Reinecke et al. 1999; Pritchett-Corning 2009). Die direkte Injektion von PSC-abgeleiteten Kardiomyozyten ermöglichte die Remuskularisierung des verletzten Myokards im Tiermodell. Jedoch ist das Transplantatüberleben (Müller-Ehmsen et al. 2002) und die Zellretention nach erfolgter Transplantation insgesamt niedrig (Dow et al. 2005). Eine Möglichkeit das Transplantatüberleben zu steigern, stellt die Erhöhung der zu transplantierenden Zellzahl dar, wodurch eine substantielle

Einleitung

Remuskularisierung nachgewiesen werden konnte (Chong et al. 2014). Allerdings steigt mit dem Einsatz hoher Zellzahlen das Risiko verbleibender PSCs und damit das Risiko für die Entstehung eines Tumors. Eine weitere Strategie das Transplantatüberleben zu verbessern, stellt die Stimulation der Proliferation der transplantierten Kardiomyozyten dar. Dies wird momentan in präklinischen Studien untersucht. So konnte beispielsweise durch eine Cyclin D2 Überexpression oder eine kombinierte Transplantation von Kardiomyozyten und epikardialen Zellen die Proliferation der Kardiomyozyten gesteigert werden. Beide Ansätze resultierten in größeren Grafts (Zhu et al. 2018; Bargehr et al. 2019). Die transplantierten Zellen waren in der Lage elektrisch an das Empfängermyokard zu koppeln (Shiba et al. 2012). Die bereits erwähnte Unreife der PSC-abgeleiteten Kardiomyozyten führt in diesem Kontext jedoch auch zu Problemen. So zeigte sich in Großtierstudien durch den Automatismus der transplantierten Zellen ein gehäuftes Auftreten von ventrikulären Arrhythmien (Liu et al. 2018; Weinberger und Eschenhagen 2021), was aktuell eine klinische Anwendung verhindert. Aus den bisherigen Studien lässt sich ableiten, dass trotz geringem Transplantatüberleben die linksventrikuläre Funktion verbessert werden kann.

Bei der Transplantation von Herzmuskelzellen mittels künstlich hergestellten Gewebekonstrukten können drei wesentliche Ansätze differenziert werden. Zum einen können die Kardiomyozyten in ein präfabriziertes Konstrukt (sog. „*scaffold*“) eingebracht werden (Weinberger et al. 2017). Zum anderen können Einzelzellschichten („*monolayer*“) bestehend aus Herzmuskelzellen generiert werden, welche übereinandergestapelt werden können und so ein dreidimensionales Konstrukt bilden (Masumoto et al. 2014). Des Weiteren ist das Einbringen der Kardiomyozyten in eine Hydrogelmatrix möglich (Riegler et al. 2015; Weinberger et al. 2016). Alle diese Methoden des kardialen *Tissue Engineering* könnten das Problem der geringen Zellretention, welche bei der intramyokardialen Injektion vorkommt, möglicherweise lösen.

1.4 Künstliches Herzmuskelgewebe – Engineered Heart Tissue

Dreidimensionale Herzmuskelkonstrukte, sog. *Engineered Heart Tissue* (EHT), sind in vitro hergestellte kontraktile Gewebe. Sie bestehen aus Kardiomyozyten, welche mit Hilfe eines Hydrogels (z.B. Kollagen I oder Fibrin) in einer biologischen Matrix zusammengeschlossen werden. Die Generierung von künstlichem Herzgewebe wurde erstmalig vor ca. 25 Jahren beschrieben (Eschenhagen et al. 1997). Seitdem wurde der Arbeitsprozess vereinfacht und durch diverse Modifikationen eine automatisierte videooptische Analyse der kohärenten und spontanen Kontraktion der EHTs ermöglicht (Hansen et al. 2010). Die initiale Ringform wurde durch eine Streifenform in einem 24-well Format ersetzt, bei dem ein Herzmuskelkonstrukt, bestehend aus 1×10^6 Herzmuskelzellen, an jeweils zwei gegenüberliegenden Silikonsäulen verankert ist.

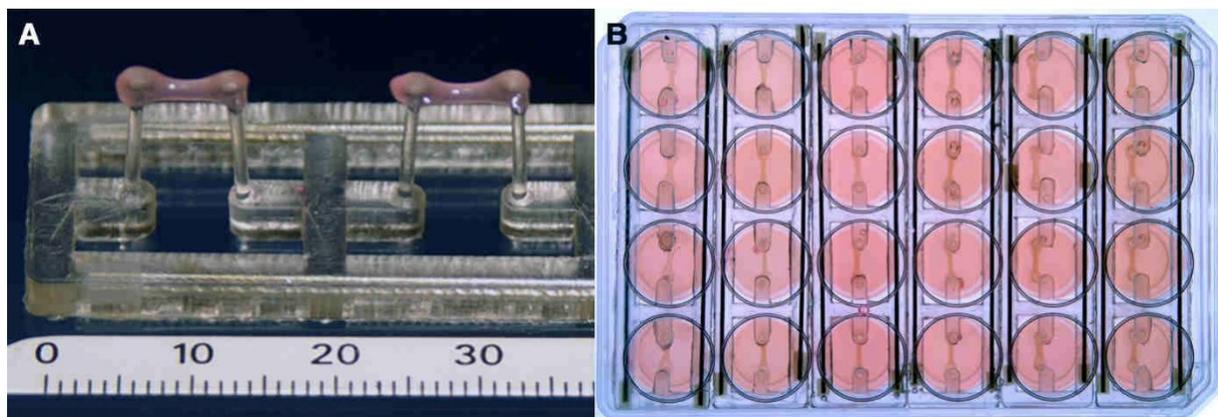


Abbildung 4: Streifenförmige EHTs angepasst für eine 24-well Zellkulturplatte. (A) Zwei EHTs, jeweils an zwei Silikonzylindern verankert. **(B)** Aufsicht auf eine Zellkulturplatte im 24-well Format mit 24 EHTs. Abbildung aus der Dissertation von Kaja Breckwoldt (2014).

Das Anheften der heranwachsenden Herzmuskelkonstrukte an den Silikonhalterungen exponiert das Gewebe einer kontinuierlichen mechanischen Belastung, worunter sich die Kardiomyozyten parallel entsprechend der Kraftvektoren ausrichten und zu einer auxotonen Kontraktion forciert werden (Hirt, Hansen und Eschenhagen 2014). Durch die Miniaturisierung dieser Methodik und der automatisierten Auswertung physiologischer Parameter ermöglicht dieser Hydrogel-basierte Ansatz eine standardisierte in vitro Analyse für diverse Fragestellungen. Die EHTs können für Analysen im Rahmen der prädiktiven Toxikologie und zur Modellierung monogenetischer kardialer Erkrankungen eingesetzt werden (Hansen et al. 2010).

Einleitung

Ein weiterer Einsatz der EHTs besteht darin, diese als Gewebeersatztherapie anzuwenden. Um den Verlust vitalen Myokardgewebes eines infarzierten Herzens zu ersetzen, sind jedoch größere EHTs notwendig. Für die Generierung solcher künstlichen Herzgewebe sind im Hinblick auf eine klinische Anwendung eine hohe Anzahl an Kardiomyozyten notwendig. Moderne Differenzierungsprotokolle erlauben die Herstellung von großen Mengen an Kardiomyozyten aus humanen induzierten PSCs (hiPSCs). Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen (ESCs) sind diese nicht mit ethischen Bedenken behaftet. In einer im Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie durchgeführten Transplantationsstudie mit humanen EHTs konnte bereits die partielle Remuskularisierung der Infarkt Narbe und eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion in einem Meerschweincheninfarktmodell nachgewiesen werden (Weinberger et al. 2016). Die verwendeten EHTs wurden für diese Studie auf eine 6-well-Zellkulturschale hochskaliert, beinhalteten 5×10^6 hiPSC-abgeleitete Kardiomyozyten und zeigten das Potenzial als kardialer Gewebeersatz geeignet zu sein. Eine Limitation in der von Weinberger et al. (2016) durchgeführten Arbeit stellten allerdings die Geometrie der verwendeten EHTs dar, welche in dieser Arbeit optimiert werden sollte.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Das Ziel der hier vorgestellten Arbeit war es die geometrischen Verhältnisse des künstlichen humanen Herzgewebes zum Einsatz als Gewebeersatz zu optimieren. Hiermit sollte der Anteil an neuem Myokard vergrößert werden. In der Transplantationsstudie um Weinberger et al. (2016) gelang durch die Verwendung von je zwei streifenförmigen EHTs pro Tier im Meerschweincheninfarktmodell keine optimale Abdeckung des Infarktareals. Zudem erschien ein Upscaling nur schwer möglich. Folgende Fragen sollten daher beantwortet werden:

1. Ist es möglich größere EHTs durch Optimierung der Geometrie herzustellen?
2. Überlebt das EHT-Patch die Transplantation auf ein infarziertes Meerschweinchenherz?
3. Führt die optimierte Geometrie zu größeren Grafts und einer kompletten Abdeckung des Infarktareals?

Um diese Fragen zu beantworten, musste zunächst die Methode zur Herstellung von EHTs optimiert werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die künstlichen Herzgewebe in einer kleinen Proof-of-concept-Studie auf infarzierte Meerschweinchenherzen transplantiert. Der Transplantationserfolg wurde anschließend mittels histologischer Aufarbeitung der Meerschweinchenherzen überprüft.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Objektträger mit Vertiefungen	Thermo Scientific
Pinzetten	Hammacher, Solingen
Pipetten (10/100/1000 µl)	Eppendorf AG
Positivformen, Teflon	Eigene Herstellung
Reaktionsgefäße (15/50 ml)	Sarstedt
Serologische Pipetten	Sarstedt
Silikonhalterung	Eigene Herstellung
Silikonnetze	Eigene Herstellung
Silikonscheiben (ø 3mm)	Eigene Herstellung
Zellkulturflaschen	
T75	Corning
T175	Sarstedt
Zellkulturschale, 6-Well	Greiner Nunc
Zellkulturschale, 24-Well	Nunc

2.2 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Konfokalmikroskop LSM 800	Zeiss
Mikroskop Axioskop 2 mit Kamera AxioCam	Zeiss
Paraffinausgießstation, EG1150 H	Leica
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand
Rollschüttler Roller Mixer SRT1	Stuart
Rotationsmikrotom 2125 RTS	Leica
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Thermo Scientific
Ventana® BenchMark® XT	Roche
Video-optisches-Messapparatur mit	Eigene Herstellung
Kamera A602f und	Basler
Kamera-Achsenführung	IAI Corporation
Wasserbad	GFL

2.3 Chemikalien, Substanzen und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
1-Thioglycerol	Sigma-Aldrich	M6145
Activin-A	R&D Systems	338-AC
Agarose	Invitrogen	15510-027
Aprotinin	Sigma-Aldrich	A1153
B27	Eigene Herstellung	
basic FGF	R&D Systems	233-FB
Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4)	R&D Systems	314-BP
DMEM	Gibco	41965-039
Eukitt®	Sigma-Aldrich	03989
FGF-2	Peptotech	100-18B
Fibrinogen	Sigma-Aldrich	F8630
Fluoromount-G®	SouthernBiotech	0100-01
HEPES	Roth	9105.4
Histofix®	Roth	P087.3
Humanes Insulin	Sigma-Aldrich	I9278
IGF-1	Peptotech	100-11
L-Glutamin	Gibco	25030
Lipid-mix	Sigma-Aldrich	L5146
Mowiol®	AppliChem	A9011
nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco	11140
PBS	Biochrom	14190
Penicillin/Streptomycin	Gibco	15140
Pferdeserum	Gibco	26050
Phosphoascorbat	Sigma-Aldrich	49752
Pluronic	Sigma-Aldrich	P2443
Polyvinylalkohol	Sigma-Aldrich	P8136
Proteinase K	Roche	745723
RPMI 1640	Gibco	21875

Material und Methoden

Sylgard™ 184 Silicone Elastomer Kit	Dow Corning	(240)1673921
TBS	Sigma-Aldrich	T6664
TGF-β	Peprotech	100- 21C
Thrombin	Sigma Aldrich	T7513
VEGF	R&D Systems	293-VE
Vitronectin	Gibco	A27940
Y-27632	biorbyt	orb60104

2.3.1 Primärantikörper

Antigen	Hersteller, Katalog-Nr.	Verdünnung
α-Actinin	Sigma-Aldrich, clone EA-53, A7811	1:800
Connexin-43	BD Transduction Laboratories, 610061	1:1000
Dystrophin	Millipore, MAB 1645	1:150
Humanes Ku80	Cell Signaling Technology, CST-2180	1:800
Phalloidin	Invitrogen, A-12379	1:60

2.3.2 Sekundärantikörper und Kernfarbstoffe

Label	Hersteller, Katalog-Nr.	Verdünnung
DRAQ5™	Biostatus Limited, DR50050	1:800
Alexa Fluor® 488	Invitrogen, A-11001	1:800

2.4 Human Engineered Heart Tissue (EHT)

2.4.1 Humane induzierte pluripotente Stammzellen und kardiale Differenzierung

PSC besitzen die Fähigkeit sich zu Zellen aller drei Keimblätter zu entwickeln. Daher besitzen sie auch über ein kardiogenes Potenzial und können effektiv in spontan kontrahierende Kardiomyozyten differenziert werden (Kattman et al. 2011).

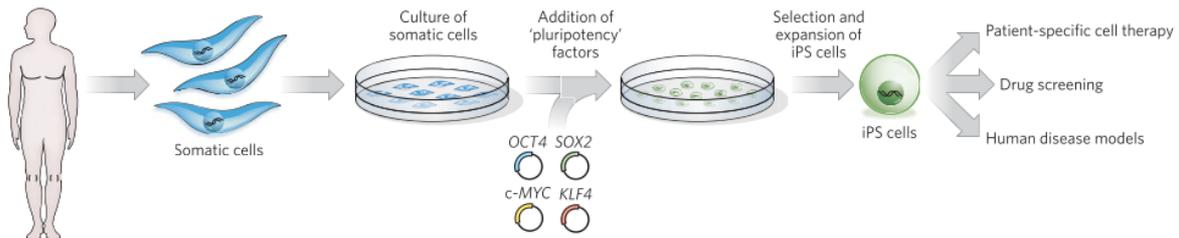


Abbildung 5: Generierung von hiPSC. Die Generierung von hiPSC erfolgt durch eine virale Transduktion von somatischen Zellen mit Transkriptionsfaktoren (z.B. Oct4, Sox2, c-Myc und Klf4). Die hiPSC können anschließend selektiert und expandiert werden. Ihre Anwendung reicht von der Erforschung humaner Krankheitsmodelle bis zur patientenspezifischen Zelltherapie. Abbildung aus *“Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches”* (Yamanaka und Blau 2010).

In dieser Arbeit wurden die hiPSC-Zelllinien C25 (Moretti et al. 2010), UKEi001, UKEi003 und die nach *good manufacturing practices* (GMP) hergestellte hiPSC-Zelllinie TC-1133 (NINDS Human Cell and Data Repository; Rutgers University, USA) verwendet. Die Expansion und die anschließende kardiale Differenzierung der hiPSC erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll, welches in diesem Institut entwickelt wurde (Breckwoldt et al. 2017). Im Folgenden erfolgt eine stark verkürzte Zusammenfassung des etablierten Protokolls. Die Kardiomyozyten, die zur Herstellung von EHTs verwendet wurden, wurden hauptsächlich von Dr. rer. nat. Marina Reinsch differenziert.

Die hiPSC müssen für eine erfolgreiche Differenzierung vollständig undifferenziert bleiben. Hierfür wurden die Stammzellen unter Verwendung von T75 Zellkulturflaschen (Corning) in FTDA, einem auf DMEM/F12-basierten Medium, kultiviert. Die Inkubation der hiPSC in FTDA Medium (Tabelle 1) sollte die spontane Differenzierung der Stammzellen reduzieren, wie in der Arbeitsgruppe um Frank et al. (2012) beschrieben wurde.

Material und Methoden

Die kardiale Differenzierung der Stammzellen erfolgte in einem dreidimensionalen System. Hierbei wurde zunächst die Bildung von sogenannten Embryoidkörperchen (embryoid bodies, EB) induziert. EBs bezeichnen Zellaggregate aus Stammzellen, welche über die Induktion mesodermaler Progenitorzellen kardial differenziert werden können. Hierfür ist die Aktivierung des Wnt-Signalwegs, einem für die Embryogenese essentieller Signaltransduktionsweg, entscheidend. Die Induktion des kardialen Mesoderms ermöglichte in einem zweiten Schritt eine erfolgreiche Kardiomyozytendifferenzierung.

Für die mesodermale Induktion wurden die EBs unter Verwendung von T175 Zellkulturflaschen (Sarstedt) im *Mesoderm Induction Medium* (Tabelle 1) kultiviert. Im Gegensatz zur Aktivierung des Wnt-Signalwegs für die Induktion mesodermaler Progenitoren, war für die kardiale Spezifizierung eine Inhibierung des Wnt-Signalwegs entscheidend. Hierfür erfolgte die Kultivierung der Zellen in drei verschiedenen Differenzierungsmedien: im *Cardiac Differentiation Medium I/II/III* (Tabelle 1). Die differenzierten Kardiomyozyten wurden zu Einzelzellsuspensionen dissoziiert und konnten zur Generierung von EHTs eingesetzt werden.

Medium	Zusammensetzung
FTDA	DMEM/F12 2 mM L-Glutamin Transferrin-Selenium (5 mg/l; 5 µg/l) 0,1% humanes Serumalbumin 1% Lipidmix 5 mg/l Insulin 50 nM Dorsomorphin 2,5 ng/ml Activin A 0,5 ng/ml TGF-β 1 30 ng/ml bFGF
Mesoderm Induction Medium	RPMI 1640 4 mg/ml PVA 0,1% Lipidmix 250 µM Phosphoascorbat

Material und Methoden

	1% Transferrin-Selenium 10 mM HEPES 10 μ M Y-27632 10 ng/ml BMP-4 3 ng/ml Activin-A 5 ng/ml bFGF
Cardiac Differentiation Medium I	RPMI 1640 0,1% Lipidmix 250 μ M Phosphoascorbat 1% Transferrin-Selenium 1% Penicillin/Streptomycin 1 μ M Y-27632 100 nM DS-I-7
Cardiac Differentiation Medium II	RPMI 1640 500 μ M 1-Thioglycerol 10 mM HEPES 0,5% Penicillin/Streptomycin 1 μ M Y-27632 2% B27 mit Insulin 100 nM DS-I-7
Cardiac Differentiation Medium III	RPMI 1640 2% B27 ohne Insulin 10 mM HEPES 0,5% Penicillin/Streptomycin 500 μ M 1-Thioglycerol 1 μ M Y-27632

Tabelle 1: Zellkulturmedien

2.4.2 Optimierung der EHT-Geometrie

In einem ersten Schritt erfolgte die Optimierung der EHT-Geometrie zur Transplantation. Hierfür wurde eine Umgestaltung der zuvor beschriebenen streifenförmigen EHT-Geometrie (Weinberger et al. 2016) in eine netzförmige flächenhafte Morphologie angestrebt. Die Umstrukturierung der EHT-Geometrie war gemeinsam mit der Ausarbeitung eines Protokolls zur Herstellung dieser EHT-Patches

Material und Methoden

ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit. Daher werden die technischen Zeichnungen, die dreidimensionalen (3D) Modellierungen und das finale Protokoll zur Herstellung der optimierten Herzmuskelkonstrukte im Ergebnissteil thematisiert.

Prinzipiell werden EHTs in 6-Well oder 24-Well Zellkulturschalen hergestellt und kultiviert. Für die Herstellung der dreidimensionalen Herzmuskelkonstrukte wird zunächst eine 2%ige Agaroselösung in eine Vertiefung der Zellkulturschale pipettiert. Bevor die Agaroselösung aushärtet, wird eine Teflonform in das Well platziert (Teflonplatzhalter), mit derer Hilfe eine spezifische Agarose-Gussform erzeugt wird. Anschließend wird eine Silikonhalterung, welche den EHTs als Verankerung dient, in diese Gussform platziert und ein Kardiomyozyten beinhaltender Mastermix in die Agarose-Gussform pipettiert. Es folgt die Inkubation der EHTs bei 37 °C für eine Stunde und abschließend der Transfer der Silikonhalterung mit den verankerten EHTs in eine neue mit Medium gefüllte Zellkulturschale.

2.4.3 Kultivierung von EHTs

Nach der Herstellung der EHTs wurden diese täglich mit 6,5 ml frisch angesetztem Medium über einen dreiwöchigen Zeitraum versorgt. Für den Medienwechsel wurden die Herzmuskelkonstrukte jeweils in eine neue 6-Well-Zellkulturschale transferiert, in der sich bereits vorgewärmtes Medium befand. Der Inkubator wurde mit 37 °C, 7% CO₂ und 40% O₂ bei einer relativen Luftfeuchtigkeit (rH) von 98% betrieben.

Die EHT-Patches wurden im Verlauf dieser Arbeit in zwei verschiedenen Kulturmedien inkubiert (Tabelle 2). Zu Beginn erfolgte die Inkubation in der serumhaltigen Standardkultur. Inspiriert durch die Arbeiten um Tiburcy et al. (2017) und dem Ziel einer potenziellen klinischen Applikation wurde anschließend auf serumfreie Kulturbedingungen umgestiegen, bei der die serumhaltigen Komponenten durch xenofreie Substanzen, B27 als Serumersatz und Wachstumsfaktoren ersetzt wurden. Aufbauend auf Arbeiten der Arbeitsgruppe von Nenad Bursac (Jackman et al. 2016) wurde am Ende dieser Arbeit eine dynamische Kulturbedingung etabliert, bei der die EHTs beinhaltenden Zellkulturschalen auf eine im Inkubator befindliche bewegliche Plattform platziert wurden. Diese Plattform wurde mit einem Kippwinkel von 30° und einer Frequenz von 0,4 Hz eingestellt. Durch den Einsatz dynamischer Kulturbedingungen erhofften wir uns eine durch die Kinetik des Kulturmediums

Material und Methoden

bedingte verbesserte Versorgung des Gewebes. Dieser Ansatz wurde inspiriert durch eine Veröffentlichung um Jackman et al. (2016), bei der durch den Einsatz einer dynamischen Kultur eine Erhöhung der Kontraktilität, der Kardiomyozytengröße und der Expression sarkomerischer Proteine in künstlichen Herzmuskelgeweben nachgewiesen werden konnte.

Kulturmedium Komponenten	Standardkultur	Serumfrei + Wachstumsfaktoren
DMEM	Basismedium	Basismedium
B27 (selbst hergestellt) mit humanem Insulin		4% (0,12 µg/ml Insulin)
Pferdeserum	10%	
Humanes Insulin	11 µg/ml	
Aprotinin	33 µg/ml	33 µg/ml
Penicillin/Streptomycin	1%	1%
Nicht-essentielle Aminosäuren		1%
L-Glutamin		2 mM
IGF-1		100 ng/ml
FGF-2		10 ng/ml
VEGF		5 ng/ml
TGF-β		5 ng/ml

Tabelle 2: EHT-Kulturmedien

2.4.4 Kontraktionsanalyse der EHTs

Die Bestimmung der EHT-Kontraktilität erfolgte mit Hilfe der Fiji-Software. Dazu wurden mit der iPhone 6 Kamera (8 Megapixel iSight Kamera mit 1,5 µm Pixeln, $f/2.2$ Blende) Zeitlupenvideos mit 120-240 fps (*frames per second*) der kontrahierenden EHTs aufgenommen. Aus den generierten Videos wurden im Moment maximaler

Kontraktion und Relaxation Bildschirmaufnahmen erstellt. Dadurch konnte der größte Abstand der Silikondeflektion bzw. der Gewebeverformung bestimmt werden. In der Fiji-Software wurde zunächst der bekannte Durchmesser der Silikonscheiben von 3 mm als Maßstab genommen und zur Kalibrierung der Pixelgröße verwendet. Anschließend wurde die Differenz der Silikonsäulenposition bzw. der Lokalisation von bestimmten Gewebepunkte in maximaler Kontraktion und Relaxation bestimmt. Um eine Korrelation der Deflektion und der resultierenden Kraft zu ermöglichen, musste der Elastizitätsmodul (E-Modul, auch Youngscher Modul) der Silikonsäulen, der neu generierten Silikonhalterungen, errechnet werden. Der E-Modul ist eine Materialkonstante und beschreibt das Verhältnis zwischen der Spannung und der daraus resultierenden Dehnung eines Körpers und stellt folglich ein Maß für die Steifigkeit dar. Definiert wird er als Steigung des linear-elastischen Bereiches (Hookesche Gerade) im Graphen des Spannungs-Dehnungs-Diagramms, welches das Ergebnis eines zu untersuchenden Materials im Zugversuch darstellt. Der E-Modul ist Bestandteil der Vandeburgh'schen Formel (Vandeburgh et al. 2008), welche hier zur Berechnung der Kontraktilität der EHT-Patches verwendet wurde.

$$F = \frac{3EI\delta}{L^3}$$

, $F \rightarrow$ Kraft, N

, $E \rightarrow$ Elastizitätsmodul, $\frac{N}{mm^2}$

, $I \rightarrow$ Flächenträgheitsmoment mit $I = \frac{\pi R^4}{4}$, mm^4

, $R \rightarrow$ Radius der Silikonsäule, mm

, $\delta \rightarrow$ Auslenkung der Silikonsäule, mm

, $L \rightarrow$ Länge der Silikonsäule, mm

Abbildung 6: Vandeburgh'sche Formel.

Für die Bestimmung des E-Moduls wurde der Versuchsaufbau aus Nils Sörensens Dissertation (2013) verwendet. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die hier neu etablierte Silikonhalterung der EHT-Patches als Messobjekt verwendet wurde. Die Silikonhalterung wurde vertikal mit einer Plexiglasklemme fixiert, welche durch eine Gewindeschraube eine variable Einstellung ihrer Höhe ermöglichte. Gleichzeitig bestand am unteren Ende der Klemme Kontakt zu einer Feinmessuhr, welche das

detaillierte Messen einer Höhenveränderung ermöglichte. Um die Auslenkung zu quantifizieren, wurde ein waagrechter Metallzeiger so aufgestellt, dass dieser exakt auf das Zentrum der Silikonsäule zeigte. Durch das Anbringen eines definierten Gewichtes an die Silikonsäule wurde diese um eine messbare Länge ausgelenkt und der Metallzeiger auf die neue Position ausgerichtet. Die dabei zurückgelegte Differenz konnte mit Hilfe der Feinmessuhr abgelesen werden und ermöglichte somit die Bestimmung der Auslenkung der Silikonsäule (δ) bei einer definierten einwirkenden Kraft (F). Durch die Äquivalenzumformung der Vandenburg'schen Formel konnte nun der E-Modul der neu etablierten Silikonhalterungen und damit auch die Kontraktilität eines einzelnen EHTs bestimmt werden.

2.4.5 Quantifizierung des EHT-Remodellings

Zur Analyse der EHT-Morphologie wurde das Ausmaß der Breitenabnahme im Verlauf der Kultur ermittelt. Der Prozess, bei dem die Kardiomyozyten reifen und das Gewebe sich in seiner initialen Form umwandelt, indem es zu einer Reduktion der Länge und insbesondere der Breite kommt, wird in diesem Kontext als *Remodelling* bezeichnet. Die Reduktion der EHT-Breite wurde quantifiziert, indem die Breite bei jeweils 30%, 50% und 70% der initialen Länge eines EHTs mit Hilfe der Fiji-Software vermessen wurde. Diese drei Werte wurden für den jeweiligen Tag gemittelt und im Zeitverlauf dargestellt.

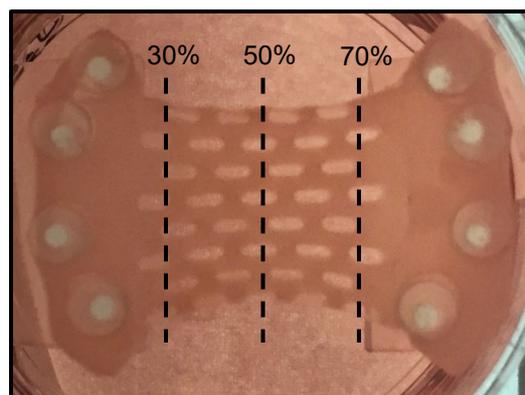


Abbildung 7: Quantifizierung des Remodellings. Zur Analyse wurde jeweils die Breite des zu untersuchenden EHTs bei 30%, 50% und 70% der EHT-Gesamtlänge gemessen.

2.5 Transplantation der EHTs

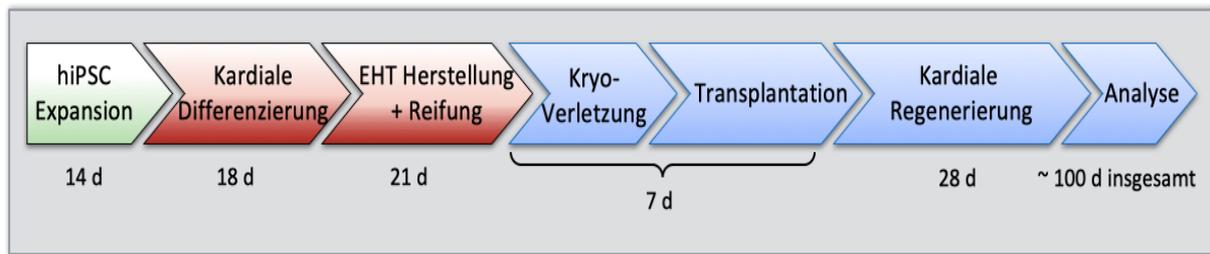


Abbildung 8: Graphische Darstellung des Studiendesigns.

Nachdem die hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten zur Herstellung von EHT-Patches eingesetzt wurden, erfolgte eine dreiwöchige Kultivierung der Herzmuskelgewebe. Anschließend wurden die künstlichen Herzmuskelgewebe transplantiert. Für die Transplantation wurden weibliche Meerschweinchen (Charles River and Envigo) im Alter von 8-9 Wochen als Empfängertier verwendet (Körpergewicht (KG): 300-450 g). Meerschweinchen wurden auf Grund ihrer menschenähnlicheren Herzphysiologie (Watanabe et al. 1985) anderen Tiermodellen vorgezogen. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet, um eine stressfreiere Haltung zu fördern. Das Studienprotokoll sah vor, dass zunächst die Induktion eines Myokardinfarkts erfolgte. Die Transplantation des künstlichen humanen Herzgewebes erfolgte eine Woche nach der Induktion der myokardialen Verletzung. Alle operativen Maßnahmen wurden von Dr. med. Liesa Castro, Dr. med. Florian Weinberger und Birgit Geertz durchgeführt (Castro et al. 2019).

Präoperativ wurde den Meerschweinchen Buprenorphin (0,05 mg/kg KG), Carprofen (4-5 mg/kg KG) sowie Atropin (0,5 mg/kg KG) subkutan injiziert. Der Operationsablauf begann durch die Narkoseeinleitung mittels Isoflurananästhesie (2-3%). Der Thorax wurde für die bessere Sicht auf den Operationssitus enthaart und anschließend desinfiziert. Es erfolgte eine Tracheotomie und das Einbringen eines Trachealtubus. Über den Tubus erfolgte nun die Anästhesie mit Isofluran (3%) und eine kontinuierliche mechanische Ventilation der Meerschweinchen. Der Thorax wurde mittels einer linkslateralen Thorakotomie auf Höhe des 5. Interkostalraums eröffnet. Nach der Dissektion der Interkostalmuskulatur und der Eröffnung der Pleura, wurden die Rippen mit Hilfe eines Retraktors gespreizt und das darunterliegende Perikard vorsichtig eröffnet, um eine klare Sicht auf das Myokard zu erhalten.

Material und Methoden

Die myokardiale Verletzung wurde mittels einer in flüssigem Stickstoff abgekühlten Aluminiumsonde (Durchmesser 0,5 cm) induziert. Die Aluminiumsonde wurde dabei für jeweils 30 Sekunden auf die Vorderwand des linken Ventrikels gedrückt und anschließend durch das Pipettieren einer erwärmten Kochsalzlösung vom Myokard gelöst. Dieser Prozess der Infarktinduktion wurde vier Mal wiederholt. Die operativen Zugänge wurden mit Wundnähten verschlossen.

Die Transplantation eines EHTs erfolgte sieben Tage nach Induktion des Myokardinfarkts. Hierfür wurden die vorher genutzten Zugangswege wiedereröffnet. Das Herzmuskelkonstrukt wurde an das infarktangrenzende vitale Myokard angenäht und überdeckte das Narbengewebe komplett. Die Meerschweinchen wurden ab dem 3. präoperativen Tag täglich mit Ciclosporin (7,5 mg/kg KG) und Methylprednisolon (2 mg/kg KG) immunsupprimiert. Die Immunsuppression durch Ciclosporin erfolgte weiterhin täglich für die nachfolgenden vier postoperativen Wochen (5 mg/kg KG). Des Weiteren erhielten die Tiere innerhalb der ersten fünf postoperativen Tage zwei Mal täglich Buprenorphin (0,05 mg/kg KG) und ein Mal täglich Carprofen (5 mg/kg KG). Die Herzen wurden vier Wochen nach erfolgter Transplantation zur histologischen Aufarbeitung entnommen.

2.6 Histologie

2.6.1 Herstellung histologischer Präparate

Es wurden Histologien der explantierten Herzen als auch der optimierten Herzmuskelkonstrukte hergestellt. Die Herzen und die EHTs wurden in 4% Histofix® (Roth) bei 4 °C fixiert und danach mit PBS (*Phosphate buffered saline*) bzw. TBS (*Tris-buffered saline*) gewaschen. Nach der Fixation wurden die Herzen von apikal nach basal in drei bis fünf Regionen unterteilt und entsprechend seziiert (Abbildung 26). Dadurch war eine detaillierte Analyse des Infarktbereichs und die Bestimmung des Anteils der Remuskularisierung durch den Graft möglich. Die EHTs wurden für die Anfertigung der Histologien von ihren Silikonhalterungen gelöst. Die nachfolgende Entwässerung und Herstellung der 4 µm dünnen Paraffinschnitte erfolgte in Kooperation mit Kristin Hartmann der HEXT Core Facility für Mauspathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

2.6.2 Entparaffinieren

Die Paraffinschnitte wurden durch die zweimalige Inkubation der Präparate in Xylol für jeweils 15 min entparaffiniert. Die Inkubation erfolgte für die ersten 15 min in einem Wärmeschrank bei 40 °C und für die nachfolgenden 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Rehydrierung der Präparate für jeweils 2 min in einer Ethanolreihe mit abnehmender Konzentration (100%, 100%, 96%, 96%, 80%, 70%) und dem nachfolgenden kurzen Waschen der Schnitte mit destilliertem Wasser.

2.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Analyse der EHT-Schnitte wurden nach dem Entparaffinieren Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (H.E.) angefertigt. In einem ersten Schritt erfolgte die zehnmünütige Färbung mit Hämalaun nach Mayer. Anschließend wurden die Schnitte für zehn Minuten mit fließendem Leitungswasser gebläut. Danach wurden die Schnitte kurz in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend für weitere zehn Minuten mit Eosin gefärbt. Zur Beendigung der Färbung erfolgte die Inkubation in destilliertem Wasser und eine Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (80%, 96%, 96%, 100%, 100%) und Xylol. Die Inkubation in den Alkoholen und dem Xylol erfolgte für jeweils 2 min. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte mit dem Eindeckmedium Eukitt® (Sigma-Aldrich, 03989) eingedeckelt.

2.6.4 Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Zur differenzierten Darstellung von Narbengewebe erfolgte für die Präparate der Meerschweinchenherzen die Anfertigung von Masson-Goldner-Trichrom-Färbungen. Der Färbeprozess begann mit einer zehnmütigen Inkubation mit Eisenhämatoxylin nach Weigert und dem anschließenden zehnmütigen fließenden Wässern. Es folgte die 60-minütige Färbung mit Ponceaurot, die siebenminütige Färbung mit Wolframatophosphorsäure-Orange und die 20-minütige Färbung mit Anilinblau. Nach der Inkubation der entparaffinierten Präparate mit den jeweiligen Farbstoffen erfolgte jeweils das fünfminütige Abspülen in 1% Essigsäure und destilliertem Wasser. Abschließend wurden die Schnitte in 100%igen Ethanol und Xylol entwässert. Dieses wurde zwei Mal für jeweils eine Minute durchgeführt. Die Schnitte wurden mit Eukitt® eingedeckelt.

2.6.5 Immunhistochemie

Die Methode der Immunhistochemie ermöglicht die Darstellung von Proteinen durch die spezifische Bindung von Antikörpern. Zur immunhistochemischen Analyse der Gewebe wurden Dystrophin-, human Ku80- und Connexin-43-Färbungen durchgeführt. Diese Färbungen wurden in der HEXT Core Facility für Mauspathologie angefertigt.

Für die Anfertigung der Immunhistochemien wurde die Ventana® BenchMark® XT (Roche) verwendet, ein vollständig automatisiertes Färbegerät. Das Antigen-Retrieval für den Dystrophin-Antikörper (Millipore, MAB 1645; Verdünnung: 1:150) erfolgte für 60 min in einem EDTA-Puffer, für den humanen Ku80-Antikörper (Cell Signaling Technology, CST-2180; Verdünnung: 1:800) für 30 min in einem Citratpuffer. Die Färbung des Connexin-43 Antikörpers (BD Transduction, Laboratories, 610061) erforderte keinen Gebrauch eines spezifischen Puffersystems. Dystrophin- und humane Ku80-gefärbte Schnitte wurden mit Hilfe des Hamamatsu Nanozoomers gescannt und mit der NDP-Software (NDP.view 2.6.13) visualisiert. Für die Anfertigung mikroskopischer Aufnahmen wurde ein Axioskop 2 Mikroskop (Zeiss) verwendet.

2.6.6 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz beschreibt ähnlich wie die Immunhistochemie eine histologische Analysemethode, bei der Proteine mittels Antikörperbindung dargestellt werden können. Im Gegensatz zur Immunhistochemie wird hier die Darstellung der

Material und Methoden

Proteine mittels eines Fluorochroms ermöglicht, welches an einen sekundären Antikörper gebunden ist. Die Fluorochrome werden durch die Absorption von Licht zur spontanen Emission von Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt, welches durch die Verwendung von Filtern für das menschliche Auge als Signal erkenntlich gemacht werden kann.

Die Darstellung der Primärantikörper erfolgte entweder mit dem auf Multimer-Technologie basierten UltraView Universal DAB Detection Kit (Roche) oder durch die Visualisierung eines Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörpers (Alexa-konjugiert, Thermofisher).

2.6.6.1 α -Actinin

Zur Darstellung der Kardiomyozytenstruktur wurde eine α -Actinin Färbung für paraffineingebetteten Präparate etabliert. Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte für 5 min in eine 1:10 in Wasser verdünnten ein molaren Tris/HCl-Pufferlösung (pH 7,4) getaucht. Für die Epitop-Demaskierung (Antigen-Retrieval) wurde Proteinase K dem Pufferansatz hinzugegeben und die Schnitte, in einem im Wasserbad befindlichen Reaktionsgefäß, für 15 min bei 37 °C belassen. Es folgte das zweimalige Waschen mit PBS für jeweils 5 min und die vollkommene Bedeckung der Schnitte mit einer Blocklösung (0,05 M TBS (pH 7,4), 10% fetales Kälberserum, 1% bovines Serum-Albumin (BSA), 0,5% Triton™ X-100) für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der primäre monoklonale α -Actinin Antikörper (Sigma-Aldrich, clone EA-53, A7811) in einer Verdünnung von 1:800 in einer Antikörperlösung (0,05 M TBS, pH 7,4; 1% BSA, 0,5% Triton™ X-100) hinzugegeben. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C in einer dunklen Feuchtkammer platziert. Am nächsten Tag erfolgte zunächst das dreimalige Waschen mit PBS für jeweils 5 min. Anschließend wurden der sekundäre Antikörper Alexa Fluor® 488 (goat anti-mouse-IgG-Alexa 488, Invitrogen, A-11001) und der Kernfarbstoff DRAQ5™ (Biostatus Limited, DR50050) in einer Verdünnung von 1:800 den Schnitten hinzu pipettiert. Die Inkubation der sekundären Antikörperlösungen erfolgte auf Grund ihrer Lichtsensitivität für eine Stunde in einer dunklen Feuchtkammer. Es folgte das dreimalige Waschen der Schnitte für jeweils 5 min in PBS unter abgedunkelten Bedingungen. Letztlich wurden die Schnitte mit jeweils 100 μ l Mowiol® (AppliChem, A9011) eingedeckelt und über Nacht bei Raumtemperatur unter abgedunkelten Bedingungen stehen gelassen. Für

die Anfertigung mikroskopischer Aufnahmen wurde das Konfokalmikroskop LSM 800 (Zeiss) benutzt.

2.6.6.2 Connexin-43

Zur Darstellung der interzellulären Verbindungen wurden Connexin-43 Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Diese Färbungen wurden analog zum Färbeprotokoll der zuvor beschriebenen α -Actinin Färbungen (2.6.6.1) hergestellt. Die Connexin-43 Färbung konnte jedoch ohne die Verwendung eines spezifischen Puffersystems zum Antigen-Retrieval realisiert werden. Der primäre Connexin-43 Antikörper (BD Transduction Laboratories, 610061; 2.3.1) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 nach dem Blocken den entparaffinierten Präparaten hinzugegeben.

2.6.6.3 Phalloidin

Um zelluläre Expressionsmuster der EHT-Patches darzustellen, wurden neben α -Actinin Färbungen auch Phalloidin Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Phalloidin ermöglicht durch seine hohe Affinität zum filamentösen Aktin (F-Aktin) die Darstellung des Zytoskeletts. In dieser Arbeit wurden sogenannte *whole mount* Färbungen angefertigt, welche die Färbung des EHTs im Ganzen bezeichnet und die dreidimensionale Betrachtung des Gewebes im konfokalen Mikroskop ermöglicht. Die EHTs wurden wie unter 2.6.1 beschrieben fixiert und gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der EHTs in der unter 2.6.6.1 erwähnten Blocklösung für 6 h. Phalloidin (Invitrogen, A-12379) wurde dann in einer Verdünnung von 1:60 in der bereits beschriebenen Antikörperlösung den EHTs hinzugegeben. Die Inkubation des Zytoskelettfarbstoffs erfolgte für 24 h bei 4 °C auf einem Rollschüttler. Dadurch, dass das verwendete Phalloidin bereits an ein Fluorochrom gekoppelt war, wurde kein sekundärer Antikörper für dessen Visualisierung benötigt. Nach der Inkubation der Präparate über Nacht bei 4 °C unter abgedunkelten Bedingungen erfolgte das wiederholte Waschen mit PBS. Letztlich wurde das Eindeckmedium Fluoromount-G® (SouthernBiotech, 0100-01) verwendet, um die gefärbten EHTs auf einem Objektträger mit entsprechender Vertiefung einzudeckeln.

2.7 Infarktgrößenbestimmung

Für die Infarktgrößenbestimmung wurden Querschnitte der Masson-Goldner-Trichrom gefärbten Meerschweinchenherzen zur Analyse herangezogen. Die Quantifizierung der Infarktgröße beruhte auf eine längenbasierte Methode, bei der entlang der Mittellinie des linksventrikulären Narbengewebes gemessen wurde (Takagawa et al. 2007). Die Mittellinie ist bei dieser Methode definiert als Zentrum zwischen der endo- und epikardialen Oberfläche. Für die Analyse eines Herzens wurde je ein Schnitt aus der apikalen, midpapillären und basalen Region (Abbildung 26) untersucht. Die Länge der Mittellinie wurde mittels der Fiji-Software eingezeichnet und gemessen. Für die Messung wurden nur Infarktareale in Betracht gezogen, bei denen mehr als 50% des Myokardgewebes durch die Induktion des Myokardinfarktes beschädigt wurden. Die resultierende Infarktgröße wurde als prozentualer Wert angegeben, der durch die Division der summierten Infarktängen und der entsprechenden linksventrikulären Umfänge, gemessen entlang der Mittellinie, aller Schnitte eines Herzens errechnet wurde.

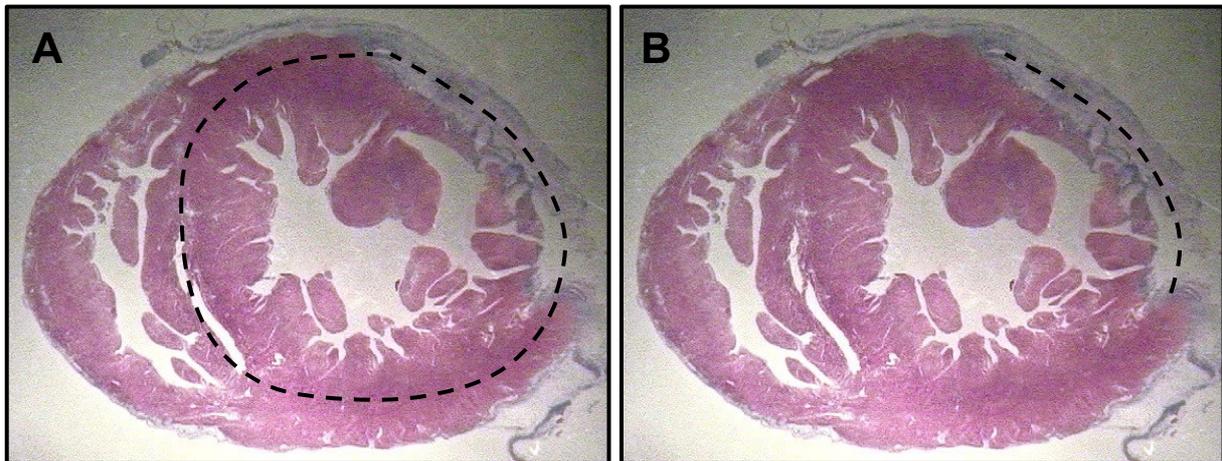


Abbildung 9: Längenbasierte Bestimmung des Infarktareals. Ermitteln des (A) linksventrikulären Umfangs und der (B) Infarktlänge im Querschnitt eines Masson-Goldner-Trichrom gefärbten Meerschweinchenherzens.

2.8 Graftgrößenbestimmung

Für die Bestimmung der Graftgröße wurden Querschnitte der Dystrophin gefärbten Meerschweinchenherzen untersucht. Die Quantifizierung der Graftfläche erfolgte manuell in der Fiji-Software und wurde in Relation zur jeweiligen ermittelten Narbenfläche desselben histologischen Präparats gesetzt. Insgesamt wurden pro Herz jeweils ein Schnitt einer jeweiligen von apikal nach basal angefertigter Sektion zur Graftgrößenbestimmung herangezogen. Somit erhielt man pro Herz drei bis fünf Werte, welche für die resultierende Graftgröße des untersuchten Herzens gemittelt und prozentual angegeben wurden.

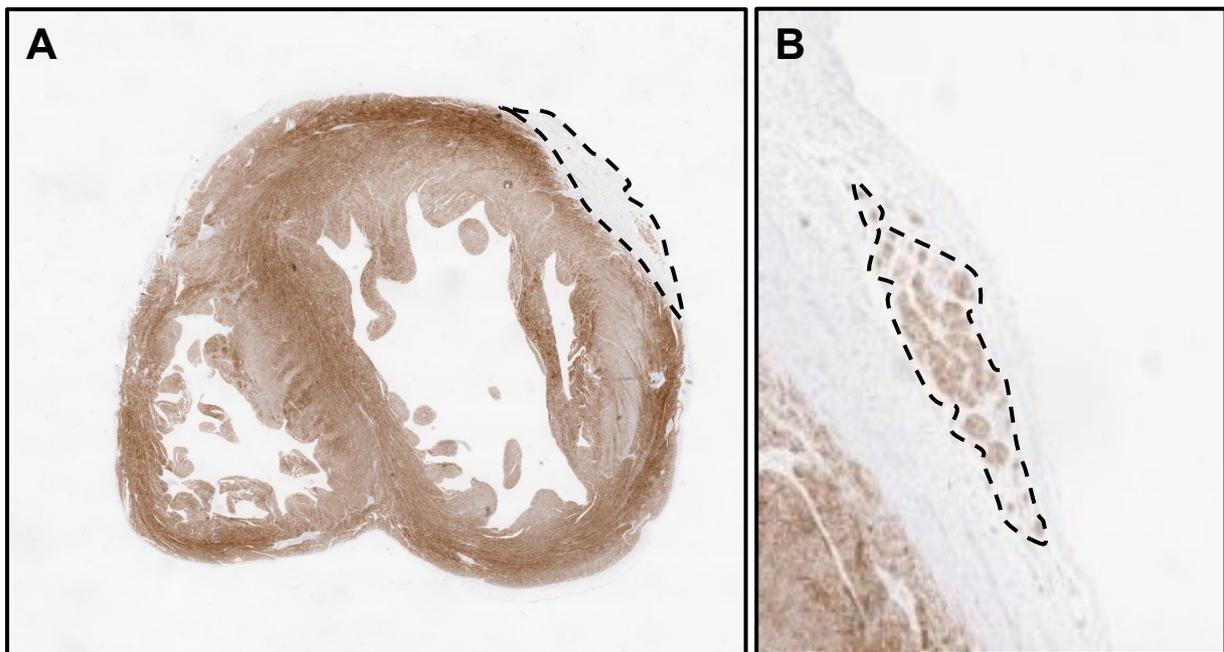


Abbildung 10: Bestimmung der Graftgröße. Bestimmung der **(A)** Narbenfläche und **(B)** Graftfläche im Dystrophin gefärbten Querschnitt eines Meerschweinchenherzens.

2.9 Analyse der transplantierten Kardiomyozyten

In dieser Studie wurde zur Beurteilung der Kardiomyozytenreife besonderer Wert auf die Quantifizierung der Sarkomerlängen und Kardiomyozytendurchmesser gelegt. Es wurden dabei die Werte aus den transplantierten Kardiomyozyten und dem Empfängermyokard der Meerschweinchen verglichen. Zur Bestimmung der Sarkomerlängen und der Kardiomyozytendiameter wurden α -Actinin Immunfluoreszenzfärbungen der Meerschweinchenherzen nach EHT-Transplantation analysiert. Die Sarkomerabstände und Durchmesser der analysierten Kardiomyozyten wurden mit der Fiji-Software ermittelt.

Für die Ermittlung der Sarkomerabstände wurde eine Gerade durch eine longitudinal angeschnittene Herzmuskelzelle gesetzt und der Abstand der Z-Scheiben gemessen. Durch die definierten Maßstabsbalken der angefertigten Immunfluoreszenzfärbungen konnten innerhalb des virtuellen Bildraumes exakte Messwerte generiert werden. Mit Hilfe der integrierten Funktion „Plot Profile“ konnten Pixelareale mit einem hohen immunfluoreszierenden Signal in Form von Amplituden innerhalb eines Intensitätsprofils visualisiert werden. In dem Diagramm wurde auf der X-Achse die Distanz in μm und auf der Y-Achse die Intensität des gemessenen Signals angegeben. Die Differenz der einzelnen Amplituden entsprach somit den Abständen der sarkomerischen Z-Scheiben. Die Quantifizierung der Kardiomyozytendurchmesser erfolgte durch die Messung der Breite einer einzelnen Zelle auf Höhe des Zellkerns.

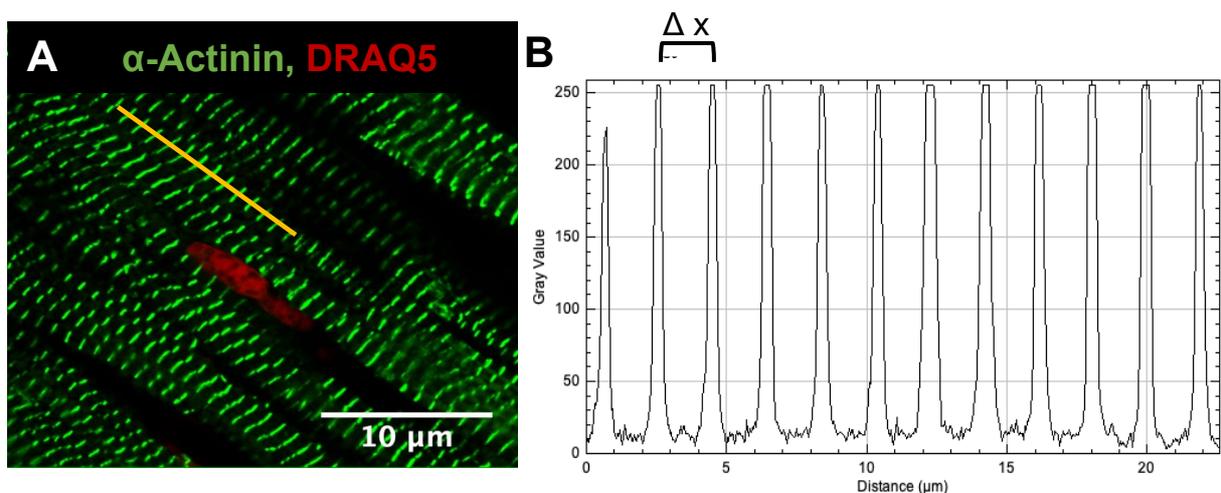


Abbildung 11: Bestimmung der Sarkomerlänge. (A) Legen einer Gerade durch eine longitudinal angeschnittene Herzmuskelzelle, **(B)** Resultierendes Intensitätsprofil

Material und Methoden

durch Verwendung der „*Plot Profile*“ Funktion. Anhand der Amplitudendifferenzen werden die Sarkomerlängen (Δx) bestimmt.

2.10 Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten werden als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) präsentiert.

3 Ergebnisse

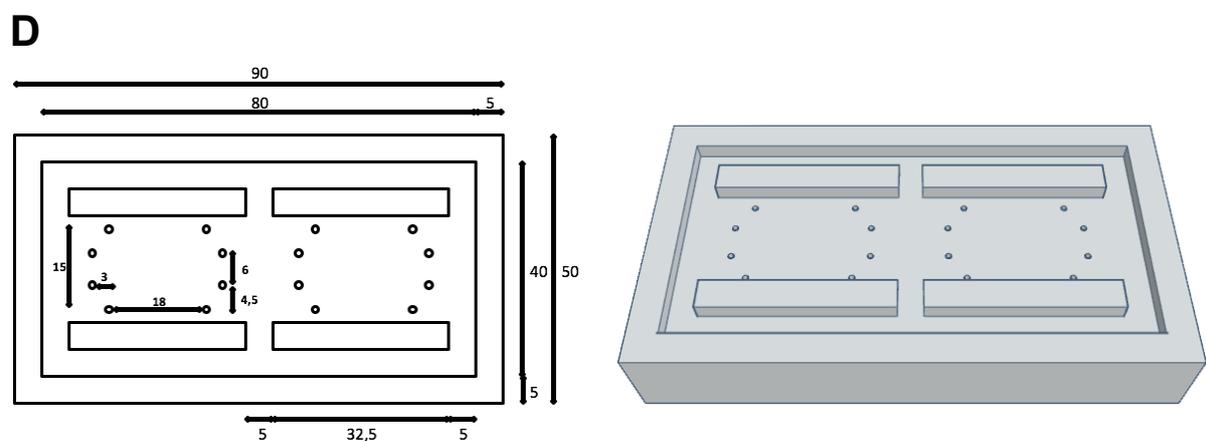
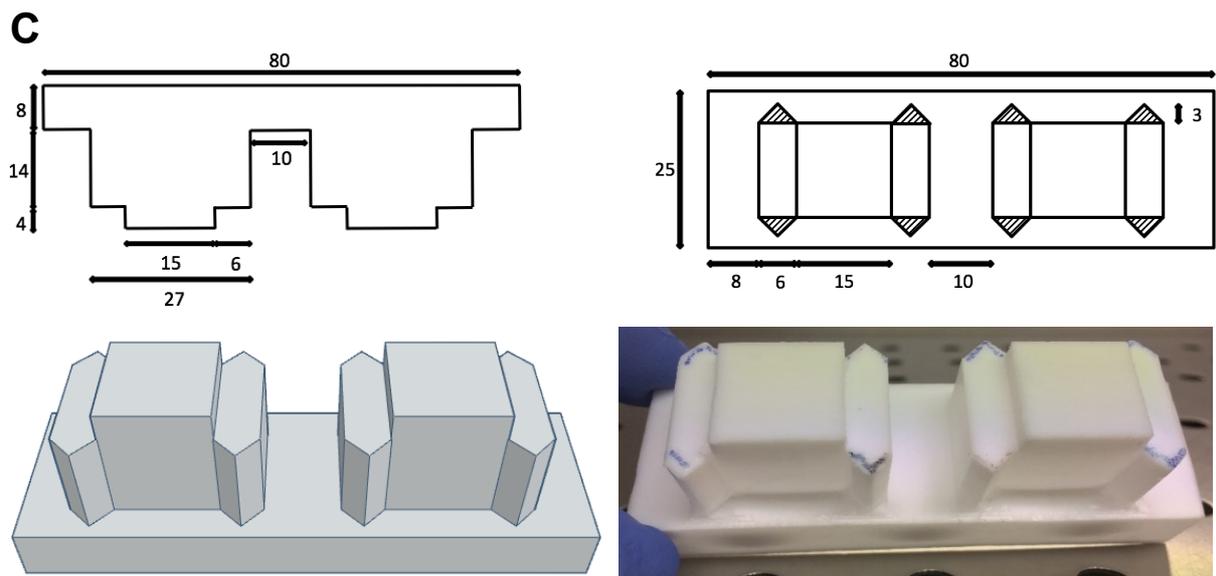
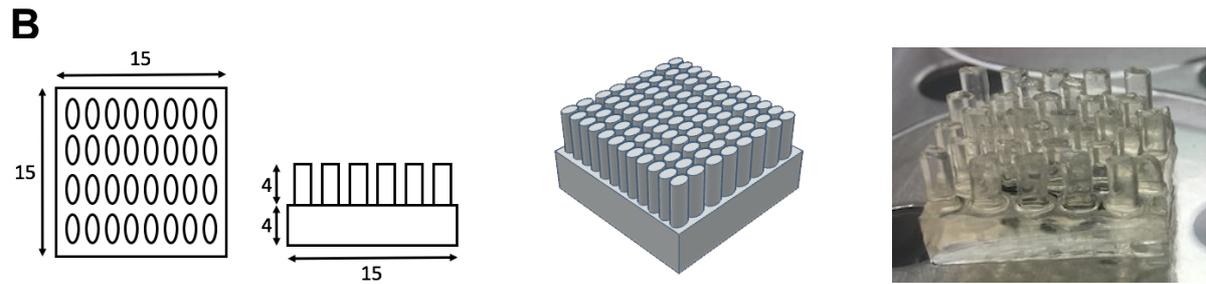
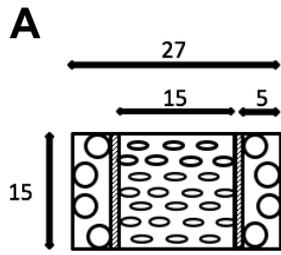
3.1 Optimierung der EHT-Geometrie zur Transplantation

In einer Proof-of-concept-Studie waren streifenförmige EHTs in einem Meerschweinchenmodell transplantiert worden (Weinberger et al. 2016). Diese Geometrie eignet sich jedoch nicht für eine klinische Anwendung. Ziel dieser Arbeit war die Optimierung der EHT-Geometrie für die Transplantation. Hierzu sollten EHT-Patches, die sich zur Transplantation in einem Kleintiermodell eignen, generiert werden. Darüber hinaus sollte die Geometrie aber auch durch die Möglichkeit einer Vergrößerung für eine Transplantation im Großtiermodell, und perspektivisch für die Anwendung in einer klinischen Studie, bieten. Aufbauend auf die Dissertation von Mohammad Yusuf Nejahsie (2019) wurden zu Beginn der Arbeit fünf EHT-Patches in einem 6-well-Format mit je drei gegenüberliegenden Silikonsäulen angefertigt. Bei diesen EHTs kam es im Kulturverlauf zu einem starken Remodelling. Damit ging die deutliche Reduktion der initial flächenhaften Morphologie und des Anteils der Netzstruktur einher. Dies widersprach dem Ziel einer Herstellung von flächenförmigen EHTs, die trotz Remodelling die komplette Abdeckung einer myokardialen Narbe im Kleintiermodell ermöglichen sollte, sodass der Hauptteil dieser Arbeit darin bestand die Geometrie der EHTs weiter zu optimieren.

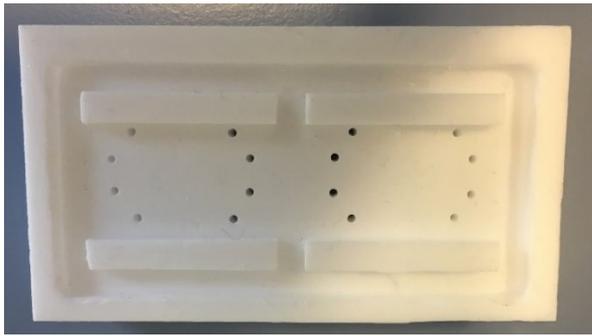
3.1.1 Technische Zeichnungen und 3D Modellierungen

Um das ausgeprägte Remodelling zu verhindern, sollten Silikonhalterungen mit je vier Silikonsäulen zwischen denen sich das EHT aufspannte, generiert werden. Zudem sollte der Anteil der Netzstruktur vergrößert werden, um eine bessere Versorgung der Kardiomyozyten durch die verminderten Diffusionsstrecken zu gewährleisten. Zu Beginn mussten die Materialien, welche zur Generierung der EHTs verwendet wurden, hergestellt werden. Es erfolgte die Anfertigung technischer Zeichnungen und 3D-Modellierungen der neuen Materialien zur Herstellung der EHT-Patches.

Ergebnisse



Ergebnisse



E

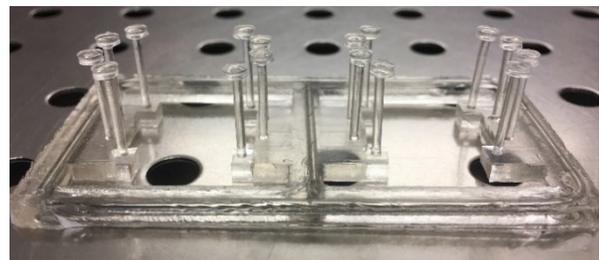
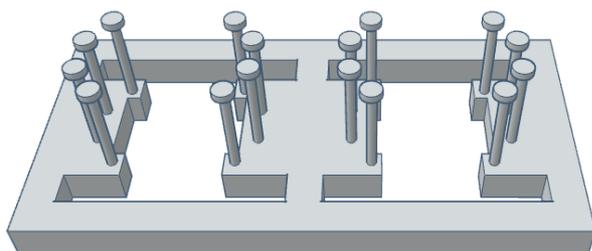


Abbildung 12: Technische Zeichnungen, 3D Modellierungen und Fotos der verwendeten Materialien. Technische Darstellung der **(A)** optimierten EHT-Geometrie. Technische Zeichnung, 3D Modellierung und Foto des **(B)** Silikonnetzes, **(C)** des Teflonplatzhalters, **(D)** der Teflonform zur Generierung der Silikonhalterung (alle Maße in mm). **(E)** 3D-Modellierung und Foto der Silikonhalterung.

In einem ersten Schritt wurden die Positivformen aus Teflon von Dipl.-Ing. Bülent Aksehirlioglu nach den technischen Zeichnungen angefertigt. Mit Hilfe dieser Positivformen konnten die abgebildeten Silikonmaterialien (Abbildung 12) hergestellt werden. Für die Herstellung des Silikons wurde das Zweikomponenten Sylgard™ 184 Silicone Elastomer Kit (Dow Corning) verwendet. Zunächst wurde das vom Hersteller vorgeschlagene Mischungsverhältnis des Silikon Elastomers und dem dazugehörigen *curing agent* von 10:1 hergestellt. Die beiden Lösungen wurden zu einer homogenen Mischung verrührt und anschließend unter einer Vakuumlampe platziert, um mögliche Luftporen zu eliminieren. Die homogene Lösung wurde anschließend über die Teflonformen gegossen und für die Aushärtung für 24-72 Stunden in einen Heihschrank bei 60 °C platziert.

Ergebnisse

Für die Herstellung einer Silikonhalterung wurde zusätzlich ein stabilisierender Edelstahldraht (1,5 mm Durchmesser) manuell so angepasst, dass dieser in seiner Form kongruent zu den geometrischen Maßen der vier Seiten der Silikonhalterung war. Außerdem wurde ein kleinerer gerader Edelstahldraht zur Stabilisierung in die Mitte der Silikonhalterung platziert. Die Drähte wurden dann in das flüssige Silikon beim Gießen auf das entsprechende Teflonpositiv eingelegt, sodass diese nach der Aushärtung des Silikons vollkommen davon umschlossen waren. Dies sorgte beim manuellen Gebrauch der Silikonhalterung für eine höhere Stabilität, welche insbesondere beim täglichen Medienwechsel der EHT-Patches wichtig war. Des Weiteren wurden kreisförmige Silikonscheiben mit einem Durchmesser von 3 mm an die Enden der Silikonsäulen (12 mm Länge, 0,625 mm Radius) befestigt (Abbildung 12E), welche später den EHTs als Aufhängung dienten. Die Entscheidung zur Verwendung von Silikonscheiben mit einem Durchmesser von 3 mm erfolgte im Rahmen von Versuchen, die unter 3.1.2 detailliert thematisiert werden. Als Befestigungsmedium wurde das homogene Silikongemisch verwendet, welches durch die Aushärtung im Heizschrank für 24-72 Stunden eine stabile Verbindung der Silikonscheiben mit den Silikonsäulen ermöglichte. Der letzte Schritt bei der Herstellung der Silikonmaterialien bestand darin, das verfestigte Silikon vorsichtig vom Teflon zu entfernen.

3.1.2 Generierung der EHT-Patches

Für die Generierung der EHTs wurde das bereits veröffentlichte Verfahren zur Herstellung von *Fibrin-based mini-EHTs* (FBMEs; Hansen et al. 2010) verwendet. Die in dieser Arbeit angestrebte Netzstruktur innerhalb der EHTs sollte durch die Erhöhung des Oberflächenanteils zu einer homogenen Kardiomyozytenverteilung beitragen. Des Weiteren sollte durch die Verwendung der Netzstruktur eine verbesserte Diffusion der Kardiomyozyten gewährleistet werden.

Nachdem die unter 3.1.1 beschriebenen Materialien angefertigt wurden, waren die Grundbedingungen für die Herstellung der in dieser Arbeit etablierten EHT-Patches gegeben. Jedoch erwies sich die Generierung der EHTs als komplex, da viele Hürden eine erfolgreiche EHT-Herstellung zunächst verhinderten. Hierbei waren insbesondere die Zusammensetzung des Mastermix, die Größe der Silikonscheiben, die initiale Geometrie des Teflonplatzhalters und die erschwerte Lösung des Gewebes vom

Ergebnisse

Silikon verantwortlich. Im Folgenden werden diese Hürden und die im Verlauf der Studie entwickelten Lösungswege, die zu einer erfolgreichen und reproduzierbaren Herstellung der EHT-Patches führten, dargestellt. Anschließend wird das finale Herstellungsprotokoll beschrieben.

Für die Herstellung der EHTs wurde ein Mastermix angesetzt, welcher die Zellsuspension, 2xDMEM, Matrigel, Fibrinogen, Y-27632 und ein Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM) beinhalten. Die Hinzugabe von Thrombin katalysierte die proteolytische Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin. Bei der Herstellung von EHT-Patches betrug das Mastermixvolumen 1400 µl und war folgendermaßen zusammengesetzt:

Zellsuspension	9-15x10 ⁶ hiPSC-abgeleitete Kardiomyozyten
2x DMEM	77 µl
Matrigel	140 µl
Fibrinogen	35 µl
Y-27632	1,4 µl
Thrombin	42 µl
Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM)*	ad 1400 µl

*Nicht-Kardiomyozyten-Medium bestehend aus 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin in DMEM

Zunächst wurde das Protokoll beibehalten und das Volumen einfach auf die Zellzahl hochgerechnet. Allerdings traten dabei einige Probleme auf. Das Volumen der Gussform, welches durch die Verwendung des neu etablierten Teflonplatzhalters generiert wurde, war zu groß, sodass die Silikonsäulen von zu wenig Mastermixvolumen benetzt waren. Dadurch gelang keine stabile Verankerung des EHTs, sodass viele der EHTs sich von den Silikonsäulen lösten. Dieses Problem konnte durch die Vergrößerung des Mastermixvolumens auf 1700 µl gelöst werden. Ein weiteres Problem stellte das initial verwendete Thrombinvolumen dar. Durch die Hinzugabe von 42 µl Thrombin (auf Basis der bereits etablierten Mastermixzusammensetzung der im Institut verwendeten kleinen streifenförmigen EHTs in einem 24-Well-Format errechnet) kam es zu einer zu schnellen Polymerisierung des Gewebes, was den Herstellungsprozess der EHT-Patches

Ergebnisse

erschwerte, da der Mastermix polymerisierte bevor die Silikonsäulen und das Silikonnetz vollständig umschlossen waren. Um den Herstellungsprozess der EHT-Patches zu erleichtern, wurde daher im Verlauf das Thrombinvolumen auf 10 µl reduziert.

Die Silikonscheiben besitzen als zentrale Verankerungen des künstlichen Herzmuskelgewebes eine essentielle Bedeutung im Herstellungsprozess. Im Verlauf der Etablierung wurden mehrere Silikonscheibendurchmesser verwendet, um die optimale Größe für eine robuste Verankerung des Gewebes zu bestimmen. Hierfür wurden Silikonhalterungen mit Silikonscheiben mit einem Durchmesser von 2 mm, 3 mm und 4 mm hergestellt, an denen zellfreie Konstrukte (sogenannte Dummies) gegossen wurden. Dabei stellte sich heraus, dass bei der Verwendung von 2 mm Durchmessern keine feste Verankerung bestand und das Gewebe sich in Folge vom Silikon löste. Bei der Verwendung von 4 mm durchmessenden Silikonscheiben kam es zu einer starken Überlappung der Silikonscheiben auf Grund des zu kleinen Raums im Well der Zellkulturschale. Die Silikonscheiben mit einem Durchmesser von 3 mm wiesen die optimale Größe auf, da es zu keiner Überlappung kam und die EHTs sich fest an das Silikon verankerten. Um den Silikonscheiben mehr Platz zu verschaffen und damit das Mastermixvolumen an diesem zentralen Bereich zu vergrößern, wurde die Geometrie des Teflonplatzhalters um die in Abbildung 12C schraffierte Fläche erweitert.

Ein weiterer wesentlicher Schritt, der zur erfolgreichen Herstellung von EHT-Patches beitrug, war die Verwendung von Pluronic. Initial inkubierten wir das Silikonnetz, welches im Herstellungsprozess der EHTs formgebend für das Netz im Gewebe war, für mehrere Stunden in einer 1%igen Pluroniclösung. Trotz der Inkubation in der Pluroniclösung haftete das Gewebe am Silikonnetz und riss in Folge dessen ein. Aus diesem Grund erhöhten wir die Konzentration des Pluronic und stellten eine 5%ige Pluroniclösung her. Das Silikonnetz wurde nach einer mehrstündigen Inkubation in dieser Lösung nachfolgend mit PBS und destilliertem Wasser gewaschen und reduzierte effizient die Reibung bzw. Anhaftung des Gewebes am Silikonnetz.

Durch die Adaptation der Mastermixzusammensetzung, der verwendeten Materialien, welche für die Herstellung und Kultivierung der EHT-Patches benötigt werden, und des Einsatzes der 5%igen Pluroniclösung konnte die angestrebte EHT-Geometrie mit einer

Ergebnisse

Größe von 1,5x2,7 cm in einem 6-Well-Format realisiert werden. Hierfür wurde der handgefertigte Teflonplatzhalter in eine 6-Well-Zellkulturschale platziert und jeweils ein Well mit 9 ml einer 60 °C warmen 2%igen Agaroselösung befüllt. Nach Aushärtung der Agaroselösung wurde das Silikonnetz, welches im späteren Verlauf für die Netzstruktur des EHTs verantwortlich war, in die am Boden des Wells entstandene Kavität platziert. Um eine Adhäsion des Silikonnetzes an das entstehende Herzmuskelkonstrukt zu verhindern, wurde das Silikonnetz vorher in einer 5%igen Pluroniclösung (Sigma-Aldrich, P2443) eingelegt und nachfolgend mit PBS und destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Silikonhalterung entsprechend platziert, sodass die gegenüberliegenden vier Silikonsäulen jeweils an das am Boden des Wells befindliche Silikonnetz angrenzten. Für ein Herzmuskelkonstrukt wurde jeweils 1700 µl eines definierten Mastermix mit $9-17 \times 10^6$ hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten in das Well der Zellkulturschale pipettiert.

Für die erfolgreiche und reproduzierbare Herstellung der EHT-Patches wurde folgender Mastermix etabliert:

Zellsuspension	9-17x10 ⁶ hiPSC-abgeleitete Kardiomyozyten
2x DMEM	93,5 µl
Matrigel	170 µl
Fibrinogen	42,5 µl
Y-27632	1,7 µl
NKM	ad 1700 µl

Nachdem der Mastermix exakt hergestellt wurde, erfolgte die Addition von 10 µl Thrombin (100 U/ml, Sigma Aldrich T7513) und das zügige Pipettieren in die Agarosevertiefung im 6-Well. Die Hinzugabe des Thrombins katalysierte die proteolytische Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin. Für die Polymerisierung wurde die Zellkulturschale zunächst für 0,5-1 h bei 37 °C in einem Zellinkubator platziert. Anschließend wurde das Well mit 3 ml EHT-Kulturmedium befüllt und für weitere 0,5 h bei 37 °C inkubiert.

Ergebnisse

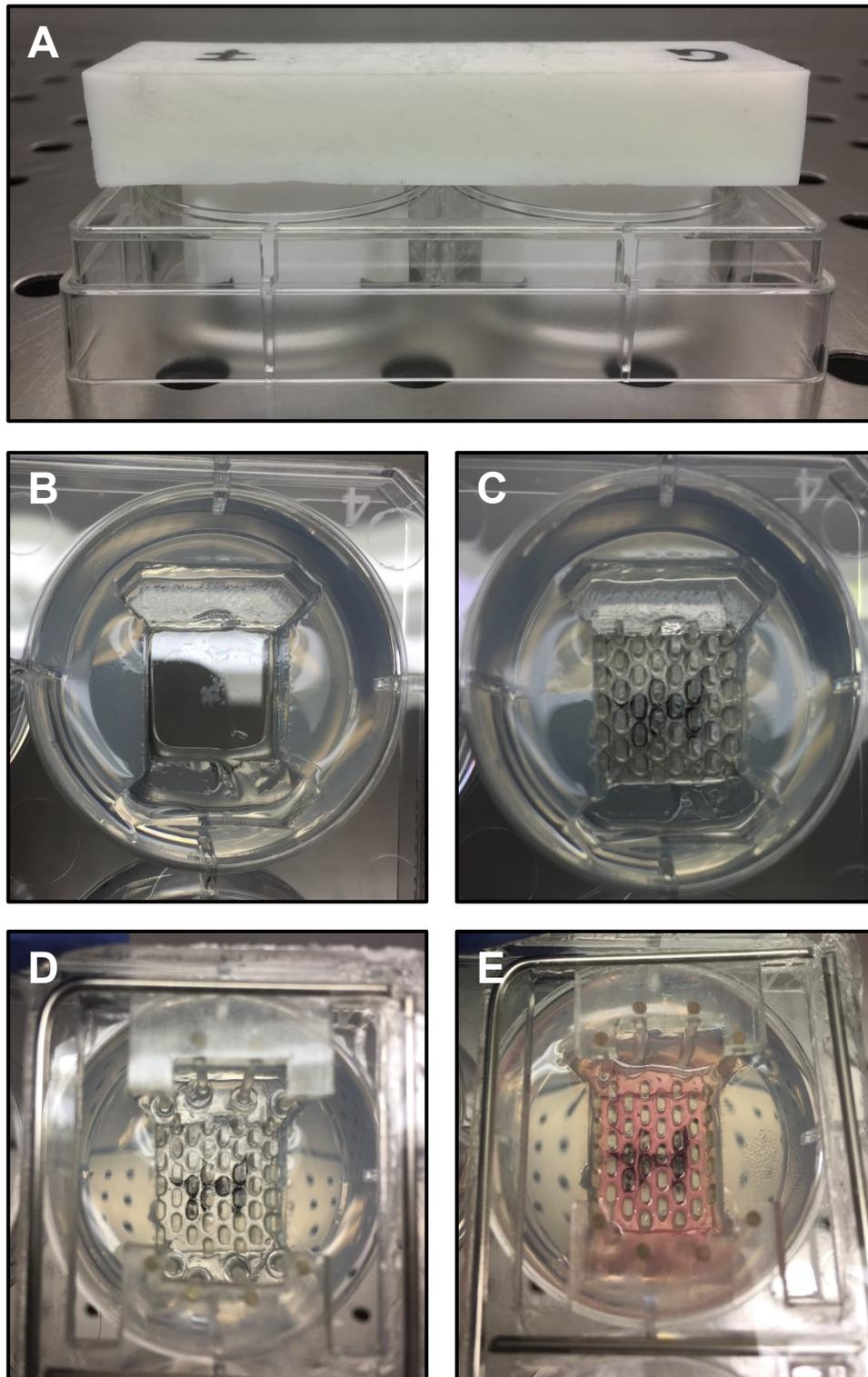


Abbildung 13: Generierung eines EHT-Patches. (A) Teflonplatzhalter in der 6-Well-Zellkulturschale, **(B)** Aushärtung der Agarose, **(C)** Einbringen des Silikonnetzes in die Kavität, **(D)** Platzierung der Silikonhalterung, **(E)** Hinzugabe des Mastermix.

Nach abgeschlossener Fibrinpolymerisation wurde die Silikonhalterung mit dem nun angehefteten EHT in eine neue 6-Well-Zellkulturschale transferiert, welche zuvor mit

Ergebnisse

8 ml vorgewärmten EHT-Kulturmedium befüllt worden war. Die Kultivierung der EHTs erfolgte bei 37 °C, 40% O₂, 7% CO₂ und 95% rH. Der Medienwechsel erfolgte täglich.

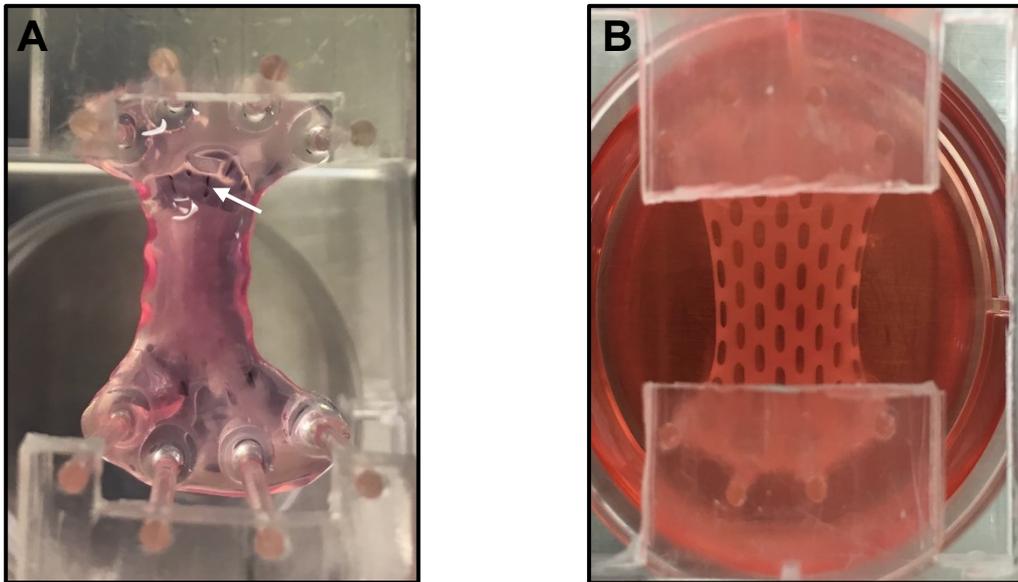


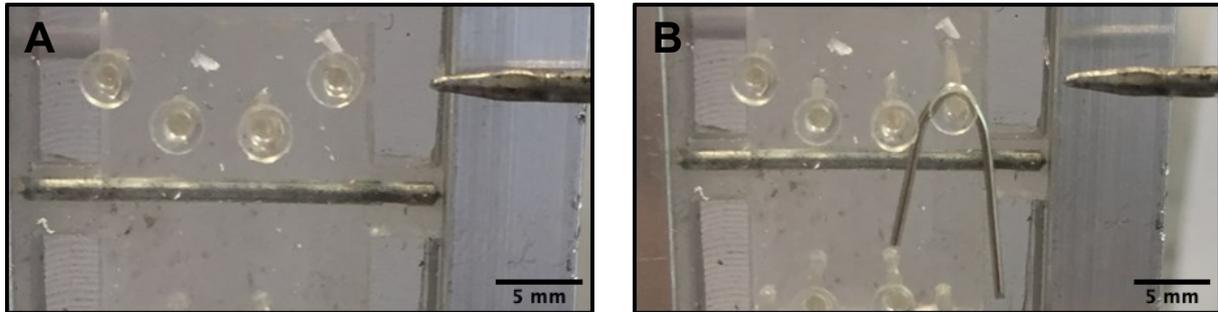
Abbildung 14: EHT-Patches direkt nach der Herstellung. (A) Initial nach der Herstellung des EHT-Patches war die Netzstruktur (weißer Pfeil) auf Grund des in sich kollabierenden Gewebes im Zentrum nicht erkennlich. **(B)** Durch den Transfer des EHTs in ein mit Medium befülltes 6-Well dehnte sich das Gewebe aus, worunter die angestrebte Netzstruktur erkennlich wurde.

3.1.3 Bestimmung des E-Moduls

Ein essentieller Bestandteil in der Charakterisierung der Herzmuskelkonstrukte beinhaltete die Bestimmung der Kontraktilität. Um die Kontraktionsanalyse mittels der Fiji-Software durchzuführen, wurde zunächst der E-Modul der Silikonsäulen, an denen die EHTs verankert waren, bestimmt. Durch das Anlegen eines Drahtes definierter Masse an die Silikonsäule konnte im zuvor erwähnten Versuchsaufbau (2.4.4) die Auslenkung der Silikonsäule durch eine Feinmessuhr gemessen werden. Mit Hilfe des 2. Newtonschen Axioms ($\vec{F} = m \cdot \vec{a}$) konnte, unter Berücksichtigung des Ortsfaktors ($\vec{g} = 9,81 \frac{N}{kg}$), durch das Anbringen des Drahtes die auf die Silikonsäulen einwirkende Gewichtskraft ($\vec{F}_G = m \cdot \vec{g}$) bestimmt werden. Bei einer Masse (m) von 113 mg wirkte eine Kraft (F) von $\approx 0,001$ N auf eine Silikonsäule und führte zu einer Auslenkung (δ) von 2,31 mm. Die ermittelten Variablen konnten nun durch die Äquivalenzumformung der Vandenburgh'schen Formel zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls eingesetzt werden (Abbildung 15C). Für die hier verwendete

Ergebnisse

Silikonhalterung (Länge der Silikonsäule = 12 mm, Radius = 0,625 mm) ergab sich ein E-Modul von $\approx 2,1 \frac{N}{mm^2}$. Mit Hilfe des E-Moduls konnte nachfolgend die Kontraktilität der optimierten EHTs bestimmt und die Auswirkung der verschiedenen Kulturbedingungen auf die generierten Kraftwerte verglichen werden.



C

$$F = \frac{3EI\delta}{L^3} = \frac{3\pi ER^4\delta}{4L^3}$$

, $F \rightarrow$ Kraft, N

$$E = \frac{4FL^3}{3\pi R^4\delta}$$

, $E \rightarrow$ Elastizitätsmodul, $\frac{N}{mm^2}$

, $I \rightarrow$ Flächenträgheitsmoment mit $I = \frac{\pi R^4}{4}$, mm^4

, $R \rightarrow$ Radius der Silikonsäule, mm

, $\delta \rightarrow$ Auslenkung der Silikonsäule, mm

, $L \rightarrow$ Länge der Silikonsäule, mm

$$E = \frac{4 \cdot 0,001 N \cdot (12 mm)^3}{3\pi(0,625 mm)^4 \cdot 2,31 mm}$$

$$= \underline{\underline{2,080657294088211 \frac{N}{mm^2} \approx 2,1 \frac{N}{mm^2}}}$$

Abbildung 15: Experimentelle Bestimmung des E-Moduls. (A) Zentrieren des Zeigers auf das Zentrum der Silikonsäule. **(B)** Anbringen eines Drahts mit einer Gewichtskraft (\vec{F}_G) von 0,001 N und Ermittlung der Silikonauslenkung (δ) von 2,31 mm. **(C)** Berechnung des E-Moduls (E) von $2,1 \frac{N}{mm^2}$.

3.2 Kulturoptimierung

3.2.1 Optimierung der hiPSCs Kulturbedingungen

Für die klinische Applikation von Arzneimitteln und Wirkstoffen müssen Richtlinien zur Qualitätssicherung der Produkte und ihrer Herstellung eingehalten werden, welche unter dem Begriff *Good manufacturing practices (GMP)* zusammengefasst werden. Eine Etablierung von GMP-Bedingungen ist in einem akademischen Labor nicht möglich, aber das Protokoll sollte so verändert werden, dass eine Umstellung auf GMP-Kulturbedingungen einfach zu realisieren wäre. Das unter 2.4.1 zusammengefasste Protokoll zur Expansion und kardialen Differenzierung wurde für die hiPSC-Zelllinie TC-1133 dementsprechend angepasst. Die Änderung beinhaltete für die Stammzellkultur die Verwendung von humanem Vitronectin (Gibco #A27940, 0,5 µg/cm²) anstelle des zuvor verwendeten Geltrex[®]. Die Kultivierung der Stammzellen erfolgte initial mit Produkten der Lonza L7 Linie, welche die GMP-Bedingungen erfüllten. Nach der 19. Passage, und der Herstellung einer Master-Zellbank, mussten auf Grund eingestellter Lieferung der Lonza-Produkte diese gezwungenermaßen durch andere Substanzen, die im GMP-Format erhältlich sind, ersetzt werden. Aus ökonomischen Gründen wurden im Verlauf der Studie nicht-GMP gerechte Varianten dieser Substrate verwendet.

3.2.2 Optimierung der EHT-Kulturbedingungen

Nach der Herstellung der EHT-Patches wurden diese täglich mit frisch angesetztem Medium über einen dreiwöchigen Zeitraum versorgt. Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei Kulturmedien verwendet (Tabelle 2). Zu Beginn der Arbeit wurden die EHT-Patches in einer Standardkultur mit Pferdeserum inkubiert. Anschließend wurde im Hinblick auf eine potenzielle klinische Applikation daran gearbeitet die EHTs unter serumfreien Bedingungen zu kultivieren. Im Folgenden werden die morphologischen, physiologischen und histologischen Auswirkungen der einzelnen Kulturbedingungen (serumhaltige Standardkultur, statische/dynamische serumfreie Kultur) auf die EHTs thematisiert.

3.2.3 Standardkultur

Insgesamt wurden elf EHT-Patches aus Kardiomyozyten der iPS-Zelllinie C25 hergestellt, welche in der unter 2.4.3 beschriebenen serumhaltigen Standardkultur kultiviert wurden (Tabelle 2). Von den elf EHTs besaßen lediglich sechs der künstlichen Herzmuskelgewebe eine vollständig intakte Morphologie. Die anderen fünf

Ergebnisse

Gewebe wiesen Löcher auf, besaßen eine nur unvollständige Verankerung am Silikon oder zerrissen komplett im Rahmen des Herstellungsprozesses. Dieser Umstand war dem bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht optimierten Herstellungsprozess geschuldet. Die EHTs entwickelten sich unter einer dreiwöchigen serumhaltigen Kultur regelrecht, sodass bereits einen Tag nach der Herstellung mikroskopische Kontraktionen einzelner Kardiomyozyten zu beobachten waren. Makroskopische Kontraktionen waren bei allen intakten EHT-Patches innerhalb von 10-14 Tagen zu erkennen. Alle unter serumhaltigen Bedingungen kultivierten EHTs entwickelten makroskopisch sichtbare Kontraktionen, die eine Deflektion der Silikonsäulen erzeugten. Da sich die etablierten EHT-Patches unter den serumhaltigen Bedingungen gut entwickelten, sollte in einem zweiten Schritt versucht werden das Kulturmedium auf serumfreie Bedingungen umzustellen, da eine serumfreie Kultur im Rahmen einer klinischen Anwendung leichter unter GMP-Bedingungen umsetzbar wäre (Tabelle 2).

Unter den serumhaltigen Kulturbedingungen zeigten sich in den Phalloidin-Immunfluoreszenzfärbungen nach einer Kulturdauer von drei Wochen eine hohe Kardiomyozytendichte mit elongierten Kardiomyozyten (Abbildung 16A und B). Zudem wiesen die Herzmuskelzellen eine differenzierte Sarkomerstruktur mit klarer Querstreifung auf (Abbildung 16C und D).

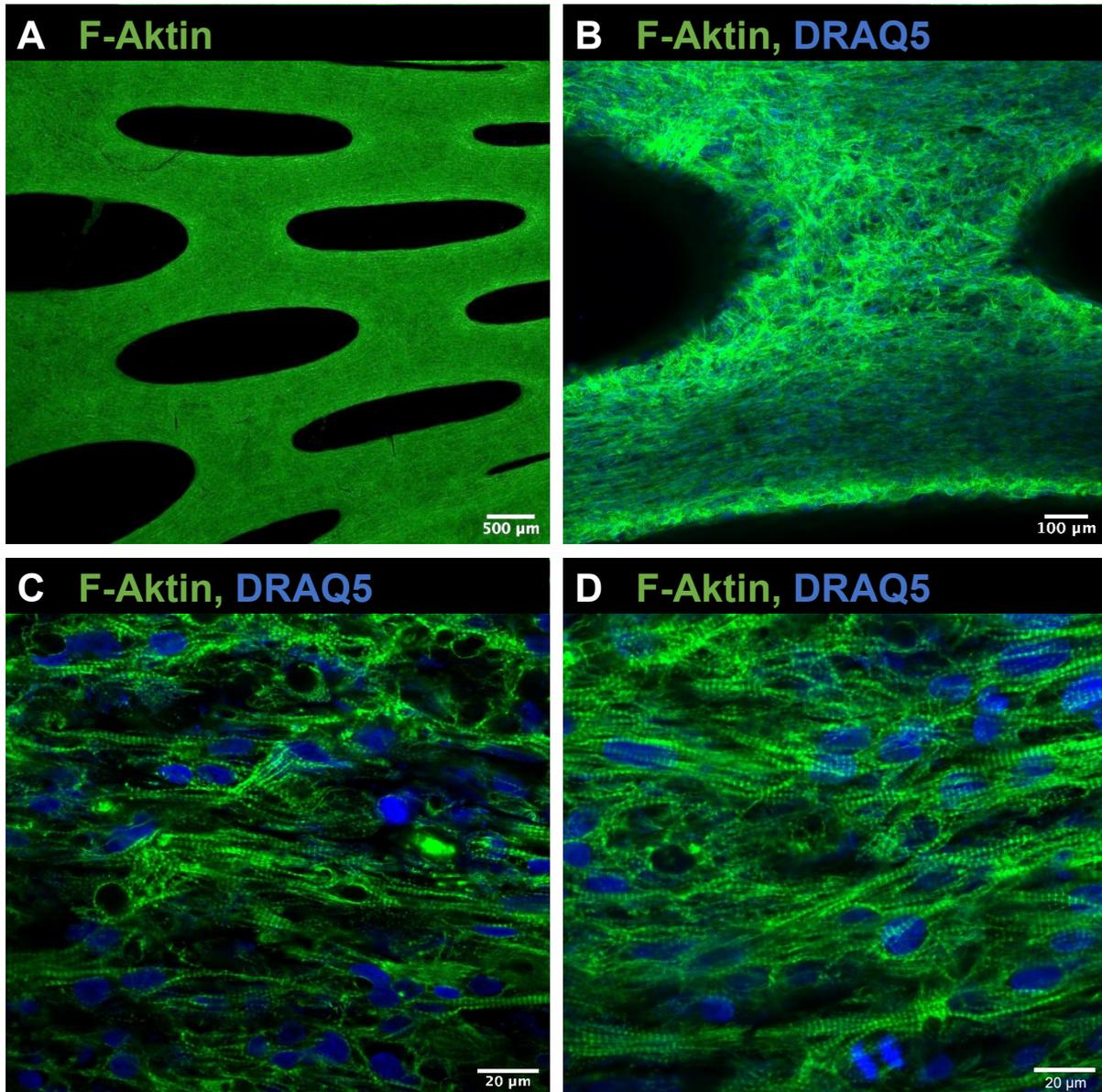


Abbildung 16: Auswirkung einer dreiwöchigen serumhaltigen Kultur auf die Kardiomyozytenstruktur der EHT-Patches. (A) In den Phalloidin-Immunfluoreszenzfärbungen der serumhaltig kultivierten EHTs wurde eine hohe Kardiomyozytendichte erkenntlich. Die Zellen wiesen im Bereich von (B) Randstrukturen eine höhere Dichte auf und zeigten (C, D) eine ausgeprägte Expression des F-Aktins. Die Zellen richteten sich entlang der Kraftvektoren aus, waren jedoch nicht streng parallel ausgerichtet.

3.2.4 Serumfreie Kultur

Inspiziert durch die Veröffentlichung um Tiburcy et al. (2017) wurde die Standardkultur durch den Einsatz xenofreier Reagenzien angepasst. Hierfür wurde B27 als Serumersatz eingesetzt und das Medium mit Zytokinen angereichert. (Tabelle 2). Die

Ergebnisse

optimierte Kulturbedingung beinhaltete: DMEM (Gibco 41965-039) versetzt mit 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco 15140), 4% selbsthergestelltes B27 mit 0,12 µg/ml humanem Insulin, 33 µg/ml Aprotinin (Sigma-Aldrich A1153), 2 mM L-Glutamin (Gibco 25030), 1% nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco 11140), 100 ng/ml IGF-1 (Peprotech 100-11), 10 ng/ml FGF-2 (Peprotech 100-18B), 5 ng/ml VEGF (R&D Systems 293-VE) und 5 ng/ml TGF-β (Peprotech 100- 21C).

Zunächst wurden die Auswirkungen der serumfreien Kulturbedingungen auf kleine EHTs in einem 24-Well-Format getestet, um keine größeren Mengen an zellulären Ressourcen aufzuwenden. Hierfür wurden kleine streifenförmige EHTs, wie in der Veröffentlichung um Hansen et al. (2010) beschrieben, hergestellt und ihre Kontraktilität mittels einer halbautomatisierten video-optischen Apparatur innerhalb einer vierwöchigen statischen serumfreien Kultur gemessen. Für die Herstellung dieser EHTs wurde die TC-1133 Zelllinie verwendet. Ein EHT beinhaltete 1×10^6 hiPSC-abgeleitete Kardiomyozyten. Die EHTs begannen nach einer Kulturzeit von ca. 10-15 Tagen kohärent zu schlagen. Nach einer Kulturzeit von 25 Tagen kontrahierten alle Herzmuskelgewebe (n=7) und generierten eine durchschnittliche Kraft von $0,073 \pm 0,002$ mN bei einer Frequenz von 63 ± 1 bpm (*beats per minute*; Abbildung 17).

Ergebnisse

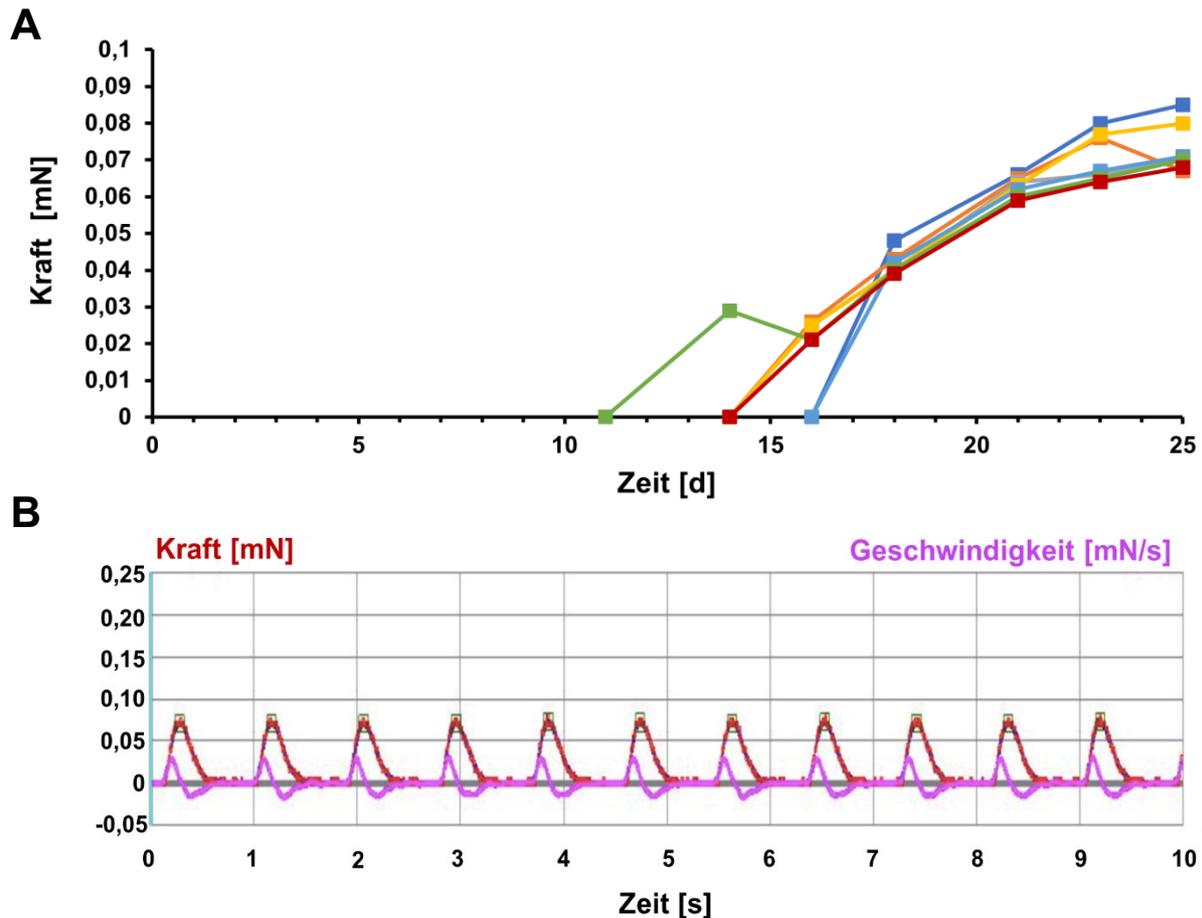


Abbildung 17: Kontraktionsanalyse kleiner EHTs im Verlauf der serumfreien Kultur. (A) EHT-Kontraktilität (n=7) im Verlauf der Kultur, **(B)** Kontraktionsanalyse eines einzelnen EHTs an Tag 25 der Kultur.

Diese ermittelten Kontraktilitätswerte waren etwas niedriger als bei EHTs, die unter Standardbedingungen kultiviert worden (Hansen et al. 2010). Da alle streifenförmigen EHTs nach einer dreiwöchigen serumfreien Kultur kohärent kontrahierten und dabei messbare Kraftwerte generierten, erfolgte im Folgenden der Einsatz der serumfreien Kulturbedingungen bei den EHT-Patches.

3.2.4.1 Statische serumfreie Kultur

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 19 EHT-Patches hergestellt, die unter serumfreien Bedingungen kultiviert wurden. Hierfür wurde die C25 Zelllinie (15 EHT-Patches), UKEi001 (3 EHT-Patches) und UKEi003 (1 EHT-Patch) verwendet. Die insgesamt 19 EHT-Patches wurden für einen dreiwöchigen Zeitraum unter statischen serumfreien Bedingungen kultiviert. Von den generierten EHT-Patches waren auf

Ergebnisse

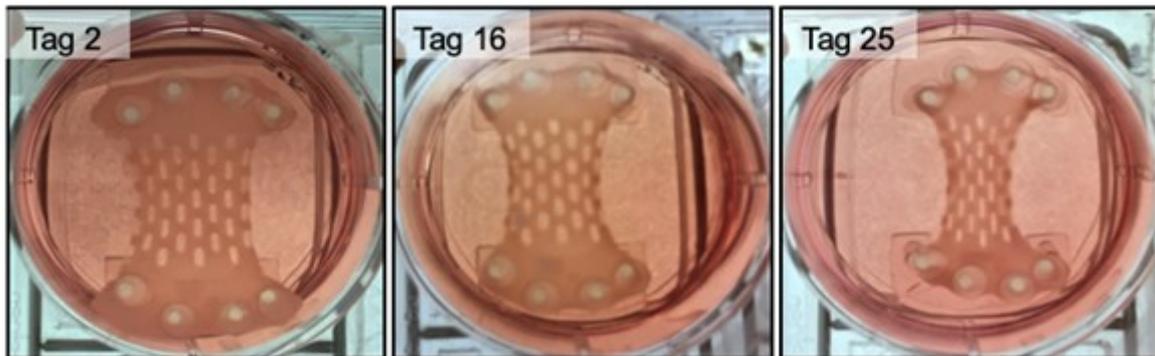
Grund des zu diesem Zeitpunkt optimierten Herstellungsprozesses bis auf ein Herzmuskelkonstrukt alle EHTs morphologisch intakt.

Wie in der serumhaltigen Kultur beobachtet, begannen auch unter den serumfreien Kulturbedingungen einzelne Kardiomyozyten innerhalb des Herzmuskelkonstrukts bereits einen Tag nach der Herstellung zu kontrahieren. Makroskopisch sichtbare Kontraktionen traten lediglich bei vier der insgesamt 19 EHT-Patches auf und begannen 10-15 Tage nach der Generierung der EHTs. Die Kontraktionen waren initial asynchron und gingen von mehreren Kardiomyozytenverbänden innerhalb des Gewebes aus, welches für eine Vielzahl an konkurrierenden Schrittmacherzentren sprach. Eine koordinierte und kohärente Kontraktion der EHTs begann weitere 3-5 Tage später und suggerierte die strukturelle Reifung der Kardiomyozyten (Abbildung 21A und B) und der Ausprägung eines funktionellen Synzytiums.

Innerhalb der dreiwöchigen Kulturperiode konnte man neben der steigenden Tendenz zur physiologischen Reifung auch eine Veränderung der makroskopischen Morphologie der EHTs beobachten. Mit zunehmender Dauer der Kultur gestalteten sich die Herzmuskelkonstrukte in ihrer Form um, welches zu einer Reduktion der initialen Länge und insbesondere der Breite der EHTs führte (Abbildung 18). Die Längenreduktion führte dazu, dass gegenüberliegende Silikonsäulen aufeinander zu gebeugt worden, was die EHTs einer kontinuierlichen mechanischen Zugbelastung aussetzte. Durch das Remodelling betrug die Breite eines EHTs nach einer Kulturperiode von 25 Tagen im Durchschnitt ca. 80% der initialen Breite (8,9 mm, n=7).

Ergebnisse

A



B

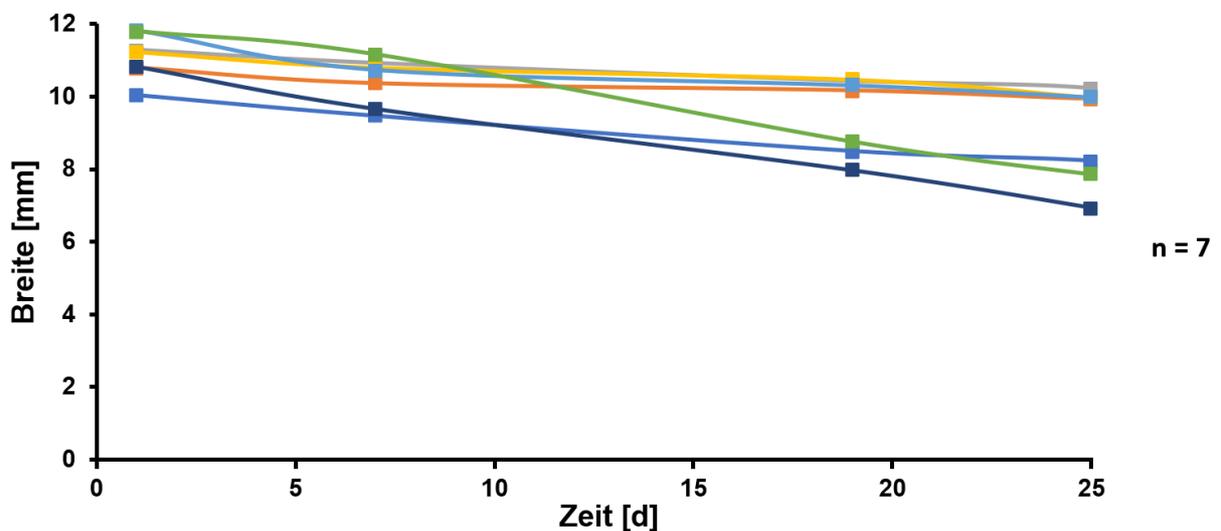


Abbildung 18: EHT-Remodelling unter statischer serumfreier Kultur. (A) In vitro Darstellung des Remodelling- und des Reifungsprozesses eines EHTs im Kulturverlauf. **(B)** Graphische Darstellung der EHT-Breitenabnahme im Zeitverlauf. Jede Linie repräsentiert ein EHT-Patch (n=7).

Das im Kulturverlauf zunehmende morphologische Remodelling der Herzmuskelkonstrukte war unabhängig von der Fähigkeit der EHTs makroskopische Kontraktionen zu erzeugen. So traten makroskopische Kontraktion lediglich bei vier der insgesamt 19 EHT-Patches auf. Zwei dieser Herzmuskelkonstrukte kontrahierten kohärent und wiesen nach einer dreiwöchigen Kultur eine Kraft von $1,55 \pm 0,55$ mN (n=2) bei einer Frequenz von $50 \pm 1,2$ bpm (n=2) auf (Abbildung 19). Weitere zwei EHTs kontrahierten nur asynchron und erreichten während der gesamten Kulturperiode keine einheitliche synchrone Kontraktion. Dieses Resultat war überraschend, da die Ergebnisse aus den Versuchen mit den kleinen streifenförmigen EHTs im 24-Well

Ergebnisse

Format, bei denen alle Herzmuskelkonstrukte unter den identischen Kulturbedingungen kohärent kontrahierten, nicht reproduziert werden konnten.

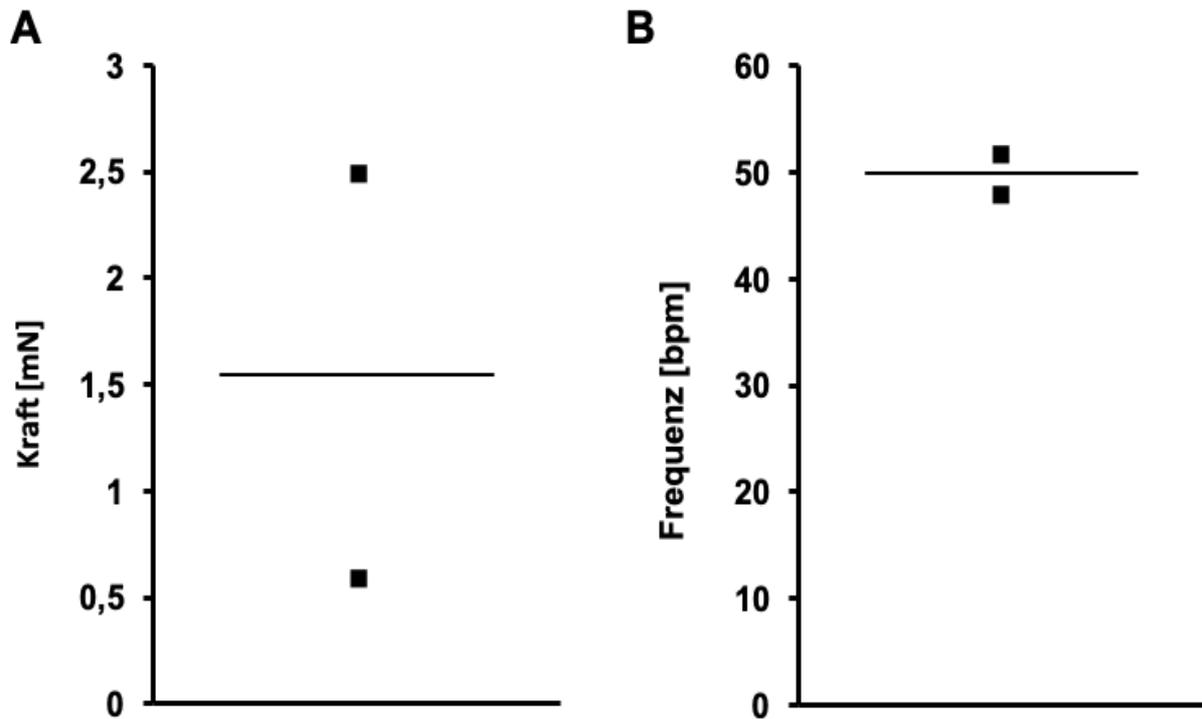


Abbildung 19: Kontraktilitäts- und Frequenzanalyse nach dreiwöchiger statischer serumfreier Kultur. (A) Kontraktilität und **(B)** Frequenz kohärent kontrahierender EHT-Patches (n=2).

Um die Struktur der neu etablierten EHT-Patches auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden Histologien von EHTs zu Beginn der Kultur und nach einer dreiwöchigen Kulturperiode angefertigt. Im Folgenden werden zunächst die H.E.- und Dystrophin-Färbungen dargestellt, welche es ermöglichen einen Überblick über die Kardiomyozytenverteilung im Gewebe zu erhalten. Anschließend werden die Phalloidin- und α -Actinin-Immunfluoreszenzfärbungen thematisiert, die eine Beurteilung über die Sarkomerstruktur der Kardiomyozyten ermöglichen.

Durch die Implementierung der Netzstruktur wurde initial eine homogene Zellverteilung innerhalb des Gewebes ermöglicht. Am Tag der Herstellung eines EHTs zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung der noch unreifen und runden Kardiomyozyten im Gewebe (Abbildung 20A und B). Innerhalb der dreiwöchigen Kulturperiode reiften die Kardiomyozyten im EHT und konzentrierten sich insbesondere an Randstrukturen (Abbildung 20C). Vor allem im Bereich der Netzstruktur, des Geweberandes als auch

Ergebnisse

im Areal, an denen die EHTs an der Silikonhalterung verankert waren, zeigte sich eine hohe Dichte an elongierten Kardiomyozyten (Abbildung 20D-F).

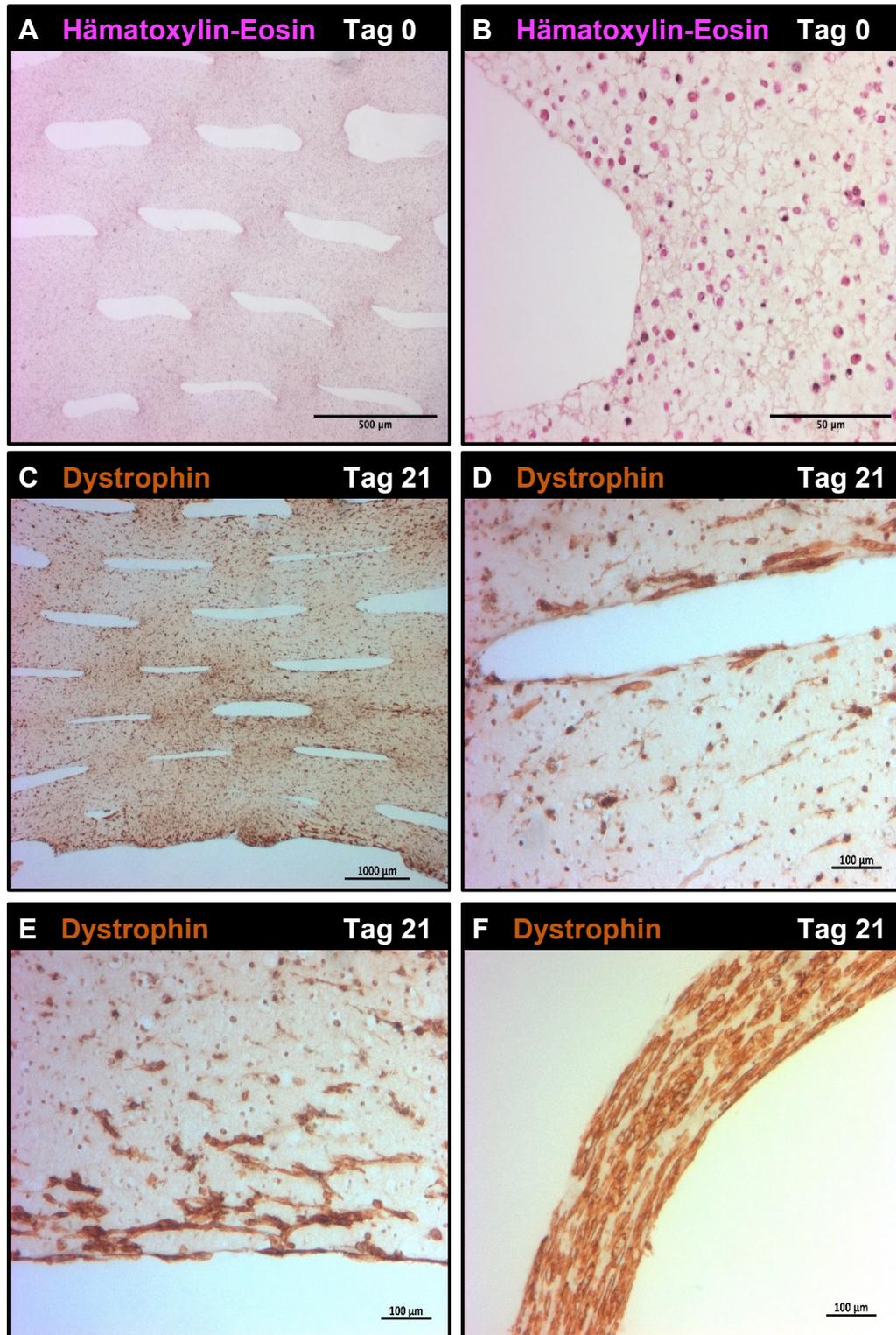


Abbildung 20: Histologische Charakterisierung der EHT-Patches zu Beginn und am Ende der dreiwöchigen statischen serumfreien Kultur. (A) Übersicht eines EHTs im Längsschnitt in der H.E. Färbung am Tag der Herstellung. Es war eine homogene Verteilung der Kardiomyozyten erkenntlich. **(B)** Die Zellen waren unreif und

Ergebnisse

wiesen eine rundliche Morphologie mit großem Zellkern und verhältnismäßig wenig Zytoplasma auf. **(C)** Übersicht eines EHTs im Längsschnitt in der Dystrophin-Färbung nach einer dreiwöchigen Kulturperiode. Im Kulturverlauf kam es zu einer strukturellen Reifung der Kardiomyozyten und der zunehmenden Tendenz sich entlang der im Gewebe befindlichen Randstrukturen auszudehnen. Insbesondere an den **(D)** Netzstrukturen, den **(E)** Geweberändern und den **(F)** Arealen, an denen die EHTs am Silikon verankert waren, zeigte sich eine hohe Dichte an elongierten Kardiomyozyten.

In den Immunfluoreszenzfärbungen der serumfrei kultivierten EHTs zeigte sich eine geringe Kardiomyozytendichte (Abbildung 21A) mit nur schlecht differenzierten Sarkomerstrukturen (Abbildung 21B).

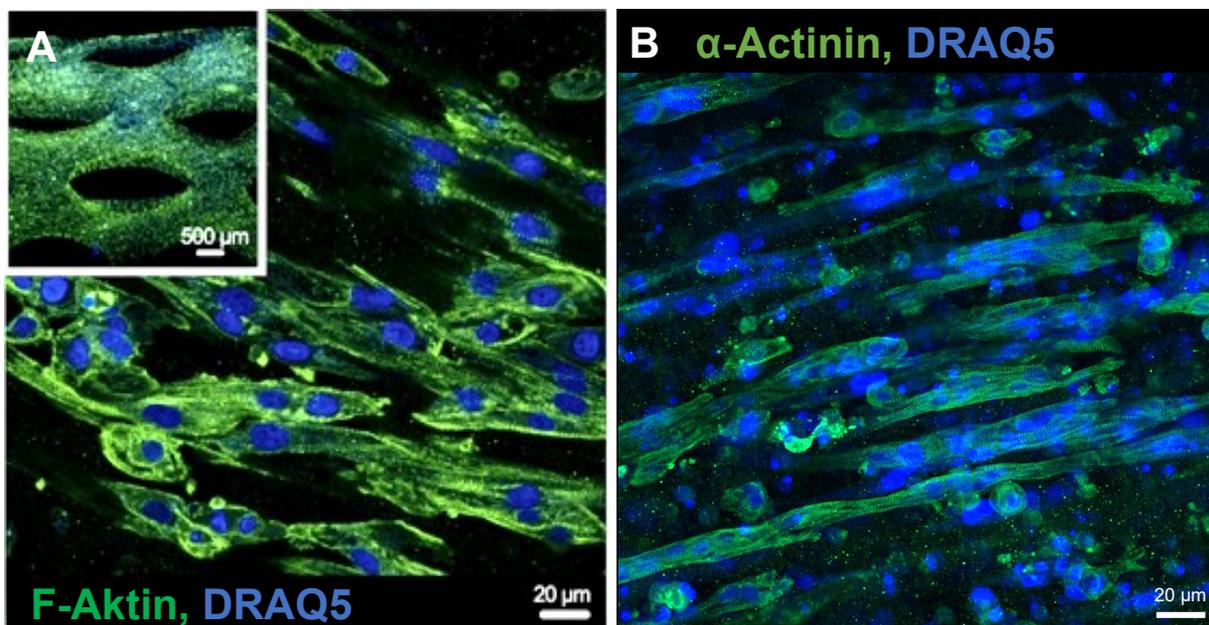


Abbildung 21: Auswirkung einer dreiwöchigen serumfreien Kultur auf die Kardiomyozytenstruktur der EHT-Patches. (A) In den Phalloidin- und **(B)** α -Actinin-Immunfluoreszenzfärbungen der serumfrei kultivierten EHTs zeigten sich eine niedrige Zelldichte sowie eine geringe Differenzierung der Sarkomerstrukturen.

3.2.4.2 Dynamische serumfreie Kultur

Nachdem sich die Kontraktilität der EHTs und die Differenzierung der Kardiomyozyten unter einer statischen serumfreien Kultur ineffizient entwickelte, wurde nach Verbesserungsmöglichkeiten gesucht. Ein möglicher Ansatz war die EHTs während der Kultur kontinuierlich auf einer beweglichen Plattform zu schwenken. Diese Methode war in der Literatur beschrieben und führte zu einer besseren Entwicklung

Ergebnisse

von kleinen kardialen Konstrukten (Jackman et al. 2016). Im Rahmen dieses Versuchs wurden zwei EHT-Patches unter Verwendung der C25 Zelllinie hergestellt und für einen dreiwöchigen Zeitraum unter dynamischen serumfreien Bedingungen kultiviert. Der Beginn der mikroskopischen Kontraktion einzelner Kardiomyozyten sowie der kohärenten makroskopischen Kontraktion eines Herzmuskelkonstrukts deckte sich mit den Zeiträumen, welche bei den statisch kultivierten EHTs beschrieben wurde. So waren erste mikroskopische Kontraktionen innerhalb des ersten Tages zu erkennen. Makroskopische Kontraktionen begannen nach etwa 14 Tagen in der Kultur.

Auch bei den dynamisch kultivierten EHTs konnte man durch den mit der Kulturdauer zunehmenden Reifungsprozess eine stetige Abnahme der initialen Breite beobachten. Das Remodelling war insbesondere innerhalb der anfänglichen zehn Kulturtage ausgeprägt. Die Breite eines dynamisch kultivierten EHTs betrug nach einer Kulturperiode von 25 Tagen im Durchschnitt ca. 60% der initialen Breite (6 mm, n=2). Somit zeigte sich im Vergleich zu den statisch kultivierten EHTs eine größere Dynamik hinsichtlich der Breitenreduktion. Die Tendenz der EHTs mit fortschreitender Kulturzeit zu remodellieren, war insgesamt unabhängig von den unter 2.4.3 verwendeten Kulturbedingungen (Abbildung 22). Möglicherweise war die Ausprägung des Remodellings etwas stärker unter dynamischen Kulturbedingungen. Aufgrund der kleinen n-Zahl kann hier jedoch keine sichere Aussage getroffen werden.

Ergebnisse

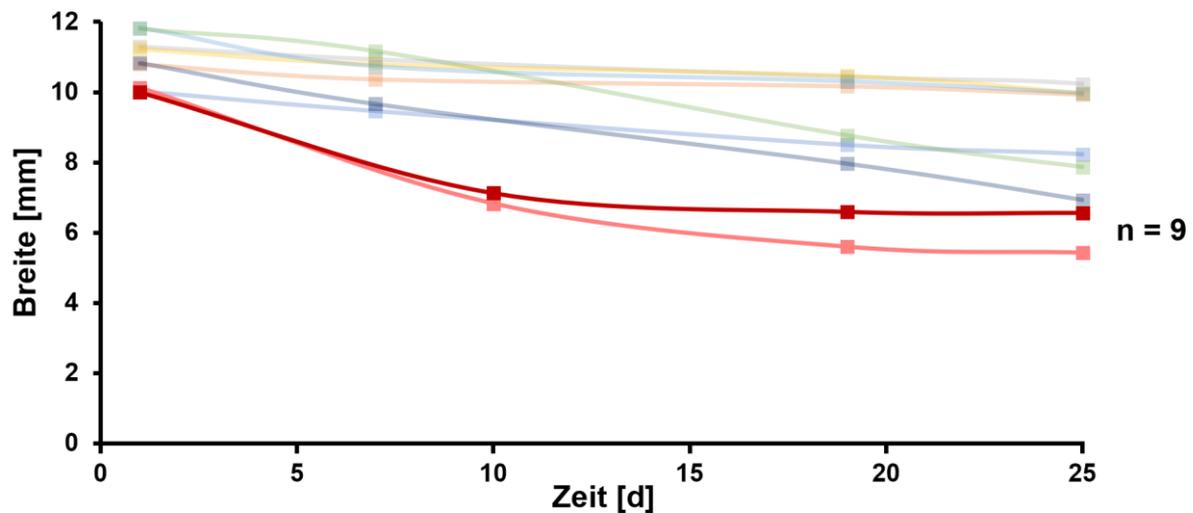


Abbildung 22: EHT-Remodelling unter dynamischer serumfreier Kultur. Graphische Darstellung der Breitenabnahme der unter dynamischen Bedingungen kultivierten EHT-Patches (rote Linien) im Zeitverlauf. Zum Vergleich sind die EHTs, die unter statischen serumfreien Bedingungen kultiviert wurden, hier nochmals aufgeführt. Jede Linie repräsentiert ein EHT-Patch (n=9, davon n=7 statisch und n=2 dynamisch).

Nach der dreiwöchigen dynamischen serumfreien Kultur konnte bei beiden EHT-Patches eine deutliche Zunahme der Kontraktilität beobachtet werden. Es kontrahierten beide EHT-Patches unter den dynamischen Bedingungen kohärent und generierten dabei eine durchschnittliche Kraft von $4,9 \pm 0,2$ mN bei einer Frequenz von 78 ± 17 bpm (n=2). So profitierten diese EHTs deutlich von den dynamischen Kulturbedingungen, da sie wesentlich höhere Kraftwerte als EHTs unter statischen Bedingungen erzeugten. Auch hier muss einschränkend festgestellt werden, dass die n-Zahl sehr klein ist und eine sichere Aussage nicht zulässt.

Ergebnisse

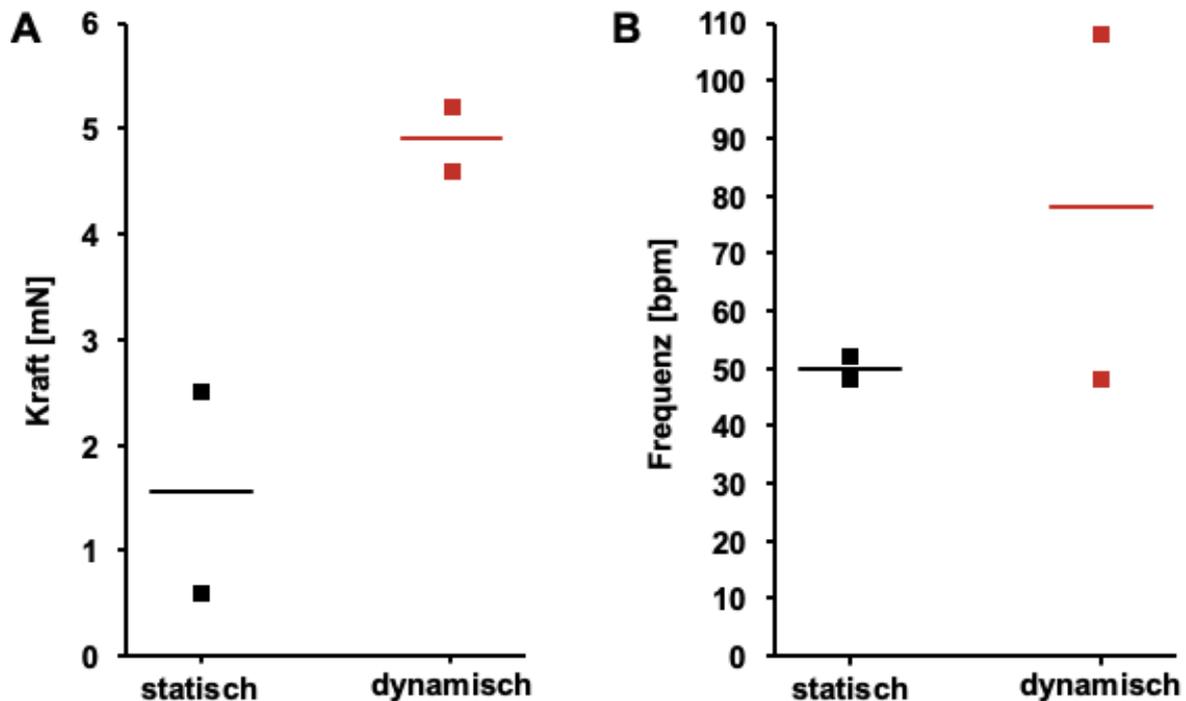


Abbildung 23: Vergleich der EHT-Kontraktilität und -Frequenz nach dreiwöchiger statischer und dynamischer serumfreier Kultur. (A) Vergleich der Kontraktilität und **(B)** der Frequenz von EHT-Patches unter statischen (n=2) und dynamischen (n=2) serumfreien Kulturbedingungen. Unter den dynamischen Bedingungen generierten die EHTs durchschnittlich eine höhere Kraft, wobei die Frequenz eine größere Varianz aufwies.

Die erhöhte EHT-Kontraktilität unter den dynamischen serumfreien Kulturbedingungen korrelierte außerdem mit einer verbesserten Ausprägung der zellulären Reifung. So wurde in den Phalloidin-Immunfluoreszenzfärbungen eine deutliche Zunahme der Zelldichte (Abbildung 24A) und der Differenzierung der Sarkomerstrukturen (Abbildung 24C und D) erkenntlich. Die homogene Verteilung der stäbchenförmigen Kardiomyozyten und ihrer strukturierten longitudinalen Ausrichtung entlang der im Gewebe einwirkenden Kraftvektoren (Abbildung 24B-D) war im Vergleich zu den Herzmuskelzellen der statisch kultivierten EHTs deutlich ausgeprägter.

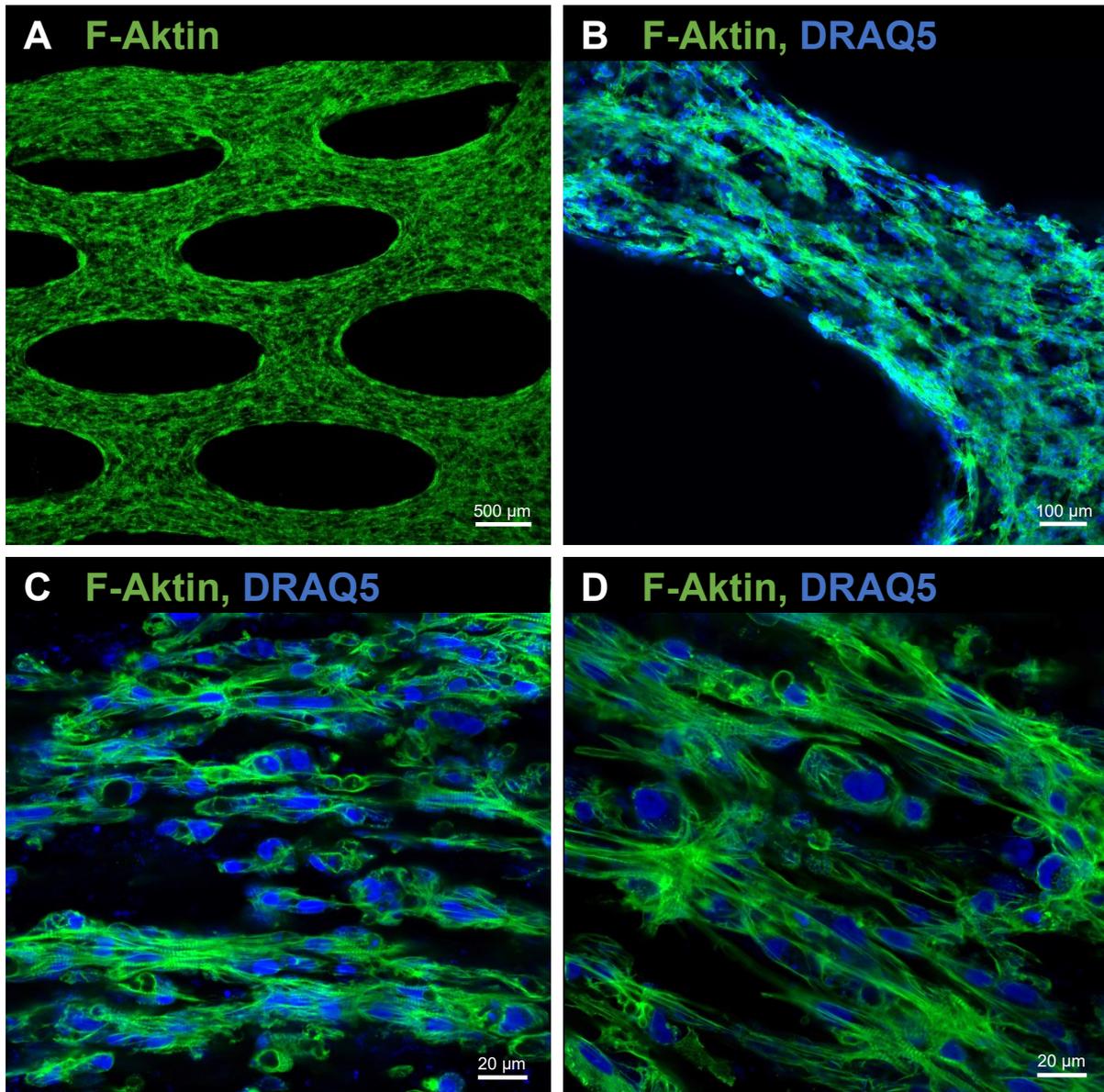


Abbildung 24: Immunhistologische Charakterisierung von EHT-Patches nach dreiwöchiger dynamischer serumfreier Kultur. (A) Phalloidin-Immunfluoreszenzfärbung eines EHTs im Längsschnitt. Es zeigten sich eine ausgeprägte Expression des F-Aktins und eine homogene Verteilung der Kardiomyozyten, welche hier deutlich ausgeprägter als bei den statisch kultivierten EHTs war. **(B)** Im Bereich des Netzes als auch **(C und D)** im Zentrum des Gewebes wiesen die Kardiomyozyten differenzierte Sarkomerstrukturen auf.

3.3 Transplantationsstudie

Im Rahmen einer Pilotstudie sollte untersucht werden, ob sich die EHT-Patches zur Transplantation eignen. In dieser Studie wurden zwölf EHT-Patches in einem Meerschweincheninfarktmodell transplantiert. Acht Tiere überlebten den vierwöchigen Nachbeobachtungszeitraum. Der überwiegende Anteil der vorzeitig verstorbenen Tiere starb innerhalb der ersten zehn postoperativen Tage. Die Ursache für die hohe Mortalität von $\approx 30\%$ waren insbesondere kardiorespiratorische Komplikationen, welche im Rahmen des postoperativen Verlaufs auftraten.

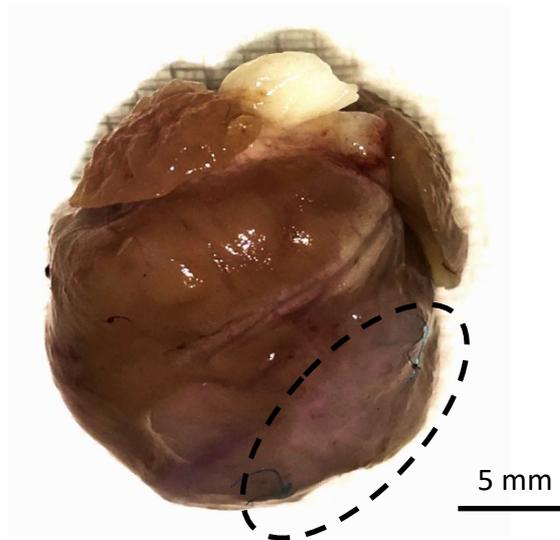


Abbildung 25: Explantiertes Meerschweinchenherz mit transplantiertem EHT-Patch.

3.3.1 Histologische Analyse der transplantierten Herzen

Für die Bestimmung der Graftgröße und der Analyse der Kardiomyozytenreife, hinsichtlich der Sarkomerlänge und der Kardiomyozytendurchmesser, wurden ausschließlich Meerschweinchen analysiert, die den geplanten vierwöchigen postoperativen Zeitraum überlebten und Grafts in den Histologien aufwiesen. Die entnommenen Herzen wurden in bis zu fünf Regionen unterteilt (Abbildung 26A), um eine differenzierte histologische Analyse durchzuführen. Bei der Analyse der Herzen betrug die Infarktgröße $13 \pm 1\%$ des linksventrikulären Umfangs ($n=8$, Abbildung 26C). Die größte Infarktregion befand sich zum überwiegenden Teil in der Region A oder B der Herzen und somit im Bereich der linken apikalen bis mittventrikulären Vorderwand. Von den zuvor erwähnten acht Tieren, die den vierwöchigen Nachbeobachtungszeitraum überlebten, wiesen lediglich drei ein erfolgreiches

Ergebnisse

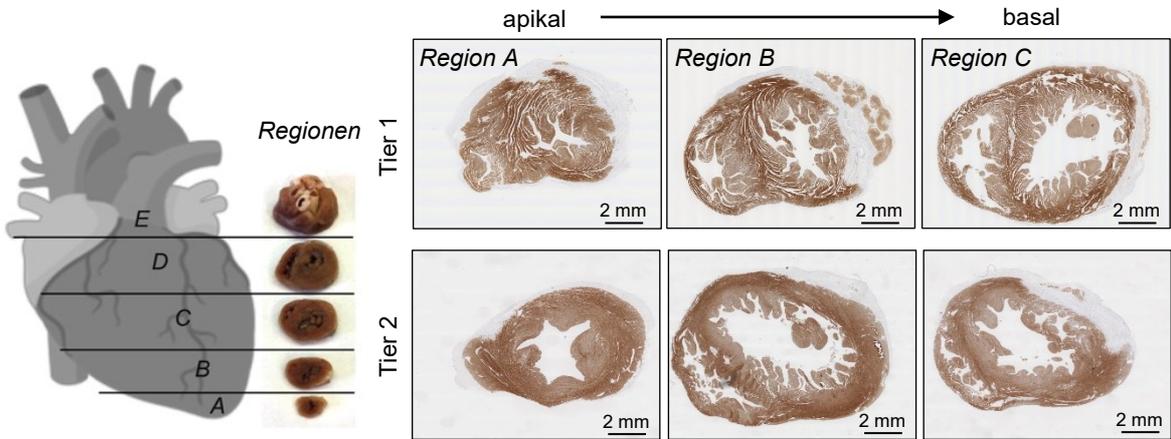
Anwachsen der EHT-Patches auf, welche durch die positiven humanen Ku80-Färbungen verifiziert wurde (Abbildung 26B). Die Graftgröße aller transplantierten Tiere betrug insgesamt $6\pm 4\%$ des Infarktareals ($n=8$). Im Kontrast dazu betrug die Graftgröße der drei Herzen, die in der Histologie ein erfolgreiches Anwachsen der EHT-Patches zeigten, $15\pm 7\%$ der Infarktfläche ($n=3$, Abbildung 26D). Hierbei war auffällig, dass bei den Herzen, in denen keine Grafts nachgewiesen werden konnten, alle transplantierten EHT-Patches zuvor unter serumfreien Bedingungen kultiviert wurden. Von den drei transplantierten EHTs, die histologisch das erfolgreiche Anwachsen eines Grafts darstellten, wurde eines unter serumhaltigen und zwei weitere unter statischen serumfreien Bedingungen kultiviert (Abbildung 26B). Alle dieser drei EHT-Patches wurden dabei mit hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten der C25 Zelllinie hergestellt. Die Zellzahl des unter serumhaltigen Bedingungen kultivierten EHTs betrug 13×10^6 und die der serumfrei kultivierten Herzmuskelkonstrukte jeweils $11,5 \times 10^6$. Auffällig war, dass das unter serumhaltigen Bedingungen kultivierte EHT nach der Transplantation auf das infarzierte Meerschweinchenherz nach einem vierwöchigen Nachbeobachtungszeitraum den größten Graft in der Histologie aufwies (Tier 1 in Abbildung 26A, linkes Bild in Abbildung 26B). Bei diesem Tier hatte der Graft einen Anteil von $\approx 32\%$ am Infarktareal. Die zwei weiteren Grafts, welche durch die Transplantationen der unter serumfreien Bedingungen kultivierten EHTs entstanden (mittleres und rechtes Bild in Abbildung 26B), nahmen jeweils einen Anteil von $\approx 8\%$ und $\approx 6\%$ des Infarktareals ein (Abbildung 26D) und waren damit deutlich kleiner (Tier 2 in Abbildung 26A).

Ergebnisse

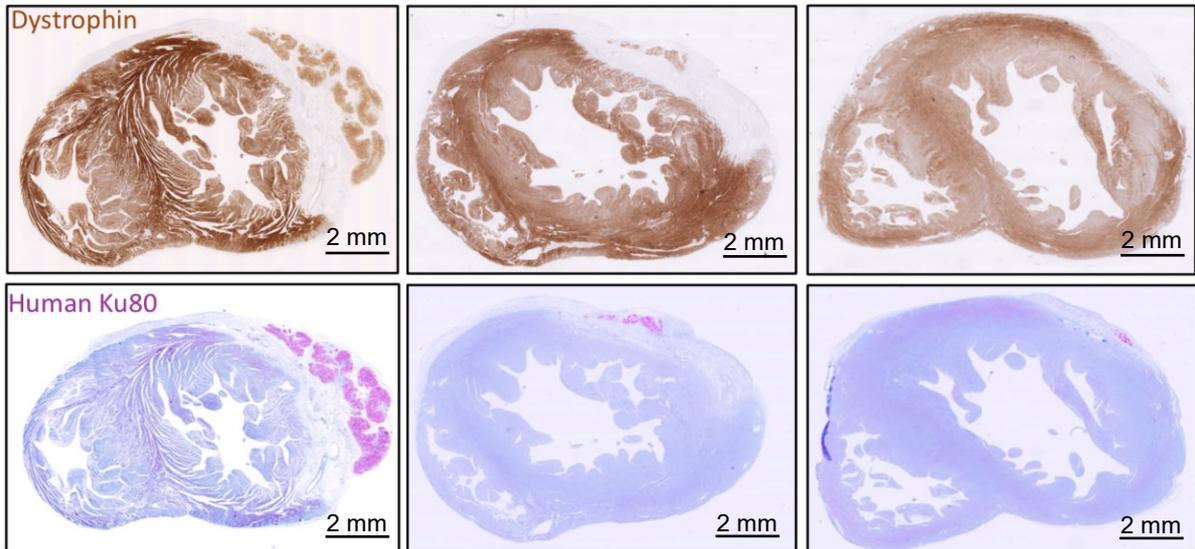
A

Unterteilung der explantierten Herzen für histologische Analyse

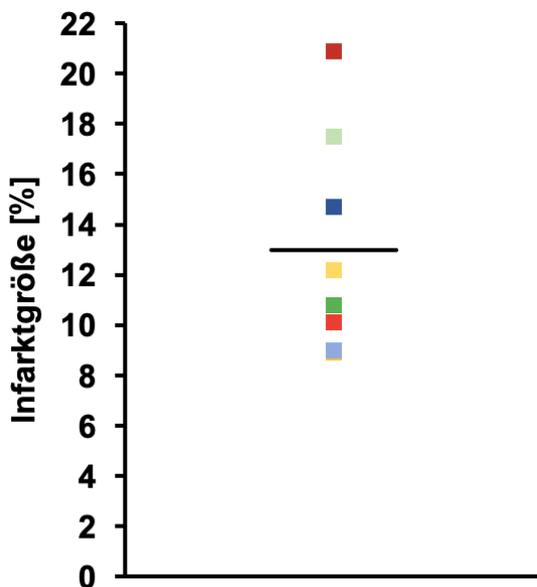
Transplantation von EHT-Patches aus serumhaltigen (Tier 1) und serumfreien Kulturbedingungen (Tier 2)



B



C



D

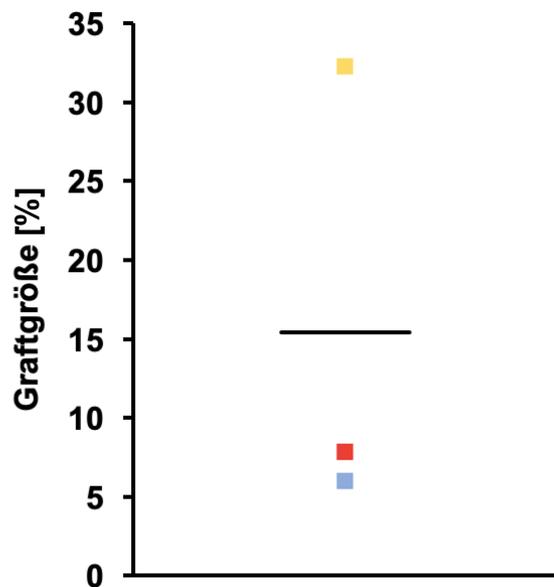


Abbildung 26: Übersicht transplanteder Herzen und Analyse der Infarkt- und Graftgröße. **(A)** Die Meerschweinchenherzen wurden nach der Explantation in fünf Regionen unterteilt und entsprechend geschnitten, um die Lokalisation des Grafts in den Herzen von apikal nach basal histologisch analysieren zu können. Die transplantierten EHTs stellten sich in den Dystrophinfärbungen strukturell als Muskelgewebsinseln in der Infarkt Narbe dar. Dabei wurde deutlich, dass das unter serumhaltigen Bedingungen kultivierte EHT einen größeren Graft aufwies. **(B)** Die erfolgreiche Transplantation der EHT-Patches wurde durch eine Färbung für humanes Ku80 verifiziert. **(C)** Die durchschnittliche Infarktgröße betrug $\approx 13\%$ des linksventrikulären Umfangs (n=8). **(D)** Die durchschnittliche Graftgröße der drei analysierten Meerschweinchenherzen betrug $\approx 15\%$ des linksventrikulären Narbengewebes (n=3). Das unter serumhaltigen Bedingungen kultivierte EHT (gelb) konnte zu einer größeren Remuskularisierung der Narbe beitragen als die unter statischen serumfreien Bedingungen kultivierten optimierten Herzmuskelkonstrukte (rot und blau). Abbildung **(A)** und **(B)** adaptiert aus Querdel et al. (2021).

3.3.2 Analyse der Graftstruktur

Für die Analyse der Graftstruktur wurden Immunfluoreszenzfärbungen und Immunhistochemien angefertigt, um qualitative als auch quantitative Analysen über die strukturelle Reife der transplantierten Kardiomyozyten durchführen zu können.

Zur detaillierten Charakterisierung der Kardiomyozytenstruktur wurden α -Actinin Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Diese zeigten im Bereich des Transplantats eine hohe Kardiomyozytendichte. Im Vergleich zu den einheitlich ausgerichteten parallel verlaufenden Empfänger kardiomyozyten waren die transplantierten Kardiomyozyten jedoch ungeordnet im Infarktareal ausgerichtet. Die transplantierten Kardiomyozyten hatten zu einem überwiegenden Anteil eine stäbchenförmige Zellmorphologie mit teilweise länglich verlaufenden Zellkernen und wiesen zum Teil differenzierte Zellstrukturen auf. Die Sarkomere waren klar abgrenzbar und kamen in regelmäßigen Intervallen vor. Dennoch stellten sich die transplantierten Herzmuskelzellen im Kontrast zu den Kardiomyozyten der Meerschweinchenherzen unreifer dar, welches in den nachfolgenden Analysen illustriert wird.

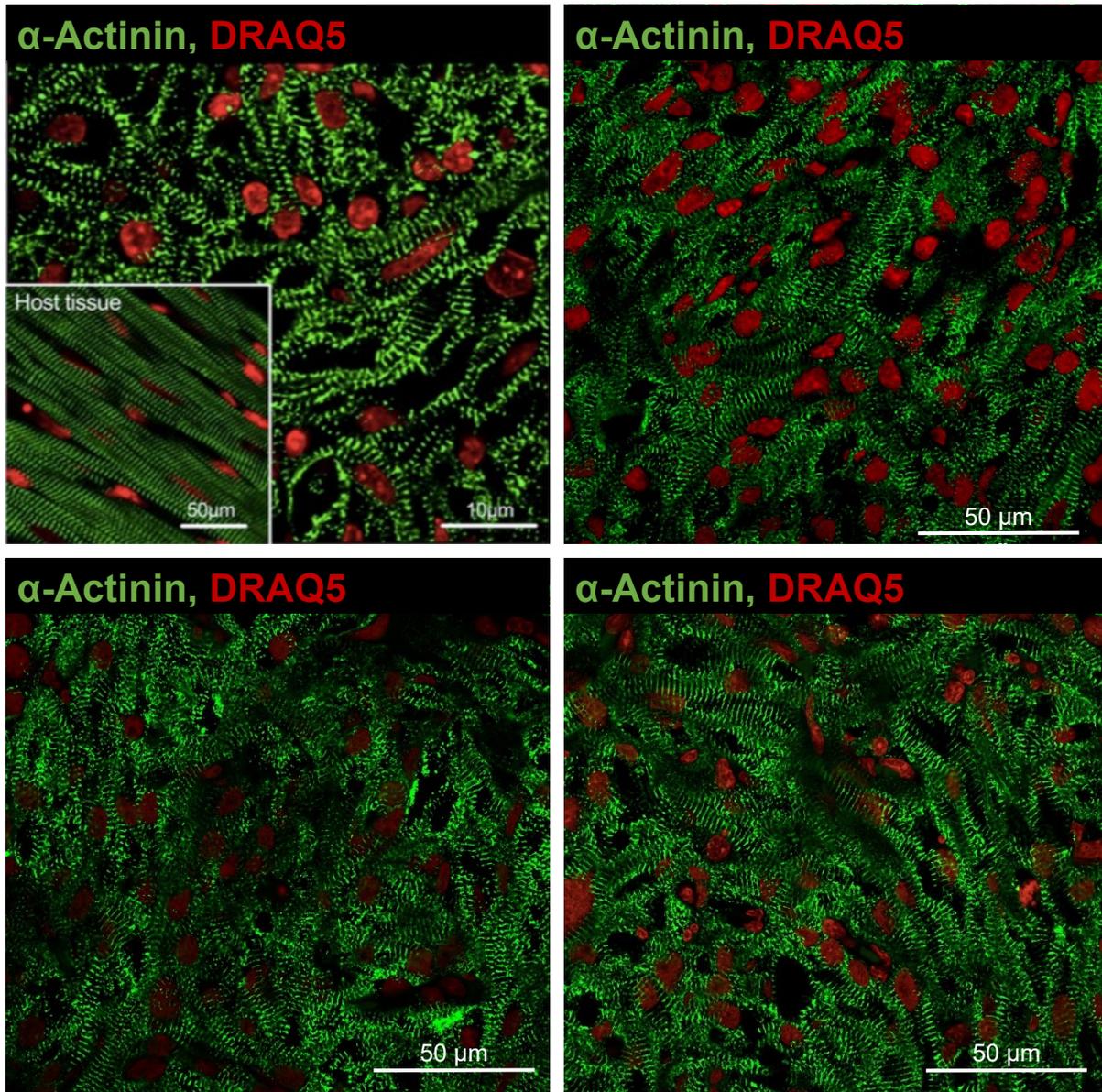


Abbildung 27: α -Actinin Immunfluoreszenzfärbungen des Graftareals eines transplantierten Meerschweinchenherzens.

Um die in den Immunfluoreszenzfärbungen qualitativ beschriebene unreife Zellmorphologie zu quantifizieren, wurden die Sarkomerlängen und Kardiomyozytendurchmesser des Transplantats mit denen des Empfängermyokards verglichen. Die Sarkomere und die Kardiomyozytendiameter der Graft-Kardiomyozyten waren insgesamt kürzer bzw. kleiner als die der Empfänger Kardiomyozyten. Die Sarkomerlängen der Grafts waren mit einem Durchschnitt von $1,73 \pm 0,01 \mu\text{m}$ ($n=100-150$ Sarkomere pro Herz; $N=3$ Herzen) kürzer als die des Empfängermyokards, welche durchschnittlich $1,85 \pm 0,02 \mu\text{m}$ ($n=50-85$ Sarkomere pro Herz, $N=3$ Herzen) betragen (Abbildung 28).

Ergebnisse

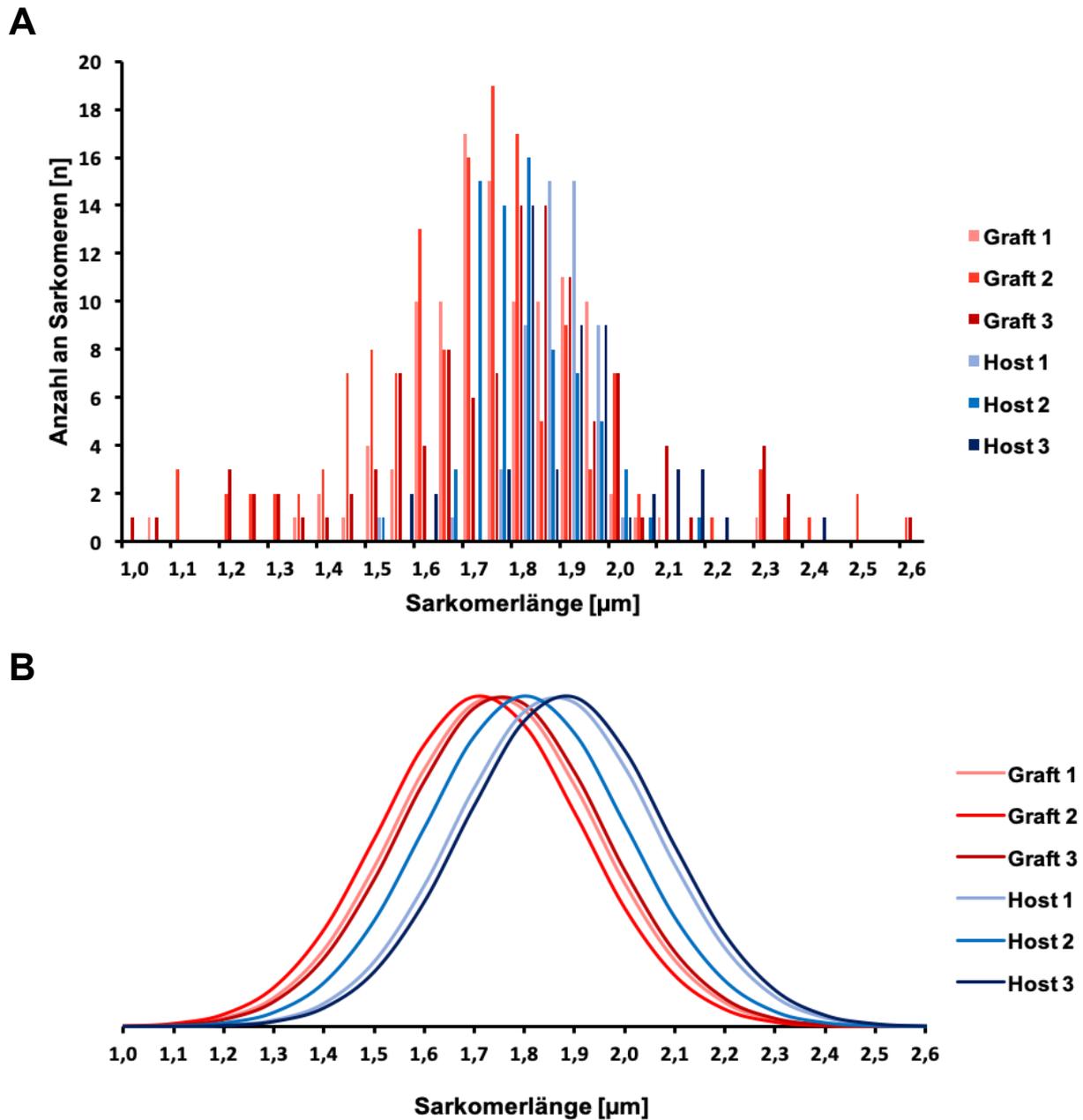
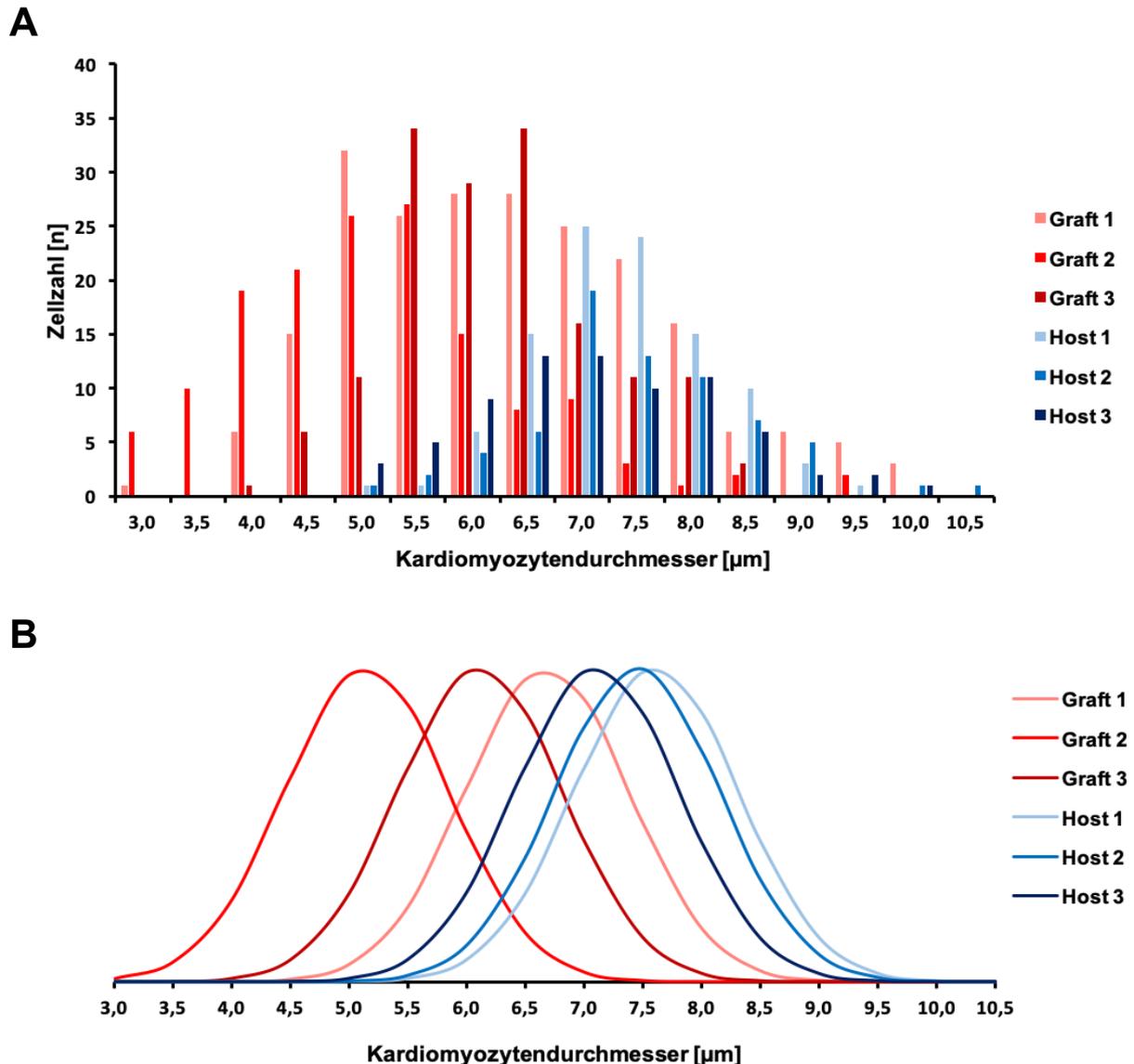


Abbildung 28: Analyse der Sarkomerlängen. (A) Numerische Darstellung der im Graft (n=3) und Host (n=3) vorkommenden Sarkomerlängen. (B) Darstellung der aus A ermittelten Werte als Gaußsche Normalverteilung.

Die selbe Tendenz war auch bei der Quantifizierung der Kardiomyozytendurchmesser erkenntlich. Die durchschnittlichen Durchmesser der Herzmuskelzellen war bei den transplantierten Kardiomyozyten $6,0 \pm 0,45 \mu\text{m}$ (n=150-220 Zellen pro Herz, N=3 Herzen). Sie waren damit deutlich kleiner als die Herzmuskelzellen des Hosts, welche im Durchschnitt einen Durchmesser von $7,4 \pm 0,15 \mu\text{m}$ (n=70-100 Zellen pro Herz, N=3

Ergebnisse

Herzen) besaßen. Die Quantifizierung bestätigt die qualitative Beschreibung der unreiferen transplantierten Kardiomyozyten, welche durch die Darstellung der Gaußschen Normalverteilung visualisiert wird (Abbildung 29). Auffällig war, dass die Kardiomyozytendurchmesser im Meerschweinchenmyokard relativ ähnlich waren, in den humanen Grafts jedoch zwischen den Tieren deutlich Unterschiede aufwiesen.



Die Unreife der transplantierten Kardiomyozyten wurde auch bei der histologischen Untersuchung der Connexin-43 Expression deutlich. Die Connexin-43

Ergebnisse

Immunfluoreszenzfärbungen und Immunhistochemien der Graft-Herzmuskelzellen zeigten eine diffuse Expression, wohingegen das Empfängermyokard eine strukturierte Expression der Gap Junction bildenden Transmembranproteine in den Glanzstreifen aufwies (Abbildung 30).

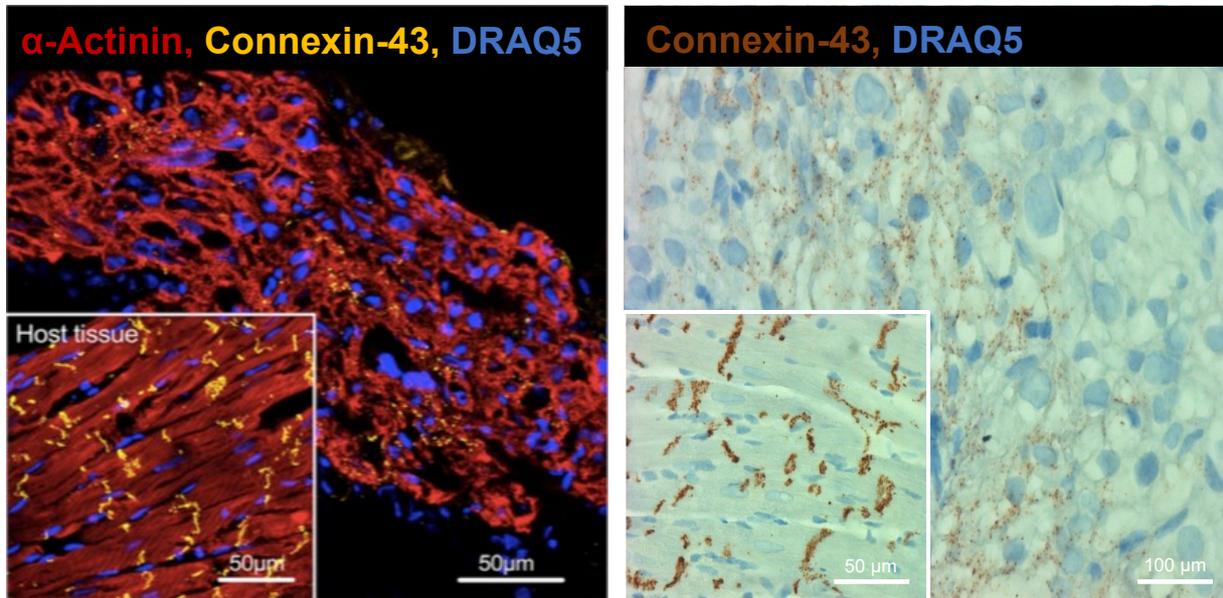


Abbildung 30: Connexin-43 Histologien eines transplantierten Meerschweinchenherzens. Sowohl in den Immunfluoreszenzfärbungen als auch in den Immunhistochemien wurde die inhomogene Connexin-43 Expression in den transplantierten Kardiomyozyten erkenntlich, welche die zelluläre Unreife des Transplantats suggerierte. Immunfluoreszenzabbildung adaptiert aus Querdel et al. (2021).

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde, angelehnt an die bereits etablierte Methode zur Herstellung von streifenförmigen EHTs in einem 6-Well-Format (Weinberger et al. 2016) und aufbauend auf die Dissertation von Mohammad Yusuf Nejahsie (2019), eine EHT-Geometrie etabliert, die besonders zur Transplantation als Gewebeersatz geeignet ist. Diese sollte eine flächenhafte Geometrie aufweisen, die Integration einer Netzstruktur beinhalten, sich zur Transplantation in einem Kleintiermodell eignen und perspektivisch in größerem Maßstab für ein Großtiermodell und letztlich in einer klinischen Studie anwendbar sein. Dafür wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll zur Herstellung von 1,5x2,7 cm messenden EHT-Patches etabliert. Mit diesem konnten reproduzierbar künstliche Herzmuskelkonstrukte hergestellt werden. Des Weiteren wurde im Hinblick auf eine klinische Applikation im Rahmen einer translationalen Studie untersucht, ob diese EHT-Patches unter GMP-kompatiblen (hier insbesondere serum-freien) Konditionen kultiviert werden können. In einer kleinen Proof-of-concept-Studie wurde anschließend untersucht, ob durch die Transplantation dieser Herzmuskelkonstrukte auf infarzierte Meerschweinchenherzen eine Remuskularisierung des Narbengewebes infolge eines Myokardinfarkts möglich ist.

4.1 Engineered Heart Tissue - EHT

Die im Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie etablierten streifenförmigen künstlichen Herzmuskelgewebe (Größe: $\approx 0,8 \times 9$ mm) erlauben durch ihre einfache Herstellung, ihrer Miniaturisierung und die halbautomatisierte videooptische Kontraktilitätsanalyse eine standardisierte in vitro Testung (Hansen et al. 2010). Mit Hilfe der videooptischen Messapparatur ist eine Analyse der Kraft möglich. Dabei kontrahiert das künstliche Herzmuskelkonstrukt durch die Verankerung an gegenüberliegenden Silikonsäulen auxoton. Hiermit wird die physiologische Belastung in vivo imitiert (Hirt et al. 2014). Die steigende Kraft im Zeitverlauf eignet sich als Surrogatparameter für die Reife der Kardiomyozyten. Neben der in vitro Analyse der EHTs im Rahmen der prädiktiven Toxikologie und ihrer Modellierung zur Untersuchung monogenetischer kardialer Erkrankungen stellt die Transplantation von EHTs auch eine potenzielle Therapiestrategie dar, um irreversibel abgestorbenes Myokard zu ersetzen.

Diskussion

In einer Proof-of-concept-Studie wurde dieses Konzept auf humane stammzell-abgeleitete Herzmuskelzellen erweitert. Dafür wurden streifenförmige EHTs in einem 6-Well-Format (Größe: $\approx 2 \times 20$ mm) hergestellt und zur Transplantation auf infarzierte Meerschweinchenherzen verwendet (Weinberger et al. 2016). Die Transplantation von je zwei streifenförmigen EHTs auf ein infarziertes Meerschweinchenherz führte zu einer Remuskularisation des verletzten Herzens und zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion. Jedoch konnte durch die streifenförmigen EHTs keine optimale Abdeckung des Infarktareals erzielt werden. Eine streifenförmige Geometrie lässt sich zudem im Kontext einer Transplantation nicht beliebig vergrößern, weshalb diese Geometrie sich nicht gut für eine klinische Anwendung eignet. Das wesentliche Ziel dieser Arbeit bestand folglich darin, durch die Optimierung der EHT-Geometrie EHT-Patches zu generieren, die sich zur Gewebeersatztherapie in Kleintiermodellen eignen. Darüber hinaus sollte durch die Vergrößerung der geometrischen Verhältnisse der Einsatz zur Transplantation im Großtiermodell und perspektivisch die Anwendung in einer klinischen Studie möglich sein. Da keine unlimitierte Anzahl der zuvor verwendeten streifenförmigen EHTs zur Abdeckung einer myokardialen Narbe verwendet werden können, wurden im Rahmen dieser Arbeit 1,5x2,7 cm messende EHT-Patches etabliert.

4.2 Etablierung der EHT-Patches

Im ersten Schritt wurden technische Zeichnungen und 3D-Modelle der Materialien angefertigt. Für die technischen Zeichnungen wurde das Computerprogramm Microsoft® PowerPoint® und für die 3D-Modellierung das Online-3D-Modellierungsprogramm Tinkercad verwendet. Für die Optimierung der finalen EHT-Geometrie sollten folgende Bedingungen in den technischen Zeichnungen realisiert werden: 1. Die streifenförmige Struktur sollte zu einer flächigen Geometrie umgewandelt werden. 2. Diese sollte eine zentrale Netzstruktur enthalten. 3. Die EHTs sollten sich zur Transplantation in einem Kleintiermodell eignen und perspektivisch zur Anwendung in einem Großtiermodell in ihrer Größe skalierbar sein.

Anschließend erfolgte anhand der technischen Zeichnungen die Herstellung der für die Generierung der EHT-Patches notwendigen Teflonformen (Abbildung 12) durch Dipl.-Ing. Bülent Aksehirlioglu. Diese wurden dann als Positivformen u.a. für die Herstellung der EHT-Träger verwendet. Jeder dieser Schritte und auch die Herstellung der Silikonmaterialien erfolgte manuell. So musste z.B. jede einzelne Silikonscheibe der Silikonhalterungen exakt auf den nur 1,3 mm durchmessenden Silikonsäulen platziert und mithilfe eines Silikongemisches befestigt werden. Durch die manuelle Anfertigung der Materialien war daher ein gewisses Maß an Inhomogenität unvermeidbar. Inwiefern sich diese Heterogenität auf die Entwicklung der EHT-Patches auswirkte, ist ungewiss. Der Herstellungsprozess, insbesondere der Silikonmaterialien, erwies sich trotz im Zeitverlauf etablierter Standardisierung als zeitintensiv. Da die Steifigkeit der neu etablierten Silikonmaterialien unbekannt war, mussten die aufwändig produzierten Materialien für die Kontraktilitätsanalyse der EHT-Patches zunächst einmal charakterisiert werden. Hierfür erfolgte die experimentelle Bestimmung des E-Moduls, bei dem sich ein Wert von $\approx 2,1 \frac{N}{mm^2}$ berechnen ließ. Dieser Wert konnte dann zur Quantifizierung der EHT-Kontraktilität im Kulturverlauf verwendet werden.

Die Etablierung des Protokolls zur Herstellung der EHT-Patches war komplex. Dabei stellten das Volumen und die Zusammensetzung des Mastermix, die Größen der Silikonscheiben, die Geometrie des Teflonplatzhalters und die erschwerte Lösung des Gewebes von den Silikonhalterungen Hürden dar, die zunächst für eine erfolgreiche und reproduzierbare Herstellung der EHTs gelöst werden mussten. Die entwickelten

Diskussion

Lösungswege zur Überwindung der Hürden nahmen mehrere Wochen ein, sodass sich das finale Herstellungsprotokoll erst im Verlauf dieser Arbeit herauskristallisierte. Damit ging einher, dass einige EHTs im Rahmen dieser Studie unvollständige Morphologien aufwiesen, weil sie bei der Herstellung zerrissen, Löcher im Gewebe besaßen oder nur partiell an den Silikonhalterungen verankert waren. Da zu Beginn dieser Arbeit zunächst EHT-Patches unter den serumhaltigen Bedingungen kultiviert wurden und zu dem Zeitpunkt noch keine standardisierte Herstellung der EHT-Patches und ihrer systematischen Analyse etabliert waren, konnten nur wenige EHTs evaluiert werden.

Am Anfang dieser Arbeit erfolgte die Herstellung von flächenförmigen EHTs, die an beiden Seiten an je drei Silikonsäulen aufgehängt waren. Dies orientierte sich an Arbeiten von Dr. med. Mohammad Yusuf Nejahsie (2019). Allerdings kam es bei diesen EHTs zu starken Umbauvorgängen, sodass aus der nach dem Gießen flächigen Geometrie im Verlauf ein EHT-Streifen resultierte. Dieses Problem konnte durch die Einführung einer vierten Silikonsäule an jeder Seite, und einer dadurch vergrößerten Aufspannung des Gewebes, gelöst werden. Die Optimierung der EHT-Geometrie beinhaltete die Integration einer Netzstruktur und eine damit einhergehende Vergrößerung des Oberflächenanteils, da in der Arbeit von Dr. med. Mohammad Yusuf Nejahsie gezeigt werden konnte, dass die Zellkonzentration im Zentrum von EHT-Patches ohne Netzstruktur nur sehr gering war. Die Verwendung der Netzstruktur orientierte sich an Arbeiten der Arbeitsgruppe von Nenad Bursac, welche eine homogene Zellverteilung in kardialen Konstrukten mit Netzstruktur gezeigt hatte (Bian et al. 2009).

Das erste Problem bei der Herstellung der neu etablierten EHT-Patches zeigte sich beim Gießen der Herzmuskelkonstrukte. Der Mastermix polymerisierte bevor die komplette Gussform ausgefüllt war. Dieses Problem konnte einfach durch die Reduktion der Thrombindosis gelöst werden. Hiermit war das Aushärten verlangsamt und der Mastermix füllte die Gussform komplett aus. Das nächste Problem trat beim Ziehen der EHT-Patches auf, infolgedessen viele EHTs zerrissen. Die Lösung hierfür beinhaltete einerseits die Vergrößerung der gewebetragenden Silikonscheiben am Ende der Silikonsäulen. Andererseits eine Erhöhung der Pluronic-Konzentration von

Diskussion

zunächst 1% auf 5% mit der das netzbildende Pinmodul vorinkubiert wurde. Letztlich konnten 1,5x2,7 cm messende flächenhafte Gewebepatches konstruiert werden.

Für die Herstellung der EHTs wurden Kardiomyozyten der Zelllinien C25 (Moretti et al. 2010), UKEi001, UKEi003 und TC-1133 verwendet. Die Differenzierung dieser Zellen erfolgte durch Dr. rer. nat. Marina Reinsch. Die unter GMP-Bedingungen hergestellte TC-1133 Zelllinie wurde in dieser Arbeit lediglich bei der Testung der serumfreien Kulturbedingungen bei den streifenförmigen EHTs im 24-Well-Format eingesetzt.

4.3 Etablierung von GMP-kompatiblen Kulturbedingungen

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die EHT-Patches in der serumhaltigen Standardkultur (Tabelle 2) inkubiert. Alle intakten EHTs remodelten nach einer dreiwöchigen serumhaltigen Kulturperiode, d.h. es kam zu einer Abnahme der EHT-Breite über die Zeit. Da bei den ersten Versuchen das Herstellungsprotokoll der EHTs sowie ihrer Analyse noch nicht ausgereift war, erfolgte keine systematische Dokumentation und Analyse dieser EHT-Patches. Dies erfolgte erst bei den späteren Versuchen als die neue EHT-Geometrie besser etabliert war.

Nach einer Kulturdauer von drei bis vier Wochen erfolgte eine histologische Aufarbeitung der EHT-Patches. Diese zeigte, dass durch die Integration der Netzstruktur eine homogenere Zellverteilung im Gewebe erreicht werden konnte, als bei streifenförmigen EHTs, bei denen die Herzmuskelzellen vorwiegend an der Oberfläche lokalisiert sind (Hirt et al. 2014; Weinberger et al. 2016). Zwar kam es auch bei den EHT-Patches präferentiell zu einer Lokalisation an der Oberfläche. Durch die Einführung der Netzstruktur wurde die Oberfläche jedoch substantiell vergrößert, sodass letztlich eine homogenere Zellverteilung resultierte. Diese Beobachtung legt nahe, dass durch die vergrößerte Oberfläche die Versorgung der Kardiomyozyten mit Nährstoffen und Sauerstoff, aufgrund der kürzeren Diffusionsstrecke, verbessert werden konnte. Bei größeren künstlichen Herzmuskelkonstrukten ohne Implementierung einer Netzstruktur wurde bereits nachgewiesen, dass die Sauerstoffkonzentration im Zentrum des Gewebes gering war (Vollert et al. 2014). Dies beeinträchtigt das Zellüberleben der im Verlauf der Kultur reifenden Herzmuskelzellen. Es ist denkbar, dass die hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten, die initial eine hohe Hypoxieresistenz besitzen (Pritchett-Corning 2009; Weinberger et al. 2016), sich im Verlauf des Reifungsprozesses zunehmend schlechter an das potenzielle hypoxische Milieu im Gewebезentrum adaptieren konnten. Die hier generierte Netzstruktur konnte dem möglicherweise entgegenwirken. Da das Zellüberleben weder in den EHT-Patches mit Netzstruktur, noch in EHT-Patches ohne Netzstruktur systematisch untersucht wurde und keine Sauerstoffmessungen in den EHT-Patches mit Netzstruktur erfolgte, lässt sich die Frage nach dem entscheidenden Unterschied jedoch nicht sicher beantworten.

Diskussion

In Anbetracht der gehäuften Tendenz der Kardiomyozyten sich entlang der Oberflächen zu lokalisieren, könnte die homogenere Zellverteilung innerhalb der EHT-Patches zum anderen durch die EHT-Geometrie als solche begründet werden. Die Arbeitsgruppe um Nenad Bursac zeigt, dass die Ausrichtung von Muskelzellen maßgeblich durch die Gewebegeometrie beeinflusst wird und sich folglich auch auf die Kraftentwicklung auswirkt (Bian et al. 2012 und 2014). In dieser Arbeit wurde durch die Verankerung der EHTs an den gegenüberliegenden Silikonsäulen eine kontinuierliche mechanische Belastung im Sinne einer auxotonen Kontraktion forciert, wodurch sich die Herzmuskelzellen parallel zu den einwirkenden Kraftvektoren ausrichten (Hirt et al. 2014). Zwar bestand bei den EHT-Patches eine relativ homogene Zellverteilung im gesamten Gewebe, jedoch wurde in den Immunhistochemien deutlich, dass sich auch bei den EHT-Patches elongierte Kardiomyozyten zunehmend an den Oberflächenstrukturen befanden (Abbildung 20D-F). Die mechanische Belastung schien insbesondere auf die im Gewebe befindlichen Randstrukturen einzuwirken. Für eine Verifizierung dieser Beobachtung könnte in zukünftigen Arbeiten eine FEM-Analyse (Finite-Elemente-Methode) der EHT-Patches erfolgen, mit derer Hilfe das Ausmaß der Gewebeerformung und der Krafteinwirkung differenziert im Herzmuskelkonstrukt untersucht werden kann. So wurden bereits FEM-Modelle entwickelt, mit denen das regionale mechanische Verhalten des linken Ventrikels während eines gesamten Herzzyklus untersucht werden kann (Zhang et al. 2018b). Mit Hilfe dieser Modelle könnte unter Umständen eine Aussage darübergemacht werden, inwiefern die Lokalisation der Kardiomyozyten im Gewebe von mathematischen und physikalischen Parametern im Sinne der Gewebegeometrie und der damit bedingten Kraftverteilung abhängig ist. Die Evaluierung der räumlichen Anordnung von Herzmuskelzellen im Gewebe ist daher relevant, weil sie ausschlaggebend für die mechanische Integrität, die elektrische Leitfähigkeit sowie der daraus resultierenden Kraft ist (Au et al. 2007; Pijnappels et al. 2008; Kowalski et al. 2017).

Die EHT-Patches zeigten abhängig von den verwendeten Kulturmedien ein unterschiedliches Ausmaß an morphologischer und physiologischer Reifung. Insbesondere die Verwendung von Serum führte im Vergleich zu einer serumfreien Kultur zu deutlichen Unterschieden, welche im Folgenden diskutiert werden. Nachdem sich die EHT-Patches in einer serumhaltigen Kultur gut entwickelten, wurde versucht,

Diskussion

aufbauend auf die Arbeit von Tiburcy et al. (2017), ein serumfreies Protokoll zu etablieren. In diesem Medium wurde Serum durch B27 sowie die Zytokine IGF, FGF, VEGF und TGF- β ersetzt. In diesen Versuchen kam es unter einer serumfreien Kultur ebenfalls zu einer Abnahme der EHT-Patchbreite, sodass diese nach einer dreiwöchigen serumfreien statischen Kultur durchschnittlich 80% (n=7) der am Tag der Herstellung initialen Breite betrug. Die Breitenabnahme war unter dynamischen Kulturbedingungen etwas ausgeprägter. Eine sichere Aussage lässt sich aufgrund der kleinen n-Zahl jedoch nicht machen.

Im Gegensatz zur Breite, die sowohl unter serumhaltigen, als auch unter serumfreien Bedingungen abnahm, war die Kontraktilität der EHT-Patches erheblich von den verwendeten Kulturmedien abhängig. Einhergehend mit der im Kulturverlauf beobachteten morphologischen Reifung der EHT-Patches generierten alle Herzmuskelkonstrukte (n=6) innerhalb einer dreiwöchigen serumhaltigen Kultur makroskopische Kontraktionen. Alle EHT-Patches erzeugten dabei eine Deflektion der Silikonsäulen. In einer kürzlich auf dieser Arbeit aufbauenden Publikation um Querdel et al. (2021) wurden die hier etablierten EHT-Patches unter der Verwendung von GMP konformen humanem Serum kultiviert und erzeugten nach einer dreiwöchigen dynamischen Kultur durchschnittliche Kraftwerte von $4,6 \pm 0,2$ mN. Die Kraft wurde aus der maximalen Deflektion der Silikonsäulen berechnet. Bei der direkten Messung der EHT-Kraft im Organbad, die von der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Torsten Christ durchgeführt worden war, ergab sich ein Wert von $2,0 \pm 0,6$ mN (Querdel et al. 2021). Die Kraft pro Kardiomyozyte war etwas niedriger, aber in einem ähnlichen Bereich wie bei EHTs, die im 24-Well-Format kultiviert werden ($\approx 0,3$ mN pro 1×10^6 Kardiomyozyten). Im Kontrast dazu konnten unter statischen serumfreien Kulturbedingungen nur bei vier der 19 EHTs makroskopische Kontraktionen verzeichnet werden. Zwei dieser EHTs zeigten nur asynchrone Kontraktionen über die dreiwöchige Kulturperiode und lediglich zwei EHT-Patches kontrahierten kohärent. Die kohärent kontrahierenden EHTs generierten Kontraktilitätswerte von $1,55 \pm 0,55$ mN (n=2) und waren damit deutlich schwächer als EHTs, die unter serumhaltigen Bedingungen kultiviert worden waren. Dies war überraschend, da in der Literatur der erfolgreiche Einsatz einer serumfreien Kultur beschrieben war (Tiburcy et al. 2017) und zudem vor der Anwendung der serumfreien Kultur an EHT-Patches ein Probelauf mit kleinen streifenförmigen EHTs durchgeführt wurde. Diese entwickelten sich unter einer

Diskussion

serumfreien Kultur etwas langsamer (Beginn der makroskopischen Kontraktion zwischen Tag 11 und 16), generierten aber letztlich nur etwas niedrignormale Kräfte. Eine Erklärung hierfür konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden.

Um die Entwicklung unter serumfreien Bedingungen zu fördern, wurde eine Methode aus dem Labor der Arbeitsgruppe von Nenad Bursac (Jackmann et al. 2016) angewandt. Hierbei werden die EHTs während der Kultur kontinuierlich auf einer beweglichen Plattform mit definiertem Kippwinkel und bestimmter Frequenz geschwenkt. In der Literatur war beschrieben, dass dies zu einer deutlichen Reifung kardialer Konstrukte aus neonatalen Rattenkardiomyozyten sowie aus humanen stammzell-abgeleiteten Kardiomyozyten führte. Die möglichen Gründe hierfür werden weiter unten in dieser Arbeit diskutiert. Durch die Einführung dynamischer serumfreier Kulturbedingungen kontrahierten alle EHT-Patches kohärent ($n=2$) und generierten mit $4,9\pm 0,2$ mN deutlich höhere Kraftwerte als EHT-Patches, die unter statischen serumfreien Bedingungen kultiviert wurden. Dieses Resultat bedarf jedoch auf Grund der kleinen Probenanzahl der dynamisch kultivierten EHT-Patches ($n=2$) weiterer Analysen.

Die im Kulturverlauf zunehmende Kontraktilität korrelierte mit der zellulären Morphologie der Kardiomyozyten. Die zelluläre Reife war maßgeblich vom Einsatz von Serum abhängig. Nach einer dreiwöchigen Kultur führte der Einsatz von Serum zu einer hohen Dichte an Kardiomyozyten (Abbildung 16A), die durch ihre klar differenzierten Sarkomerstrukturen und der stäbchenförmigen Morphologie (Abbildung 16C und D) strukturelle Zeichen reifer Kardiomyozyten aufwiesen. Zudem richteten sich die Herzmuskelzellen longitudinal im EHT aus und elongierten hierbei insbesondere an den Randstrukturen. Bei den EHT-Patches, die unter serumfreien Bedingungen kultiviert wurden, konnten diese histologischen Resultate nicht reproduziert werden. Unter den statischen serumfreien Kulturbedingungen besaßen die EHT-Patches eine geringe Dichte an Kardiomyozyten mit gering differenzierten Sarkomerstrukturen (Abbildung 20A und B). Durch die Einführung der dynamischen serumfreien Kulturbedingungen konnte eine Erhöhung der Kardiomyozytendichte erzielt werden (Abbildung 24A). Außerdem waren bei den Kardiomyozyten klar differenzierte Sarkomerstrukturen abgrenzbar, die sich u.a. in einer regelmäßigen Querstreifung präsentierte. Trotz der verbesserten Entwicklung der EHTs unter den

Diskussion

dynamischen Kulturbedingungen zeigten EHT-Patches unter dem Einsatz von Serum in allen Aspekten bessere Resultate.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass der Einsatz von Serum und die Etablierung dynamischer Kulturbedingungen wichtig für die zelluläre Reifung und der damit einhergehenden Kraftentwicklung der EHT-Patches war und die Herzmuskelkonstrukte folglich deutlich von ihnen profitierten. Der Ersatz des Serums durch B27 und der Zusatz von Wachstumsfaktoren konnten den Effekt des Serums nach einer dreiwöchigen Kultur nicht ausgleichen. Welche Gründe für die Differenz zu den Ergebnissen von Tiburcy et al. (2017) ausschlaggebend waren, blieb unklar. Für die verbesserte Kraftentwicklung, die erhöhte Zelldichte und den höheren Differenzierungsgrad der Kardiomyozyten innerhalb einer serumhaltigen dynamischen Kultur könnten mehrere Faktoren ursächlich sein, welche nachfolgend diskutiert werden.

4.4 Auswirkung einer serumhaltigen Kultur

In mehreren Studien wurde durch den Einsatz von Serum ein hypertropher Effekt auf Kardiomyozyten beschrieben (Simpson et al. 1982; Bass et al. 2012; Dambrot et al. 2014). Im Rahmen der Hypertrophie zeigten neonatale Rattenkardiomyozyten in einer serumhaltigen Kultur eine vergrößerte Zelloberfläche, ein erhöhtes Zellvolumen sowie eine erhöhte zelluläre Proteinkonzentration bei konstanter Zellzahl (Simpson et al. 1982). Die Arbeitsgruppe um Dambrot et al. (2014) konnte ebenfalls eine vergrößerte Zelloberfläche sowie eine Erhöhung der Kontraktionsfrequenz bei hESC- und hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten im Rahmen einer serumhaltigen Kultur nachweisen. Sowohl bei neonatalen Rattenkardiomyozyten als auch bei hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten war das Ausmaß der Kardiomyozytenhypertrophie durch eine serumhaltige Kultur dosisabhängig (Simpson et al. 1982; Dambrot et al. 2014). Außerdem konnte beim Zusatz von Serum in einer zuvor serumfreien Kardiomyozytenkultur ein rapides Wachstum der Zellen, eine organisierte Querstreifung und ein spontanes Kontraktionsmuster erzielt werden, was in der Zusammenschau eine wachstums- und differenzierungsfördernde Wirkung des Serums indizierte (Simpson et al. 1982). Die Arbeitsgruppe um Bass et al. (2012) beschrieb ebenfalls, dass die Kardiomyozytenstimulation durch Serum in einem Anstieg der strukturierten Sarkomerorganisation resultierte, welche unter dem Einsatz von IGF-1 nicht beobachtet wurde. Außerdem beschrieben sie eine Abnahme der runden Kardiomyozytenmorphologie unter einer serumhaltigen Kultur. Diese Resultate gehen mit den in dieser Arbeit beschriebenen histologischen Beobachtungen der serumhaltig kultivierten EHT-Patches einher. Dies passt auch zu Arbeiten der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Dr. rer. biol. hum. Marc Hirt, die zeigten, dass eine serumfreie EHT-Kultur erst nach einer initialen Konsolidierungsphase, während der die EHTs auf Serum angewiesen sind, möglich war (Hirt et al. 2012).

Des Weiteren führte der Einsatz von Serum im Gegensatz zu einer serumfreien Kultur bei den Kardiomyozyten zu einer Erhöhung von Zell-Zell-Kontakten (Bass et al. 2012). Im Gegensatz führte der Einsatz von IGF-1, welches auch in der hier verwendeten serumfreien EHT-Kultur enthalten war, zu einer verminderten Expression von Zell-Zell-Kontakten (Bass et al. 2012). Die Expression von Zell-Zell-Kontakten stellen neben einer organisierten Sarkomerstruktur mit regelrechter Querstreifung wichtige strukturelle Charakteristiken terminal differenzierter Kardiomyozyten dar

Diskussion

(Eschenhagen und Zimmermann 2005). Diese Erkenntnis unterstreicht die differenzierungsfördernde Wirkung einer serumhaltigen Kultur, wie sie auch bei den EHT-Patches in den Histologien illustriert wurde.

Welche molekularbiologischen Signaltransduktionswege hierbei beteiligt sind, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht endgültig erforscht. Dies liegt u.a. daran, dass die genauen Inhaltsstoffe von Serum nicht definiert sind und sich die jeweiligen Chargen in ihrer Zusammensetzung unterscheiden können, was in phänotypischen Unterschieden in den Zellkulturen resultiert (van der Valk et al. 2010). Fest steht, dass diverse Wachstumsfaktoren (Bass et al. 2012), Nährstoffe, Vitamine, Spurenelemente und Hormone wie z.B. Katecholamine und Cortisol in Seren beinhaltet sind und essentiell zum Wachstum von Zellen beitragen (van der Valk et al. 2010). Die Arbeitsgruppe um Simpson et al. (1982) konnte beispielweise nachweisen, dass der hypertrophe Effekt von Norepinephrin auf eine Kardiomyozytenkultur in der Abwesenheit von Serum größer war als bei der kombinatorischen Gabe von Norepinephrin und Serum. Aus diesem Resultat folgerten sie, dass das Serum eine endogen vorhandene Katecholaminkonzentration besitze. Die Arbeitsgruppe um Dambrot et al. (2014) beschreibt einen ähnlich ausgeprägten hypertrophen Effekt einer kurzen (72 Stunden) serumhaltigen Kultur auf hESC- und hiPSC-abgeleitete Kardiomyozyten wie den durch die Applikation von Phenylepinephrin. Beide Komponenten führten zu einer ähnlich ausgeprägten Veränderung der Kardiomyozytenoberfläche und der Kontraktionsfrequenz. Die zusätzliche Gabe von Isoprenalin hatte unter dem Einsatz von Serum keinen stimulierenden Effekt auf die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten, wobei in Abwesenheit von Serum eine Verdopplung der Schlagfrequenz erreicht wurde. Diese Resultate suggerierten laut Dambrot et al. (2014), dass das Serum die erzielte Kardiomyozytenhypertrophie u.a. über adrenerge Signalkaskaden reguliere. Die Arbeiten von PD Dr. med. Dr. rer. biol. hum. Marc Hirt und Dr. med. Nils Sörensen aus dem Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie unterstreichen zudem die Bedeutung des Schilddrüsenhormons T3 und des Glukokortikoids, welche die spontane Aktivität von Kardiomyozyten verbessern (Hirt et al. 2012).

4.5 Auswirkung einer dynamischen Kultur

Die Arbeitsgruppe um Jackman et al. (2016) konnte diverse Effekte einer dynamischen im Vergleich zu einer statischen Kultur auf dreidimensionale Herzmuskelgewebe aus Rattenkardiomyozyten und hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten nachweisen. Im Rahmen einer dynamischen Kultur konnte eine signifikante Erhöhung der strukturellen und funktionalen Reife der Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Die Erhöhung der Kontraktilität ging mit erhöhten Calciumtransienten einher, was eine fortgeschrittene Kardiomyozytenreife suggerierte. Diese Resultate korrelierten mit einer Aktivierung des nährstoffsensitiven mTOR-Signalwegs (*mechanistic Target of Rapamycin*, Kim et al. 2002), der neben anderen Signalwegen maßgeblich an der physiologischen Hypertrophie des Herzens beteiligt ist (Maillet et al. 2012). Die Proteinkinase mTOR reguliert die Proteinsynthese und Proliferation von Zellen und ist in ihrer Aktivität abhängig vom lokalen und systemischen Energie- und Nährstoffangebot (Howell und Manning 2011). Unter den dynamischen Kulturbedingungen war im Vergleich zu statischen Kulturbedingungen die Aktivität des mTOR complex 1 (mTORC1) und seines Effektors S6K (ribosomale S6 Kinase) erhöht (Jackman et al. 2016). Die Autoren beschreiben, dass eine Erhöhung von mTORC1 durch die gesteigerte Aktivität der Proteinkinase B (Akt) erzielt wurde. Diese wiederum wurde durch Insulin oder IGF-1 stimuliert (Alessi et al. 1996; Maillet et al. 2012). Alternativ ist eine Stimulation von mTORC1 durch die Suppression der AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) möglich. Dieser Mechanismus wird bei Energiemangel aktiviert, um die Energiehomöostase im Organismus aufrechtzuerhalten (Hardie, Ross und Hawley 2012). Diese Erkenntnisse suggerierten laut Jackman et al. (2016) den verbesserten Transport von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren in die Zellen von dreidimensionalen Herzmuskelkonstrukten durch die Etablierung dynamischer Kulturbedingungen. Bei dynamisch kultivierten Geweben konnte zudem eine erhöhte Expression von Genen nachgewiesen werden, die für Proteine codieren, welche an der kardialen elektrischen und kontraktile Funktion beteiligt sind (z.B. SERCA, L-Typ Calciumkanäle, α - und β -MHC, Connexin-43). Des Weiteren konnte bei statisch kultivierten Herzmuskelkonstrukten aus Rattenkardiomyozyten eine höhere Expression des Hypoxiemarkers Prollyhydroxylase 3 (PHD3) als bei dynamisch kultivierten Konstrukten gemessen werden, welche eine insuffiziente Sauerstoffversorgung suggerierte. (Jackman et al. 2016).

Diskussion

In der Zusammenschau wird deutlich, dass die EHT-Patches unter einer dynamischen serumhaltigen Kultur hinsichtlich ihrer morphologischen, funktionalen und zellulären Entwicklung am meisten profitieren würden. Für potenzielle klinische Studien ist daher, wie bereits in der Studie um Querdel et al. (2021) durchgeführt, der Einsatz von GMP konformen humanem Serum zielführend.

4.6 Transplantationsstudie

4.6.1 Limitationen des Studiendesigns

Im Rahmen einer Pilotstudie wurden die in dieser Arbeit etablierten EHT-Patches auf infarzierte Meerschweinchenherzen transplantiert. Es sollte überprüft werden, ob die Transplantation von EHT-Patches technisch möglich ist und ob diese eine Transplantation überleben und dabei zu einer Abdeckung des Infarktareals im Meerschweinchenherzen führen. Diese Arbeiten wurden vornehmlich von Dr. med. Liesa Castro und Frau Birgit Geertz durchgeführt. Für diese Studie wurden Meerschweinchen verwendet, weil ihre Herzphysiologie, im Vergleich zu anderen Kleintiermodellen, der Physiologie des humanen Herzens am meisten gleichen (Watanabe et al. 1985). Außerdem erleichterte die Größe der Meerschweinchen im Vergleich zu denen von Mäusen oder Ratten die operativen Eingriffe, was insbesondere hinsichtlich einer Wiederöffnung des Thorax zur Transplantation der EHT-Patches vorteilhaft war. Jedoch erlaubte die ausgeprägte Kollateralisation des Meerschweinchenherzens keine Verletzung des Myokards mittels eines Ischämie-Reperusionsmodells (Maxwell et al. 1987; Lindsey et al. 2018). Aus diesem Grund wurde, wie in der Publikation um Weinberger et al. (2016) beschrieben, die Induktion einer myokardialen Verletzung durch eine in flüssigem Stickstoff abgekühlte Aluminiumsonde durchgeführt.

Bei den Operationsprozeduren im Rahmen der Infarktinduktion als auch bei der Transplantation der EHTs kam es zu einer hohen peri- und postoperativen Mortalität, sodass insgesamt jedes dritte Tier verstarb. Im Kontext der Literatur ist die Mortalitätsrate im Vergleich zu ähnlichen Tiermodellen hoch, jedoch nicht viel höher. So zeigte sich beispielsweise in der Studie um Weinberger et al. (2016) bei der Transplantation von künstlichen Herzmuskelkonstrukten auf infarzierte Meerschweinchenherzen eine Mortalitätsrate von 40%.

Ursächlich für die hohe Mortalität in dieser Arbeit war zum einen die Verwendung der erwärmten Kochsalzlösung mit der die abgekühlte Aluminiumsonde vom Meerschweinchenmyokard gelöst wurde. Da dieser Prozess vier Mal wiederholt wurde, kam es zu einer Ansammlung eines relevanten Flüssigkeitsvolumens im Thorax, welche alleinig durch den Einsatz von Mullkompressen und ohne die Verwendung eines vakuumbetriebenen OP-Saugers nicht vollständig entfernt werden

konnte. Daher ist es denkbar, dass durch die intrathorakale Retention der Kochsalzlösung der Thorax flüssigkeitsbedingt komprimiert wurde, was in Folge die kardiopulmonale Funktion behinderte. Ein möglicher Ansatz dieses Problem zu verhindern, wurde in der Studie um Querdel et al. (2021) durch die Verwendung eines hohlen Stempels und eines Lötkolbens gezeigt. Weiterhin bestand durch den nur kleinen Operationssitus bei der Induktion des Myokardinfarkts eine geringe Distanz zwischen der stark abgekühlten Aluminiumsonde und dem linken Lungenflügel, sodass dieser wiederholt verletzt wurde. Im Rahmen dieser Implantationen erfolgten einige Modifikationen der Prozedur. So wurde der linke Lungenflügel während der Induktion der Myokardverletzung mittels einer Kompresse abgedeckt. Ein weiteres Problem war die durch die Isoflurananästhesie ausgelöste Stimulation der Speichelproduktion und der bronchialen Sekretion. Diese konnte durch den Einsatz von Atropin reduziert werden, was zu einer Reduktion der Mortalität beitrug (Castro et al. 2019). Insgesamt konnten acht EHT-Patches erfolgreich transplantiert werden. Hiervon war ein EHT unter serumhaltigen und sieben EHTs unter serumfreien Bedingungen kultiviert worden.

4.6.2 Transplantatüberleben

Das Resultat der Transplantationen wurde nach einem vierwöchigen Nachbeobachtungszeitraum histologisch untersucht. Es zeigte sich, dass nur drei der insgesamt acht erfolgreich transplantierten EHT-Patches die Transplantation auf das infarzierte Meerschweinchenmyokard überlebten.

Die resultierenden Graftgrößen waren hierbei insbesondere von den zuvor verwendeten EHT-Kulturmedien abhängig. So zeigte eines der drei Meerschweinchen einen Graftanteil von 32% und zwei weitere Meerschweinchen lediglich Graftareale von 8% und 6% des gesamten Narbengewebes. Der große Graft im ersten Tier resultierte aus der Transplantation eines EHT-Patches, der unter dem Einsatz von Serum kultiviert worden war. Die beiden kleineren Grafts resultierten aus EHT-Transplantationen, in welchen die Herzmuskelkonstrukte zuvor unter serumfreien Bedingungen kultiviert worden waren. Aufbauend auf die Resultate dieser Arbeit erfolgte in der Studie um Querdel et al. (2021) die Transplantation von EHT-Patches, die unter serumhaltigen Bedingungen (humanes Serum) kultiviert worden waren. Hierbei zeigte sich unter dem Einsatz von GMP kompatiblen humanem Serum eine

Diskussion

durchschnittliche Graftgröße von $17\pm 1\%$ ($n=6$) und war somit deutlich größer als in dieser Arbeit bei einer durchschnittlichen Graftgröße von $6\pm 4\%$ des Infarktareals. Somit kann man schlussfolgern, dass die Transplantation von EHT-Patches, die unter serumhaltigen Bedingungen kultiviert worden sind, zu größeren Grafts führt. In Anbetracht der histologischen Ergebnisse, die eine deutlich bessere Struktur zeigten, lässt sich ableiten, dass die Kardiomyozytenstruktur, oder vereinfacht gesagt, das Wohlbefinden der Kardiomyozyten, entscheidend für einen Transplantationserfolg waren. Insgesamt könnte das Transplantationsergebnis aber optimiert werden. Das geringe Transplantatüberleben könnte durch eine fehlende initiale Vaskularisation der EHT-Patches begründet werden. Im gesunden Herzen wird jede Kardiomyozyte durch die ausgeprägte vaskuläre Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt und ist auch durch die sekretorische Funktion von Endothelzellen maßgeblich für das Überleben und die Funktion von Kardiomyozyten relevant (Hsieh et al. 2006). Im Rahmen der Transplantation muss man annehmen, dass ein gewisser Zeitraum besteht, bei dem sich die transplantierten Zellen in einem nährstoffarmen und hypoxischen Zellmilieu befinden und in Folge eine substantielle Anzahl an Kardiomyozyten abstirbt. In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass Gefäße aus dem Empfängermyokard das Transplantat vaskularisieren (Weinberger et al. 2016, Querdel et al. 2021). Fest steht, dass die Vaskularisierung eine kritische Voraussetzung darstellt, um das Überleben und die Funktion von künstlichem Herzmuskelgewebe zu gewährleisten (Zhang et al. 2018a). Jedoch ist die finale Graftgröße nicht nur vom Überleben der transplantierten Zellen abhängig, sondern auch von ihrer Proliferation (Querdel et al. 2021). Eine weitere Ursache für das geringe Transplantatüberleben könnte trotz der hier verwendeten Immunsuppression durch eine immunologische Abstoßung des allogenen humanen Transplantats begründet werden. Welche Faktoren in dieser Pilotstudie zum Überleben bzw. Absterben der Transplantate geführt haben, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Möglichkeiten das Transplantatüberleben zu verbessern, konnten in mehreren Studien durch diverse Strategien realisiert werden:

- 1) Präoperative Hitzeschockbehandlung der Kardiomyozyten (Zhang et al. 2001; Laflamme et al. 2007),
- 2) Überexpression von anti-apoptotisch wirkender Proteine wie Akt (Zhang et al. 2001) oder Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*; Nakamura et al. 2006),

- 3) Gezielte Hemmung pro-apoptotischer Proteinkinasen (Rho-assoziierte Proteinkinasen; Zhao et al. 2019),
- 4) Überexpression von VEGF (Wang et al. 2006),
- 5) Ko-Transplantation von epikardialen Zellen und Kardiomyozyten (Bargehr et al. 2019),
- 6) Ko-Transplantation von Kardiomyozyten mit Zellmatrizes wie Matrigel, um eine Zellverankerung der Kardiomyozyten an der umliegenden extrazellulären Matrix zu gewährleisten, um somit Anoikis, eine Form des programmierten Zelltods, zu verhindern (Laflamme et al. 2007).

Die Verbesserung des Transplantatüberlebens durch die unterschiedlichsten Strategien verdeutlicht, dass eine Vielzahl von Signalkaskaden für den Zelltod im Kontext der Zelltransplantation verantwortlich ist. Die Arbeitsgruppe um Laflamme et al. (2007) konnte durch den Einsatz multipler Faktoren (*prosurvival cocktail*) Signalkaskaden blockieren, die potenziell am Zelltod transplantierter Kardiomyozyten beteiligt sind, und so das Transplantatüberleben ESC-abgeleiteter Kardiomyozyten auf Rattenherzen steigern. Der vereinzelte Einsatz derselben Faktoren führte in der Studie zu keinem verbesserten Transplantatüberleben. Dies suggeriert, dass zukünftig ein multifaktorieller Ansatz erforderlich sein wird, um das Transplantatüberleben der EHT-Patches zu verbessern.

4.6.3 Analyse der transplantierten Kardiomyozyten

Trotz des deutlichen Einflusses einer serumhaltigen Kultur auf die Größe bzw. das Überleben des Transplantats unterschieden sich die überlebenden Zellen nicht, unabhängig davon ob die EHTs mit oder ohne Serum kultiviert worden waren. Die transplantierten Zellen stellten sich in den Histologien unabhängig von den vorherigen Kulturbedingungen als Kardiomyozyteninseln dar. Diese Kardiomyozyten waren uneinheitlich im Narbengewebe ausgerichtet, was im starken Kontrast zu den strikt parallelverlaufenden Kardiomyozyten des Meerschweinchenmyokards stand. Die humanen Kardiomyozyten wiesen trotz ihrer ungeordneten räumlichen Orientierung auch strukturelle Anzeichen von differenzierten Herzmuskelzellen auf. Zu diesen Anzeichen gehörten eine elongierte stäbchenförmige Zellmorphologie, längliche Zellkerne und eine regelrechte Querstreifung. Dennoch zeigten sich auch Merkmale von unreifen Zellen. Die humanen Kardiomyozyten waren nach einer vierwöchigen Nachbeobachtungsphase kleiner (Durchmesser $6,0 \pm 0,45 \mu\text{m}$ vs. $7,4 \pm 0,15 \mu\text{m}$) und

Diskussion

besaßen kürzere Sarkomere ($1,73 \pm 0,01 \mu\text{m}$ vs. $1,85 \pm 0,02 \mu\text{m}$) im Vergleich zum Meerschweinchenmyokard. Außerdem war die Expression des Connexin-43 im Transplantat diffus, welches im deutlichen Kontrast zum klar strukturierten Expressionsmuster im Empfängermyokard stand.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur einige wenige Merkmale der Kardiomyozytenreife untersucht. In der Studie um Querdel et al. (2021) wurden neben den hier untersuchten Kriterien zur Beurteilung der Kardiomyozytenreife weitere Kriterien wie die Zellzyklusaktivität und die Expression der ventrikulären bzw. atrialen Myosinleichtkettenisoform herangezogen. In der Studie wurde festgestellt, dass die unter humanem Serum kultivierten EHT-Patches nach der Transplantation phänotypische Zeichen reifer Kardiomyozyten aufwiesen (z.B. erhöhte Expression der ventrikulären Isoform und geringere Expression der atrialen Isoform der Myosinleichte-Ketten-Kinase). Jedoch zeigten die transplantierten Kardiomyozyten aus der Studie um Querdel et al. (2021) auch unreife Zellcharakteristika auf, welche beispielsweise durch die unregelmäßige Connexin-43 Expression im Graft, wie auch in dieser Arbeit beobachtet, begründet wurde.

Insgesamt stellen sich die transplantierten Zellen in dieser Arbeit unabhängig von den zuvor verwendeten EHT-Kulturmedien vier Wochen nach der Transplantation weiterhin als unreif dar. Dies könnte für eine Transplantation jedoch vorteilhaft sein, da unreife Kardiomyozyten über eine bemerkenswerte Hypoxieresistenz verfügen (Pritchett-Corning 2009), welche insbesondere im Rahmen der Transplantation relevant ist. Diese Hypothese wird auch durch die Erkenntnisse der Arbeitsgruppe um Reinecke et al. (1999) verstärkt. Sie beschreiben, dass unreife Rattenkardiomyozyten im Gegensatz zu adulten eine Transplantation auf Rattenherzen überleben. Ein weiterer Grund für den weniger differenzierten Phänotyp der Graft Kardiomyozyten könnte der kurze Zeitraum von nur vier Wochen zwischen der Transplantation der EHT-Patches und der Entnahme der Herzen zur histologischen Analyse sein.

4.7 Ausblick

Die hier etablierten EHT-Patches bilden eine solide Grundlage für zukünftige Studien, in denen die Applikation dieser dreidimensionalen Gewebe zu Transplantationszwecken im Kleintiermodell und perspektivisch in einer klinischen Studie untersucht werden können. Jedoch bedarf es weiterer Optimierungen, um die hier dargestellten EHT-Patches einer klinischen Anwendung näher zu bringen.

Die auf dieser Arbeit aufbauende Studie um Querdel et al. (2021) hat bereits deutliche Verbesserungen hinsichtlich der Herstellung, der Kultivierung und der Analysen der EHT-Patches erzielt. So konnte der Gebrauch von Matrigel bei der Herstellung der EHT-Patches vermieden, stabile Kulturbedingungen durch den Einsatz von humanem Serum etabliert sowie standardisierte Funktionsanalysen der EHT-Patches durchgeführt werden. Des Weiteren konnte das Transplantatüberleben deutlich verbessert und eine dosisabhängige Remuskularisierung nachgewiesen werden, welche zukünftigen Studien als Orientierung dienen wird. Außerdem wurden durch eine Vergrößerung der hier dargestellten EHT-Geometrie bereits EHT-Patches hergestellt, die potenziell für eine Transplantation auf humane Herzen geeignet sind.

Im Hinblick auf eine klinische Anwendung muss weiterhin kritisch abgewogen werden, welche Zellpopulation und Immunsuppression verwendet werden sollten und welches Patientenkollektiv am besten für eine Transplantation geeignet ist (Reinsch und Weinberger 2018). Mit dem Einsatz pluripotenter Stammzellen geht trotz hocheffizienter Differenzierungsprotokolle durch den Verbleib einzelner Stammzellen das potenzielle Risiko einer Tumorbildung einher. Zusätzlich kann es zu genetischen Veränderungen kommen (Mandai et al. 2017). Aus diesem Grund ist für eine klinische Anwendung eine umfangreiche Qualitätskontrolle notwendig (Okano et al. 2013). Weiterhin muss das mit dem Einsatz von Serum einhergehende potenzielle Infektionsrisiko untersucht werden. Es ist möglich, dass unentdeckte Viren durch die Transplantation weitergegeben werden. Um dies zu verhindern und Ereignisse wie sie im Rahmen der transfusionsassoziierten viralen Infektionen Anfang der 1980er Jahre zu vermeiden, sollten strenge Qualitätskontrollen etabliert werden. In Anbetracht der Notwendigkeit eines umfangreichen Qualitätsmanagements muss abgewogen werden, ob ein autologer Ansatz im Hinblick auf die hohen Prävalenzen des Myokardinfarkts und der Herzinsuffizienz umsetzbar ist. Es stellt sich die Frage

Diskussion

inwiefern ein allogener Ansatz realisierbar ist und wie eine adäquate Immunsuppression angesichts eines multimorbiden Patientenkollektivs durchzuführen ist.

5 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit die häufigsten Todesursachen dar. Dabei haben der Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz einen erheblichen Anteil an der Gesamtanzahl kardiovaskulär bedingter Tode. Durch den Myokardinfarkt kommt es angesichts der insuffizienten endogenen Regenerationsfähigkeit des humanen Herzens zu einem irreversiblen Verlust vitalen Myokards und zur Bildung eines nicht-kontraktiven fibrotischen Narbengewebes. Letztlich führt diese Entwicklung häufig zur Entstehung bzw. Progression einer Herzinsuffizienz.

Im Rahmen der regenerativen Medizin werden verschiedene Strategien untersucht, um den irreversiblen Verlust vitalen Myokardgewebes zu ersetzen. Diese Arbeit konzentrierte sich auf die Transplantation von humanen aus induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleiteten Kardiomyozyten als potenzielle regenerative Strategie. Es wurden dreidimensionale Herzmuskelkonstrukte, sog. *Engineered Heart Tissue* (EHT) Patches, zur Transplantation in einem Meerschweincheninfarktmodell etabliert. Durch die Optimierung der EHT-Geometrie wurden 1,5x2,7 cm messende Gewebepatches hergestellt, welche durch die Vergrößerung der geometrischen Verhältnisse auch für eine Gewebeersatztherapie in Großtiermodellen und perspektivisch für klinische Studien geeignet ist. Die hier etablierten EHT-Patches zeigten durch ihre Geometrie und der Integration einer Netzstruktur eine homogene Verteilung der Kardiomyozyten, welche sich insbesondere an Oberflächenstrukturen ausdehnten. Im Hinblick auf die im Kulturverlauf zunehmende Kardiomyozytenreife konnte eine medienabhängige Korrelation nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich insbesondere der Einsatz von Serum und die Etablierung dynamischer Kulturbedingungen hinsichtlich der Zellreife als stimulierend.

Die EHT-Patches sind in der Lage die Transplantation auf infarzierte Meerschweinchenherzen zu überleben und dabei das Narbengewebe partiell zu remuskularisieren. Das Ausmaß der Remuskularisierung variierte stark und hing von den zuvor verwendeten EHT-Kulturbedingungen ab. Die transplantierten Zellen waren trotz organisierter Sarkomerstrukturen unreif. Die im Vergleich zum Empfängermyokard unreife Zellmorphologie wurde durch kleinere Sarkomerlängen ($1,73 \pm 0,01 \mu\text{m}$ vs. $1,85 \pm 0,02 \mu\text{m}$) und Kardiomyozytendurchmessern ($6,0 \pm 0,45 \mu\text{m}$ vs. $7,4 \pm 0,15 \mu\text{m}$) sowie die unorganisierte Connexin-43 Expression deutlich.

Zusammenfassung

Zusammenfassend demonstriert diese Arbeit, dass durch die Optimierung der Geometrie von künstlichem humanen Herzgewebe EHT-Patches zur Transplantation im Kleintiermodell generiert werden können.

6 Summary

Cardiovascular diseases are the leading cause of global mortality. Myocardial infarction and heart failure make up a considerable proportion of the total number of cardiovascular deaths. Since the endogenous regenerative capacity of the human heart is inefficient, myocardial infarction leads to an irreversible loss of vital myocardium, which leads to the formation of non-contractile fibrotic scar tissue and promotes the development and progression of heart failure.

In the context of regenerative medicine, various strategies are being investigated to replace the irreversible loss of vital myocardial tissue. This work focused on human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocyte transplantation as a potential regenerative strategy. The geometry of three-dimensional heart muscle constructs, so-called engineered heart tissue (EHT), was optimized for transplantation in a guinea pig injury model. By optimizing the EHT geometry, tissue patches measuring 1.5x2.7 cm were produced, which ensured the coverage of a myocardial scar in this small animal model. Through to the increase of the geometric proportions the established EHT patches may also be suitable for tissue replacement therapy in large animal models and prospectively for clinical studies. The optimized geometry and the integration of a mesh structure resulted in homogeneously distributed cardiomyocytes, which in particular elongate on the surface areas. With regard to the increasing maturation of cardiomyocytes in the course of the culture, a media-dependent correlation could be demonstrated. Especially, the use of serum and the establishment of dynamic culture conditions were found to improve tissue development.

The EHT patches were able to survive the transplantation on infarcted guinea pig hearts and partially remuscularized the scar tissue. The extent of remuscularization varied widely and was dependent on the previously used EHT culture conditions. The engrafted cardiomyocytes showed characteristics of immature cells. The immature cell morphology of the transplanted cells in comparison to the host myocardium was made clear by the shorter sarcomere lengths ($1.73\pm 0.01\ \mu\text{m}$ vs. $1.85\pm 0.02\ \mu\text{m}$) and cardiomyocyte diameters ($6.0\pm 0.45\ \mu\text{m}$ vs. $7.4\pm 0.15\ \mu\text{m}$) as well as the disorganized connexin-43 expression.

Summary

In summary, this work demonstrates that by optimizing the geometry of human engineered heart tissue, EHT patches can be generated for transplantation in small animal models.

7 Literaturverzeichnis

Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, et al (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15:6541–6551.

Au HTH, Cheng I, Chowdhury MF, Radisic M (2007) Interactive effects of surface topography and pulsatile electrical field stimulation on orientation and elongation of fibroblasts and cardiomyocytes. *Biomaterials* 28:4277-93.

Bargehr J, Ong LP, Colzani M, et al (2019) Epicardial cells derived from human embryonic stem cells augment cardiomyocyte-driven heart regeneration. *Nat Biotechnol* 37:895–906.

Bass GT, Ryall KA, Katikapalli A, et al (2012) Automated image analysis identifies signaling pathways regulating distinct signatures of cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 52:923-30.

Bassat E, Mutlak YE, Genzelinakh A, et al (2017) The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice. *Nature* 547:179–184.

Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E (2014) Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res* 114:1852–1866.

Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al (2009) Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324:98–102.

Bergmann O, Zdunek S, Felker A, et al (2015) Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* 161:1566–1575.

Bian W, Jackman CP, Bursac N (2014) Controlling the Structural and Functional Anisotropy of Engineered Cardiac Tissues. *Biofabrication* 6:024109.

Bian W, Juhas M, Pfeiler TW, Bursac N (2012) Local Tissue Geometry Determines Contractile Force Generation of Engineered Muscle Networks. *Tissue Eng Part A* 18:957-67.

Literaturverzeichnis

Bian W, Liao B, Badie N, Bursac N (2009) Mesoscopic hydrogel molding to control the 3D geometry of bioartificial muscle tissues. *Nat Protoc* 4:1522-34.

Braasch W, Gudbjarnason S, Puri PS, et al (1968) Early Changes in Energy Metabolism in the Myocardium Following Acute Coronary Artery Occlusion in Anesthetized Dogs. *Circ Res* 23:429–438.

Breckwoldt K, Letuffe-brenière D, Mannhardt I, et al (2017) Differentiation of cardiomyocytes and generation of human engineered heart tissue. *Nat Protoc* 12:1177–1197.

Bujak M, Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, et al (2009) Induction of the CXC chemokine interferon- γ -inducible protein 10 regulates the reparative response following myocardial infarction. *Circ Res* 105:973–983.

Burke AP, Virmani R (2007) Pathophysiology of Acute Myocardial Infarction. *Med. Clin. North Am.* 91:553–572

Castro L, Geertz B, Reinsch M, et al (2019) Implantation of hiPSC-derived Cardiac-muscle Patches after Myocardial Injury in a Guinea Pig Model. *J Vis Exp* (145): e58810.

Cheng RK, Asai T, Tang H, et al (2007) Cyclin A2 induces cardiac regeneration after myocardial infarction and prevents heart failure. *Circ Res* 100:1741–1748.

Chong JJH, Yang X, Don CW, et al (2014) Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 510:273–7.

Collet J-P, Thiele H, Barbato E, et al (2021) 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* 42:1289-1367.

Crespo-Leiro MG, Anker SD, Maggioni AP, et al (2016) European Society of

Literaturverzeichnis

Cardiology Heart Failure Long-Term Registry (ESC-HF-LT): 1-year follow-up outcomes and differences across regions. *Eur J Heart Fail* 18:613–625.

Cybulsky MI, Gimbrone MA (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251:788–791.

Dambrot C, Braam SR, Tertoolen LGJ, et al (2014) Serum supplemented culture medium masks hypertrophic phenotypes in human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *J Cell Mol Med* 18:1509–1518.

DeWood MA, Spores J, Notske R, et al (1980) Prevalence of Total Coronary Occlusion during the Early Hours of Transmural Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 303:897–902.

Dow J, Simkhovich BZ, Kedes L, Kloner RA (2005) Washout of transplanted cells from the heart: A potential new hurdle for cell transplantation therapy. *Cardiovasc Res* 67:301–307.

Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, et al (1997) Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J* 11:683–694.

Eschenhagen T, Zimmermann WH (2005) Engineering Myocardial Tissue. *Circ Res* 97:1220–1231.

Frangogiannis NG (2015) Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol* 5: 1841–1875.

Frangogiannis NG (2012) Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res* 110:159–173

Frangogiannis NG (2014) The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat. Rev. Cardiol.* 11:255–265

Literaturverzeichnis

Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, et al (2000) IL-10 Is Induced in the Reperfused Myocardium and May Modulate the Reaction to Injury. *J Immunol* 165:2798–2808.

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

Hansen A, Eder A, Bönstrup M, et al (2010) Development of a Drug Screening Platform Based on Engineered Heart Tissue. *Circ Res.* 107:35-44.

Hardie DG, Ross FA, Hawley SA (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:251–262.

Hassink RJ, Pasumarthi KB, Nakajima H, et al (2008) Cardiomyocyte cell cycle activation improves cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 78:18–25.

Heusch G (2019) Myocardial ischemia: Lack of coronary blood flow, myocardial oxygen supply-demand imbalance, or what? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 316:H1439–H1446.

Heusch G, Gersh BJ (2017) The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: A continual challenge. *Eur. Heart J.* 38:774–784

Hirt MN, Boeddinghaus J, Mitchell A, et al (2014a) Functional improvement and maturation of rat and human engineered heart tissue by chronic electrical stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 74:151–161.

Hirt MN, Hansen A, Eschenhagen T (2014b) Cardiac tissue engineering : State of the art. *Circ Res* 114:354–367

Hirt MN, Sörensen NA, Bartholdt LM, et al (2012) Increased afterload induces

Literaturverzeichnis

pathological cardiac hypertrophy: a new in vitro model. *Basic Res Cardiol* 107:307.

Howell JJ, Manning BD (2011) mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 22:94–102.

Hsieh PCH, Davis ME, Lisowski LK, Lee RT (2006) Endothelial-Cardiomyocyte Interactions in Cardiac Development and Repair. *Annu Rev Physiol* 68:51-66.

Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, Van De Werf F (2015) Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J. Am. Coll. Cardiol.* 65:1454–1471.

Ibanez B, James S, Agewall S, et al (2018) 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur. Heart J.* 39:119–177

Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al (2010) Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142:375–386.

Jackman CP, Carlson AL, Bursac N (2016) Dynamic culture yields engineered myocardium with near-adult functional output. *Biomaterials* 111:66–79.

Jennings RB (2013) Historical perspective on the pathology of myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 113:428–438

Jennings RB, Reimer KA (1981) Lethal myocardial ischemic injury. *Am. J. Pathol.* 102:241–255

Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, et al (2011) Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell* 8:228–240.

Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, et al (2011) Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 123:594–604.

Literaturverzeichnis

Kenneth Mallory G, White PD, Salcedo-Salgar J (1939) The speed of healing of myocardial infarction. A study of the pathologic anatomy in seventy-two cases. *Am Heart J* 18:647–671.

Kentish JC (1986) The effects of inorganic phosphate and creatine phosphate on force production in skinned muscles from rat ventricle. *J Physiol* 370:585–604.

Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110:163–175.

Kowalski WJ, Yuan F, Nakane T, et al (2017) Quantification of Cardiomyocyte Alignment from Three-Dimensional (3D) Confocal Microscopy of Engineered Tissue. *Microsc Microanal* 23:826–842.

Kübler W, Spieckermann PG (1970) Regulation of glycolysis in the ischemic and the anoxic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1:351–377.

Laflamme M a, Chen KY, Naumova A V, et al (2007) Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 25:1015–1024.

Laflamme M a, Murry CE (2011) Heart regeneration. *Nature* 473:326–335.

Leach JP, Heallen T, Zhang M, et al (2017) Hippo pathway deficiency reverses systolic heart failure after infarction. *Nature* 550:260–264.

Li J, Gao E, Vite A, et al (2015) Alpha-catenins control cardiomyocyte proliferation by regulating yap activity. *Circ Res* 116:70–79.

Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868–874

Lindsey ML, Bolli R, Cauty JM, et al (2018) Guidelines for experimental models of

myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 314:H812–H838

Liu YW, Chen B, Yang X, et al (2018) Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nat Biotechnol* 36:597–605.

Maillet M, van Berlo JH, Molkentin JD (2012) Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:38–48.

Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al (2017) Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med* 376:1038–1046.

Masumoto H, Ikuno T, Takeda M, et al (2014) Human iPS cell-engineered cardiac tissue sheets with cardiomyocytes and vascular cells for cardiac regeneration. *Sci Rep* 4:6716.

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

Mestas J, Ley K (2008) Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 18:228–232.

Miyamoto K, Akiyama M, Tamura F, et al (2018) Direct In Vivo Reprogramming with Sendai Virus Vectors Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction. *Cell Stem Cell* 22:91-103.

Mohamed TMA, Stone NR, Berry EC, et al (2017) Chemical enhancement of in vitro and in vivo direct cardiac reprogramming. *Circulation* 135:978–995.

Moore KJ, Tabas I (2011) Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 145:341–355.

Moretti A, Bellin M, Welling A, et al (2010) Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-

Literaturverzeichnis

Cell Models for Long-QT Syndrome. *N Engl J Med* 363:1397–1409.

Müller-Ehmsen J, Whittaker P, Kloner RA, et al (2002) Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 34:107–116.

Nakamura Y, Yasuda T, Weisel RD, Li R-K (2006) Enhanced cell transplantation: preventing apoptosis increases cell survival and ventricular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:939–947.

Nam YJ, Song K, Luo X, et al (2013) Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:5588–5593.

Okano H, Nakamura M, Yoshida K, et al (2013) Steps Toward Safe Cell Therapy Using Induced Pluripotent Stem Cells. *Circ Res* 112:523–533.

Pasumarthi KBS, Nakajima H, Nakajima HO, et al (2005) Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice. *Circ Res* 96:110–118.

Pfeffer MA, Braunwald E (1990) Ventricular remodeling after myocardial infarction: Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81:1161–1172.

Pijnappels DA, Schalij MJ, Ramkisoensing AA, et al (2008) Forced Alignment of Mesenchymal Stem Cells Undergoing Cardiomyogenic Differentiation Affects Functional Integration With Cardiomyocyte Cultures. *Circ Res* 103:167–176.

Pritchett-Corning KR (2009) Euthanasia of neonatal rats with carbon dioxide. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 48:23–27.

Qian L, Huang Y, Spencer CI, et al (2012) In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 485:593–598.

Querdel E, Reinsch M, Castro L, et al (2021) Human Engineered Heart Tissue Patches

Literaturverzeichnis

Remuscularize the Injured Heart in a Dose-Dependent Manner. *Circulation* 143:1991–2006.

Reimer KA, Jennings RB (1979) The “wavefront phenomenon” of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest* 40:633–644.

Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB (1977) The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 56:786–794.

Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE (1999) Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: A study in normal and injured rat hearts. *Circulation* 100:193–202.

Reinsch M, Weinberger F (2018) Stammzellbasierte kardiale Regeneration nach Infarkt. *Herz* 43:109–114.

Riegler J, Tiburcy M, Ebert A, et al (2015) Human engineered heart muscles engraft and survive long term in a rodent myocardial infarction model. *Circ Res* 117:720–730.

Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, et al (2020) Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol* 76:2982–3021.

Sayen JJ, Sheldon WF, Peirce G, Kuo PT (1958) Polarographic oxygen, the epicardial electrocardiogram and muscle contraction in experimental acute regional ischemia of the left ventricle. *Circ Res* 6:779–798.

Shapiro SD, Ranjan AK, Kawase Y, et al (2014) Cyclin A2 induces cardiac regeneration after myocardial infarction through cytokinesis of adult cardiomyocytes. *Sci Transl Med* 6:224ra27.

Shiba Y, Fernandes S, Zhu WZ, et al (2012) Human ES-cell-derived cardiomyocytes

Literaturverzeichnis

electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature* 489:322–325.

Simpson P, McGrath A, Savion S (1982) Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ Res* 51:787–801.

Solaro RJ, Lee JA, Kentish JC, Allen DG (1988) Effects of acidosis on ventricular muscle from adult and neonatal rats. *Circ Res* 63:779–787.

Steenbergen C, Deleeuw G, Rich T, Williamson JR (1977) Effects of acidosis and ischemia on contractility and intracellular pH of rat heart. *Circ Res* 41:849–858.

Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB (1985) Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro: Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity. *Circ Res* 57:864–875.

Sutton MSJ, Pfeffer MA, Moya L, et al (1997) Cardiovascular death and left ventricular remodeling two years after myocardial infarction: Baseline predictors and impact of long-term use of captopril - Information from the survival and ventricular enlargement (SAVE) trial. *Circulation* 96:3294–3299.

Sutton MSJ, Lee D, Rouleau JL, et al (2003) Left ventricular remodeling and ventricular arrhythmias after myocardial infarction. *Circulation* 107:2577–2582.

Takagawa J, Zhang Y, Wong ML, et al (2007) Myocardial infarct size measurement in the mouse chronic infarction model: Comparison of area- and length-based approaches. *J Appl Physiol* 102:2104–2111.

Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al (2019) Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J* 40:237–269.

Tiburcy M, Hudson JE, Balfanz P, et al (2017) Defined engineered human myocardium with advanced maturation for applications in heart failure modeling and repair. *Circulation* 135:1832–1847.

Literaturverzeichnis

Torrini C, Cubero RJ, Dirkx E, et al (2019) Common Regulatory Pathways Mediate Activity of MicroRNAs Inducing Cardiomyocyte Proliferation. *Cell Rep* 27:2759-2771.

van der Valk J, Brunner D, De Smet K, et al (2010) Optimization of chemically defined cell culture media – replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro* 24:1053–1063.

Vandenburgh H, Shansky J, Benesch-Lee F, et al (2008) Drug-screening platform based on the contractility of tissue-engineered muscle. *Muscle Nerve* 37:438–447.

Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, et al (2008) Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation* 118:2057–2062.

Vollert I, Seiffert M, Bachmair J, et al (2014) In vitro perfusion of engineered heart tissue through endothelialized channels. *Tissue Eng Part A* 20:854–863.

Wang Y, Haider HK, Ahmad N, et al (2006) Combining pharmacological mobilization with intramyocardial delivery of bone marrow cells over-expressing VEGF is more effective for cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 40:736–745.

Watanabe T, Rautaharju PM, McDonald TF (1985) Ventricular action potentials, ventricular extracellular potentials, and the ECG of guinea pig. *Circ Res* 57:362–373.

Weinberger F, Breckwoldt K, Pecha S, et al (2016) Cardiac repair in Guinea pigs with human engineered heart tissue from induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med* 8: 363ra148.

Weinberger F, Eschenhagen T (2021) Cardiac Regeneration: New Hope for an Old Dream. *Annu Rev Physiol* 83:59–81.

Weinberger F, Mannhardt I, Eschenhagen T (2017) Engineering Cardiac Muscle Tissue: a maturing field of research. *Circ Res* 120:1487–1500.

Williams KJ, Tabas I (1995) The response-to-retention hypothesis of early

Literaturverzeichnis

atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:551–561.

Xin M, Kim Y, Sutherland LB, et al (2013) Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:13839–13844.

Yamanaka S, Blau HM (2010) Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465:704–712.

Yan X, Anzai A, Katsumata Y, et al (2013) Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 62:24–35.

Zhang J, Zhu W, Radisic M, Vunjak-Novakovic G (2018a) Can we engineer a human cardiac patch for therapy? *Circ Res* 123:244–265.

Zhang M, Methot D, Poppa V, et al (2001) Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: Graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol* 33:907–921.

Zhang X, Liu ZQ, Campbell KS, Wenk JF (2018b) Evaluation of a novel finite element model of active contraction in the heart. *Front Physiol* 9:425.

Zhao M, Tang Y, Ernst PJ, et al (2019) Enhancing the Engraftment of Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes via a Transient Inhibition of Rho Kinase Activity. *J Vis Exp* (149): e59452.

Zhu W, Zhao M, Mattapally S, et al (2018) CCND2 Overexpression Enhances the Regenerative Potency of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: Remuscularization of Injured Ventricle. *Circ Res* 122:88–96.

Zimmerman SD, Thomas DP, Velleman SG, et al (2001) Time course of collagen and decorin changes in rat cardiac and skeletal muscle post-MI. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H1816-22.

8 Abkürzungsverzeichnis

A

ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i> , Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACS	<i>Acute coronary syndrome</i> , Akutes Koronarsyndrom
Akt	Proteinkinase B
α -MHC	<i>α-myosin heavy chain</i> , α -Isoform der schweren Myosinkette
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
apoB-LPs	<i>Apolipoprotein B-containing lipoproteins</i> , Apolipoprotein B beinhaltende Lipoproteine
ATP	Adenosintriphosphat

B

Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
β -MHC	<i>β-myosin heavy chain</i> , β -Isoform der schweren Myosinkette
BMP-4	<i>Bone morphogenetic protein 4</i> , Knochenmorphogenetisches Protein-4
bpm	<i>Beats per minute</i> , Schläge pro Minute
BSA	Bovines Serum-Albumin

C

CCL2	CC-Chemokinligand 2
Ccnd	Cyclin D
CVD	<i>Cardiovascular disease</i> , Herz-Kreislauf-Erkrankung

D

DAPT	<i>Dual antiplatelet therapy</i> , Duale antithrombozytäre Therapie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DRAQ5	Deep Red Anthraquinone 5
DS-I-7	4-(cis-endo-1,3-dioxooctahydro-2H-4,7-methanoisindol-2-yl)-N-(quinolin-8-yl)-trans-cyclohexylcarboxamid

E

EB	<i>Embryoid body</i> , Embryoidkörperchen
EHT	<i>Engineered Heart Tissue</i> , Künstliches Herzgewebe
EKG	Elektrokardiogramm
E-Modul	Elastizitätsmodul
ESC	<i>Embryonic stem cells</i> , Embryonale Stammzelle

F

F	<i>Force</i> , Kraft
FBME	<i>Fibrin-based mini-EHT</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> , Fibroblastenwachstumsfaktor
fps	<i>frames per second</i> , Bilder pro Sekunde

G

GMP	<i>Good manufacturing practices</i> , Gute Herstellungspraxis
GMT	Gata4, Mef2c und Tbx5

Abkürzungsverzeichnis

H

h	<i>Hour</i> , Stunde
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
hiPSC	<i>Human induced pluripotent stem cell</i> , Humane induzierte pluripotente Stammzelle
hs-cTn	<i>High-sensitivity cardiac troponin</i> , Hochsensitives kardiales Troponin

I

IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> , Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
-----	--

K

KG	Körpergewicht
Klf4	Krüppel-like Faktor 4

M

min	Minute
miRNA	<i>Micro ribonucleic acid</i> , Mikro-Ribonukleinsäure
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
mTORC1	<i>mTOR complex 1</i>

N

n	Stichprobenanzahl
NKM	Nicht-Kardiomyozyten-Medium
NSTEMI	<i>Non-ST-segment elevation myocardial infarction</i> , Nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkt

O

Oct-4	<i>Octamer binding transcription factor 4</i> , Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4
-------	--

P

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCI	<i>Percutaneous coronary intervention</i> , Perkutane Koronarintervention
PHD3	Prolylhydroxylase 3
PSC	<i>Pluripotent stem cell</i> , Pluripotente Stammzelle
PVA	Polyvenylalkohol

R

rH	<i>Relative humidity</i> , Relative Luftfeuchtigkeit
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>

S

s	Sekunde
S6K	Ribosomale S6 Kinase
Salv1	<i>Scaffold protein salvador homolog 1</i>

Abkürzungsverzeichnis

SaO ₂	Sauerstoffsättigung
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i> , Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
Sox2	<i>Sex determining region Y (SRY)- box 2</i> , Geschlechtsdeterminierende Region Y-Box 2
STEMI	<i>ST-segment elevation myocardial infarction</i> , ST-Strecken-Hebungsinfarkt
T	
T3	Trijodthyronin
TAZ	<i>Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TGF	<i>Transforming growth factor</i> , Transformierender Wachstumsfaktor
V	
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> , Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
Y	
YAP	<i>Yes-associated protein</i>

9 Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Human Engineered Heart Tissue Patches Remuscularize the Injured Heart in a Dose-Dependent Manner (2021). Eva Querdel, Marina Reinsch, Liesa Castro, **Deniz Köse**, Andrea Bähr, Svenja Reich, Birgit Geertz, Bärbel Ulmer, Mirja Schulze, Marc D. Lemoine, Tobias Krause, Marta Lemme, Jascha Sani, Aya Shibamiya, Tim Stüdemann, Maria Köhne, Constantin von Bibra, Nadja Hornaschewitz, Simon Pecha, Yusuf Nejahsie, Ingra Mannhardt, Torsten Christ, Hermann Reichenspurner, Arne Hansen, Nikolai Klymiuk, M. Krane, C. Kupatt, Thomas Eschenhagen, Florian Weinberger. *Circulation* 143:1991-2006.

Kongressteilnahmen

84. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie:

Optimization of human engineered heart tissue from induced pluripotent stem cells for cardiac repair. **D. Köse**, F. Weinberger, M. Reinsch, L. Castro, S. Pecha, I. Mannhardt, H. Reichenspurner, A. Hansen, T. Eschenhagen. 5. April 2018, Keynote Session

10 Finanzielle Förderung

Diese Arbeit wurde finanziell im Rahmen des Kaltenbach-Doktorandenstipendiums der Deutschen Herzstiftung e.V. gefördert.

11 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen, der mir durch das entgegengebrachte Vertrauen nicht nur ermöglicht hat an diesem spannenden Thema zu forschen, sondern auch diese Arbeit durch einen konstruktiven Austausch bedeutend gefördert hat.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Florian Weinberger für die langjährige wissenschaftliche Betreuung, sowie der mir ermöglichten Freiheit in der Entwicklung und Gestaltung der EHT-Geometrie. Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie für die kollegiale Zusammenarbeit und niederschwellige Hilfsbereitschaft.

Weiterhin bedanke ich mich bei der Deutschen Herzstiftung e.V. für die finanzielle Förderung im Rahmen des Kaltenbach-Doktorandenstipendiums.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meiner Partnerin Valentina ausdrücken, die mich zu jedem Zeitpunkt liebevoll und fürsorglich unterstützt hat.

Meine herzlichste Dankbarkeit und meine tiefste Wertschätzung gelten meinen Eltern, Naci und Sultan, und meinem Bruder, Utku, die mich in jeder Lebenslage aus reiner Liebe und Überzeugung grenzenlos unterstützt und mir mein bisheriges Leben ermöglicht haben.

12 Lebenslauf

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

13 Eidesstattliche Versicherung

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.

Deniz Köse