

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

Humanes künstliches Herzgewebe aus mehreren Zelltypen zur Untersuchung kardialer Hypertrophie

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

Hamburg, 2018

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Elke Oetjen

Datum der Disputation: 19.03.2018

Datum der Druckfreigabe: 22.03.2018

Diese Arbeit wurde von Herrn PD Dr. Dr. Marc Hirt praktisch betreut.

*„Die Wissenschaft, richtig verstanden, heilt den Menschen von seinem Stolz;
denn sie zeigt ihm seine Grenzen.“*

– Albert Schweitzer –

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1	Herzhypertrophie.....	1
1.2	Künstliches Herzgewebe – <i>Engineered Heart Tissue</i>	2
1.3	Modell für pathologische Herzhypertrophie in Ratten-EHTs	4
1.4	Induziert-pluripotente Stammzellen	5
1.4.1	Kardiomyozyten aus Stammzellen	6
1.4.2	Endothelzellen aus Stammzellen.....	8
1.4.3	Glatte Muskelzellen aus Stammzellen	8
1.4.4	Fibroblasten aus Stammzellen	9
1.5	Zelluläre Zusammensetzung und Interaktionen	10
1.6	Zielsetzung.....	12
2.	Methoden	13
2.1	Stammzellkultur und Differenzierungsprotokolle.....	15
2.1.1	Lentivirale Transduktion von hiPS-Zellen	16
2.1.2	Differenzierung von Kardiomyozyten in 3D.....	16
2.1.3	Differenzierung von Kardiomyozyten in 2D.....	18
2.1.4	Differenzierung von Endothelzellen	19
2.1.5	Differenzierung von glatten Muskelzellen und Fibroblasten	20
2.2	Fibroblastenzellkultur	22
2.3	Mediumoptimierung.....	23
2.4	Funktionelle Charakterisierung der Zelltypen.....	23
2.4.1	Gefäßbildung.....	23
2.4.2	Zellmigration	24
2.4.3	TGFβ-Stimulation	24
2.5	<i>Engineered Heart Tissue</i> (EHT)	24
2.6	Video-optische Kontraktionsmessung	25
2.7	Hypertrophe Interventionen	26
2.8	RNA Präparation und quantitative <i>real time</i> PCR	28
2.9	Histologie	30
2.9.1	Histologische Färbungen.....	31
2.9.2	Immunhistochemie	31
2.9.3	Auswertung der Immunhistochemie	32

Inhalt

2.10	Durchflusszytometrie.....	32
2.11	Konfokale Mikroskopie	33
2.12	Statistik	35
3.	Ergebnisse	36
3.1	Nachlasterhöhung und ET-1-Behandlung in unizellulären EHTs	36
3.1.1	Nachlasterhöhung in C25-EHTs.....	37
3.1.2	Nachlasterhöhung und ET-1-Behandlung in ERC018-EHTs.....	39
3.2	Bizelluläre EHTs aus Kardiomyozyten und Fibroblasten	41
3.3	Differenzierung von glatten Muskelzellen und Fibroblasten aus hiPSCs.....	43
3.4	Nachlasterhöhung in bizellulären EHTs.....	45
3.4.1	Vergleich von epikardialen und dermalen Fibroblasten in C25-EHTs	45
3.4.2	Nachlasterhöhung und ET-1-Behandlung in bizellulären C25-EHTs.....	50
3.4.3	Nachlasterhöhung in bizellulären ERC018-EHTs	51
3.5	Lentivirale Transduktion von hiPS-Zellen	55
3.6	Charakterisierung der verschiedenen Zelltypen.....	58
3.6.1	Fluoreszenz und Morphologie	58
3.6.2	Genexpression	59
3.6.3	Gefäßbildung.....	61
3.6.4	Zellmigration	62
3.6.5	TGF β -Stimulation	63
3.7	Multizelluläre EHTs	64
3.7.1	Zellzusammensetzung	65
3.7.2	Zellkulturbedingungen	66
3.7.3	Konfokale Mikroskopie	68
3.7.4	Morphologie	72
3.7.5	Kontraktilität	73
3.7.6	Genexpression	74
3.7.7	Histologie	76
4.	Diskussion.....	79
4.1	Hypertrophe Interventionen in humanen EHTs.....	79
4.1.1	Zellkulturbedingungen	79
4.1.2	Nachlasterhöhung und Bestimmung der Kardiomyozytengröße	80
4.1.3	ET-1-Behandlung	83

Inhalt

4.1.4	<i>In vitro</i> -Modelle für kardiale Hypertrophie mit hiPSC-Kardiomyozyten.....	84
4.2	Bizelluläre EHTs aus Kardiomyozyten und Fibroblasten	85
4.2.1	Hypertrophe Interventionen in bizellulären EHTs.....	87
4.2.2	Einteilung, Funktion und Aktivierung von Fibroblasten	88
4.3	Differenzierung von epikardialen Zellen.....	90
4.4	Charakterisierung verschiedener aus hiPS-Zellen abgeleiteter Zelltypen	93
4.4.1	Epikardiale Fibroblasten und glatte Muskelzellen	93
4.4.2	Endothelzellen.....	95
4.5	Multizelluläre EHTs	95
4.5.1	Optimierung der Zellkulturbedingungen.....	95
4.5.2	Fluoreszenz-markierte Zellen	96
4.5.3	Zellzusammensetzung	97
4.5.4	Kardiale multizelluläre dreidimensionale <i>in vitro</i> -Modelle.....	100
4.6	Ausblick.....	102
5.	Zusammenfassung.....	104
6.	Summary.....	105
7.	Literatur.....	106
8.	Bildnachweis	113
9.	Anhang.....	114
9.1	Zusätzliche Abbildungen	114
9.2	Abkürzungsverzeichnis	121
9.3	Geräte, Materialien und Substanzen	124
9.3.1	Geräte	124
9.3.2	Materialien	125
9.3.3	Kits.....	125
9.3.4	Puffer und Lösungen	126
9.3.5	Zellkulturmedien und Seren.....	126
9.3.6	Substanzen	127
9.3.7	Proteine.....	128
9.3.8	Primer	129
9.4	Sicherheitsinformationen.....	130
9.4.1	H-Sätze	131
9.4.2	P-Sätze	133

Inhalt

9.5	Kongressbeiträge	136
10.	Danksagung	137
11.	Lebenslauf	138
12.	Eidesstattliche Erklärung	140

1. Einleitung

1.1 Herzhypertrophie

Die Herzhypertrophie beschreibt eine Zunahme der Herzmuskelmasse aufgrund einer Hypertrophie, also einer Vergrößerung der einzelnen Herzmuskelzellen. Grundsätzlich lassen sich zwei Formen unterscheiden, die physiologische und die pathologische kardiale Hypertrophie. Während es sich bei der physiologischen Hypertrophie um eine reversible Anpassung des Herzens an erhöhte hämodynamische Anforderungen handelt, wie sie bei starkem körperlichen Training oder in der Schwangerschaft auftreten, kommt es bei der pathologischen Form neben der Kardiomyozytenhypertrophie zu einer Einschränkung der kontraktilen Funktion sowie zu einem fibrotischen Umbau des Herzgewebes. Zu einer der häufigen Ursachen zählt die arterielle Hypertonie, wobei die dauerhaft erhöhte Druckbelastung zunächst, ähnlich wie bei der physiologischen Hypertrophie, durch das Wachstum der Kardiomyozyten und die damit verbundene Erhöhung der Kontraktionskraft kompensiert werden soll. Wird die Kapazität dieses Kompensationsmechanismus überschritten, kommt es neben der kontraktilen Dysfunktion und der Fibrose zu weiteren pathologischen Veränderungen, wie einer erhöhten Apoptoserate und der Reaktivierung fetaler Gene, wobei im Besonderen das atriale natriuretische Peptid (ANP), das *Brain Natriuretic Peptide* (BNP) und die α -skelettale Isoform von Aktin zu nennen sind. Außerdem verschiebt sich der Stoffwechsel hin zu mehr Glykolyse und weniger Betaoxidation (Hill and Olson 2008; Samak et al. 2016).

Diese pathologische Form der Hypertrophie stellt einen der wichtigsten Risikofaktoren im Kontext kardiovaskulärer Erkrankungen dar und kann unter anderem zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz führen, bei der das Herz nicht mehr in der Lage ist, die peripheren Organe ausreichend zu perfundieren. Mehr als 1-2% der allgemeinen Bevölkerung sind betroffen, und die hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten zeigen die Bedeutung und Notwendigkeit der Erforschung zugrundeliegender Risikofaktoren (Metra et al. 2017). Das Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen ist dabei erforderlich, um Krankheitsverläufe besser zu verstehen, neue Therapieansätze zu entwickeln und eine bessere Prävention zu ermöglichen. Dazu gehören auch molekularbiologische Grundlagen, anhand derer die Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen physiologischer und pathologischer Hypertrophie aufgeklärt werden sollen, um ein detailliertes und differenziertes Bild von adaptiven beziehungsweise maladaptiven Prozessen zu erlangen (Frey und Olson 2003; Bisping et al. 2014).

1.2 Künstliches Herzgewebe – *Engineered Heart Tissue*

Für die kardiovaskuläre Forschung sind Modellsysteme ein unabdingbares Mittel, unter anderem weil Gewebe von Patienten und im Besonderen von gesunden Probanden kaum zugänglich ist. Neben Tiermodellen ist das Tissue Engineering, also die Herstellung von künstlichem Gewebe, eine Methode, die eine Vielzahl von Anwendungen ermöglicht. Es gibt zwei grundsätzlich verschiedene Methoden, künstliches Herzmuskelgewebe, auf Englisch *Engineered Heart Tissue* oder kurz EHT herzustellen. Entweder man nutzt vorgefertigtes festes Trägermaterial, auf dem sich die Zellen ansiedeln, oder man erlaubt den Zellen, sich in einem initial flüssigen Hydrogel selbst dreidimensional zu organisieren. Trägermaterial einzusetzen hat den Vorteil, dass die Zellen auf einem Gerüst wachsen, dessen Form und Größe technisch vorgegeben wird, und die Weiterentwicklungen von 3D-Druckern und in der Materialforschung tragen stetig dazu bei, diese Methode zu verbessern. Die in dieser Arbeit verwendeten EHTs wurden mit dem Hydrogel Fibrin hergestellt, deshalb wird diese Methode im Folgenden genauer beschrieben. Eine der Möglichkeiten, vorgefertigtes festes Trägermaterial zu vermeiden, besteht darin, biologische extrazelluläre Matrix zu verwenden, die man gewinnt, indem man vollständige Herzen dezellularisiert und diese anschließend mit kardialen Zellen perfundiert und somit neu zellularisiert. Dieser Ansatz ist besonders für den Bereich der regenerativen Medizin interessant, wo strukturelle Aspekte wie zum Beispiel bereits vorhandene Gefäßstrukturen eine wichtige Rolle spielen. Aktuell ist diese Methode jedoch dadurch limitiert, dass die Effizienz, mit der sich die Zellen auf der Matrix ansiedeln und dauerhaft überleben, noch sehr gering ist. Im Gegensatz dazu gibt es eine andere Option, die ganz ohne Matrix auskommt, bei der viele zweidimensionale Zellschichten übereinander gelegt werden, um ein dreidimensionales Konstrukt herzustellen. Die dritte, sehr häufig angewendete Methode, besteht darin, die kardialen Zellen in Suspension mit extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen oder Fibrin zu mischen und in einer Gussform polymerisieren zu lassen, so dass die Zellen gleichmäßig im gebildeten Hydrogel eingebettet sind. Die so generierten Gewebekonstrukte können je nach Anwendung unterschiedlich aussehen. Sie können ring-, streifen- oder netzförmig sein und in ihrer Größe variieren (Hirt et al. 2014b; Weinberger et al. 2017).

Die in dieser Arbeit verwendeten EHTs wurden von Hansen et al. (2010) beschrieben, sie gehen zurück auf die Erstpublikation von Eschenhagen et al. (1997). Im Jahr 2015 war die Technologie so weit entwickelt, dass sie mit der Firmengründung von *EHT Technologies* kommerzialisiert wurde. Es handelt sich um Fibrin-basierte EHTs, die zwischen zwei flexiblen Silikonhalterungen befestigt sind und spontan gegen einen dauerhaften gerichteten Widerstand kontrahieren (s. Abbildung 1.1). Sie können mit kardialen Zellen verschiedener

Einleitung

Spezies generiert werden (Stoehr et al. 2014). Publiziert sind unter anderem Arbeiten an Maus-EHTs (Stoehr et al. 2016), Ratten-EHTs (Hirt et al. 2015) und EHTs aus Kardiomyozyten, die aus embryonalen Stammzellen (Schaaf et al. 2011) oder humanen induziert-pluripotenten Stammzellen (engl.: *human induced Pluripotent Stem Cells*; hiPSCs) differenziert wurden (Mannhardt et al. 2016).

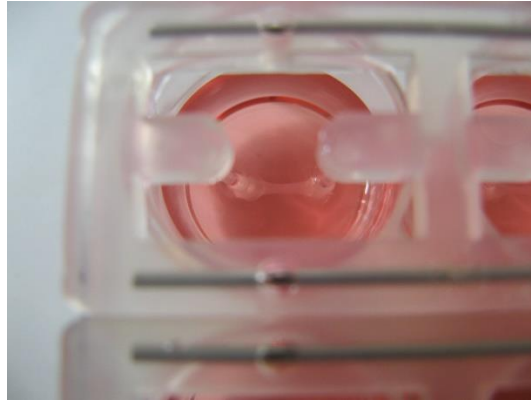


Abbildung 1.1: Aufsicht eines EHTs in einer 24-Well-Zellkulturschale. Das EHT ist an zwei flexiblen Silikonstäben befestigt, die in das Zellkulturmedium reichen und vertikal an einer stabilen Silikonhalterung hängen, die sich über eine ganze Reihe der Zellkulturschale erstreckt und damit für vier EHTs als Aufhängung dient.

Eine der besonderen Eigenschaften und Vorteile dieses Systems ist, dass die Kontraktilität der EHTs unter sterilen Zellkulturbedingungen mit Hilfe eines video-optischen Messstandes wiederholt analysiert werden kann und die Software dabei verschiedene kontraktile Parameter, wie beispielsweise Kontraktionskraft, Frequenz, Kontraktionszeit und -geschwindigkeit sowie Relaxationszeit und -geschwindigkeit parallel auswertet. Daraus ergeben sich vielzählige Anwendungsmöglichkeiten, die in drei große Bereiche eingeteilt werden können, und zwar Substanztestung (Eder et al. 2016), *in vitro*-Krankheitsmodelle (Wijnker et al. 2016) und regenerative Medizin (Weinberger et al. 2016).

Die Herausforderungen, Krankheitsbilder in *in vitro*-Modellen wiederzugeben, bestehen einerseits auf Ebene der Zellen, da mit neonatalen und hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten relativ unreife Zellen verwendet werden, um Krankheiten zu simulieren, die sich im Menschen meist erst im adulten bis späten Lebensabschnitt manifestieren (Vunjak Novakovic et al. 2014). Zudem können human-pathologische Phänotypen in Zellen von Ratten oder Mäusen nur bedingt nachvollzogen werden, weil es genetische, physiologische und molekularbiologische Unterschiede zu bedenken gilt. Zu diesem offensichtlichen Unterschied, der in allen Tiermodellen relevant ist, kommt der Aspekt, dass die kardialen Zellen in EHTs isoliert sind und Effekte humoralen oder systemischen Ursprungs nicht nachvollzogen werden können.

Gleichzeitig steigert die Fokussierung auf einen Gewebe- oder gar Zelltyp aber auch die Chancen, molekulare Mechanismen im Detail aufklären zu können.

1.3 Modell für pathologische Herzhypertrophie in Ratten-EHTs

Ein erfolgreiches Beispiel für ein EHT-basiertes Krankheitsmodell wurde von Hirt et al. (2012) etabliert. Bei dem Modell für pathologische Hypertrophie in Ratten-EHTs werden diese nach etwa zweiwöchiger Kulturdauer auf Serum-freies Medium umgestellt. Mit Hilfe einer Metallklammer werden die hohlen Silikonschläuche dann versteift, an denen die EHTs befestigt sind (s. Abbildung 2.6). Diese mechanische Nachlasterhöhung (engl.: *Afterload Enhancement*, AE) resultiert in einem 12-fach höheren Widerstand, gegen den die EHTs kontrahieren. Führt man diese Intervention für eine Woche durch, zeigen die EHTs nach Entfernen der Klammern einen irreversiblen Phänotyp, der vergleichbar mit den Auswirkungen einer einwöchigen Behandlung mit Endothelin-1 (ET-1; Agonist von ET_A- und ET_B-Rezeptoren) oder α -adrenergen Stimulation mit Phenylephrin (PE) ist. Beide Substanzen aktivieren über Gq/G11-Proteine die Phospholipase C und sind bekannte Induktoren der Kardiomyozytenhypertrophie (Münzel et al. 2005; Frank et al. 2008). Neben der in Abbildung 1.2 ersichtlichen Hypertrophie und der schlechteren Kontraktilität, die sich durch eine geringere Kraft und verlängerte Relaxationszeit im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-EHTs (Ktr) zeigt, kommt es zu vermehrter Expression des fetalen/hypertrophen Genprogramms, fibrotischen Veränderungen und höherem Glukoseverbrauch.

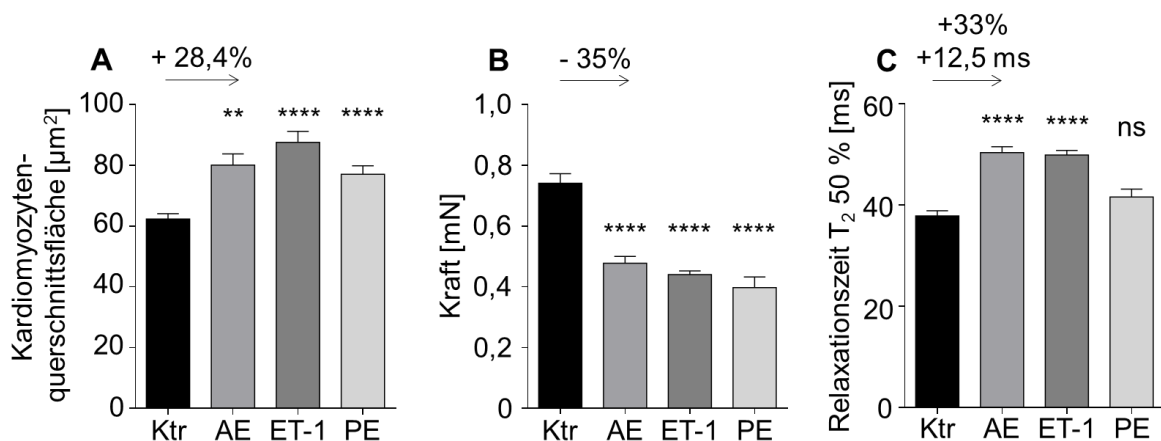


Abbildung 1.2: Pathologische Hypertrophie in Ratten-EHTs (modifiziert nach Hirt et al. 2012). Hypertrophe Ratten-EHTs zeigen unabhängig vom Stimulus, ob nach Nachlastverstärkung (AE), oder Behandlung mit Endothelin-1 (ET-1) bzw. Phenylephrin (PE), größere Kardiomyozyten (A), geringere Kontraktionskräfte (B) und längere Relaxationszeiten (C) als Kontroll-EHTs (Ktr.); *One-Way-ANOVA* mit *Dunnnett's-Multiple-Comparison-Test*, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Dieser umfangreiche Phänotyp des *in vitro*-Modells ist auf vielen Ebenen vergleichbar mit dem häufig angewandten *in vivo*-Modell der transversalen Aortenkonstriktion. Es zeichnet sich dem gegenüber aber durch das einfachere experimentelle Design aus. Und da aus einem

neonatalen Ratten-Herz vier bis fünf EHTs hergestellt werden können, ist die Zahl an benötigten Versuchstieren vergleichsweise gering. Publikationen aus Bereichen, wie MicroRNA-Forschung, Metabolismus oder Epigenetik (Hirt et al. 2015; Schäfer et al. 2015; Stenzig et al. 2016) zeigen, wie vielseitig dieses Modell in Bezug auf ganz unterschiedliche Fragestellungen eingesetzt werden kann.

1.4 Induziert-pluripotente Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die sich theoretisch unbegrenzt teilen und dadurch immer wieder neue Stammzellen bilden oder sich zu anderen Zelltypen entwickeln können. Anhand ihrer Entwicklungsfähigkeit können Stammzellen folgendermaßen eingeteilt werden: Totipotente (=omnipotente) Stammzellen sind sehr frühe embryonale Stammzellen, die sich uneingeschränkt zu allen Zelltypen eines Organismus entwickeln können. Pluripotente Stammzellen haben ebenfalls das Potential, sich zu verschiedenen Zellen aller drei Keimblätter zu entwickeln, können jedoch nicht aus sich heraus ein intaktes Individuum bilden. Multipotente Stammzellen kommen in adulten Geweben vor und können meist nur zu verschiedenen Zelltypen eines Keimblattes differenzieren.

Nach ihrem Ursprung lassen sich pluripotente Zellen in embryonale Stammzellen (ESCs) und induziert-pluripotente Stammzellen (iPSCs) einteilen. Erstere werden aus Blastozysten gewonnen, die häufig aus *in vitro*-Fertilisationsversuchen stammen. Da bei diesem Verfahren Blastozysten zerstört werden, aus denen ein Mensch hätte entstehen können, ist die Verwendung von ESCs ethisch umstritten. Im Gegensatz dazu werden iPSCs durch Reprogrammierung aus somatischen Zellen gewonnen, so dass für ihre Herstellung beispielsweise eine Hautbiopsie oder Blutprobe ausreichend ist (s. Abbildung 1.3). Erstmals beschrieben wurde die Methode 2006 von Takahashi und Yamanaka an murinen Zellen, 2007 dann ebenfalls von Takahashi et al. an humanen Fibroblasten. Die Zellen werden dabei mit vier Transkriptionsfaktoren viral transduziert. Klf4 (*Kruppel-like factor 4*) aktiviert Sox2 (*Sex determining region Y-box 2*), die Kombination aus Oct4 (*Octamer-binding transcription factor 4*) und Sox2 wiederum sorgt für die Aktivierung von Pluripotenzgenen. C-Myc induziert durch Rekrutierung von Chromatin-modifizierenden Proteinen eine breite Transkriptionsaktivierung, ist jedoch nicht essentiell für die Reprogrammierung und kann durch L-Myc ersetzt werden. Zu Beginn bestanden durch die Transduktion mit Retroviren oder Lentiviren Risiken, dass durch die Insertion der Transgene Mutationen entstehen oder dass diese nach der Differenzierung reaktiviert werden und sich dadurch Tumoren bilden. Neue nicht-integrierende Methoden, bei denen die Zellen mit Plasmidvektoren oder Sendaiviren transduziert werden, minimieren diese Risiken. Auch das anfängliche Problem ineffizienter Reprogrammierung konnte dank unterschiedlicher Ansätze, wie die Inhibition der Histon-Deacetylase oder des p53-

Einleitung

Signalwegs, die Zugabe speziell in Oozyten exprimierter Faktoren oder die Kultur der Zellen unter hypoxischen Bedingungen, deutlich verbessert werden. Ein fortbestehendes Problem ist dagegen die variable Differenzierungskapazität unterschiedlicher hiPS-Zelllinien, die zum Beispiel durch (epi-) genetische Faktoren zustande kommen kann. Dazu gehören unterschiedliche, von den parentalen Zellen bestehende bleibende DNA-Methylierungsmuster, generelle genetische Unterschiede der Spender oder aberrante DNA-Methylierung während der Reprogrammierung (Yoshida und Yamanaka 2017).

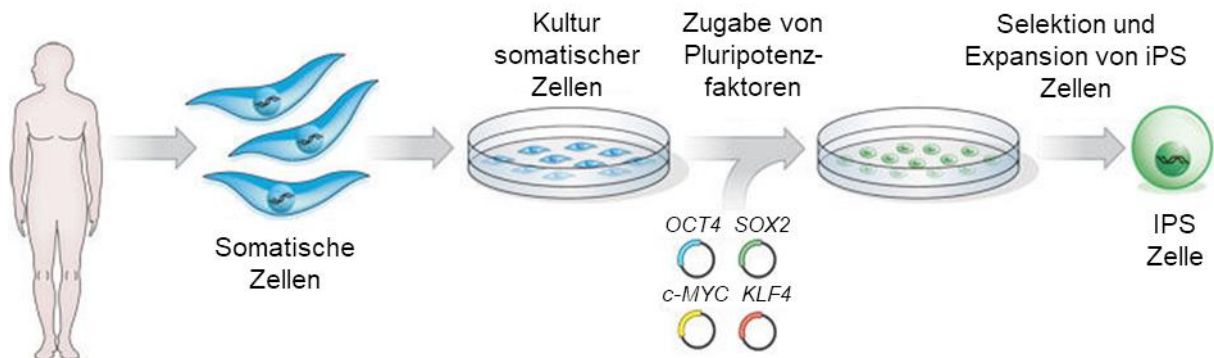


Abbildung 1.3: Herstellung von iPSCs. Somatische Zellen werden mit den Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, c-Myc und Klf4 transduziert. Deren Expression führt dazu, dass die Zellen reprogrammiert und in einen pluripotenten Zustand überführt werden (modifiziert nach Yamanaka and Blau 2010).

Trotz einiger ungelöster Fragen und Problemen haben sich iPSCs seit der Entdeckung vor nur 10 Jahren zu einem unverzichtbaren Instrument für viele Forschungsbereiche entwickelt, und es werden ständig neue Anwendungen und Verbesserungen publiziert. Sucht man bei PubMed nach iPS-Zellen (*iPS cells*) lag die Zahl der Artikel 2006 bei 81 und im Jahr 2017 bereits bei über 2.100. In den folgenden Kapiteln werden die Differenzierungen der vier wichtigsten kardialen Zelltypen aus iPS-Zellen erklärt, sowie die Charakteristika und Aufgaben dieser Zellen beschrieben.

1.4.1 Kardiomyozyten aus Stammzellen

Die Differenzierung von Kardiomyozyten aus hiPSCs erfolgt nach grundlegenden Prinzipien der Embryogenese über eine biphasische Modulierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, die einem spezifischen Zeitverlauf folgt. Zunächst wird durch Aktivierung von Wnt/ β -Catenin die mesodermale Entwicklung der Zellen induziert, gefolgt von einer Inhibition, die in der kardialen Differenzierung resultiert. Es gibt viele publizierte Protokolle, die alle nach diesem Prinzip funktionieren, sich aber in verschiedenen Punkten essentiell unterscheiden und dadurch die Komplexität des Prozesses unterstreichen. Ein Beispiel ist die Wahl des Zellkulturformats, wobei die Zellen entweder als zweidimensionaler Zellrasen (*monolayer*) oder dreidimensionale Embryoidkörperchen (EBs) kultiviert werden können. Als nächstes kann die mesodermale

Einleitung

Differenzierung entweder mit verschiedenen Kombinationen der Zytokine *Bone Morphogenic Protein-4* (BMP4), Aktivin A und *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) oder mit Hilfe des kleinmolekularen Inhibitors CHIR 99021 erreicht werden, wobei letzterer den Wnt-Signalweg durch Inhibition der Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) aktiviert (Zhang et al. 2015). Eine weitere wichtige Entwicklung ist der Ersatz einer Schicht von Fütterzellen (*feeder layer*) und Serum-haltigen Zellkulturmedien hin zu vollständig chemisch-definierten Protokollen, wie von Lian et al. (2013) und Burrige et al. (2014) beschrieben.

Für diese Arbeit wurde neben dem von Breckwoldt et al. (2017) publizierten EB- und Wachstumsfaktor-basierten Protokoll noch eine Methode zur Kardiomyozytendifferenzierung angewendet, bei der die Zellen zweidimensional zwischen zwei Schichten aus extrazellulärer Matrix (Matrigel) kultiviert werden (s. Kapitel 2.1.2 und 2.1.3).

Zusammenfassend gilt, dass die heute verfügbaren Differenzierungsprotokolle, unabhängig von ihren methodischen Unterschieden, eine reproduzierbare und effiziente Herstellung von hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten ermöglichen. Bei den meisten Protokollen werden hauptsächlich, jedoch nicht ausschließlich, ventrikuläre Kardiomyozyten generiert, was anhand der elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen untersucht werden kann. Der aber wohl wichtigste Faktor bei der Charakterisierung von hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten ist der unreife, mit fetalen Kardiomyozyten vergleichbare Phänotyp und die dadurch notwendige Reifung der Zellen, um sie als aussagekräftiges und verlässliches Modellsystem nutzen zu können. Zu den Merkmalen des unreifen Phänotyps gehören unter anderem die eher rundliche statt stabförmige (*rod shaped*) Morphologie der Zellen und die damit häufig einhergehende schlecht organisierte Sarkomerstruktur. Hinzu kommt, dass auch die Mitochondrien zahlenmäßig geringer und weniger organisiert sind als in adulten Kardiomyozyten, was sich auch darin äußert, dass hiPSC-abgeleitete Kardiomyozyten mehr Glucose und weniger Fettsäuren metabolisieren. Weitere Aspekte sind das Fehlen oder die nur geringe Ausprägung von transversalen Tubuli, die im Vergleich zu adulten Kardiomyozyten geringe Kontraktionskraft und sich von diesen unterscheidenden elektrophysiologische Eigenschaften, wie eine geringere Aufstrichgeschwindigkeit und ein weniger negatives Ruhemembranpotential. Ebenso vielseitig wie die Ausprägungen des unreifen Zustands dieser Zellen sind die Ansätze, diesen dem Phänotyp adulter Kardiomyozyten anzunähern. Im 2D-Zellkulturformat kann hierfür beispielweise schlicht die Kulturdauer verlängert werden, oder man supplementiert das Medium mit verschiedenen Substanzen wie zum Beispiel Triiodthyronin (T_3) oder *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1). Die Kultur der Kardiomyozyten im dreidimensionalen EHT-Format trägt schon für sich zu einer Reifung der Zellen bei, die beispielweise durch elektrische Stimulation der EHTs (Hirt et al. 2014a), mechanische

Beanspruchung oder Kokultur mit Endothelzellen (Tulloch et al. 2011) noch verstärkt werden kann (Yang et al. 2014).

1.4.2 Endothelzellen aus Stammzellen

Endothelzellen (ECs) sind epitheliale Zellen, die in einer einzigen Schicht Blutgefäße auskleiden und damit eine Grenzschicht zwischen dem Extravasalraum und dem perivaskulären Gewebe bilden. Neben der Regulation der Blutgerinnung, die in der Regel über Heparin inhibiert und nur im Fall einer Gefäßverletzung über verschiedene Koagulantien und Inhibitoren von Antikoagulantien aktiviert wird, gehört die Regulation des Blutdrucks zu den Hauptaufgaben der Endothelzellen. Über die Freisetzung von parakrinen Substanzen wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid (vasodilatativ), Endothelin-1 (vasokonstriktiv), Prostaglandin I und Angiotensin II interagieren sie nicht nur mit glatten Muskelzellen, sondern beeinflussen auch direkt den Stoffwechsel, die Kontraktilität und den Rhythmus des Herzens (Varga et al. 2017).

Die ersten Protokolle zur Differenzierung von Endothelzellen aus pluripotenten Stammzellen verwendeten hohe Konzentrationen an VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) und waren vergleichsweise ineffizient (Nourse et al. 2010). Es folgte die Entwicklung zweistufiger Protokolle, die zunächst die mesodermale Differenzierung induzieren und anschließend mit VEGF und dem kleinmolekularen TGF β (*Transforming Growth Factor β*)-Inhibitor SB431542 wie bei Orlova et al. (2014) oder VEGF und bFGF wie bei White et al. (2013) die endotheliale Differenzierung stimulieren. Diese Protokolle haben die Methode zwar verbessert, benötigen aber nach der Differenzierung ebenfalls noch eine Aufreinigung der Endothelzellen mit Hilfe des spezifischen Oberflächenmarkers CD31. Die von Palpant et al. (2016) veröffentlichte Methode ermöglicht erstmals nicht nur eine so effiziente Differenzierung, dass keine Aufreinigung mehr nötig ist, sondern darüber hinaus sogar die gezielte Differenzierung verschiedener Subtypen.

Das hier verwendete endotheliale Differenzierungsprotokoll basiert auf der Arbeit von White et al. (2013) und wurde von Kaja Breckwoldt modifiziert und in ihrer Dissertation beschrieben (Breckwoldt 2015; vgl. Kapitel 2.1.4).

1.4.3 Glatte Muskelzellen aus Stammzellen

Vaskuläre glatte Muskelzellen (*Vascular Smooth Muscle Cells*; VSMCs) bilden den strukturellen Halt von Gefäßwänden und regulieren den Gefäßwiderstand. Ähnlich wie Endothelzellen können auch diese Zellen verschiedenen Ursprungs sein. Die Unterschiede zeigen sich bereits während der Embryonalentwicklung, wobei sich beispielweise die VSMCs der Koronararterien aus dem Proepikardium und die der Aortenwurzel aus dem sekundären Herzfeld bilden. Diese entwicklungsbiologische Heterogenität der Zellen resultiert in einer

Vielzahl von Differenzierungsprotokollen, die häufig, aber nicht immer, über mesodermale Vorläuferzellen erfolgen, welche dann mittels PDGF- (*Platelet Derived Growth Factor*) oder TGF β -Behandlung zu VSMCs differenziert werden, was ähnlich wie bei Kardiomyozyten in einem zwei- oder dreidimensionalen Zellkulturformat stattfinden kann. VSMCs stellen allerdings nicht nur aufgrund ihres Ursprungs, sondern auch phänotypisch eine heterogene Zellpopulation dar. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen ruhenden und aktivierten glatten Muskelzellen. Diese beiden verschiedenen Phänotypen beeinflussen neben der Funktion der Zellen auch die Morphologie, Genexpression und Proliferationsfähigkeit, wodurch die Charakterisierung nach der Differenzierung erschwert wird. Ruhende VSMCs dienen mit ihren kontraktile Eigenschaften dazu, den Gefäßwiderstand zu regulieren. Sie sind ausdifferenziert und exprimieren im ruhenden Zustand Markergene wie α -SMA (*α -Smooth Muscle Actin*) oder Calponin, während diese im aktivierten Zustand herabreguliert sind. Aktivierte VSMCs dedifferenzieren und proliferieren und zusätzlich zur Produktion von extrazellulärer Matrix steigt auch die Neigung der Zellen, zu migrieren, um den Verschluss und die Heilung von Gefäßverletzungen zu ermöglichen (Wang et al. 2015; Ayoubi et al. 2017).

Obwohl es bereits neue Ansätze wie den von Yang et al. (2016) gibt, welche die gezielte Differenzierung der beiden verschiedenen Phänotypen ermöglichen sollen, wurde in dieser Arbeit diese Unterscheidung nicht vorgenommen. Das hier angewandte Protokoll wurde nach Witty et al. (2014) modifiziert und rekapituliert die embryonale Entwicklung glatter Muskelzellen der Koronararterien. Dabei wird zuerst die Bildung mesodermaler Zellen initiiert, die sich dann mittels weiterer Aktivierung des Wnt-Signalwegs zu epikardialen Zellen entwickeln, welche als letzten Schritt eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen, die durch die sukzessive Behandlung mit TGF β und bFGF induziert wird und die Differenzierung zu glatten Muskelzellen bewirkt.

1.4.4 Fibroblasten aus Stammzellen

Für die Differenzierung von Fibroblasten aus hiPSCs wurde ebenfalls die Publikation von Witty et al. (2014) als Grundlage genutzt. Hierbei wird die EMT am Ende des Protokolls nur durch Behandlung mit bFGF hervorgerufen. Eine neuere Publikation von Bao et al. (2017) beschreibt ein sehr ähnliches Protokoll, bei dem ebenfalls Fibroblasten und glatte Muskelzellen über epikardiale Vorläuferzellen differenziert werden. Die vier in dieser Arbeit verwendeten Differenzierungsprotokolle inklusive der Zwischenstufen und der benötigten Wachstumsfaktoren sind zur Veranschaulichung in Abbildung 1.4 noch einmal schematisch zusammengefasst.

Einleitung

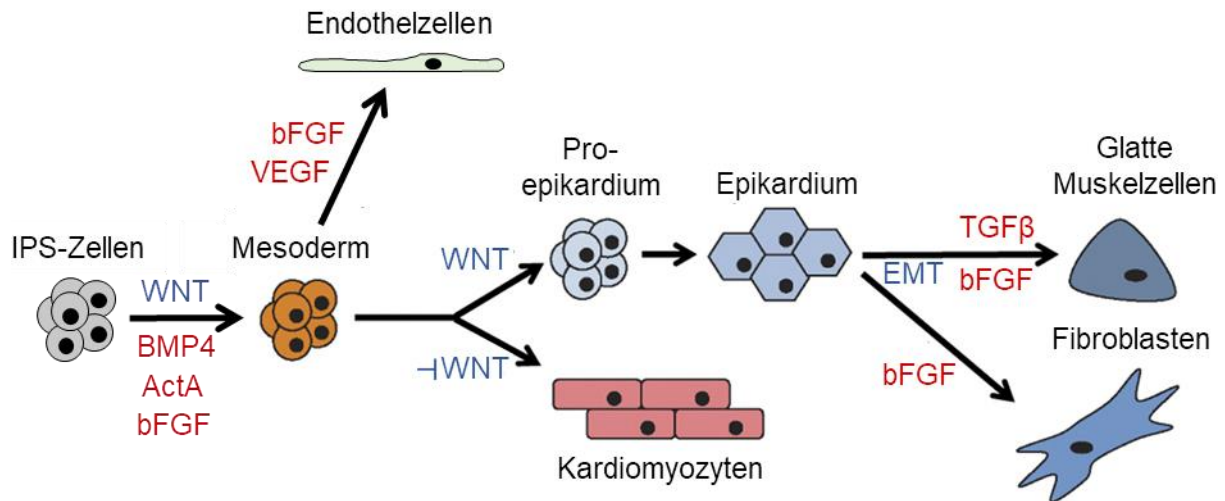


Abbildung 1.4: Schematische Übersicht der verwendeten Differenzierungsprotokolle, ausgehend von hiPS-Zellen, über eine mesodermale Zwischenstufe, aus der alle vier finalen Zelltypen hervorgehen. Neben den eingesetzten Wachstumsfaktoren in rot, sind in blau die Aktivierung bzw. Inhibition des Wnt-Signalwegs sowie die Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) eingezeichnet (modifiziert nach Witty et al. 2014).

Insgesamt ist die Zahl der Differenzierungsprotokolle für Fibroblasten aber deutlich geringer als für andere Zelltypen. Hautbiopsien und damit dermale Fibroblasten sind zwar sehr häufig Ausgangsmaterial zur Herstellung der hiPS-Zellen, da aber sowohl der embryonale Ursprung, die Morphologie und die Genexpression als auch die Funktion von Fibroblasten sehr heterogen sind, sind die Differenzierung zu kardialen Fibroblasten und eine möglichst detaillierte Charakterisierung der Zellen notwendig. Ähnlich wie bei glatten Muskelzellen lassen sich auch Fibroblasten prinzipiell in ruhende Fibroblasten und aktivierte bzw. Myofibroblasten einteilen. Im ruhenden Zustand erhalten diese Zellen unter physiologischen Bedingungen das Gleichgewicht zwischen Sekretion und Degradation von extrazellulärer Matrix aufrecht und übernehmen vermutlich weitere Aufgaben, wie z.B. die elektrische Kopplung mit Kardiomyozyten oder die Wahrnehmung von Stresssignalen. Die Aktivierung zu Myofibroblasten unter Krankheitsbedingungen erfolgt über den TGFβ-Signalweg und über MRTFs (*Myocardin-Related Transcription Factors*), wodurch die Zellen vermehrt proliferieren, extrazelluläre Matrix produzieren und durch die erhöhte Expression von α-SMA Stressfasern bilden (Lajiness and Conway 2014; Ivey and Tallquist 2016).

1.5 Zelluläre Zusammensetzung und Interaktionen

Kardiomyozyten machen trotz ihres großen Volumenanteils und der entscheidenden Funktion im Herzen zahlenmäßig nur etwa 30% der Zellen aus. Während lange Zeit Fibroblasten als häufigster Zelltyp galten, zeigen die Daten von Pinto et al. (2016), dass mit über 50% die meisten Zellen in murinem als auch in humanem Herzgewebe Endothelzellen sind und der Anteil der Fibroblasten nur ca. 10-15% beträgt. Die Variabilität bei der Bestimmung der

Einleitung

Fibroblastenzahl lässt sich auf die Wahl unterschiedlicher Marker zurückführen. Da es keinen spezifischen Marker gibt, werden Fibroblasten, glatte Muskelzellen und Perizyten manchmal als mesenchymale Zellen zusammengefasst und wie bei Bergmann et al. (2015) durch das Fehlen von Kardiomyozyten- und Endothelzellmarkern quantifiziert. Zusätzlich zu dieser indirekten Methode wurde von Pinto et al. (2016) auch noch eine Kombination aus verschiedenen transgenen Mäusen für die Quantifikation der Fibroblasten verwendet. Perizyten und glatte Muskelzellen wurden dadurch wiederum im Ausschlussverfahren gemeinsam auf 8% und Leukozyten auf 5% aller Zellen beziffert.

Alle diese verschiedenen Zellen stehen miteinander in Kontakt und beeinflussen sich gegenseitig unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen. Dabei gibt es generell verschiedene Möglichkeiten zur Interaktion, wie Abbildung 1.5 zeigt. Dazu gehören chemische Signale, wie z.B. Zytokine und Wachstumsfaktoren, die direkt oder Rezeptorvermittelt übertragen werden können. Hinzu kommen mechanische und elektrische Signale, die über die extrazelluläre Matrix vermittelt und durch Gap Junctions zwischen den Zellen weitergeleitet werden können.

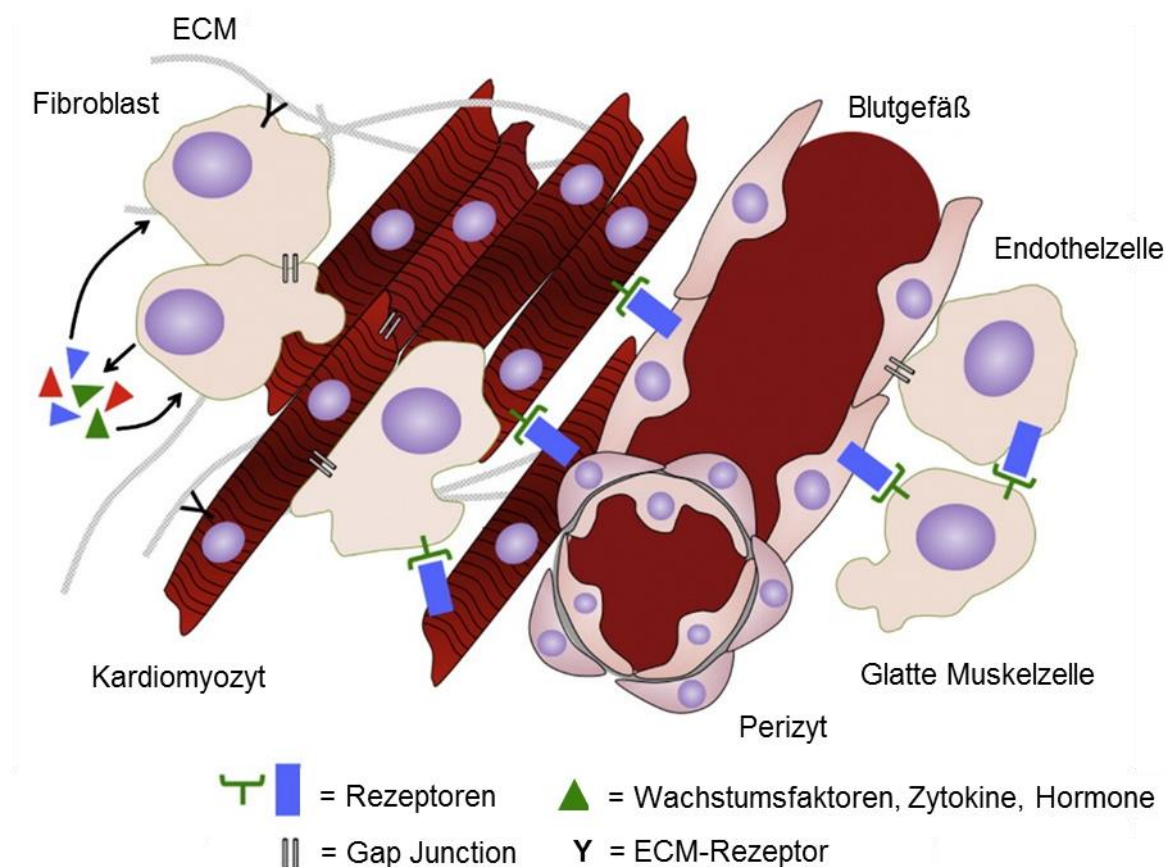


Abbildung 1.5: Möglichkeiten interzellulärer Interaktionen in kardialen Gewebe (modifiziert nach Howard und Baudino 2014; ECM: Extrazelluläre Matrix)

Dieses komplexe System bildet die Grundlage zellulärer Interaktionen und ermöglicht die Weitergabe von extrazellulärer Signalen, die dann intrazelluläre Signalwege aktivieren und so die Reaktion der Zellen steuern können (Howard and Baudino 2014).

1.6 Zielsetzung

Die Grundlage für diese Arbeit war das auf Ratten-EHTs basierende *in vitro*-Modell für pathologische kardiale Hypertrophie (Hirt et al. 2012). Das Hauptziel war, das Hypertrophie-Modell an humanen EHTs zu testen und zu untersuchen, wie sich die Nachlasterhöhung und die Behandlung mit Endothelin-1 auf diese auswirken. Bestenfalls sollte ein mit dem Ratten-EHT-Modell vergleichbares, auf humanen Zellen basierendes Modell etabliert werden, um damit eine geeignetere Plattform zu schaffen, die der Untersuchung vielseitiger Fragen zur Herzhypertrophie in menschlichem Gewebe dienen soll.

Aus der Diskrepanz in der Zellzusammensetzung zwischen Ratten-EHTs und humanen EHTs entwickelte sich die zweite wichtige Fragestellung dieser Dissertation. Da humane EHTs bislang nur aus hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten bestanden und nicht wie Ratten-EHTs aus einer physiologischen Mischung von Herzzellen, sollte der Einfluss der Nicht-Kardiomyozyten-Fraktion untersucht werden. Dazu sollten verschiedene Differenzierungsprotokolle verwendet werden, um neben Kardiomyozyten auch Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten aus Stammzellen zu generieren und humane EHTs aus einer Mischung dieser vier wichtigsten kardialen Zelltypen herzustellen. Zusätzlich sollten die hiPS-Zellen zuvor mittels lentiviraler Transduktion mit vier unterschiedlichen Fluorochromen markiert werden, um die verschiedenen Zelltypen im EHT-Format später identifizieren und gut visualisieren zu können.

2. Methoden

Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Geräte, Materialien und Substanzen ist im Anhang zu finden, die verwendeten Zellkulturmedien sind alphabetisch in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
2D-KM-Tag 0	StemPro-34 + Supplement 1% Matrigel 2 mM L-Glutamin 1 ng/ml BMP4
2D-KM-Stufe-1	StemPro-34 + Supplement 2 mM L-Glutamin 10 ng/ml BMP4 8 ng/ml Activin A
2D-KM-Stufe-2	RPMI 1640 2% B27 ohne Insulin 10 µM KY 021111 10 µM XAV 939
2D-KM-Stufe-3	RPMI 1640 2% B27 mit Insulin
2x DMEM	1 ml 10x DMEM 1 ml Pferdeserum 0,1 ml Penicillin/Streptomycin 2,9 ml Wasser für Injektionszwecke
EB-Formationsmedium (FTDA-basiert)	FTDA 4 mg/ml Polyvinylalkohol 0,5% Penicillin/Streptomycin 10 µM Y-27632 30 ng/ml bFGF
EHT-Medium	DMEM 10% HS 1% Penicillin/Streptomycin 10 µg/ml Insulin 33 µg/ml Aprotinin
EHT-Medium (Serum-frei)	DMEM 1% Penicillin/Streptomycin 10 µg/ml Insulin 33 µg/ml Aprotinin 50 ng/mL Hydrocortison 0,5 ng/mL Trijodthyronin
Einfriermedium	90% FCS 10% DMSO
Endo-Stufe-1	StemPro-34 + Supplement 4 mg/ml Polyvinylalkohol

Methoden

	<p>400 µM 1-Thioglycerol 0,5% Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1 mM Magnesium Ascorbyl-Phosphat 75 mg/l Transferrin 1 µM Y-27632 5 ng/ml FGF2 12 ng/ml BMP4 6 ng/ml Activin A</p>
Endo-Stufe-2	<p>StemPro-34 + Supplement 4 mg/ml Polyvinylalkohol 400 µM 1-Thioglycerol 0,5% Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1 mM Magnesiumascorbyl-Phosphat 75 mg/l Transferrin 1 µM Y-27632 10 ng/ml FGF2 100 ng/ml VEGF</p>
Epi-Medium	<p>RPMI 1640 0,5% Penicillin/Streptomycin 0,1% Lipidmix (Sigma-Aldrich) 250 µM Phosphoascorbat 0,01% Transferrin-Selenium 1 µM Y-27632</p>
Epi-Medium- Tag 4	<p>Epi-Medium 10 ng/ml BMP4 5 ng/ml VEGF 4 µM CHIR 5,4 µM SB-431542</p>
Epi-Medium- Tag 7	<p>Epi-Medium 5 ng/ml VEGF</p>
Epi-Medium- Tag 15	<p>Epi-Medium 10 µM Y-27632</p>
Epi-Medium- Tag 16 für glatte Muskelzellen	<p>Epi-Medium 5 ng/ ml TGFβ</p>
Epi-Medium- Tag 16 für Fibroblasten	<p>Epi-Medium 10 ng/ ml bFGF</p>
Epi-Medium- Tag 20	<p>Epi-Medium 10 ng/ ml bFGF</p>
FTDA	<p>DMEM/F12 0,01% Transferrin-Selenium 10 µg/ml Insulin 2 mM L-Glutamin 1% humanes rekombinantes Serumalbumin 1/1000 Lipidmix (Sigma-Aldrich) 10 ng/ml bFGF 2,5 ng/ml Activin A</p>

Methoden

	50 nM Dorsomorphin 0,5 ng/ml TGFβ1
hiPSC-Endothelzellmedium	hEC-SFM 1% <i>platelet-poor plasma</i> (PPP) 30 ng/ml VEGF 20 ng/ml bFGF
KM-Stufe-1	RPMI 1640 0,5% Penicillin/Streptomycin 4 mg/ml Polyvinylalkohol 1/1000 Lipidmix (Sigma-Aldrich) 250 μM Phosphoascorbat 1/10.000 Transferrin-Selenium 10 μM Y-27632 5 ng/ml FGF2 10 ng/ml BMP4 3 ng/ml Activin A
KM-Stufe-2	RPMI 1640 0,5% Penicillin/Streptomycin 4 mg/ml Polyvinylalkohol 1/1000 Lipidmix (Sigma-Aldrich) 250 μM Phosphoascorbat 1/10.000 Transferrin-Selenium 1 μM Y-27632 100 nM XAV 939
KM-Stufe-3	RPMI 1640 4 mg/ml Polyvinylalkohol 500 μM 1-Thioglycerol 10 mM HEPES, pH 7.4 0,5% Penicillin/Streptomycin 1 μM Y-27632 2% B27 mit Insulin
Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM)	DMEM 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin

2.1 Stammzellkultur und Differenzierungsprotokolle

Für die Differenzierungen wurden zwei verschiedene hiPS-Zelllinien verwendet. Die ursprünglich von Dr. Moretti zur Verfügung gestellten hiPSCs der Linie C25 wurden mit Hilfe retroviraler Transduktion reprogrammiert (Moretti et al. 2010), während die ebenfalls aus einer Hautbiopsie eines gesunder Probanden stammenden Fibroblasten der Linie ERC018 unter Verwendung eines Sendaivirus-basierten Kits (CytoTune; Life Technologies) von der Hamburg Zentrum für Experimentelle Therapieforschung (HEXT) Stammzell-Facility reprogrammiert wurden. Die Kultivierung und Expansion der Stammzellen erfolgte unter hypoxischen

Methoden

Bedingungen auf Geltrex-beschichteten Zellkulturschalen und -flaschen in definiertem Medium, das unter anderem bFGF, TGF β 1, Dorsomorphin und Aktivin A enthielt (s. Tabelle 1; FTDA). Die Zellen wurden mit Hilfe des Ca²⁺-Chelators EDTA und einer Expansionsrate von 1:12 passagiert. Alle anderen Stammzellen betreffende Zellkulturarbeiten wurden wie in Breckwoldt et al. (2017) beschrieben durchgeführt.

2.1.1 Lentivirale Transduktion von hiPS-Zellen

Die hiPS-Zellen wurden hierfür wie oben beschrieben bis zu einer Konfluenz von etwa 50% kultiviert, dann für vier Stunden mit den lentiviralen Vektoren inkubiert. Diese wurden danach durch FTDA-Medium ersetzt und die Zellen weiter kultiviert. Die in Tabelle 2 aufgelisteten Vektoren wurden von Kristoffer Riecken hergestellt und die Transduktion wurde von ihm in den Laboren der Forschungsgruppe für Zell- und Gentherapie durchgeführt. Dabei wurden 400 μ l der Vektoren mit 400 μ l FTDA gemischt und auf ein 12-Well gegeben. Bei geschätzten 0,5 Millionen Zellen pro Well entspräche das einer ungefähren Multiplizität der Infektion (MOI) von 0,1-0,3. Bei allen vier Vektoren war die Expression des Fluoreszenzproteins unter der Kontrolle des EF1 α -Promotors mit einer Puromycin-Resistenz gekoppelt. Die Expression der Fluoreszenzproteine wurde 48 Stunden nach Transduktion mikroskopisch an einem Olympus IX81 Mikroskop unter Verwendung der angegebenen Filter überprüft, bevor die zweiwöchige Selektion mit Puromycin (2 μ g/ml) gestartet wurde. Die Ergebnisse der Selektion wurden mittels Mikroskopie und Durchflusszytometrie bestimmt, dann wurden die Stammzellen expandiert und von allen vier Linien mindestens sechs Kryoproben bei -150 °C eingefroren.

Tabelle 2: Lentivirale Vektoren, deren Titer und die jeweiligen Fluoreszenzfilter für die mikroskopische Analyse.

Vektor	Titer [TU/ml]	Filter im Olympus IX81
LeGO-EF1a-mTagBFP-Puro+	2,3E+05	AHF F36-710
LeGO-EF1a-Venus-Puro+	2,0E+05	Olympus U-MNiBA2AHF
LeGO-EF1a-mOrange2-Puro+	3,5E+05	AHF F36-730
LeGO-EF1a-dKatushka2-Puro+	1,3E+05	AHF F36-508

2.1.2 Differenzierung von Kardiomyozyten in 3D

Für die Kardiomyozytendifferenzierung wurde ein mehrstufiges, EB-Format- und Wachstumsfaktor-basiertes Protokoll angewendet, das in unserem Institut etabliert und von Breckwoldt et al. (2017) veröffentlicht wurde. Ein Fließschema der wichtigsten Arbeitsschritte ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Die hiPSCs wurden eine Woche vor dem Start der Differenzierung expandiert und dann mit EDTA dissoziiert, gezählt und für die EB-Formation 30 x 10⁶ Zellen pro 100 ml Medium in Magnetrührflaschen über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die EBs gewaschen, das Volumen in skalierten 15 ml-Reaktionsgefäßen abgeschätzt und ca. 200 μ l EBs pro T175-Flasche in KM-Stufe-1-Medium für drei Tage unter

Methoden

hypoxischen Bedingungen in Suspension kultiviert, um die mesodermale Differenzierung zu stimulieren. Danach wurden die EBs erneut gewaschen, das Volumen abgeschätzt und in KM-Stufe-2-Medium überführt. Nach weiteren drei Tagen wurde das Medium vollständig durch KM-Stufe-3-Medium ersetzt. Ab Tag 10 konnten die ersten kontrahierenden Zellen beobachtet werden, ab Tag 11 wurde Medium ohne den Wnt-Inhibitor XAV verwendet und die EBs noch für sechs weitere Tage kultiviert. An Tag 17 der Differenzierung wurden die kontrahierenden EBs mit HBSS gewaschen und dann für etwa vier Stunden in Kollagenase-II mit 10 μ M Y-27632 und BTS dissoziiert, die Reaktion wurde mit DNase in RPMI abgestoppt, die Zellen mit Trypanblau in einer Neubauer-Kammer gezählt und entweder zur Herstellung von EHTs genutzt oder eingefroren.

Methoden

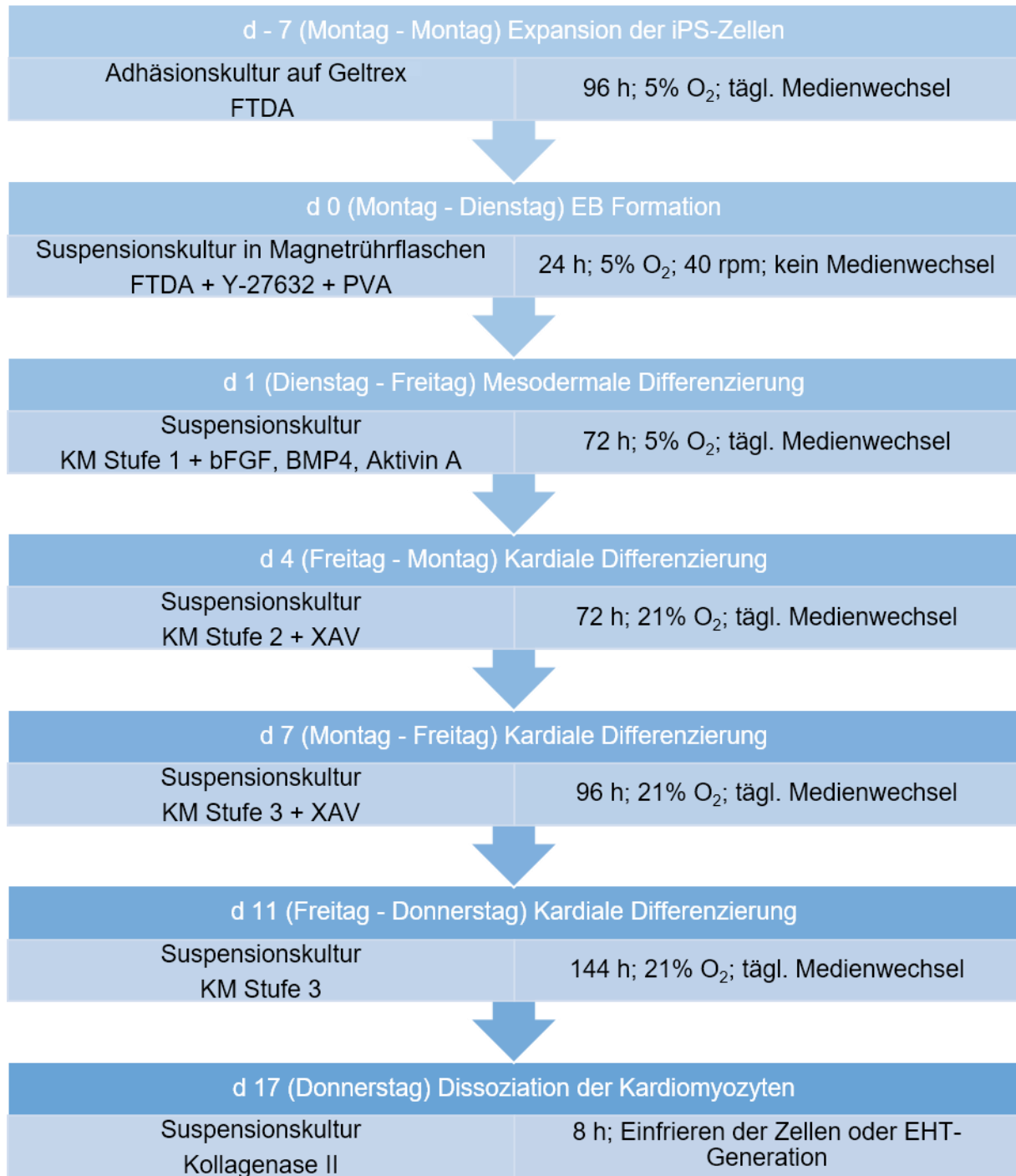


Abbildung 2.1: Fließschema der kardialen Differenzierung. Dargestellt sind für den jeweiligen Arbeitsschritt der Differenzierungstag und eine Kurzbeschreibung. In den beiden Kästen darunter finden sich zusätzliche Informationen zur Art der Zellkultur und dem verwendeten Medium (links), die Dauer des Arbeitsvorgangs, die Sauerstoffbedingungen im Inkubator und der Häufigkeit der Medienwechsel (rechts).

2.1.3 Differenzierung von Kardiomyozyten in 2D

Für lentiviral transduzierte ERC018-hiPS-Zellen wurde ein zusätzliches Kardiomyozytendifferenzierungsprotokoll angewendet. Hierbei wurden die hiPS-Zellen in FTDA auf Matrigel-beschichteten Zellkulturschalen unter normoxischen Bedingungen bis zu

einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Das Medium wurde durch 2D-KM-Tag-0-Medium (1,5 ml pro 6-Well) ersetzt und die Zellen dabei mit einer Schicht des darin enthaltenen Matrigels überdeckt. 12-18 Stunden später wurde mit 2D-KM-Stufe-1-Medium die mesodermale Differenzierung induziert. Von hier an wurde nur noch jeden zweiten Tag das Medium gewechselt (3 ml pro 6-Well). Bereits an Tag 3 des Protokolls wurde mit 2D-KM-Stufe-2-Medium die kardiale Differenzierung initiiert. An Tag 5 wurde 2D-KM-Stufe-2-Medium mit Insulin verwendet und ab Tag 7 2D-KM-Stufe-3-Medium. Ab Tag 9 waren die ersten Kontraktionen sichtbar, dissoziiert wurden die Zellen in der Regel zwischen Tag 12 und Tag 15. Dies erfolgte analog zur Dissoziation von EBs mit Kollagenase-II, die Inkubationszeit war im 2D-Format aber meist etwas kürzer (ca. 3-3,5 Stunden).

2.1.4 Differenzierung von Endothelzellen

Das Protokoll zur Differenzierung von Endothelzellen wurde von Kaja Breckwoldt in unserem Institut etabliert und detailliert in ihrer Dissertation beschrieben (Breckwoldt 2015). Aus dem Fließschema in Abbildung 2.2 sind der Arbeitsablauf und die Unterschiede zur Kardiomyozytendifferenzierung ersichtlich. Zunächst wurden für die mesodermale Differenzierung StemPro-34 als Grundmedium und leicht abgeänderte Wachstumsfaktorkonzentrationen eingesetzt (Endo-Stufe-1). Deutliche Unterschiede zeigten sich erst ab Tag 4, hier wurden die Zellen von einer Suspensionskultur in eine Adhäsionskultur überführt und für drei weitere Tage unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Dabei wurde die endotheliale Differenzierung mit einer hohen Konzentration an VEGF im Endo-Stufe-2-Medium stimuliert. Anschließend wurden die Zellen in einem Inkubator mit normoxischen Bedingungen für eine weitere Woche kultiviert. Da die Effizienz der endothelialen Differenzierung nur bei etwa 30% lag, wurden die Endothelzellen nach der 14-tägigen Differenzierung durch zwei sequentielle magnetisch aktivierte Zellsortierungen (MACS) aufgereinigt. Dazu wurden die Zellen nach der Dissoziation mit CD31 MicroBeads (Miltenyi Biotec) magnetisch markiert und mit Hilfe von ferromagnetischen LS Säulen (Miltenyi Biotec) von den CD31-negativen Zellen separiert. Diese Methode wurde ebenfalls aus der Dissertation von Kaja Breckwoldt übernommen und erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers. Im Anschluss konnten die schnell proliferierenden Endothelzellen expandiert und dann eingefroren oder für die Herstellung von EHTs verwendet werden. Für die Expansion wurde das hiPS-Endothelzellmedium drei Mal wöchentlich gewechselt und die Zellen wurden mit TrypLE im Verhältnis 1:3 bis zu fünf Mal passagiert. Als Einfriermedium wurde anders als von (Breckwoldt 2015) beschrieben 90% FCS und 10% DMSO verwendet.

Methoden

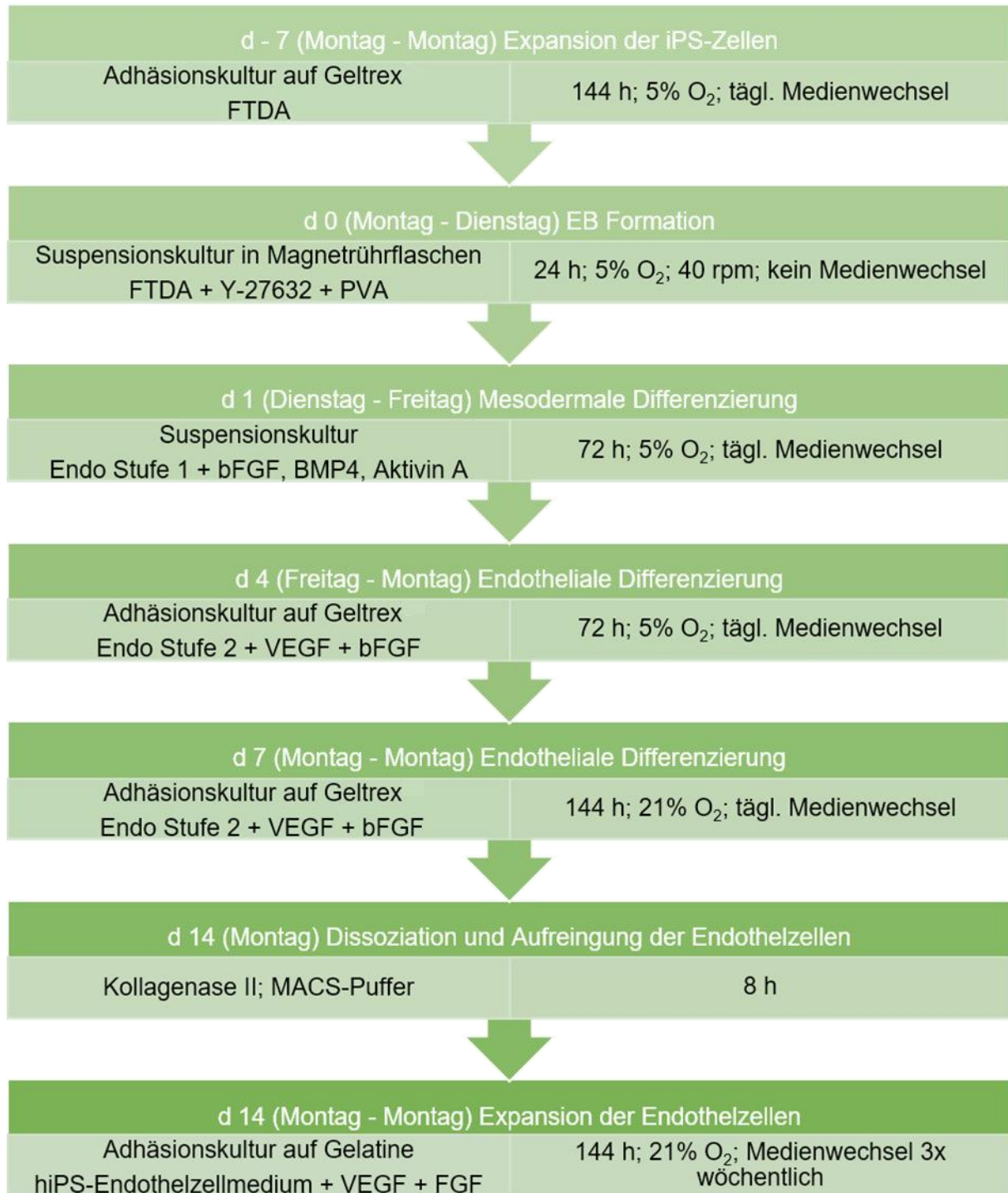


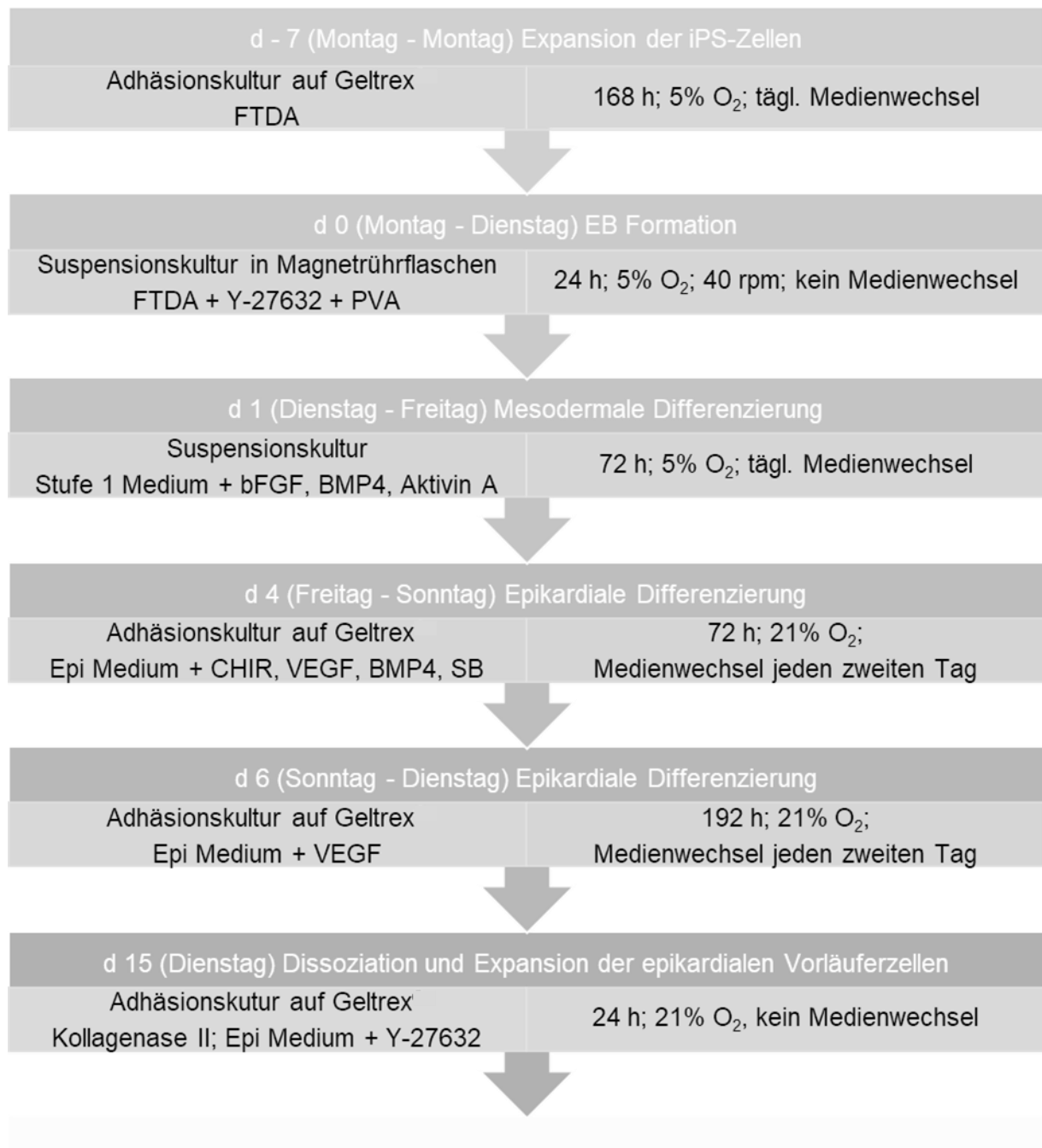
Abbildung 2.2: Fließschema der endothelialen Differenzierung. Dargestellt sind für den jeweiligen Arbeitsschritt der Differenzierungstag und eine Kurzbeschreibung. In den beiden Kästen darunter finden sich zusätzliche Informationen zur Art der Zellkultur und dem verwendeten Medium (links), die Dauer des Arbeitsvorgangs, die Sauerstoffbedingungen im Inkubator und der Häufigkeit der Medienwechsel (rechts).

2.1.5 Differenzierung von glatten Muskelzellen und Fibroblasten

Die in Abbildung 2.3 zusammengefasste Differenzierung von glatten Muskelzellen und Fibroblasten basiert auf einer Publikation von Witty et al. (2014) und wurde an mehreren Stellen modifiziert. Das Fließschema in Abbildung 2.3 fasst daher nur die grundlegenden

Methoden

Arbeitsschritte zusammen. Eine detaillierte Beschreibung des Protokolls findet sich im Ergebnisteil (s. Kapitel 3.3).



Methoden

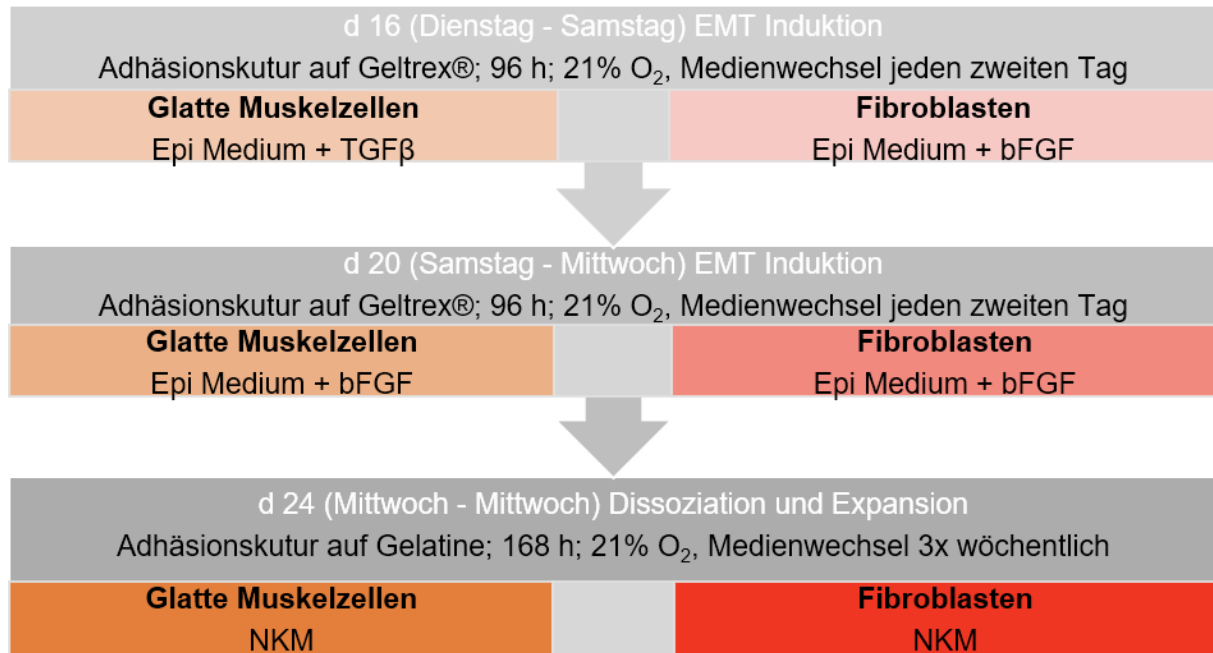


Abbildung 2.3: Fließschema der epikardialen Differenzierung. Dargestellt sind für den jeweiligen Arbeitsschritt der Differenzierungstag und eine Kurzbeschreibung. In den beiden Kästen darunter finden sich zusätzliche Informationen zur Art der Zellkultur und dem verwendeten Medium (links), Dauer des Arbeitsvorgangs, den Sauerstoffbedingungen im Inkubator und der Häufigkeit der Medienwechsel (rechts). Zu beachten ist bei dieser Abbildung, dass das Protokoll zu Beginn identisch war für glatte Muskelzellen und Fibroblasten und eine Aufspaltung der beiden Zelltypen erst ab Tag 16 stattfand.

2.2 Fibroblastenzellkultur

Neben den aus hiPS-Zellen differenzierten epikardialen Fibroblasten wurden auch die folgenden Fibroblastentypen für Versuche in EHTs genutzt und dafür vorher kultiviert. Adulte kardiale Fibroblasten wurden aus Herzohrgewebe gewonnen, indem das Gewebe in kleine Stückchen geschnitten und diese in eine mit Gelatine beschichtete Zellkulturschale gegeben wurden. Nach 3-4 Tagen waren Fibroblasten aus dem Gewebe an der Schale angewachsen, so dass die restlichen Gewebestücke entfernt und die Fibroblasten expandiert werden konnten.

Kryoproben von humanen dermalen Fibroblasten und murinen 3T3-Fibroblasten wurden von Grit Höppner zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden aufgetaut und 5 ml NKM langsam zum DMSO-haltigem Einfriermedium gegeben, bevor die Zellen für 10 min bei 100 g zentrifugiert wurden. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in NKM aufgenommen und gezählt und dann in Gelatine-beschichtete Zellkulturschalen ausgesät und expandiert.

Alle Fibroblasten wurden 2-3 Mal wöchentlich mit NKM gefüttert (2 ml pro 6-Well und 15 ml pro T75-Flasche) und im Verhältnis 1:3 mit Trypsin-EDTA passagiert, sobald sie konfluent waren.

2.3 Mediumoptimierung

Nach der Differenzierung wurden Fibroblasten und glatte Muskelzellen in NKM und Endothelzellen in hiPSC-Endothelzellmedium kultiviert. Für die Zellkultur von multizellulären EHTs aus vier verschiedenen Zelltypen war es notwendig, das für Kardiomyozyten optimierte EHT-Medium zu testen und zu modifizieren. Dafür wurden Endothelzellen und Fibroblasten in ihrem Standardmedium passagiert, in 6-Well Zellkulturschalen ausgesät und kultiviert bis sie 60-70% konfluent waren. Dann wurde eines der Wells weiter mit dem jeweiligen Standardmedium gefüttert und die anderen erhielten die fünf in Tabelle 3 aufgelisteten Medien. Alle enthielten Aprotinin, Insulin und Penicillin/Streptomycin in der gleichen Konzentration wie EHT-Medium. Die Wachstumsfaktoren wurden in der gleichen Konzentration wie in hiPSC-Endothelzellmedium eingesetzt (s. Tabelle 1). Nach einem, drei und fünf Tagen wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit dem *EVOS FL Cell Imaging System* fotografiert.

Tabelle 3: Liste der miteinander verglichenen Zellkulturmedien

PPP=Plättchen-armes Plasma, FCS=Fetales Kälberserum, HS=Pferdeserum

Name	Grundmedium	Serum
hiPSC-Endothelzellmedium	hEC-SFM	PPP
NKM	DMEM	FCS
EHT-Medium	DMEM	HS
EHT-Medium+ VEGF	DMEM	HS
EHT-Medium + VEGF+ FGF	DMEM	HS
DMEM/F12 + VEGF +FGF	DMEM/F12	HS
NKM+ VEGF + FGF	DMEM	FCS

2.4 Funktionelle Charakterisierung der Zelltypen

2.4.1 Gefäßbildung

Um zu testen, ob die aus ERC018-hiPS-Zellen differenzierten CD31-positiven Endothelzellen auch funktionell in der Lage sind Gefäß-ähnliche Strukturen zu formen, wurden sie mit *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) und den ebenfalls aus hiPS-Zellen differenzierten Fibroblasten verglichen. Dafür wurden $1,5 \times 10^4$ Zellen in ein mit 50 µl Matrigel beschichtetes Well einer 96-Well Zellkulturschale in 150 µl Medium ausgesät. Die Endothelzellen und HUVECs wurden in hiPSC-Endothelzellmedium und die Fibroblasten in NKM kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit dem *EVOS FL Cell Imaging System* fotografiert. Für die GFP-transduzierten HUVECs und die Venus-transduzierten Endothelzellen wurde der *GFP EVOS LED Light Cube* (470/22 nm Anregung; 510/42 nm Emission) und für die dKatushka2-

transduzierten Fibroblasten der *GFP EVOS LED Light Cube* (531/40 nm Anregung; 593/40 nm Emission) verwendet.

2.4.2 Zellmigration

Die aus ERC018-hiPS-Zellen differenzierten Fibroblasten und glatten Muskelzellen wurden in je drei *Wells* einer 24-*Well* Zellkulturschale in NKM kultiviert, bis sie fast konfluent waren. Nach einer Nacht in Serum-freiem Medium wurde mit einer 100 µl-Pipettenspitze eine Furche in den Zellrasen gekratzt und das Medium gewechselt, um die Zellreste zu entfernen. Von der Ausgangssituation und nach sechs, 13, 27 und 33 Stunden wurden die freigekratzten Bereiche fotografiert. Für die quantitative Auswertung mit FIJI (ImageJ) wurde anhand der Fotos zu jedem Zeitpunkt die freie Fläche gemessen und auf die Ausgangssituation bezogen. Um die von den Zellen erneut besiedelte Fläche zu bestimmen wurde die Differenz dieser Werte zu 100% gebildet.

2.4.3 TGFβ-Stimulation

Fibroblasten und glatte Muskelzellen wurden hierfür im 6-*Well*-Format kultiviert bis sie ca. 70-80% konfluent waren. Dann wurden sie für drei Tage mit 10 nM TGFβ in NKM inkubiert und anschließend wurde die RNA aus den Zellen extrahiert, wobei die biologischen Triplikate unabhängig voneinander gehandhabt wurden (vgl. Kapitel 2.8). Anschließend wurde die Expression von *Smooth Muscle Alpha Actin* (ACTA2) und Kollagen-I (COL1A1) mittels quantitativer PCR gemessen.

2.5 Engineered Heart Tissue (EHT)

Die Herstellung von EHTs erfolgte wie von Hansen et al. (2010) beschrieben. In einer 24-*Well* Zellkulturschale wurden hierfür zunächst Gussformen aus Agarose hergestellt, in die dann die Silikonhalterungen gesetzt wurden. Die hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten und gegebenenfalls zusätzliche Zellen wurden gezählt und bei 100 g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurden in NKM resuspendiert und ein Mastermix für die entsprechende Anzahl herzustellender EHTs angefertigt (s. Tabelle 4:). 100 µl des Mastermix, wurden zu 3 µl Thrombin (3 U) gegeben und die Mischung dann zügig in die Gussform pipettiert. Die EHTs wurden zum Polymerisieren eine Stunde bei 37 °C inkubiert, dann mit DMEM überschichtet und nach weiteren 30 min Inkubationszeit in eine neue, mit EHT-Medium befüllte Zellkulturschale überführt.

Methoden

Tabelle 4: Zusammensetzung des Mastermix für ein EHT (inkl. 10% Pipettierverlust)

Komponente	Volumen
Zellen	$1,1 \times 10^6$
NKM	86,9 μ l
2x DMEM	6,2 μ l
10% Matrigel	11 μ l
0,1% Y-27632	0,11 μ l
Fibrinogen	2,8 μ l

2.6 Video-optische Kontraktionsmessung

Die Kontraktionskraft, Frequenz und Kontraktions- bzw. Relaxationszeit wurden durch ein in unserem Institut für das 24-Well-Format entwickeltes Messsystem analysiert, das mittlerweile kommerzialisiert wurde und von der Firma EHT Technologies GmbH vertrieben wird. Der schematische und reale Aufbau der Messapparatur sind in Abbildung 2.4 dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung der Methode findet sich unter Hansen et al. 2010 und auf der Homepage von EHT Technologies (<http://www.eht-technologies.de/>).

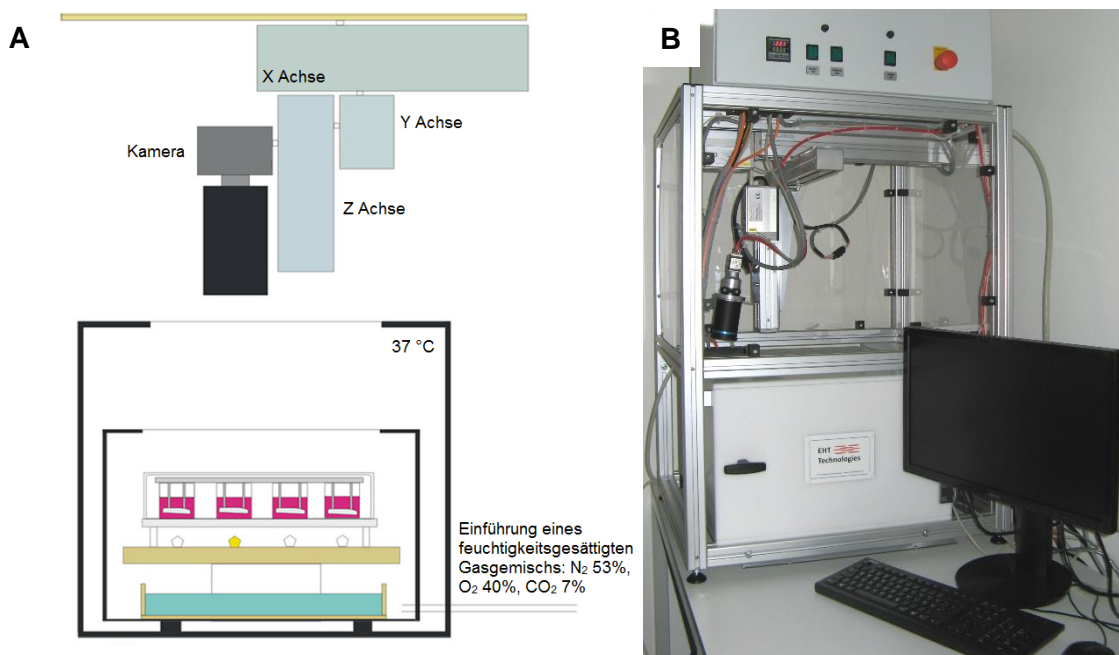


Abbildung 2.4: Video-optische Messapparatur, schematische Darstellung. Dargestellt ist das x-y-z-System mit der Kamera. Darunter befindet sich die Zellkulturschrank-ähnliche Einheit, darin die Zellkulturschale, welche von unten durch LEDs beleuchtet wird (modifiziert nach Hansen et al., 2010; A), Fotografie der Messapparatur (B).

Kurz gesagt handelte es sich um eine video-optische Messung, die mit Hilfe einer eigens hierfür programmierten Software (*Consulting Team Machine Vision; CTMV*) ausgewertet wurde. Das Programm basiert dabei auf dem Prinzip der Figurerkennung und setzt

Methoden

automatisch oder manuell Messpunkte am oberen und unteren Ende des kontrahierenden EHTs. Der sich verändernde Abstand zwischen diesen Messpunkten wurde von der Software bestimmt und über die Aufnahmezeit festgehalten. Darauf basierend und unter Berücksichtigung der elastischen Eigenschaften der Silikonschläuche, an denen die EHTs fixiert sind, wurden die Kontraktionsparameter durch das Programm berechnet. Zur besseren Veranschaulichung ist in Abbildung 2.5 das Layout der Software gezeigt. Neben der Kameraaufnahme des EHTs und des korrespondierenden Kontraktionsmusters sind dabei die zahlreichen Einstellungsmöglichkeiten der Messparameter sichtbar.

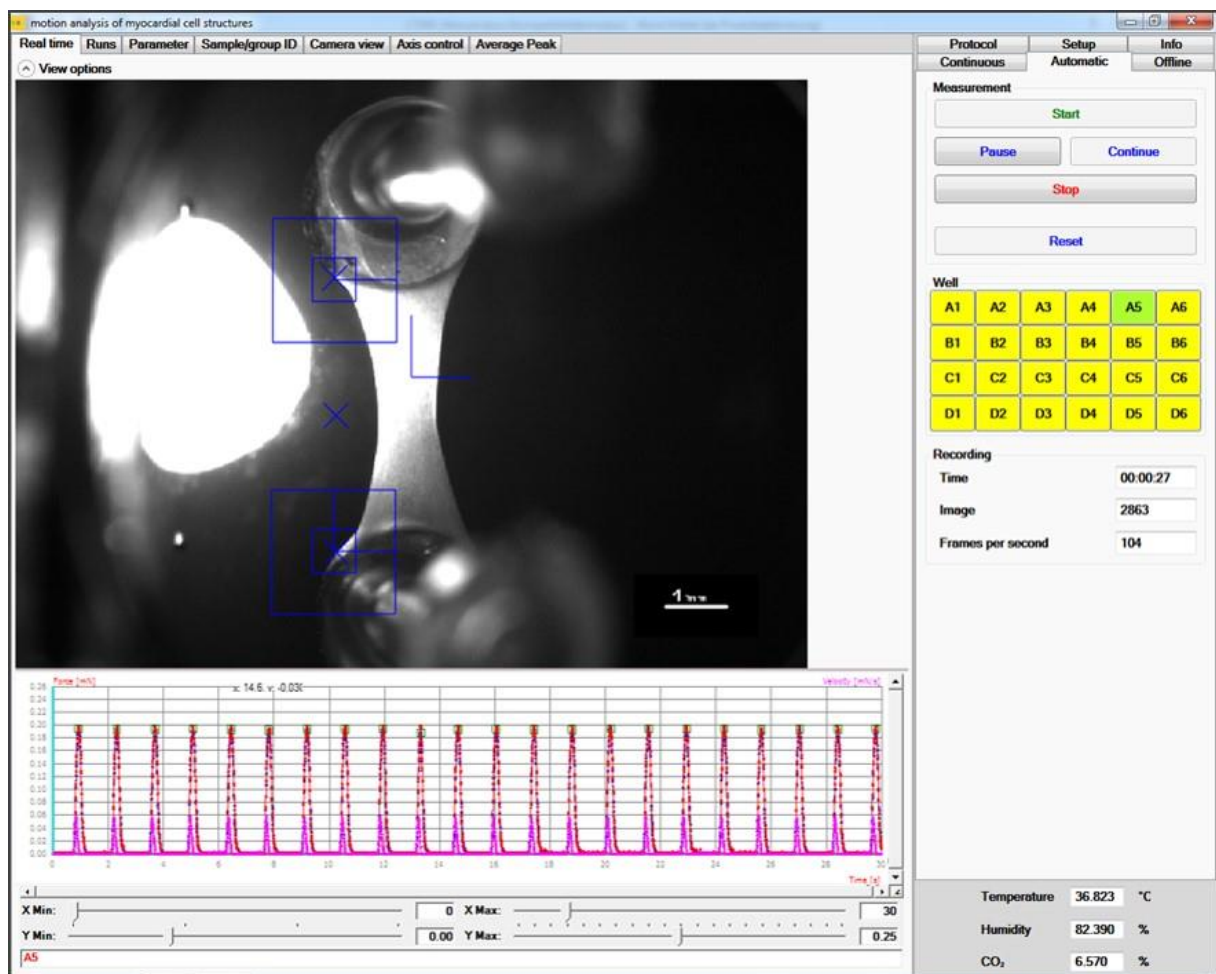


Abbildung 2.5: Screenshot der Software während der Kontraktionsanalyse. Gezeigt ist das durch die Kamera aufgenommene Bild eines Wells der Zellkulturschale mit einem EHT in der Aufsicht. Die blauen Quadrate kennzeichnen die Messpunkte, die durch die Software gesetzt wurden. Darunter ist das aufgezeichnete Kontraktionsmuster der Messung zu sehen. Dabei ist die Kraft in Millinewton gegen die Zeit in Sekunden aufgetragen.

2.7 Hypertrophe Interventionen

In dieser Arbeit wurde die Methode wie für Ratten-EHTs beschrieben nun bei humanen EHTs angewendet. Dafür wurde die Kontraktilität der EHTs ab dem Beginn kohärenter

Methoden

Kontraktionen, die etwa nach sieben bis zehn Tagen zu beobachten waren, drei Mal wöchentlich gemessen. Nach der anfänglichen Kraftzunahme erreichten die EHTs etwa nach 14-21 Tagen eine Plateauphase, in der sich die Kontraktionskräfte nur noch wenig veränderten. Zu Beginn dieser Phase wurde einmalig Medium mit nur 4% statt 10% Pferdeserum verwendet. Beim nächsten Medienwechsel wurde dann Serum-freies Medium verwendet, das mit Hydrocortison und Trijodthyronin supplementiert war (vgl. Tabelle 1). Unter diesen Serum-freien Bedingungen fand die mechanische Nachlasterhöhung statt, bei der über einen Zeitraum von einer Woche Metallklammern in die Silikonschläuche eingeführt werden, an denen die EHTs fixiert sind. Der Widerstand gegen den die EHTs kontrahierten war dadurch um das 12-fache höher als in Kontroll-EHTs (Abbildung 2.6).

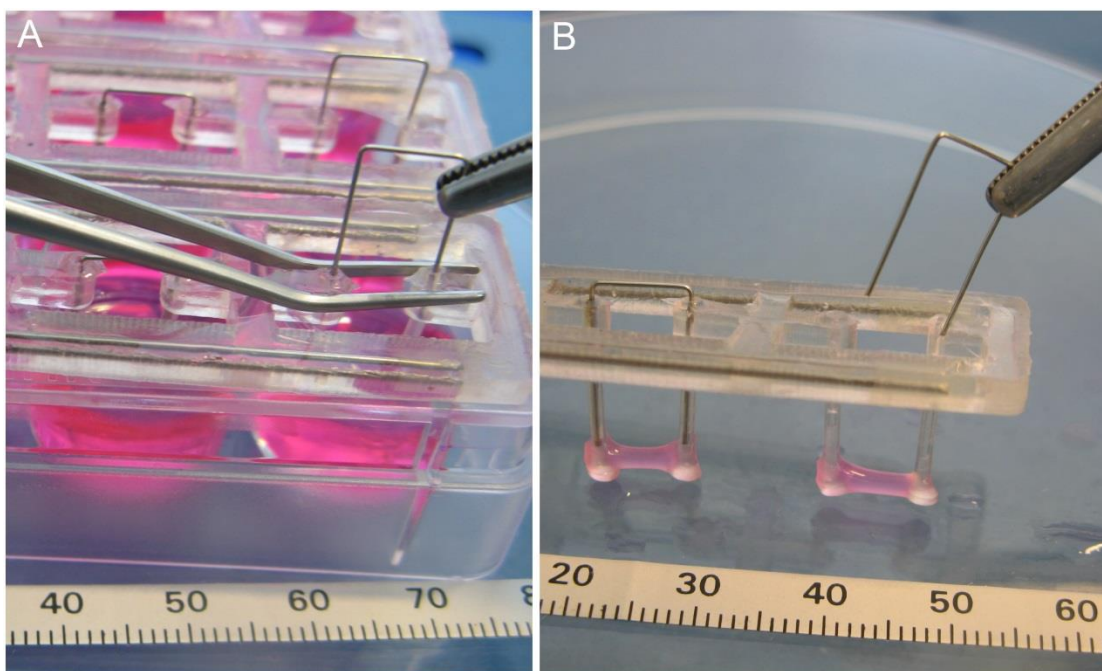


Abbildung 2.6: Erhöhung der Nachlast (*Afterload Enhancement*, AE). Gezeigt ist (A) das Einführen einer Metallklammer mit Hilfe von Pinzetten und (B) EHTs an der Silikonhalterung mit Nachlastverstärkung (links) und ohne (rechts).

Zum Vergleich zur Nachlasterhöhung wurde als weiterer hypertropher Stimulus Endothelin-1 (ET-1; 100 nM) über eine Woche ins EHT-Medium gegeben. Dafür wurde eine wässrige Stammlösung von ET-1 (100 μ M) angesetzt, bei - 80 °C gelagert und ein Aliquot davon für jeden Medienwechsel frisch aufgetaut. Während des Interventionszeitraums wurde das EHT-Medium täglich gewechselt. Am letzten Tag der Intervention wurden eine Stunde nach dem Medienwechsel die Metallklammern aus den Silikonschläuchen entfernt und nach weiteren 20 min die Kontraktilität der EHTs gemessen. Direkt im Anschluss an die Messung wurden die EHTs entweder in flüssigen Stickstoff eingefroren oder fixiert. Beim Einfrieren wurden die EHTs zunächst kurz in PBS gewaschen, dann der Teil des EHTs zwischen den

Methoden

Silikonschläuchen abgeschnitten, der der mechanischen Beanspruchung ausgesetzt war (s. Abbildung 2.7). Dieser wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und sofort schockgefroren. Die EHT Proben wurden dann bis zur RNA-Extraktion bei - 80 °C gelagert.

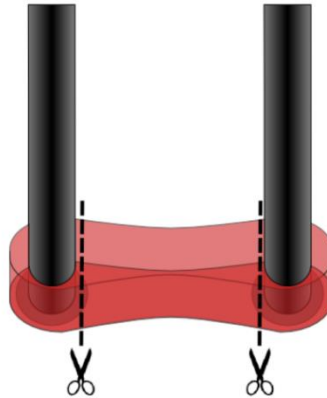


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Probengewinnung für das Einfrieren von EHTs.

2.8 RNA Präparation und quantitative *real time* PCR

Die folgenden molekularbiologischen Versuche wurden Großteils von der technischen Assistentin Jutta Starbatty durchgeführt.

Für die RNA-Extraktion aus EHTs wurde eine Kombination aus Trizol und einem Säulenbasierten Kit (*Split RNA Extraction Kit*, Lexogen) verwendet. Zuerst wurden Edelstahlkugeln zu den gefrorenen Proben in 350 µl Lysepuffer (*Split RNA Extraction Kit*, Lexogen) gegeben und das Gewebe 2 min bei 30 Hz im Tissue Lyser homogenisiert. Die Kugeln wurden entfernt und die Ansätze in spezielle Reaktionsgefäße des Kits überführt, die ein Gel enthalten, das sich zwischen der wässrigen und organischen Phase sammelt und damit eine bessere Trennung der beiden Phasen ermöglicht. Hierfür wurde aufgrund besserer RNA Ausbeuten Trizol anstelle von Phenol verwendet. Danach wurde die wässrige Phase wie vom Hersteller beschrieben mit Isopropanol versetzt, über die Siliziumoxidsäule aufgereinigt und mit 30 µl Puffer eluiert.

Um RNA aus Zellen in 2D-Kultur zu extrahieren, wie z.B. hiPS-Zellen, Endothelzellen oder Fibroblasten, wurde das *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen) verwendet. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 350 µl RLT-Puffer pro 6-Well lysiert. Um das Lysat zu homogenisieren, wurde es auf eine Qiashredder-Säule (Qiagen) gegeben und 1 min bei 16.000 g zentrifugiert (Tischzentrifuge 5415 R; Eppendorf). Die so gewonnenen Zelllysate wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei - 80 °C gelagert. Für die Isolation der RNA wurden die Lysate aufgetaut und das Säulen-basierte

Methoden

RNeasy Plus Mini Kit wie vom Hersteller beschrieben verwendet. Am Ende wurde die RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte in beiden Fällen über die Fluoreszenz-basierte Methode des *Qubit RNA Broad Range Assay Kit* und dem Qubit 3 Fluorometer (Invitrogen). Für die Messung wurden 2 µl der RNA-Lösung eingesetzt und das Volumen gegebenenfalls angepasst, falls die Konzentration außerhalb des Detektionsbereichs lag.

Die isolierte RNA wurde in einer reversen Transkription (RT) in komplementäre DNA (*complementary* DNA, cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) und *random* RT-Primer (Applied Biosystems) verwendet. Alle Schritte wurden gemäß Herstellerangaben vollzogen und der PCR-Ansatz wurde wie in Tabelle 5 pipettiert. Nach dem in Tabelle 6 zusammengefassten PCR-Programm lag die cDNA in 25 µl Reaktionsgemisch gelöst vor.

Tabelle 5: Reaktionsansatz der reversen Transkription

Komponente	Volumen pro Reaktion [µl]
10x RT Puffer	2,5
25x dNTP Mix	1,0
10x <i>random</i> RT-Primer	2,5
OneStep RT-PCR Enzyme	1,0
RNA	300 ng
Nuklease-freies Wasser	<i>ad 25</i>

Tabelle 6: Ablauf der reversen Transkription

Zeit	Temperatur	Beschreibung
10 min	25 °C	Initiation
120 min	37 °C	Reverse Transkription
5 min	85 °C	Denaturierung
--	4 °C	Programmende

Die anschließende quantitative *real time* PCR (*quantitative real time polymerase chain reaction*; qPCR) wurde mit einem *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems) laut Herstellerhandbuch durchgeführt. Die Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit beruhte auf der Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes (*EvaGreen*; Solis Biodyne; verwendet nach Herstellerempfehlung), welcher in doppelsträngige DNA interkaliert. Als interner Standard für die qPCR wurde aufgrund der sehr geringen Expressionsschwankungen die mRNA von β -Glucuronidase (GUSB) verwendet. Die cDNA

Methoden

aus der RT-PCR wurde 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt in der qPCR eingesetzt, deren Reaktionsgemisch in Tabelle 7 und der Ablauf in Tabelle 8 zu sehen ist.

Tabelle 7: Reaktionsansatz der qPCR

Komponente	Volumen pro Reaktion [μ l]
<i>Eva Green</i> Master Mix	2,0
<i>forward/reverse</i> Primer-Mix	0,5
cDNA	2,0
Nuklease-freies Wasser	5,5

Tabelle 8: Ablauf der qPCR

Zyklen	Zeit	Temperatur	Beschreibung
1	2 min 10 min	50 °C 95 °C	Initialisierung der Polymerase
40	15 s 1 min	95 °C 60 °C	Denaturierung Primeranlagerung, Elongation
1	15 s 15 s 15 s	95° C 60 °C 95 °C	Dissoziationsphase

Die für alle Proben und interne Standards gleiche Menge an cDNA ermöglichte eine sichere Quantifizierung der Expressionssignale. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung analysiert und die Transkript-Menge über den Vergleich der Ct-Werte unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel bestimmt. Die Ct-Werte des internen Standards wurden von den Ct-Werten der zu bestimmenden RNA subtrahiert (ΔCt). Der Mittelwert der ΔCt -Werte der Kontrollgruppe wurde wiederum von jedem einzelnen ΔCt -Wert der Interventionsgruppe abgezogen, wodurch die $\Delta\Delta Ct$ -Werte berechnet werden konnten. Die Anwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel zeigte nun den relativen Transkript-Gehalt, also die mRNA Konzentration in Bezug auf die Kontrolle an.

2.9 Histologie

Die EHTs für histologische Untersuchungen wurden nach der Kontraktionsanalyse mit PBS gewaschen und dann mit 4% Histofix über Nacht bei 4 °C an den Silikonhalterungen fixiert. Im Anschluss wurden sie vorsichtig mit einer Pinzette von den Silikonstäben entfernt und in TBS überführt. Zur besseren Ausrichtung bei der Einbettung in Paraffin wurden EHTs, die quer geschnitten werden sollten vorher in 4%-iger Agarose eingebettet. Entwässerung, Einbetten in Paraffin und die Färbungen wurden von Kristin Hartmann aus der HEXT Mauspathologie-Facility durchgeführt.

2.9.1 Histologische Färbungen

Zuerst wurden alle Schnitte im Wärmeschrank in Xylol für jeweils 20 min entparaffiniert und anschließend durch die aufsteigende Ethanol-Reihe gezogen.

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgte durch eine vierminütige Inkubation in Hämatoxylin nach Harris. Durch kurzes Abspülen mit 1%iger Salzsäurelösung wurde der pH-Wert erniedrigt und dann für zwei Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Schnitte wurden für 20 s mit einer 1%igen Eosinlösung gefärbt und nach dreimaligem Eintauchen in 100% Ethanol und zweimaligem Eintauchen in Xylol mit Mounting-Medium (Tissue Tec) und einem Deckgläschen auf dem Objektträger fixiert.

Bei der Masson-Goldner-Trichrom Färbung erfolgte die Entparaffinierung nur bis 80% Ethanol, dann wurden die Schnitte für fünf Minuten mit Eisenhämatoxylin nach Weigert inkubiert. Als nächstes wurden sie kurz in Leitungswasser gespült, mit HCl-Ethanol differenziert und für fünf Minuten gewässert. Im Anschluss wurde für sieben Minuten mit Masson Goldner-Lösung, für drei Minuten mit Phosphormolybdänsäure-Orange und für fünf Minuten mit Lichtgrün gefärbt. Zwischen den drei Färbeschritten und danach wurden die Schnitte jeweils mit 1%iger Essigsäure gespült. Abschließend wurden sie in 96% und 100% Ethanol dehydriert, in Xylol getaucht und eingedeckelt.

Für die Pikro-Siriusrot-Färbung wurden die Schnitte für 60 Minuten in Sirius-Rot-Lösung inkubiert, anschließend in HCl-Wasser für fünf Sekunden differenziert und dann sofort in 100% Ethanol abgespült, in Xylol getaucht und eingedeckelt.

2.9.2 Immunhistochemie

Die Optimierung der Demaskierungs- und Antikörperbedingungen sowie die immunhistologischen Färbungen erfolgten mit der Ventana BenchMark XT (Roche), einem Vollautomaten für histologische Färbungen. Die Antigendemaskierung erfolgte für 60 min in EDTA-Puffer bei pH 8,0. Alle in Tabelle 9 zusammengefassten Antikörper wurden mit dem auf Multimer-Technologie basierten *UltraView Universal DAB Detection Kit* (Roche) visualisiert.

Tabelle 9: Antikörper für Immunhistochemie und deren eingesetzte Verdünnung

Antigen	Antikörper (Hersteller)	Verdünnung
Dystrophin	MAB1645 (Merck)	1:200
ANP	sc-80686 (Santa Cruz)	1:500
Kollagen-I	Ab138492 (Abcam)	1:1500

2.9.3 Auswertung der Immunhistochemie

Die Bestimmung der Kardiomyozytenquerschnittsflächen erfolgte an Dystrophin-gefärbten EHT-Querschnitten. Die dafür benötigten Aufnahmen der Schnitte wurden mit einem Leica DMD108 Mikroskop unter Verwendung des 40x oder 10x Objektivs gemacht. Anschließend wurden diese unter verblindeten Bedingungen manuell mit der FIJI Software (ImageJ) ausgewertet. Dazu wurden 40-50 Dystrophin-positive Zellen pro Bild entlang der gefärbten Zellmembran umrandet und die Querschnittsfläche unter Zuhilfenahme des Maßstabsbalkens von der Software berechnet.

Die ANP-Expression in EHTs wurde entweder auf mRNA-Ebene mittels qPCR oder auf Protein-Ebene mittels Immunhistochemie untersucht. Für letztere wurden die ANP-gefärbten EHT-Querschnitte zuerst mit dem Leica DMD108 Mikroskop unter Verwendung des 10x Objektivs fotografiert. Anschließend wurden diese unter verblindeten Bedingungen mit der FIJI Software (ImageJ) ausgewertet. Dazu wurde ein Farbgrenzwert festgelegt, bei dem alle ANP-positiven Bereiche markiert waren (Rot 191, Grün 225, Blau 135) und die entsprechende Fläche von der Software berechnet. Dann wurde das ganze EHT manuell umrandet, die Querschnittsfläche berechnet und die Fläche der ANP-positiven Zellen dazu in Relation gesetzt.

Genau wie bei der ANP-Färbung wurden die für Kollagen-I-gefärbten EHT-Längsschnitte fotografiert und mit der FIJI Software analysiert. Die Kollagen-I-positiven Bereiche wurden ebenfalls mit Hilfe eines festgelegten Farbgrenzwerts bestimmt (Rot 186, Grün 113, Blau 136).

2.10 Durchflusszytometrie

Für die Auswertung der Selektionseffizienz wurden die lentiviral transduzierten hiPS-Zellen für 10 min mit EDTA dissoziiert, dann für 5 min bei 200 g zentrifugiert und in FACS-Puffer aufgenommen.

Für die Analyse der Zellzusammensetzung multizellulärer EHTs wurden diese entweder mit PBS gewaschen und dann für 1,5 Stunden bei 37 °C mit 2,0 ml Kollagenase-II inkubiert und dabei alle 10-15 min mit einer 1000 µl-Pipette (Eppendorf) vorsichtig auf und ab pipettiert. Wenn sich das EHT aufgelöst hatte wurde die Reaktion mit DMEM mit DNase (6 µl pro ml) abgestoppt und die Zellen für 10 min bei 100 g zentrifugiert und in FACS-Puffer aufgenommen.

Alternativ wurden die EHTs mit Papain dissoziiert. Dafür wurden sie ebenfalls in PBS gewaschen und dann für ca. 20 min bei 37 °C in der Papain-Lösung inkubiert. Wenn das EHT fast aufgelöst war wurden die Zellen mit einer 1000 µl-Pipette (Eppendorf) vorsichtig auf und

Methoden

ab pipettiert und die Reaktion mit HBSS inkl. 10% FCS abgestoppt. Wie bei der Dissoziation mit Kollagenase-II wurden die Zellen für 10 min bei 100 g zentrifugiert und danach in FACS-Puffer aufgenommen.

Die Analysen wurden unter Anleitung von Kristoffer Riecken oder Justus Stenzig an einem LSR Fortessa Durchflusszytometer durchgeführt und die Daten wurden mit der BD FACSDiva Software 6.0 ausgewertet.

2.11 Konfokale Mikroskopie

Die Verteilung und Struktur der vier unterschiedlichen Zelltypen in multizellulären EHTs wurde mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 800 (Zeiss) untersucht.

Die EHTs wurden dafür 10 min lang mit 30 mM 2,3-Butandionmonoxim (BDM) inkubiert und dann in relaxiertem Zustand vorsichtig mit einer Pinzette von der Silikonhalterung abgezogen und mit einem Tropfen Phenolrot-freiem DMEM in die Vertiefung eines Objektträgers überführt. Die lebenden EHTs wurden nicht eingebettet, das Deckgläschen war nur über Adhäsion mit dem Objektträger verbunden. Wenn die EHTs fixiert wurden, geschah dies über Nacht bei 4 °C in 4% Histofix. Abschließend wurden die EHTs ebenfalls auf einen Objektträger mit Vertiefung überführt und mit Fluoromount-G eingebettet.

Die Anregungs- bzw. Emissionsmaxima der vier Fluorochrome, sowie der jeweils verwendete Laser des Mikroskops sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Abbildung 2.8 zeigt die vollständigen Anregungs- und Emissionsspektren, woraus unter anderem hervorgeht, dass mOrange2 und dKatuska2 aufgrund der weit auseinander liegenden Emissionsspektren mit dem gleichen Laser angeregt und trotzdem getrennt voneinander detektiert werden können.

Tabelle 10: Spektrale Eigenschaften der Fluorochrome und die dafür gewählten Laser am LSM 800

Fluorochrom	Anregung [nm]	Emission [nm]	Laser [nm]
mTag BFP	399	456	405
Venus	515	528	488
mOrange2	549	565	561
dKatuska2	588	633	561

Methoden

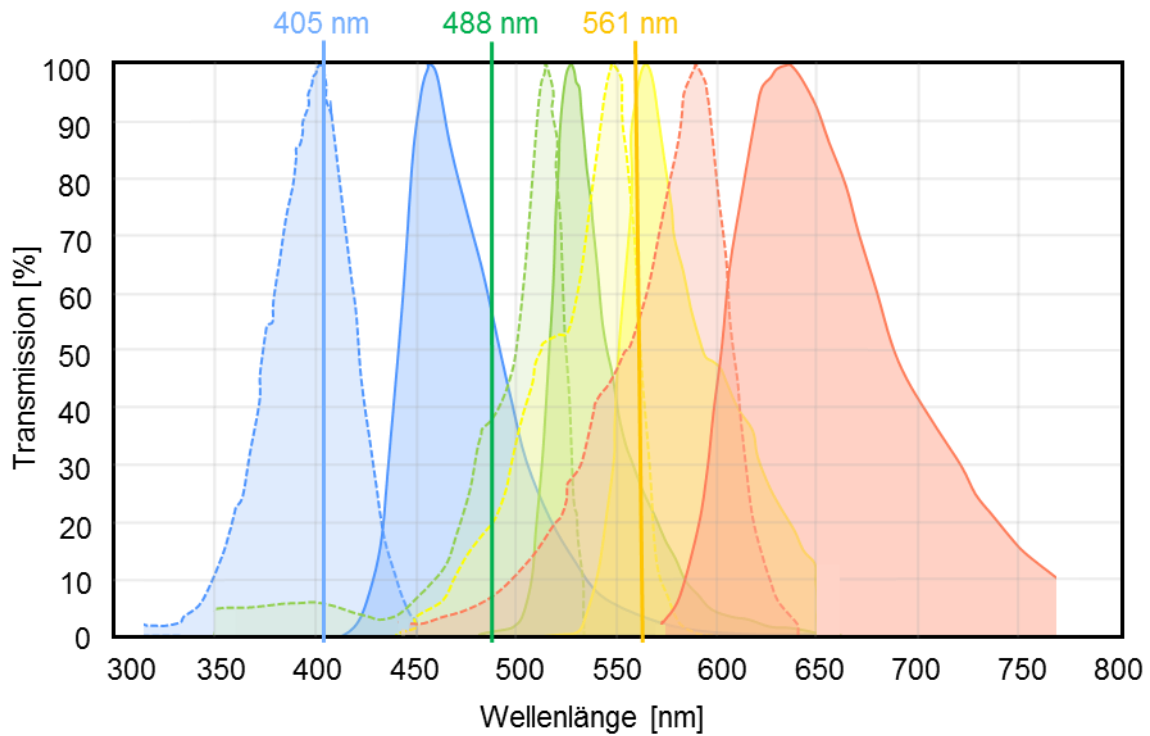


Abbildung 2.8: Anregungs- (gestrichelte Linien) und Emissionsspektren (durchgezogene Linien) von mTagBFP (blau), Venus (grün), mOrange2 (gelb) und dKatushka2 (rot). Als vertikale Linien eingezeichnet sind die zur Anregung verwendeten Laser des konfokalen Mikroskops (vgl. Tabelle 10).

Die Aufnahmen wurden mit möglichst geringer Laserintensität und optimalen Einstellungen mit Hilfe des Airyscan-Detektors aufgenommen. Die Besonderheit dieses in Abbildung 2.9 schematisch dargestellten Array-Detektors besteht darin, dass sich jedes der 32 Detektorelemente wie ein der Airyeinheit untergeordnetes Pinhole verhält, so dass das konfokale Pinhole geöffnet bleiben kann und eine optimale Kombination aus Auflösung und Lichteffizienz erreicht wird.

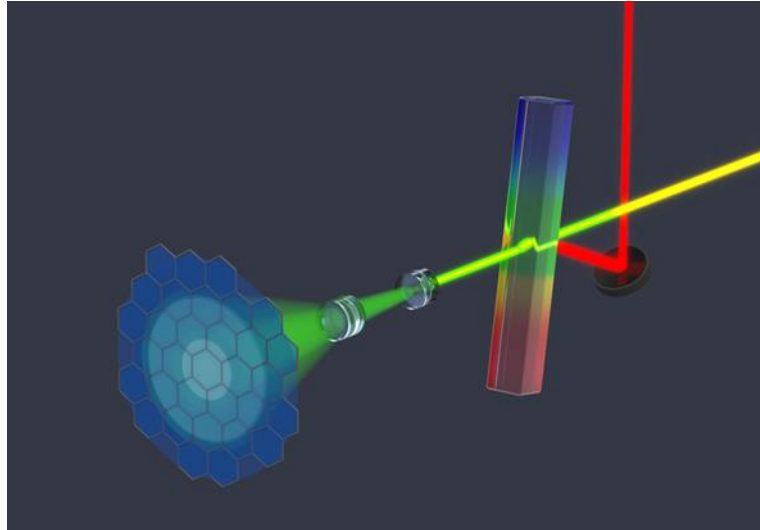


Abbildung 2.9: Schematischer Strahlengang des Airyscan-Detektors

2.12 Statistik

Alle Daten wurden mit der GraphPad Prism 6 Software ausgewertet und sind als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (*Standard Error of the Mean*; SEM) präsentiert. Die n-Zahl bezieht sich auf die Anzahl der EHTs oder der Einzelversuche/-proben. Als statistische Analyse für ungepaarte Vergleiche zweier Versuchsgruppen wurden *Student's t-Tests* und für mehr als zwei Versuchsgruppen, *One-Way-ANOVA* mit anschließenden *Dunnett's-Multiple-Comparison-* oder *Bonferroni's-Multiple-Comparison-Tests* durchgeführt. P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant bewertet. In den Abbildungen wird das Signifikanzniveau in Form von Sternchen angezeigt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$), nicht signifikante Ergebnisse wurden mit der Abkürzung ‚ns‘ gekennzeichnet.

Für die statistische Auswertung der Experimente zur Zellmigration von Fibroblasten und glatten Muskelzellen (Kapitel 3.6.4) und zur Morphologie multizellulärer EHTs (Kapitel 3.7.4) wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*Two-Way-ANOVA*) durchgeführt, weil dabei nicht nur Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, sondern auch Veränderungen über die Zeit in Betracht gezogen werden mussten. Wenn der Datensatz vollständig war und keine Werte fehlten, konnte eine zweifaktorielle Varianzanalyse für wiederholte Messungen durchgeführt werden. Es wurden die Varianzen für die einzelnen Faktoren und die Varianz der Wechselwirkung beider Faktoren berechnet und die Ergebnisse als Tabelle zusammengefasst.

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in zwei Abschnitte, deren Organisation in Abbildung 3.1 dargestellt ist. Im ersten Teil wurden aus C25 oder ERC018-Kardiomyozyten unizelluläre EHTs hergestellt und diese unter Kontrollbedingungen, Nachlasterhöhung und ET-1-Behandlung analysiert. Danach wurden bizelluläre EHTs aus Kardiomyozyten und Fibroblasten hergestellt und den gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt. Für den zweiten Teil wurden ERC018-hiPS-Zellen lentiviral mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen transduziert und aus diesen Kardiomyozyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten differenziert. Die verschiedenen Zellen wurden charakterisiert und zur Herstellung multizellulärer EHTs verwendet.

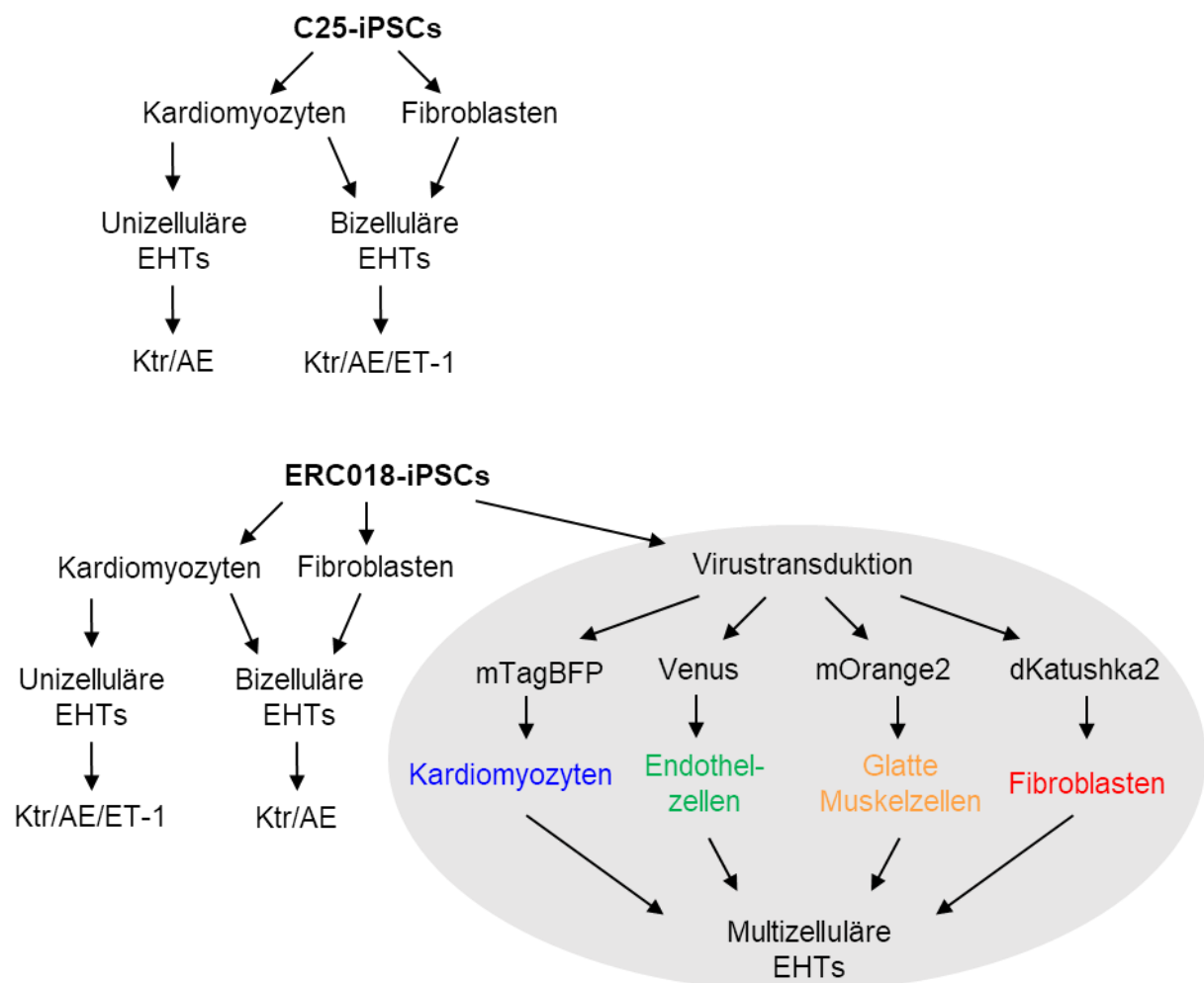


Abbildung 3.1: Übersicht zu den im Ergebnisteil vorkommenden Zelllinien, Differenzierungen und Art der hergestellten EHTs.

3.1 Nachlasterhöhung und ET-1-Behandlung in unizellulären EHTs

Zu Beginn des Projekts wurde das für Ratten-EHTs entwickelte Versuchsprotokoll von Hirt et al. (2012) so genau wie möglich auf humane EHTs übertragen. Der Serumentzug und die

Ergebnisse

hypertrophe Intervention wurden wie beschrieben durchgeführt, nur der Zeitpunkt der Intervention wurde variabel an die Kraftentwicklung der EHTs angepasst, so dass die Versuche möglichst während der stabilen Plateauphase stattfanden.

3.1.1 Nachlasterhöhung in C25-EHTs

Vergleichbar zu Ratten-EHTs zeigten unizelluläre EHTs der Zelllinie C25 nach einwöchiger Nachlastverstärkung (AE) geringere Kontraktionskräfte als die unbehandelten Zeitkontrollen (Ktr). Die Relaxationszeit unterschied sich nicht zwischen den beiden Gruppen, im Gegensatz zu Ratten-EHTs verursachte die Intervention bei C25-EHTs also keine verlangsamte Relaxation (s. Abbildung 3.2).

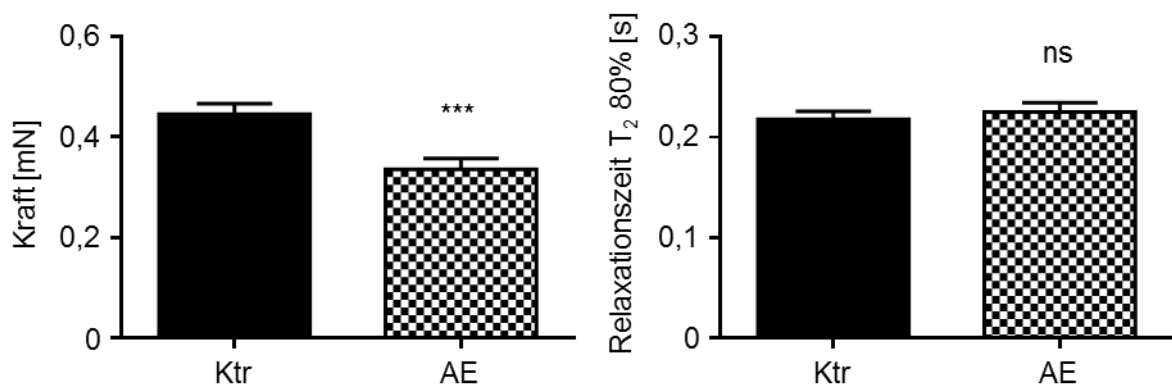


Abbildung 3.2: Kontraktionskraft und Relaxationszeit von C25-EHTs nach einer Woche Nachlasterhöhung (AE) verglichen mit unbehandelten Zeitkontrollen (Ktr). Sieben unabhängige Versuche, n=35-47 pro Gruppe, *Student's t-test*, ***p<0,001.

Neben der Kontraktilität der EHTs wurde auch die Kardiomyozytenhypertrophie untersucht, wofür, wie in Abbildung 3.3 zu sehen ist, EHT-Querschnitte immunhistochemisch für Dystrophin gefärbt und daraus die Querschnittsflächen der Kardiomyozyten manuell bestimmt wurden. Hierbei ergab sich kein Unterschied zwischen Nachlast-erhöhten- und Kontroll-EHTs.

Ergebnisse

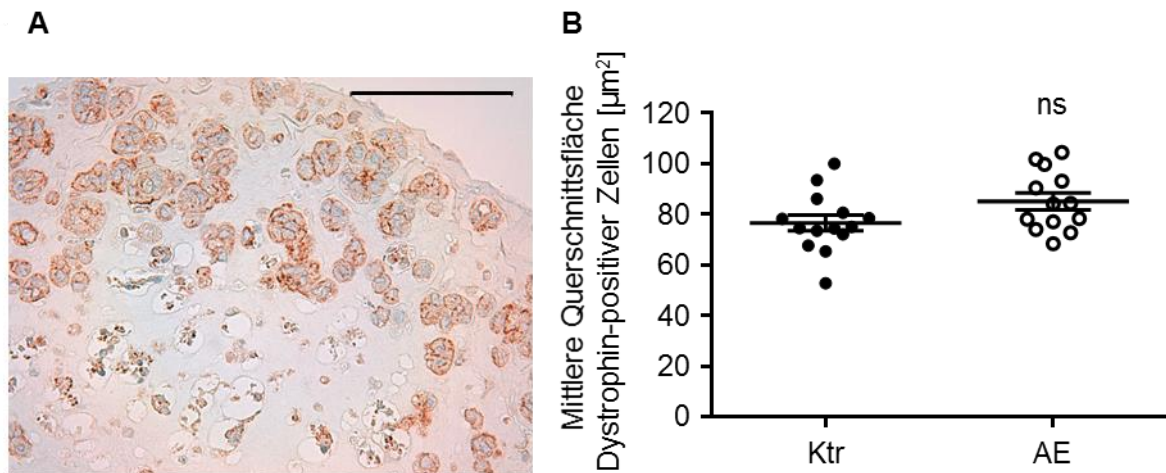


Abbildung 3.3: Bestimmung der Kardiomyozytengröße an Hand von Dystrophin-gefärbten C25-EHT Querschnitten. Repräsentatives Foto der Dystrophin-Immunhistochemie; der Maßstabsbalken entspricht 100 μm (A). Ergebnisse der manuellen Evaluation der Kardiomyozytenquerschnittsflächen; zwei unabhängige Versuche, $n=13-14$ EHTs pro Gruppe, *Student's t-test* (B).

Als Indikatoren für die Hochregulation des fetalen Genprogramms beziehungsweise für fibrotische Veränderungen wurde die Genexpression von ANP und Kollagen-I (COL1A1) gemessen (s. Abbildung 3.4). Während ANP in Kontroll- und AE-EHTs in etwa gleich stark exprimiert wurde, war die Expression von COL1A1 in AE-EHTs niedriger als in der Kontrolle. Mit Ct-Werten von teilweise über 30 war das Expressionsniveau von Kollagen-I jedoch insgesamt sehr niedrig.

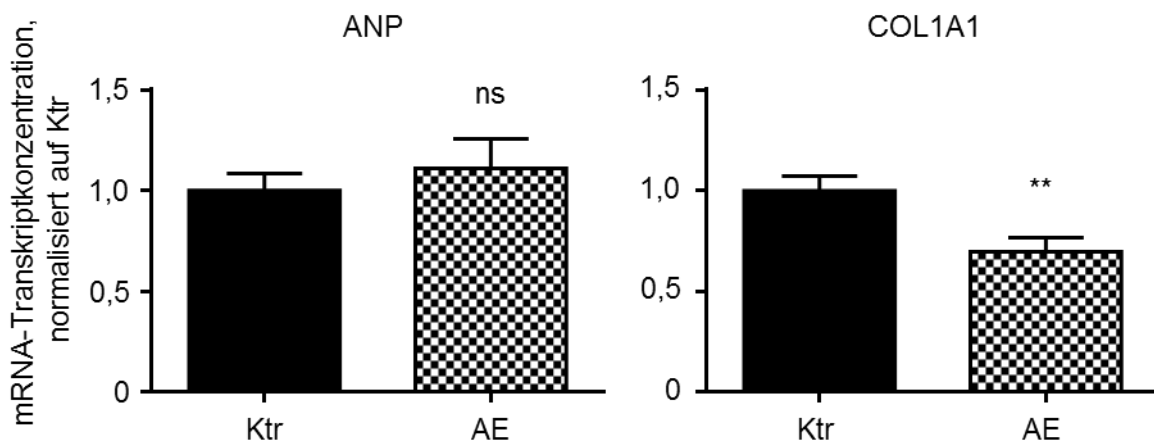


Abbildung 3.4: RT-qPCR von Nachlasterhöhten C25-EHTs, normalisiert auf die Kontrolle. Zu sehen sind die relativen Transkriptkonzentrationen von ANP (NPPA) und COL1A1 aus zwei unabhängigen Versuche, $n=8$ EHTs pro Gruppe, *Student's t-test*, $**p<0,01$.

Fasst man die Daten für die Nachlastverstärkung in unizellulären C25-EHTs zusammen, ergaben sich keine hypertrophen oder fibrotischen Veränderungen. AE-EHTs zeigten zwar geringere Kontraktionskräfte als die Kontrollen, die Relaxationszeit, die Kardiomyozytengröße

Ergebnisse

und die Expression von ANP waren jedoch unverändert, die Expression der Alpha-1-Kette von Kollagen-I sogar vermindert.

3.1.2 Nachlasterhöhung und ET-1-Behandlung in ERC018-EHTs

Als Nächstes wurden die Auswirkungen der Nachlastverstärkung in unizellulären EHTs der Zelllinie ERC018 untersucht und die Behandlung der EHTs mit ET-1 als weitere Versuchsgruppe hinzugefügt. In Ratten-EHTs resultierte die ET-1-Behandlung in einem ähnlichen hypertrophen Phänotyp wie die Nachlastverstärkung und wurde deshalb als Kontrollgruppe verwendet (s. Abbildung 1.2).

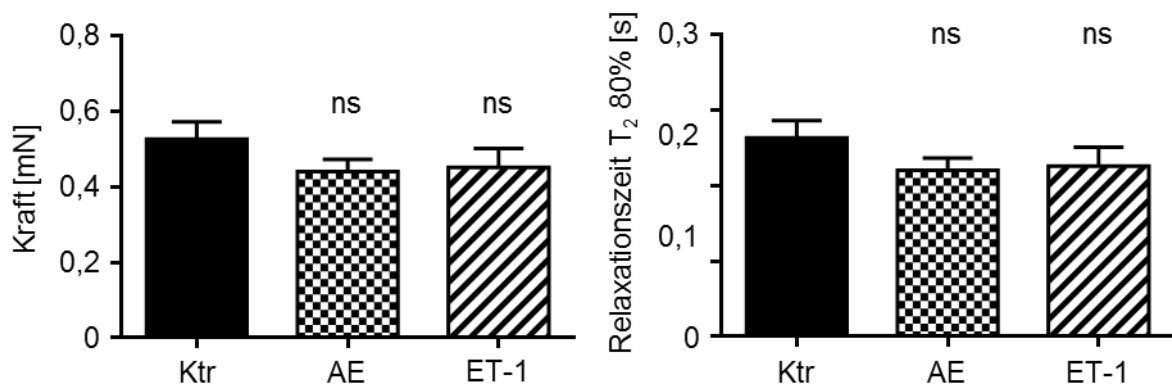


Abbildung 3.5: Kontraktionskraft und Relaxationszeit von ERC018-EHTs nach einer Woche Nachlastverstärkung (AE) bzw. Behandlung mit ET-1 verglichen mit unbehandelten Zeitkontrollen (Ktr). Vier unabhängige Versuche, n=21-23 EHTs pro Gruppe, *One-Way-ANOVA* mit *Dunnett's-Multiple-Comparison-Test*.

Die in Abbildung 3.5 dargestellten Daten der video-optischen Kontraktionsmessung von ERC018-EHTs ergaben, dass beide Interventionsgruppen (AE und ET-1) tendenziell, aber nicht signifikant niedrigere Kontraktionskräfte aufwiesen als die Kontroll-EHTs. Die Relaxationszeiten der drei Gruppen unterschieden sich nicht, waren insgesamt aber länger als bei C25-EHTs (*Student's t-test*, * $p < 0.05$).

Die Querschnittsflächen der Kardiomyozyten in AE- und ET-1-EHTs unterschieden sich nicht von Kontroll-EHTs (s. Abbildung 3.6). Im Vergleich der beiden Zelllinien sind die Querschnitte von ERC018-Kardiomyozyten in Kontroll-EHTs mit durchschnittlich $120 \mu\text{m}^2$ aber größer als C25-Kardiomyozyten mit $80 \mu\text{m}^2$ (*Student's t-test*, ** $p < 0.01$).

Ergebnisse

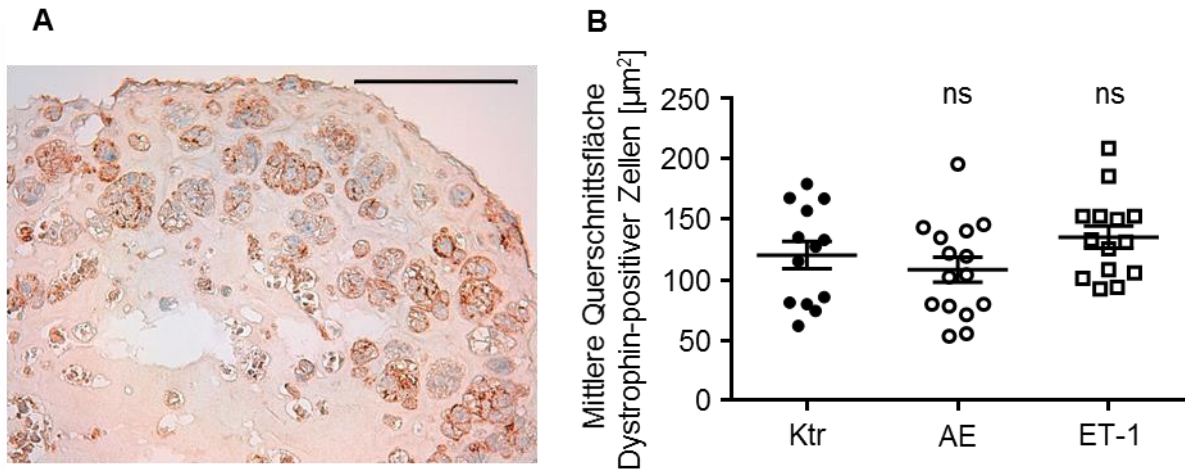


Abbildung 3.6: Bestimmung der Kardiomyozytengröße anhand von Dystrophin-gefärbten ERC018-EHT Querschnitten. Repräsentatives Foto der Dystrophin-Immunhistochemie; der Maßstabsbalken entspricht 100 µm (A). Ergebnisse der manuellen Evaluation der Kardiomyozytenquerschnittsflächen; drei unabhängige Versuche, n=13-15 EHTs pro Gruppe, *One-Way-ANOVA* mit *Dunnett's-Multiple-Comparison-Test* (B).

Auch in der Analyse der Genexpression von ANP und COL1A1 konnte keine Regulation der beiden Gene unter den gegebenen Versuchsbedingungen festgestellt werden. Die tendenziell erhöhte Expression von Kollagen-I in EHTs nach ET-1-Behandlung ist statistisch nicht signifikant (s. Abbildung 3.7).

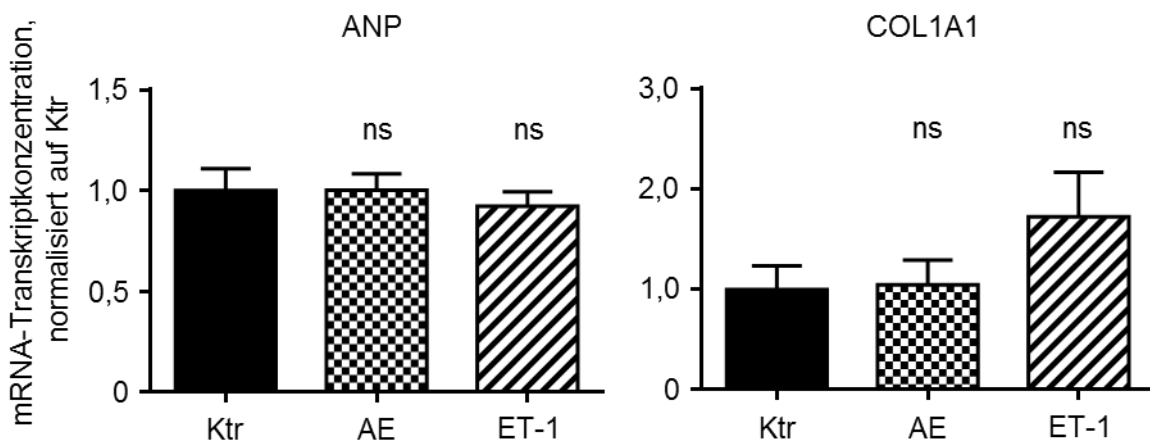


Abbildung 3.7: RT-qPCR von AE- und ET-1-behandelten ERC018-EHTs, normalisiert auf die Kontrolle. Zu sehen sind die relativen Transkriptkonzentrationen von ANP (NPPA) und COL1A1, n=5 EHTs pro Gruppe, *One-Way-ANOVA* mit *Dunnett's-Multiple-Comparison-Test*.

Aus den bisher gezeigten Daten geht einerseits hervor, dass es in humanen EHTs Zelllinien-spezifische Unterschiede gibt. Andererseits konnte in unizellulären EHTs aus den beiden hier verwendeten hiPS-Linien gesunder Probanden, C25 und ERC018, durch Erhöhung der Nachlast keine Hypertrophie hervorgerufen werden. Die Stimulation von ERC-018 EHTs mit ET-1 resultierte ebenfalls nicht in einem hypertrophen Phänotyp. In weiteren Versuchen (s. Anhang: Zusätzliche Abbildung 1 und zusätzliche Abbildung 2) wurden ERC018-EHTs mit

Ergebnisse

20 μ M Phenylephrin (PE) oder einer Kombination von AE und ET-1 behandelt. Bei beiden Versuchen waren die Kontraktionskräfte der Kontroll-EHTs während des Interventionszeitraums nicht konstant, sondern nahmen zu, was die Interpretation der funktionellen Ergebnisse erschwert. Die in der zusätzlichen Abbildung 1 sichtbare kontraktile Dysfunktion der mit ET-1-behandelten EHTs war nicht reproduzierbar (vgl. Abbildung 3.5 oder im Anhang zusätzliche Abbildung 2). Die Messung der Zellgrößen ergab jedoch eindeutig, dass die EHTs auch unter diesen Interventionen keine Hypertrophie zeigten.

3.2 Bizelluläre EHTs aus Kardiomyozyten und Fibroblasten

Da die Zellzusammensetzung ein zentraler Aspekt ist, der Unterschiede zwischen Ratten- und humanen EHTs erklären könnte, wurde der Einfluss von Fibroblasten im humanen EHT-Modell untersucht. Dazu wurden je 5% bzw. 10% primäre humane kardiale, primäre humane dermale oder murine embryonale 3T3-Fibroblasten zu C25-Kardiomyozyten gegeben und aus den verschiedenen Mischungen bizelluläre EHTs hergestellt.

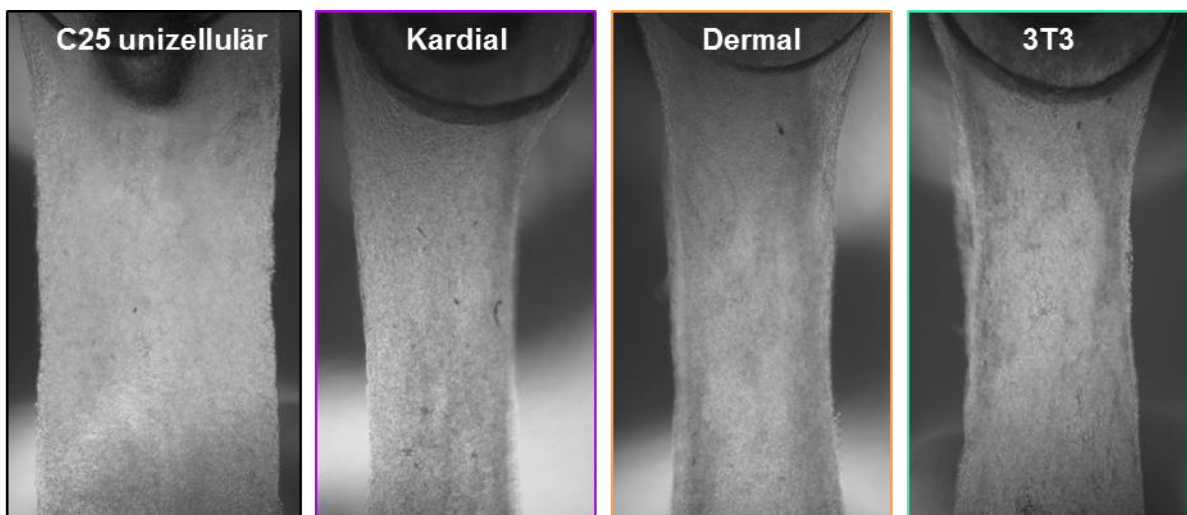


Abbildung 3.8: Repräsentative EHT-Fotos zwei Tage nach der Herstellung. Von links nach rechts sieht man eine unizelluläre Kontrolle, dann je ein EHT mit 5% kardialen, dermalen und 3T3-Fibroblasten.

Bereits zwei Tage nach der Herstellung dieser EHTs konnten eindrucksvolle morphologische Unterschiede zwischen EHTs mit zugesetzten Fibroblasten zu Kontroll-EHTs beobachtet werden. Abbildung 3.8 zeigt beispielhaft vier unterschiedliche Konditionen, wobei das unizelluläre Kontroll-EHT noch die Quader-förmige Struktur der Gussform erkennen lässt. Im Gegensatz dazu sieht man bei den drei EHTs mit 5% Fibroblastenanteil schon die konkave Form, die durch den Abbau der Fibrinmatrix entsteht. Die verschiedenen Typen von Fibroblasten hatten dabei keinen besonderen Einfluss in dieser frühen Zellkulturphase, lediglich der Unterschied im Vergleich zu den Kontroll-EHTs war optisch eindeutig nachvollziehbar. Die Menge an Fibroblasten, also ob 5% oder 10% verwendet wurden ließ

Ergebnisse

keine morphologischen Unterschiede erkennen (Daten nicht abgebildet) und höhere Fibroblastenanteile wurden nicht untersucht.

In Abbildung 3.9 ist die Kraftentwicklung der EHTs über die Zeit unter basalen Bedingungen gezeigt. Während alle Gruppen mit Fibroblasten früher kohärent zu kontrahieren begannen als die unizellulären Kontroll-EHTs, zeigte sich über die Zeit, dass sich nur die EHTs mit kardialen Fibroblasten tendenziell besser entwickelten als die Kontrollen. Die Zugabe von dermalen Fibroblasten resultierte zwischen Tag 5 und Tag 10 zwar in der schnellsten Kraftzunahme, danach stiegen die Kontraktionskräfte jedoch kaum noch an. Ab Tag 12 der EHT-Kultur unterschieden sich die Kräfte von EHTs mit dermalen und 3T3-Fibroblasten nicht mehr voneinander und auch der prozentuale Anteil, also ob 5% oder 10% Fibroblasten, machte keinen Unterschied. Alle vier Gruppen zeigten von Tag 18 an geringere Kontraktionskräfte als die Kontrollen. Während EHTs mit kardialen oder dermalen Fibroblasten am Ende des Versuchs langsamer relaxierten als die unizellulären Kontrollen, resultierte die Zugabe von 3T3 Fibroblasten nicht in einer Verlängerung der Relaxationszeiten (vgl. Abbildung 3.9 C). Stattdessen war diese im Verlauf der EHT-Kultur zeitweise sogar kürzer als bei den unizellulären EHTs und die Frequenz erhöht (s. Anhang: Zusätzliche Abbildung 3).

Ergebnisse

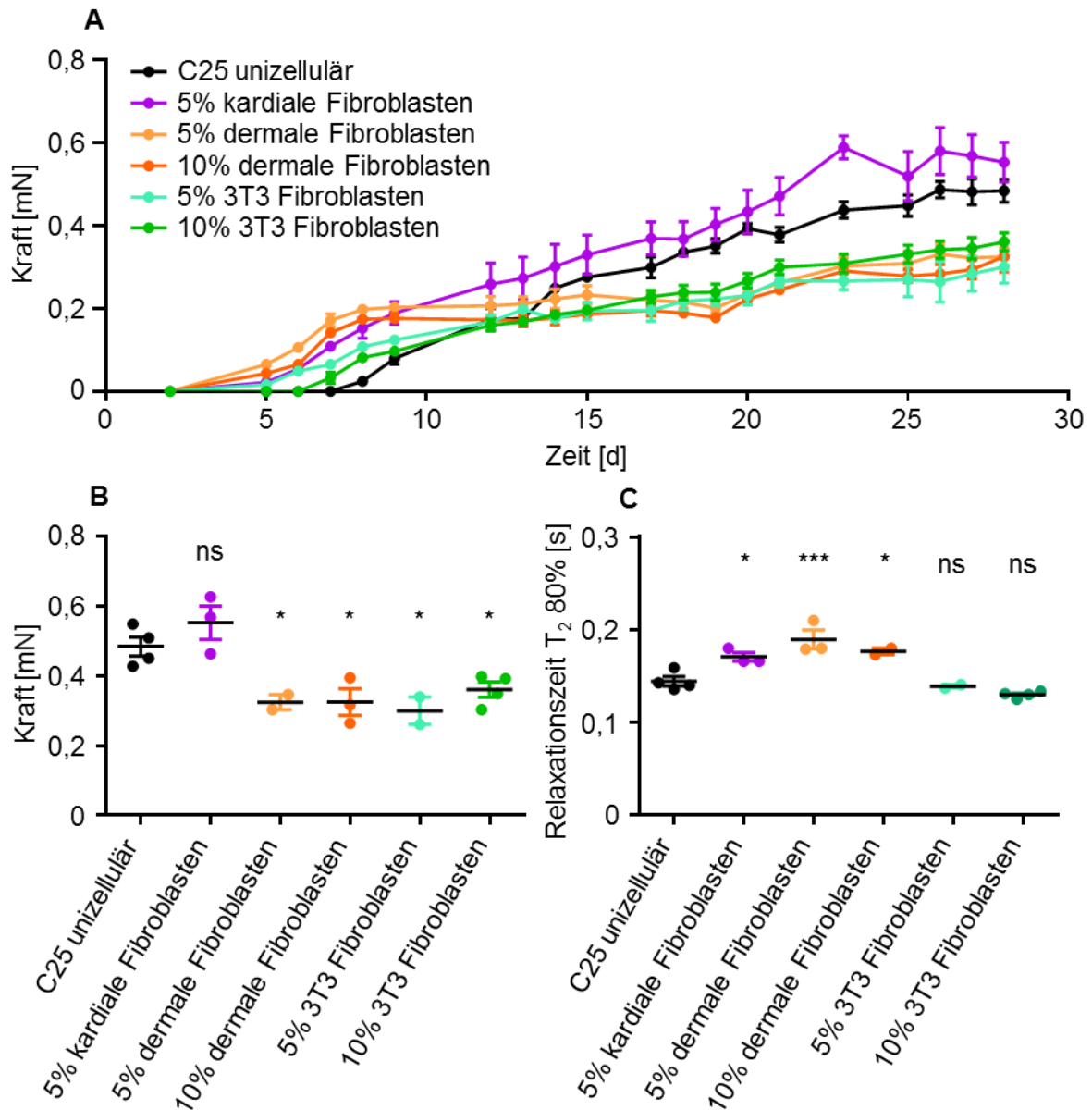


Abbildung 3.9: Kontraktionskraft von C25-EHTs mit verschiedenen Fibroblasten über die Kulturdauer (A) und an Tag 28 (B). Relaxationszeit an Tag 28 (C), n=2-4 pro Gruppe, *One-Way-ANOVA* mit *Dunnnett's-Multiple-Comparison-Test.*, *p<0,05, ***p<0,001.

3.3 Differenzierung von glatten Muskelzellen und Fibroblasten aus hiPSCs

Aufgrund der vorangegangenen funktionellen Ergebnisse und unter Beachtung der Vorteile hiPSC-abgeleiteter Zellen sowie der schlechten Verfügbarkeit humaner kardialer Fibroblasten war es Teil dieser Arbeit, ein Differenzierungsprotokoll für epikardiale Fibroblasten und glatte Muskelzellen aus hiPS-Zellen zu etablieren. Ein übersichtliches Schaubild dieses Protokolls ist in Kapitel 2.1.5 abgebildet.

Die hiPS-Zellen wurden wie in Kapitel 2.1 beschrieben kultiviert und expandiert. Die Formation der EBs und die mesodermale Differenzierung erfolgten so wie in Breckwoldt et al. (2017) für

Ergebnisse

die Differenzierung von Kardiomyozyten beschrieben und nicht wie bei Witty et al. (2014) in StemPro-34-basiertem Medium mit niedrigeren Wachstumsfaktorkonzentrationen. Fotos der hiPS-Zellen zu Beginn der Differenzierung und der daraus gebildeten EBs sind in der obersten Reihe von Abbildung 3.10 zu sehen. Nach 3-tägiger Kultur unter hypoxischen Bedingungen mit einer Wachstumsfaktorkombination aus BMP4, Aktivin A und bFGF für die mesodermale Entwicklung wurden die EBs in Geltrex-beschichtete Zellkulturflaschen ausgesät (70 - 80 µl EBs pro T75-Flasche) ohne sie vorher zu dissoziieren. Von nun an wurden die adhärennten Zellen unter normoxischen Bedingungen kultiviert und für zwei Tage mit Epi-Medium-Tag 4 inkubiert, das mit BMP4, CHIR, SB-431542 und VEGF supplementiert war, um weiterhin den Wnt-Signalweg zu aktivieren und damit die epikardiale Differenzierung zu stimulieren (vgl. Abbildung 3.10 Tag 4 und Tag 7). Im nächsten Schritt wurden die proepikardialen Zellen für acht Tage in Epi-Medium-Tag 7 mit VEGF expandiert, das Medium wurde dabei jeden zweiten Tag gewechselt. An Tag 15 wurden die Zellen im Verhältnis 1:6 passagiert und für 24 Stunden in Epi-Medium mit 10 µM Y-27632 inkubiert. Danach wurde die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) induziert. Dies erfolgte für glatte Muskelzellen durch 4-tägige Inkubation mit TGFβ (5 ng/ml) und darauffolgende ebenfalls 4-tägige Inkubation mit bFGF (10 ng/ml) und für Fibroblasten anhand einer 8-tägigen Inkubation mit bFGF (10 ng/ml) in Epi-Medium. Dabei wurde weiterhin jeden zweiten Tag das Medium gewechselt. Fotos der Zellen zu Beginn und nach der EMT (Tag 17 und Tag 24) sind in der unteren Reihe von Abbildung 3.10 zu sehen. Am Ende der Differenzierung wurden die Zellen für etwa 3 Stunden mit Kollagenase-II dissoziiert und in mit 0,1%iger Gelatine beschichtete Zellkulturflaschen in NKM ausplattiert (3 Mio Zellen und 15 ml Medium pro T75-Flasche). Die Zellen wurden im Anschluss an die Differenzierung über mehrere Passagen expandiert und dabei mit Trypsin-EDTA dissoziiert und im Verhältnis 1:3 vermehrt. Das Medium wurde 3x wöchentlich gewechselt (20 ml pro T75-Flasche). Die Zellen konnten im Anschluss entweder direkt für die Herstellung von EHTs genutzt oder nach dem gleichen Protokoll wie für Kardiomyozyten eingefroren werden.

Ergebnisse

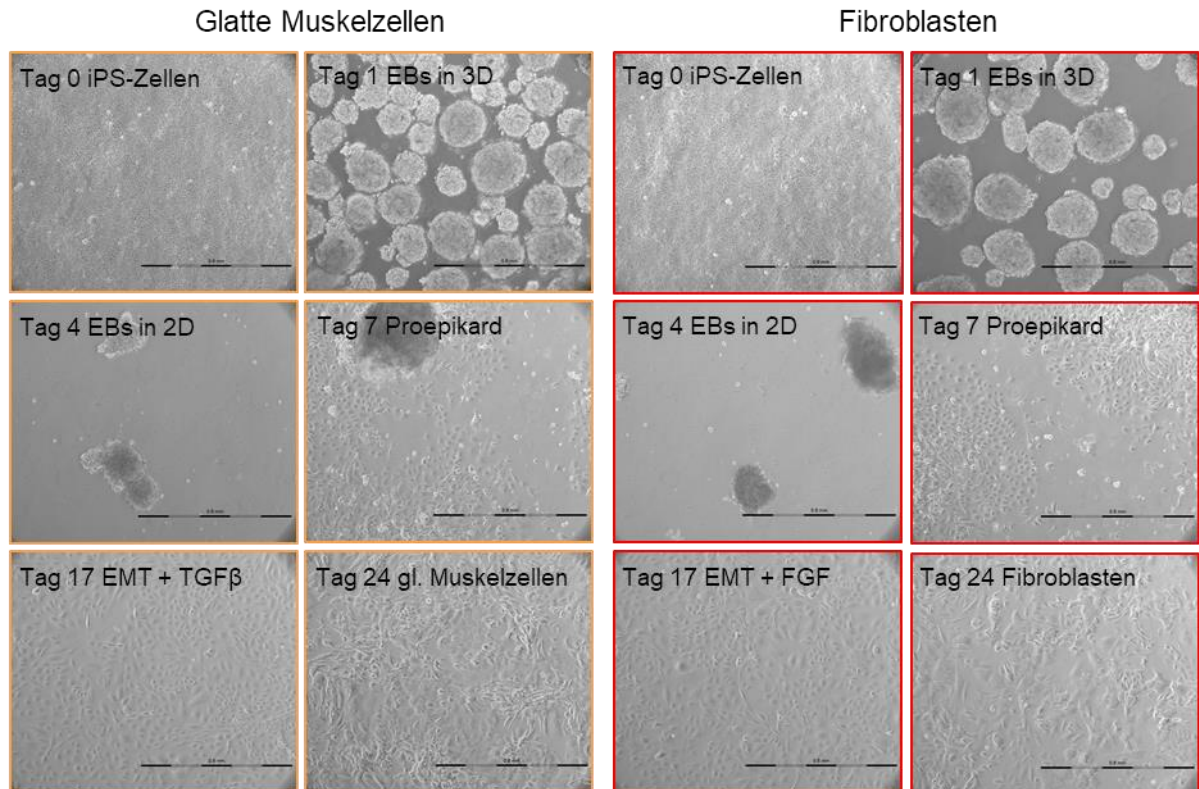


Abbildung 3.10: Fotos der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der epikardialen Differenzierung von glatten Muskelzellen (links) und Fibroblasten (rechts), der Maßstabsbalken entspricht 800 µm.

3.4 Nachlasterhöhung in bizellulären EHTs

Im nächsten Teil der Arbeit wurden bizelluläre C25-EHTs mit epikardialen oder dermalen Fibroblasten unter basalen Bedingungen und unter Nachlasterhöhung miteinander verglichen.

3.4.1 Vergleich von epikardialen und dermalen Fibroblasten in C25-EHTs

C25-EHTs wurden entweder mit 5% der aus hiPS-Zellen differenzierten epikardialen Fibroblasten oder der bereits vorher verwendeten dermalen Fibroblasten supplementiert, das heißt 95% der Zellen stammten aus der Kardiomyozytendifferenzierung und die anderen 5% waren Fibroblasten. Da die durchschnittliche Effizienz der Kardiomyozytendifferenzierung bei 70-90% lag, war also bei allen Versuchen, auch in unizellulären EHTs, ein Anteil an undefinierten Zellen in den humanen EHTs enthalten. Der funktionelle Einfluss dieser heterogenen Zellpopulation, von nicht korrekt oder nicht vollständig differenzierten Zellen, wurde in dieser Arbeit nicht systematisch untersucht.

Wie zuvor zeigte der Zeitverlauf der Kraftentwicklung unter Basalbedingungen, dass EHTs mit dermalen Fibroblasten anfangs schnell stärker wurden, aber bereits an Tag 14 ein Plateau erreicht hatten und mit maximal 0,2 mN nur geringe Kräfte entwickelten. Im Gegensatz dazu stiegen die Kräfte von unizellulären Kontroll-EHTs und bizellulären EHTs mit epikardialen

Ergebnisse

Fibroblasten langsamer an und erreichten maximale Kräfte von 0,43 mN bzw. 0,53 mN erst an Tag 32. Wie auch EHTs mit adulten kardialen Fibroblasten waren die EHTs mit epikardialen Fibroblasten durchweg zumindest tendenziell stärker als die unizelluläre Kontrolle (s. Abbildung 3.11 A und Abbildung 3.9 A).

An Tag 32 wurden die EHTs in je zwei gleich starke Gruppen eingeteilt und bei einer davon für eine Woche die Nachlast erhöht. Die Ergebnisse der Kontraktionsmessung nach der Intervention sind in Abbildung 3.11 B und C zu sehen. In diesem Versuch waren die Kontraktionskräfte der unizellulären AE-EHTs zwar im Mittel etwas geringer als die der Kontrolle, die einzelnen Werte streuten jedoch relativ stark. AE-EHTs mit epikardialen Fibroblasten kontrahierten dagegen signifikant schwächer als die korrespondierenden Kontroll-EHTs (~50%). Bei EHTs mit dermalen Fibroblasten unterschieden sich die Kräfte von Kontrolle und AE nicht, waren insgesamt aber sehr niedrig und die EHTs konnten kaum noch analysiert werden. Wie bereits im Zeitverlauf ersichtlich wurde, ergab auch der Vergleich der drei Kontrollgruppen an Tag 39, dass die EHTs mit epikardialen Fibroblasten stärker, und EHTs mit dermalen Fibroblasten schwächer waren als die unizellulären Kontrollen. Die Auswertung der Relaxationszeiten war für EHTs mit dermalen Fibroblasten aufgrund der zu geringen Kontraktionskräfte nicht möglich. Der Vergleich von Kontrollen mit epikardialen Fibroblasten zu unizellulären Kontrollen ergab längere Relaxationszeiten in der ersten Gruppe. Die Nachlasterhöhung hatte jedoch in beiden Gruppen keinen Effekt auf die Relaxation.

Ergebnisse

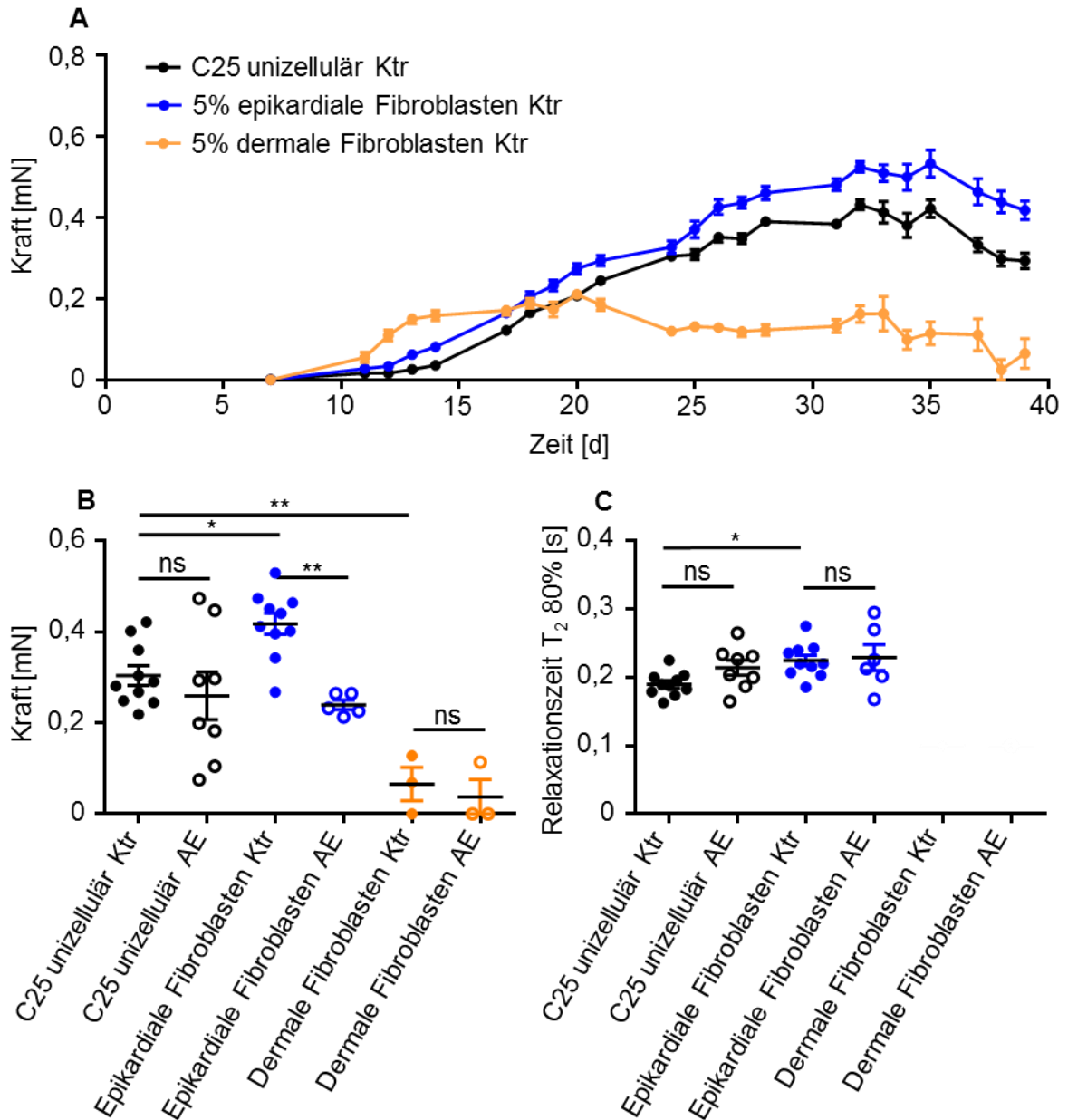


Abbildung 3.11: Kontraktionskraft der unizellulären C25-EHTs und C25-EHTs mit epikardialen bzw. dermalen Fibroblasten unter Kontrollbedingungen über die Kulturdauer (A) und an Tag 39 unter Kontrollbedingungen (Ktr) und nach einwöchiger Nachlasterhöhung (AE), $n=3-10$ pro Gruppe (B). Relaxationszeit an Tag 39, EHTs mit dermalen Fibroblasten konnten nicht ausgewertet werden (C), $n=6-10$ EHTs pro Gruppe, *One-Way-ANOVA* mit *Bonferroni's-Multiple-Comparison-Test*. * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Die schlechten kontraktile Eigenschaften von EHTs mit dermalen Fibroblasten können leicht nachvollzogen werden, wenn man wie in Abbildung 3.12 die Morphologie dieser EHTs betrachtet. Anhand der Beispielaufnahmen von EHTs während der Kontraktionsmessungen an Tag 39 lassen sich keine morphologischen Unterschiede zwischen unizellulären und mit epikardialen Fibroblasten supplementierten EHTs feststellen. EHTs mit dermalen Fibroblasten hingegen waren kürzer und dünner als die Kontrollen, und die Fibrinmatrix dieser EHTs war viel stärker abgebaut.

Ergebnisse

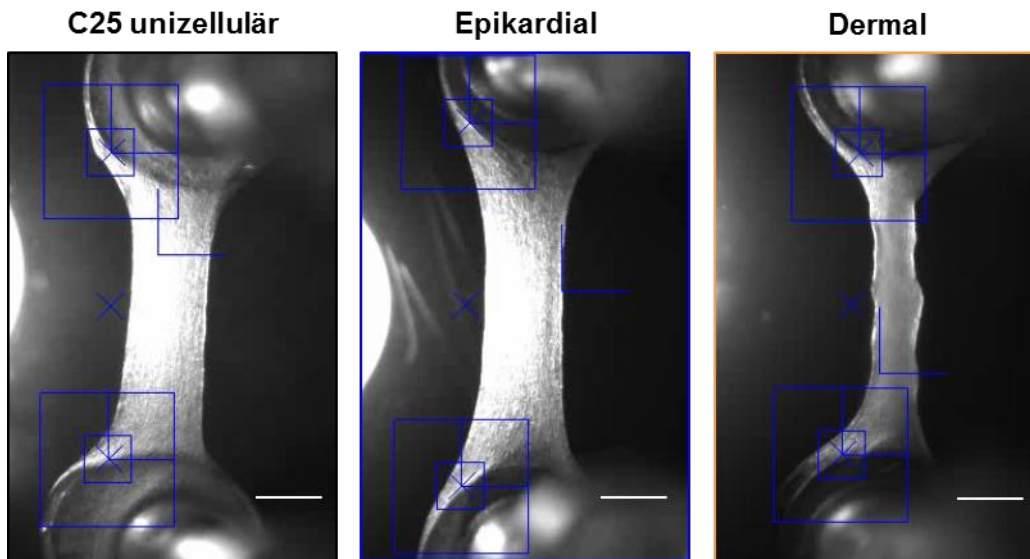


Abbildung 3.12: Aufnahmen der video-optischen Kontraktionsmessung von unizellulären C25-EHTs und bizellulären C25-EHTs mit 5% epikardialen oder mit 5% dermalen Fibroblasten an Tag 39, der Maßstabsbalken entspricht 1 mm.

Wie in den vorangegangenen Versuchen wurde auch hier die Genexpression von ANP als Marker für pathologische Hypertrophie untersucht. Dabei zeigte sich, dass durch die Nachlasterhöhung in keiner der drei Bedingungen eine erhöhte Expression von ANP stattfand. In AE-EHTs mit dermalen Fibroblasten war die Expression zudem niedriger als in der unizellulären Kontrolle. Um den Einfluss der Fibroblasten genauer zu untersuchen, wurden neben COL1A1 auch noch S100A4 (auch bekannt als *Fibroblast Specific Protein-1*; FSP-1) und Periostin (POSTN) auf ihre Expression hin getestet. Wie aus Abbildung 3.13 hervorgeht, wurde die Expression dieser Gene durch die Erhöhung der Nachlast nicht beeinflusst. Beide Gruppen, die dermale Fibroblasten enthielten, exprimierten alle drei Marker jedoch stärker als unizelluläre EHTs oder solche mit epikardialen Fibroblasten. Für COL1A1 und POSTN war die Expression sogar um das 100-200-fache erhöht.

Ergebnisse

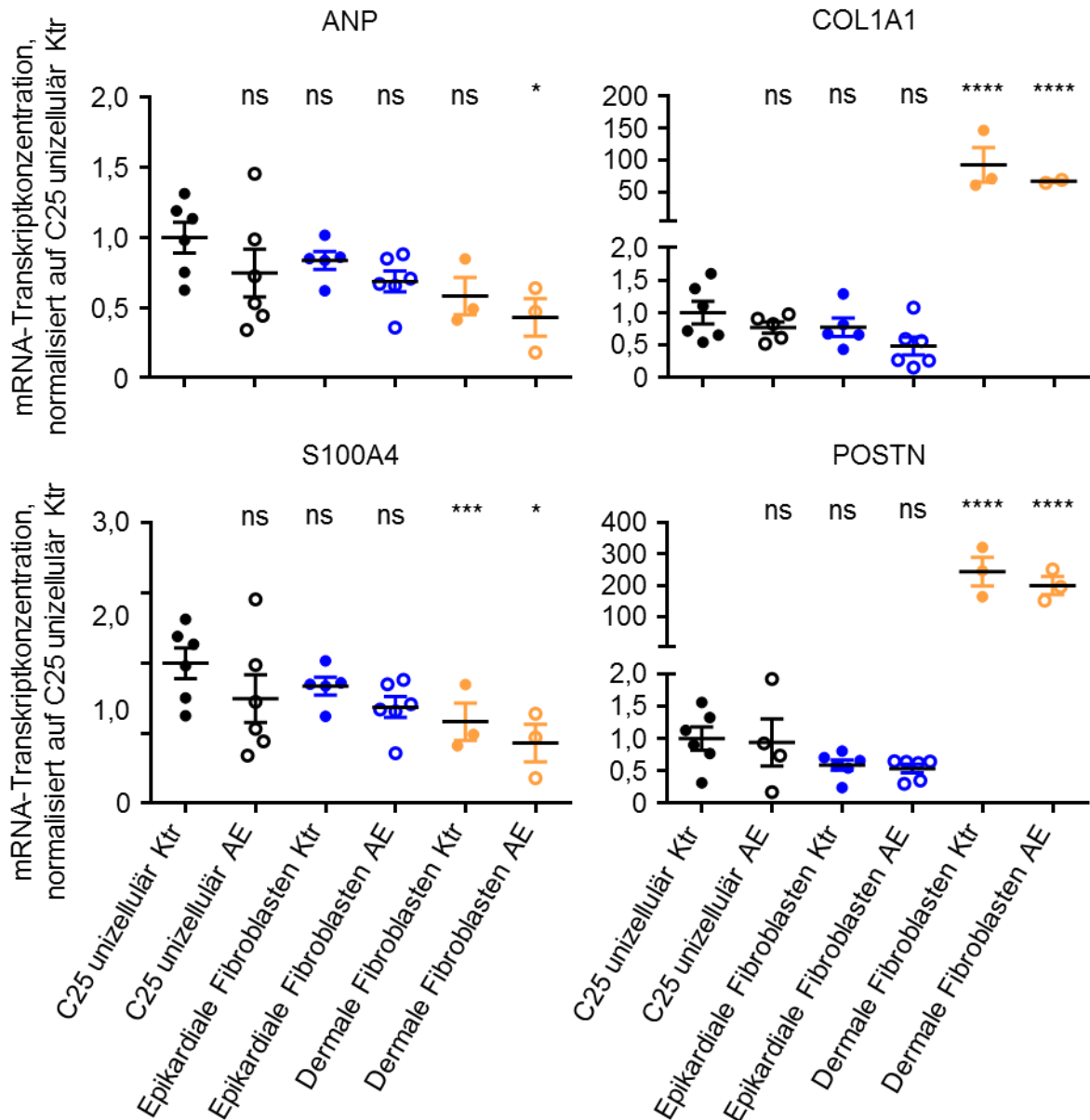


Abbildung 3.13: RT-qPCR von Kontroll- (Ktr) und Nachlasterhöhten (AE) unizellulären C25-EHTs sowie C25-EHTs mit epikardialen oder mit dermalen Fibroblasten, normalisiert auf die unizellulären Kontroll-EHTs. Zu sehen sind die relativen Transkriptkonzentrationen von ANP, Kollagen-I (COL1A1), S100A4 und Periostin (POSTN), n=2-6 EHTs pro Gruppe, *One-Way-ANOVA* mit *Dunnett's-Multiple-Comparison-Test.*, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe von epikardialen Fibroblasten zu höheren Kontraktionskräften und längeren Relaxationszeiten führte. Die Zugabe von dermalen Fibroblasten verschlechterte die Kontraktilität der C25-EHTs beträchtlich, was gemeinsam mit morphologischen Veränderungen und der hohen Expression von Fibroblastenmarkern auftrat. In beiden Fällen führte die Beimischung der Fibroblasten zwar nicht zur Entwicklung einer Hypertrophie, die kontraktile Dysfunktion war bei EHTs mit epikardialen Fibroblasten jedoch viel ausgeprägter als bei unizellulären C25-EHTs.

Ergebnisse

3.4.2 Nachlasterhöhung und ET-1-Behandlung in bizellulären C25-EHTs

In nächsten Versuch wurden die bizellulären C25-EHTs mit epikardialen Fibroblasten nicht nur unter Nachlasterhöhung, sondern auch unter ET-1-Behandlung mit den unizellulären Kontrollen verglichen.

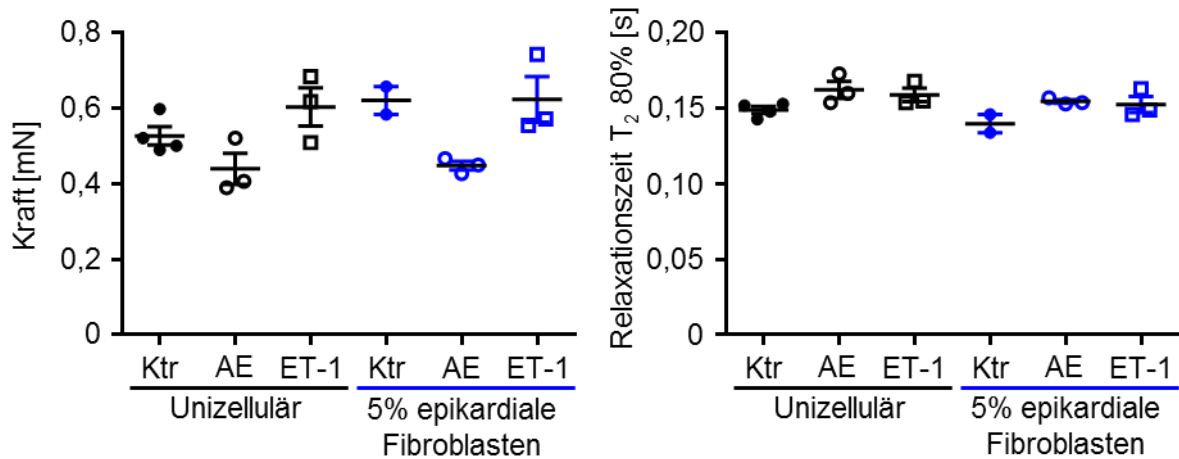


Abbildung 3.14: Kontraktionskraft und Relaxationszeit von unizellulären und bizellulären C25-EHTs nach einer Woche Nachlasterhöhung (AE) bzw. Behandlung mit ET-1, n=2-4 EHTs pro Gruppe, *One-Way-ANOVA* mit *Dunnnett's-Multiple-Comparison-Test*, keine signifikanten Unterschiede.

Sowohl bei den Kontraktionskräften, als auch bei den Relaxationszeiten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Sowohl unizelluläre als auch bizelluläre C25-EHTs zeigten wie zuvor gesehen eine gewisse kontraktile Dysfunktion unter AE. Die mit ET-1-behandelten EHTs waren etwa gleich stark wie die jeweilige Kontrolle. EHTs beider Interventionsgruppen relaxierten tendenziell langsamer als die Kontrolle (s. Abbildung 3.14). Unterschiedliche Relaxationszeiten zwischen unizellulären und bizellulären EHTs wie sie in Abbildung 3.11 zu beobachten waren, konnten hier nicht festgestellt werden.

Alle EHTs wurden für die Bestimmung der Zellgrößen fixiert, weshalb die Expression von ANP nicht auf mRNA-Ebene, sondern auf Protein-Ebene mittels immunhistochemischer Färbung der EHT-Querschnitte quantifiziert wurde. In Abbildung 3.15 B ist erkennbar, dass die Kardiomyozyten unizellulärer AE- bzw. ET-1-behandelter EHTs etwas größer waren als die Zellen von Kontroll-EHTs. Bei bizellulären EHTs war diese Tendenz nur unter AE-Bedingungen und nicht unter ET-1-Behandlung vorhanden.

Die Analyse der ANP-Färbung ergab, dass ANP-positive Zellen etwa 3-4% der Querschnittsfläche von C25-EHTs ausmachen. Die Streuung der einzelnen Werte ist jedoch zu hoch, um Unterschiede zwischen den Gruppen sehen zu können (s. Abbildung 3.15 C und D).

Ergebnisse

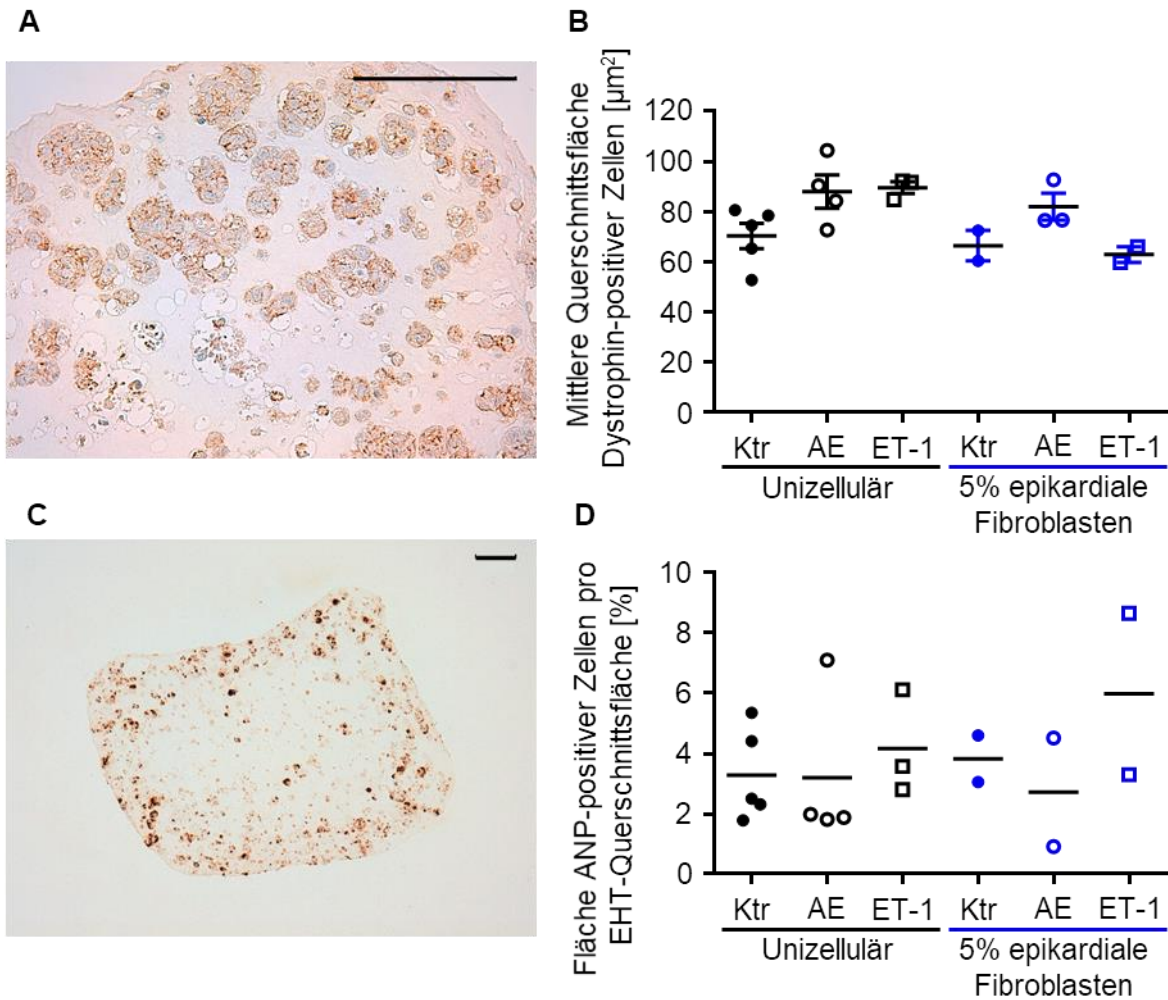


Abbildung 3.15: Bestimmung der Kardiomyozytengröße anhand von Dystrophin-gefärbten C25-EHT Querschnitten. Repräsentatives Foto der Dystrophin-Immunhistochemie; der Maßstabsbalken entspricht 100 μm (A). Ergebnisse der manuellen Evaluation der Kardiomyozytenquerschnittsflächen; Repräsentatives Foto der ANP-Immunhistochemie; der Maßstabsbalken entspricht 100 μm (C). Ergebnisse der semiautomatischen Evaluation der Fläche ANP-positiver Zellen, $n=2-4$ EHTs pro Gruppe, *One-Way-ANOVA* mit *Dunnnett's-Multiple-Comparison-Test* (D), keine signifikanten Unterschiede.

3.4.3 Nachlasterhöhung in bizellulären ERC018-EHTs

Abschließend wurden auch aus ERC018-hiPS-Zellen epikardiale Fibroblasten differenziert, um bizelluläre und unizelluläre ERC018-EHTs unter AE- und Kontrollbedingungen miteinander vergleichen zu können.

Ergebnisse

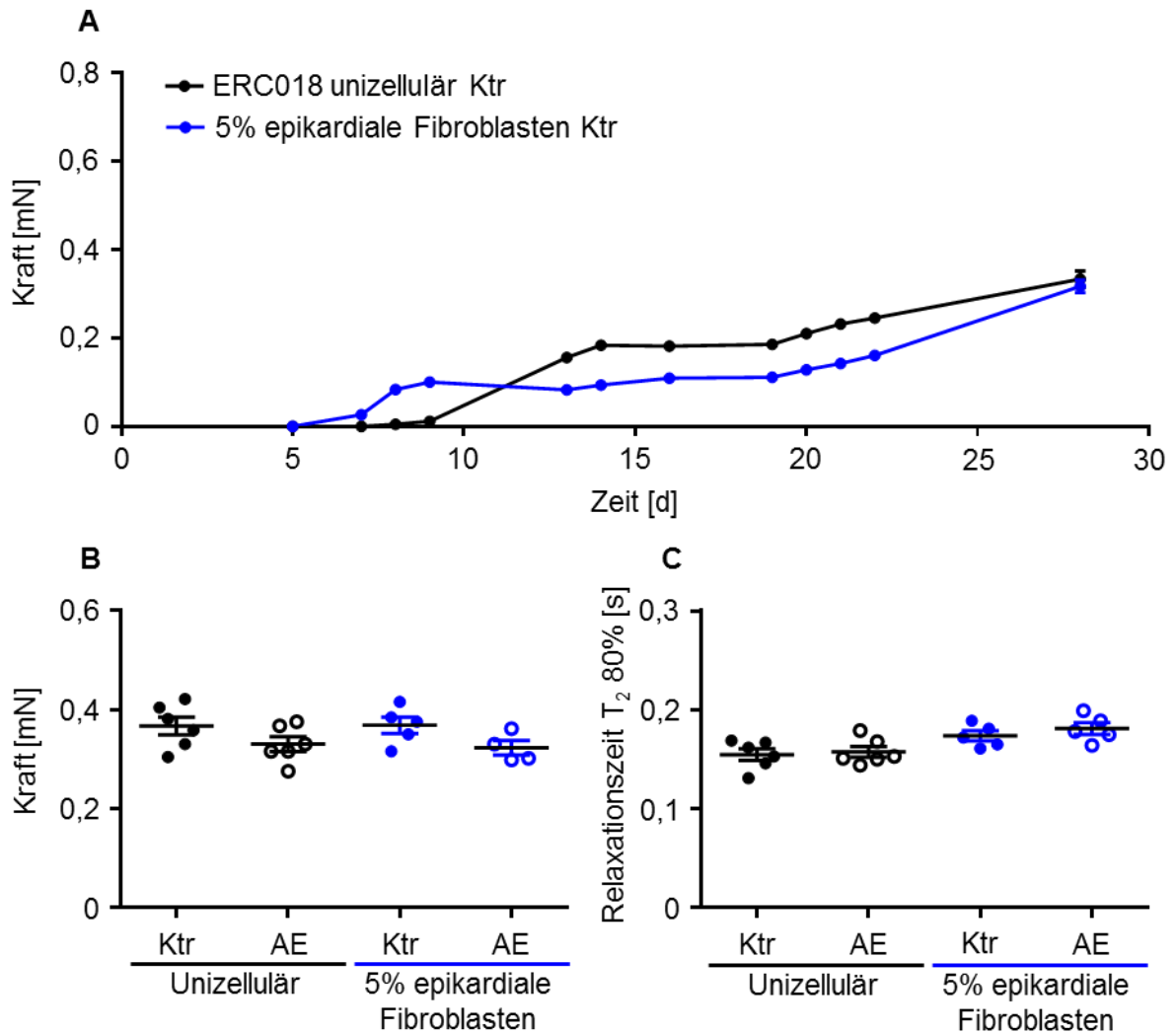


Abbildung 3.16: Kontraktionskraft der unizellulären ERC018-EHTs und ERC018-EHTs mit epikardialen Fibroblasten unter Kontrollbedingungen über die Kulturdauer (A) und an Tag 28 unter Kontrollbedingungen (Ktr) und nach einwöchiger Nachlasterhöhung (AE; B), Relaxationszeiten an Tag 28 (C), n=6-10 EHTs pro Gruppe, *One-Way-ANOVA* mit *Bonferroni's-Multiple-Comparison-Test*, keine signifikanten Unterschiede.

Der Zeitverlauf in Abbildung 3.16 A zeigt, dass bizelluläre ERC018-EHTs früher anfangen zu kontrahieren als unizelluläre Kontroll-EHTs. Sie waren aber zwischen Tag 12 und Tag 22 schwächer, und am Ende des Versuchs (Tag 28) kontrahierten beide Gruppen gleich stark. Insgesamt nahmen beide Gruppen nur sehr langsam an Kraft zu und erreichten keine Plateauphase. Maximale Kräfte von 0,37 mN wurden erst an Tag 28 erreicht, als die an Tag 22 begonnene Nachlasterhöhung bereits beendet wurde.

In der Abschlussmessung unterschieden sich ERC018-EHTs mit epikardialen Fibroblasten weder in der Kontraktionskraft, noch in der Relaxationszeit von der unizellulären Kontrolle. In beiden Gruppen waren AE-EHTs mit durchschnittlich 0,32 mN geringfügig schwächer als die

Ergebnisse

Kontrollen, die Relaxationszeiten blieben durch die Intervention unverändert (s. Abbildung 3.16 B und C).

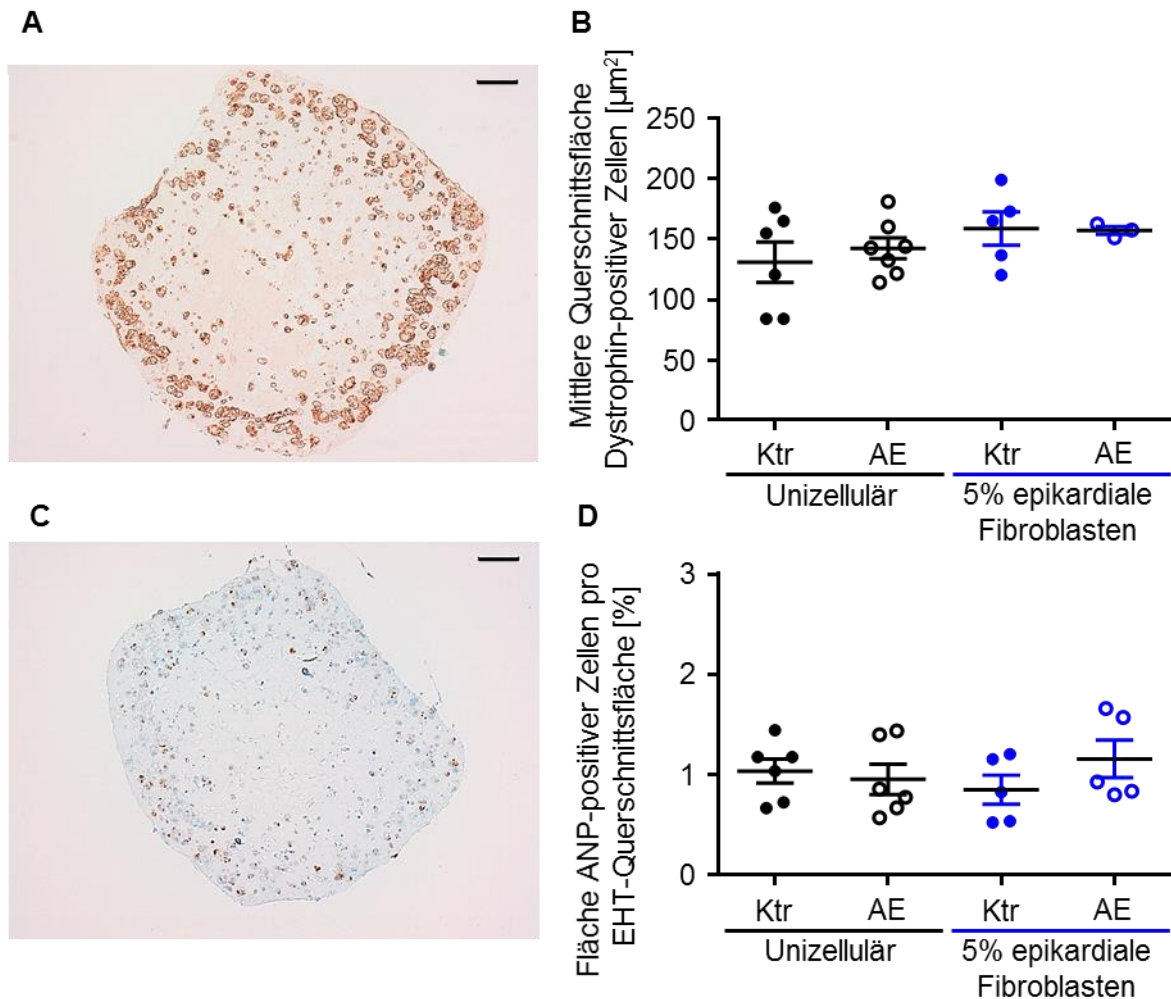


Abbildung 3.17: Bestimmung der Kardiomyozytengröße anhand von Dystrophin-gefärbten ERC018-EHT Querschnitten. Repräsentatives Foto der Dystrophin-Immunhistochemie; der Maßstabsbalken entspricht 100 μm (A). Ergebnisse der manuellen Evaluation der Kardiomyozytenquerschnittsflächen. Repräsentatives Foto der ANP-Immunhistochemie; der Maßstabsbalken entspricht 100 μm (C). Ergebnisse der semiautomatischen Evaluation der Fläche ANP-positiver Zellen, n=5-6 EHTs pro Gruppe, *One-Way-ANOVA* mit *Dunnnett's-Multiple-Comparison-Test* (D), keine signifikanten Unterschiede.

Die histologische Auswertung in Abbildung 3.17 ergab keine Unterschiede bei der Zellgröße oder der ANP-Expression innerhalb des Versuchs. Die bereits bei unizellulären EHTs beobachteten Größenunterschiede der Kardiomyozyten in C25- und ERC018-EHTs wurden hier jedoch nochmals bestätigt. Die Schwankungen der ANP-Färbung, wie auch die absoluten Werte, die nur bei ca. 1% der EHT-Querschnittsfläche lagen, waren deutlich niedriger als in C25-EHTs.

Ergebnisse

Die Effekte der hypertrophen Interventionen in unizellulären und bizellulären EHTs beider Zelllinien sind in Tabelle 11 noch einmal zusammengefasst. Die Supplementierung der C25-EHTs mit 5% epikardialen Fibroblasten resultierte in höheren Kontraktionskräften und längeren Relaxationszeiten. Bizelluläre ERC018-EHTs unterschieden sich jedoch nicht signifikant von unizellulären EHTs, kontrahierten zeitweise aber tendenziell schwächer als diese. Durch die Erhöhung der Nachlast kontrahierten unizelluläre und bizelluläre C25-EHTs schwächer als unbehandelte Kontrollen, wohingegen die Intervention in ERC018-EHTs keine signifikanten Effekte hervorrief. Keinen Einfluss auf die Funktion der getesteten EHTs hatte die Behandlung mit Endothelin-1, und eine Hypertrophie der Zellen konnte unter keiner der Interventionsbedingungen beobachtet werden. Die Querschnittsflächen von C25-Kardiomyozyten nach Nachlasterhöhung waren zwar tendenziell größer als bei Kontroll-EHTs, bei den bereits unter Kontrollbedingungen großen ERC018-Kardiomyozyten zeigten sich hingegen gar keine Unterschiede durch die Interventionen.

Tabelle 11: Signifikante Veränderungen in EHTs durch hypertrophe Interventionen und/oder Fibroblastensupplementierung

	C25 unizellulär	C25 bizellulär	ERC018 unizellulär	ERC018 bizellulär
Ausgangslage		Kraft ↑ T ₂ ↑		--
AE	Kraft ↓	Kraft ↓	--	--
ET-1	--	--	--	--

Aufgrund der zeitlichen Abfolge der Versuche, in Verbindung mit der Verfügbarkeit der Zellen wurden für den nächsten Teil dieser Arbeit, der lentiviralen Transduktion von hiPS-Zellen und der Herstellung multizellulärer EHTs, dennoch ERC018-Zellen verwendet.

3.5 Lentivirale Transduktion von hiPS-Zellen

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte neben Fibroblasten auch die Rolle von Endothelzellen und glatten Muskelzellen in EHTs untersucht werden. Um die verschiedenen Zelltypen später im EHT-Format visualisieren und unterscheiden zu können, wurden ERC018-hiPS-Zellen in vier getrennte Populationen unterteilt und diese unabhängig voneinander mit je einem von vier lentiviralen Vektoren transduziert, die für verschiedene Fluoreszenzproteine kodierten.

In Abbildung 3.18 A sind Epifluoreszenzfotos der hiPS-Zellen nach 2-wöchiger Puromycin-Selektion zu sehen. Die einzelnen mit mTagBFP, Venus, mOrange2 oder dKatushka2 transduzierten Zellpopulationen wurden jeweils mit gleichen Einstellungen mit vier verschiedenen Fluoreszenzfiltern fotografiert. Alle vier Fluoreszenzproteine wurden von den hiPS-Zellen exprimiert, und die Populationen konnten eindeutig voneinander unterschieden werden. Innerhalb der einzelnen Populationen war die Expression in manchen Zellen stärker als in anderen, weshalb diese zum Teil unterschiedlich hell erschienen. Die mOrange2-exprimierenden Zellen waren sowohl im F36-730 als auch im F36-508 Filter zu sehen und unterschieden sich dadurch von den dKatushka2-exprimierenden Zellen, die nur im langwelligen Bereich des F36-508 Filters zu sehen waren. Zur besseren Veranschaulichung sind in Abbildung 3.18 B die Emissionsspektren der Fluoreszenzproteine gemeinsam mit der Durchlässigkeit der Filter dargestellt. Daraus wird einerseits ersichtlich, dass mOrange2 trotz seines Emissionsmaximums bei 565 nm aufgrund der Form der Emissionskurve in den Kanal des F36-508 Filters strahlte. Andererseits erklärt die Abbildung auch, warum die Fotos der mOrange2-positiven Zellen im F36-730 eher grün statt orange erschienen. Die Bandbreite des Filters liegt im grün-gelben Wellenlängenbereich des sichtbaren Spektrums und bildet daher auch nur diesen Bereich ab, während die orange-rötlichen Anteile des emittierten Lichts vom Filter nicht durchgelassen werden.

Ergebnisse

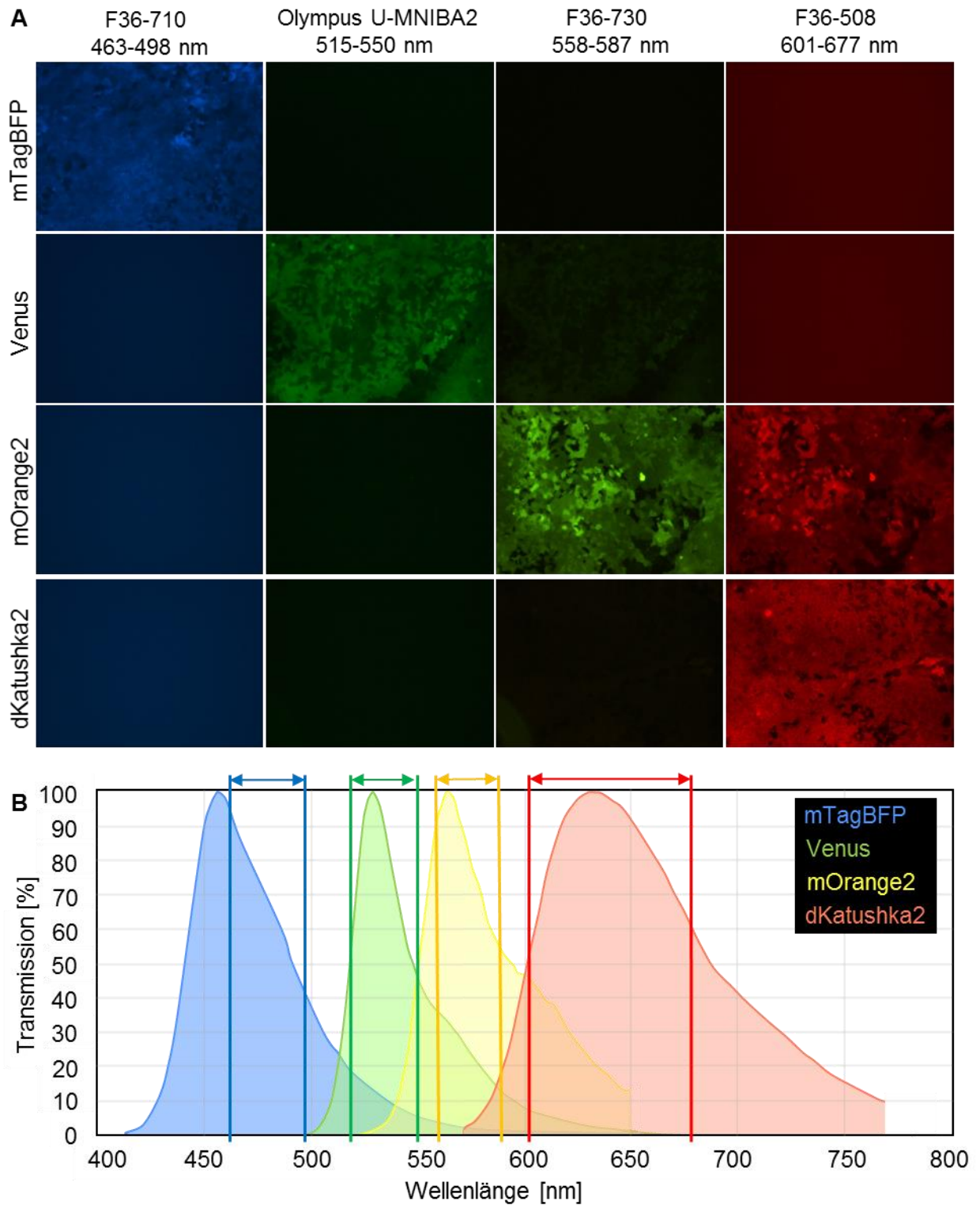


Abbildung 3.18: Epifluoreszenzfotos der lentiviral transduzierten hiPS-Zellen nach der Selektion. Die vier Zellpopulationen sind reihenweise untereinander angeordnet, das heißt in jeder Zeile sind die Fotos einer Population in allen vier Fluoreszenzfiltern gezeigt (A). Emissionsspektrum der vier Fluoreszenzproteine. Darin eingezeichnet sind die jeweiligen Bandbreiten der verwendeten Filter (B).

Die Selektionseffizienz wurde nicht nur qualitativ am Mikroskop, sondern auch quantitativ am Durchflusszytometer ausgewertet.

Ergebnisse

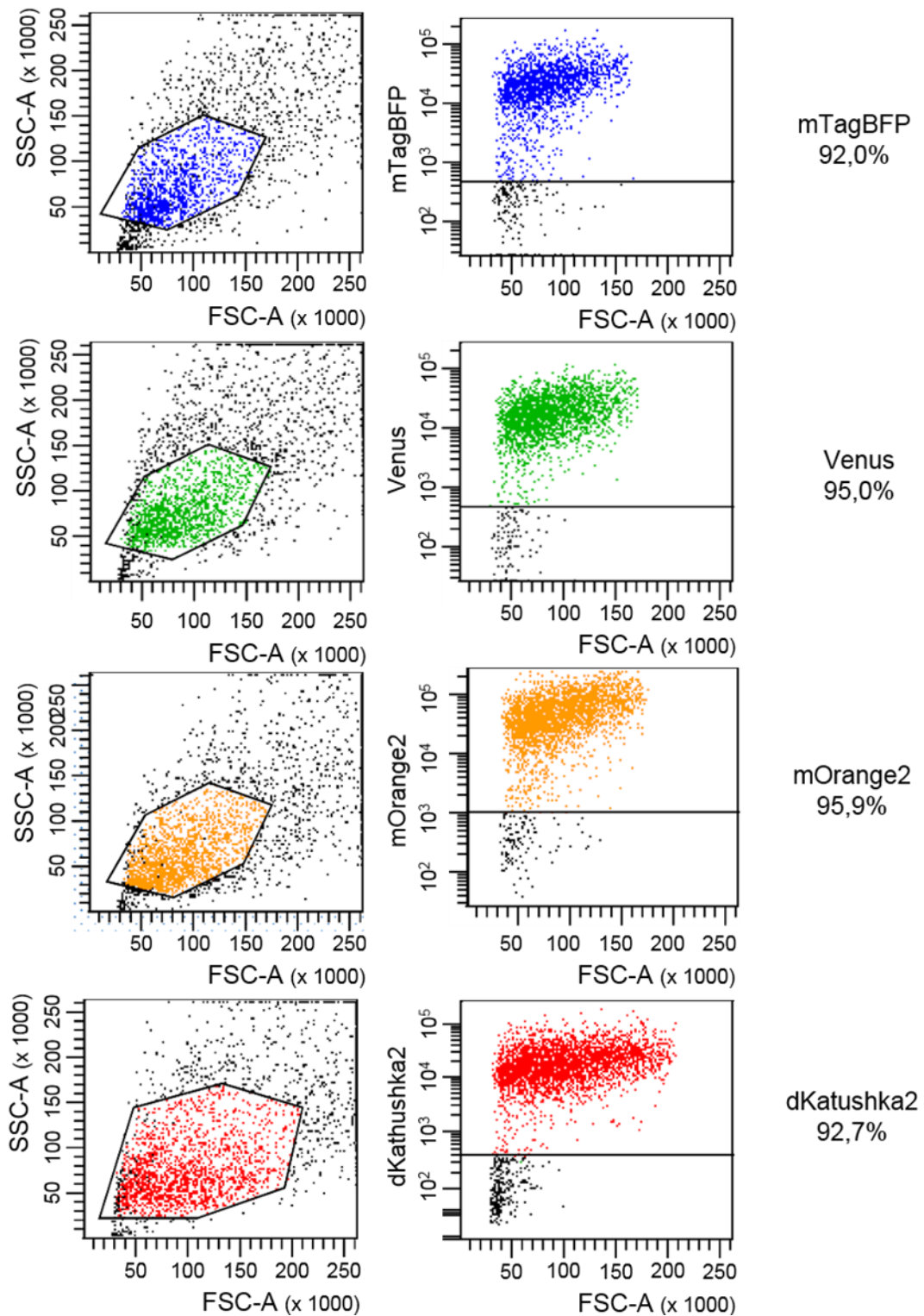


Abbildung 3.19: Durchflusszytometrie der lentiviral mit Fluoreszenzproteinen transduzierten hiPS-Zellen.

Dabei ergab sich, dass 92% der mit dem mTagBFP-Virus transduzierten hiPS-Zellen dafür positiv waren. Bei den mit Venus transduzierten Zellen exprimierten 95% der Zellen das Protein. Bei den Populationen, die mit mOrange2 bzw. dKathushka2 transduziert waren,

Ergebnisse

fluoreszierten 95,9% bzw. 92,7% der hiPS-Zellen (s. Abbildung 3.19). Die Selektion mit Puromycin war demnach für alle vier transduzierten Vektoren gleichermaßen erfolgreich.

3.6 Charakterisierung der verschiedenen Zelltypen

Die beschriebenen hiPS-Zellen wurden dann für die Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen verwendet. Aus den mTagBFP-positiven Zellen wurden Kardiomyozyten, die Venus-positiven Zellen wurden zu Endothelzellen und aus den mOrange2-positiven bzw. dKatushka2-positiven Zellen wurden glatte Muskelzellen bzw. Fibroblasten differenziert. Anschließend wurden die differenzierten Zellen miteinander verglichen und charakterisiert.

3.6.1 Fluoreszenz und Morphologie

Zunächst wurde überprüft, ob die Differenzierung Einfluss auf die Fluoreszenz der Zellen hatte. Dafür wurde die Epifluoreszenz der Zellen unter gleichen Bedingungen wie bei den hiPS-Zellen aufgenommen.

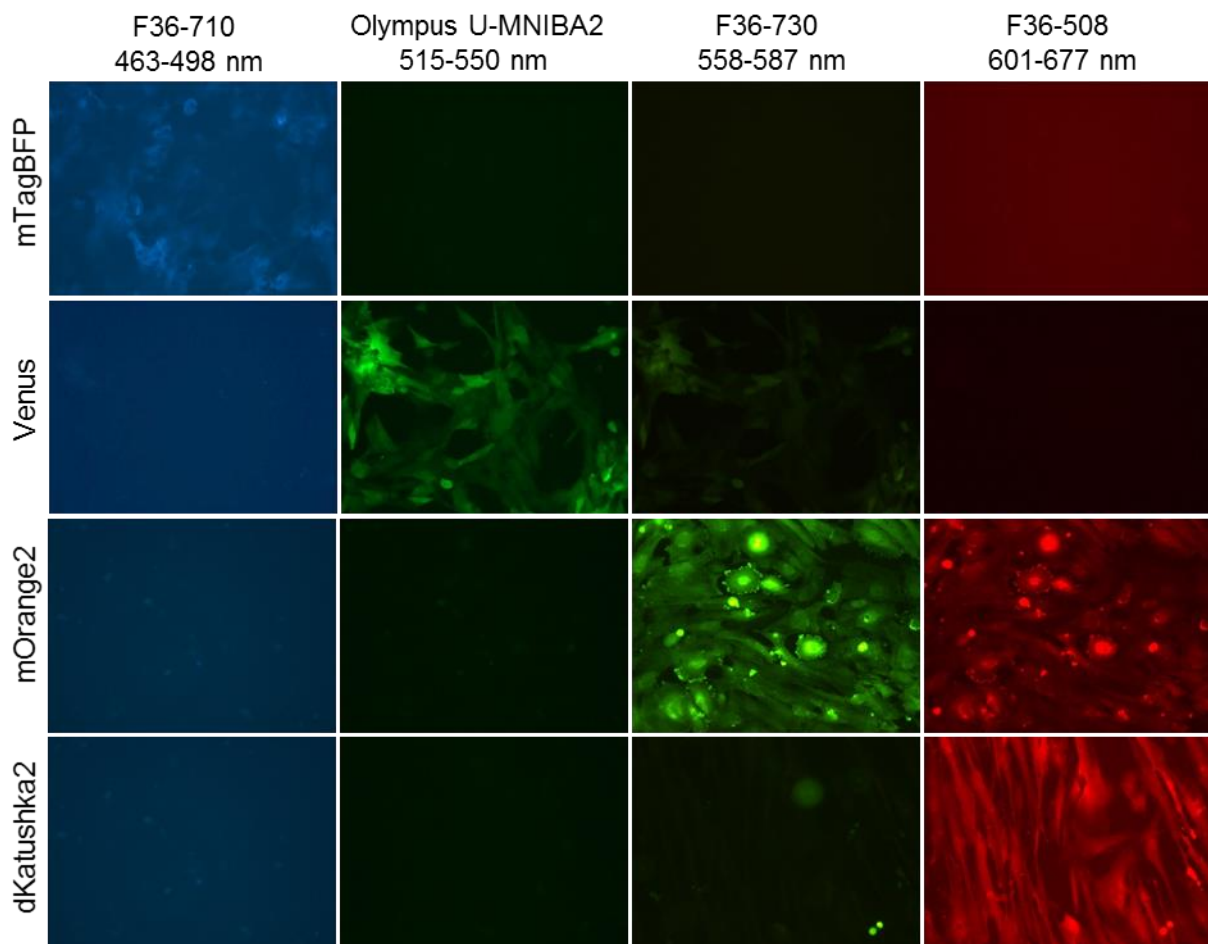


Abbildung 3.20: Epifluoreszenz der final differenzierten Zellen, von oben nach unten sieht man Kardiomyozyten (mTagBFP), Endothelzellen (Venus), glatte Muskelzellen (mOrange2) und Fibroblasten (dKatushka2). In den Zeilen sind jeweils die Fotos unter Einsatz der vier verschiedenen Fluoreszenzfilter gezeigt.

Ergebnisse

Wie aus Abbildung 3.20 hervorgeht, wurden auch nach den unterschiedlichen Differenzierungsprozessen alle vier Fluoreszenzproteine weiterhin von den Zellen exprimiert. Wie bereits in den hiPS-Zellen war die Expression von mTagBFP relativ gering, verglichen mit den drei anderen Proteinen.

Unabhängig von der Fluoreszenz konnten die blauen Kardiomyozyten anhand der spontanen Kontraktionsfähigkeit der Zellen leicht identifiziert werden. Die Endothelzellen zeichneten sich durch langgestreckte Ausläufer bei geringer bis mittlerer Zelldichte aus, während sie die typische kopfsteinpflasterähnliche Morphologie nur im konfluenten Zustand zeigten. Die glatten Muskelzellen und Fibroblasten konnten morphologisch nicht eindeutig voneinander unterschieden werden. Beide Zelltypen waren unabhängig von der Zelldichte meist spindelförmig.

Die Proliferationsraten der Zellen unterschieden sich ebenfalls deutlich. Während die Zellen am Ende der Kardiomyozytendifferenzierung kaum noch proliferierten, vermehrten sich die Endothelzellen nach der auf die Differenzierung folgenden Aufreinigung stark. Über vier bis fünf Passagen teilten sich die Zellen sehr schnell, so dass aus einem Differenzierungslauf eine große Zahl an Zellen für die spätere Herstellung von EHTs eingefroren werden konnte. Die glatten Muskelzellen und Fibroblasten proliferierten besonders stark im proepikardialen Zustand während der Differenzierung (vgl. Kapitel 3.3). Nach der Differenzierung konnten beide Zelltypen über sieben bis acht Passagen vermehrt werden, bevor die Proliferationsrate merklich geringer wurde. Die differenzierten epikardialen Zellen teilten sich langsamer als die Endothelzellen oder auch als primäre dermale Fibroblasten oder 3T3-Fibroblasten.

3.6.2 Genexpression

Aus hiPS-Zellen und den vier daraus differenzierten Zelltypen wurde RNA extrahiert und die Expression verschiedener Markergene miteinander verglichen. Abbildung 3.21 zeigt, dass nur die hiPS-Zellen den für die Pluripotenz wichtigen Transkriptionsfaktor NANOG exprimierten. In Kardiomyozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten war dieser gleichermaßen nahezu vollständig herunterreguliert. Als Marker für Kardiomyozyten wurde die Expression des Strukturproteins α -Actinin-2 (ACTN2) gemessen, das in kardialen und Skelettmuskelzellen dazu dient, Aktin-Filamente mit der Z-Scheibe zu verbinden. Im Vergleich der Zelltypen exprimierten nur die Kardiomyozyten ACTN2 und zwar 2500-fach mehr als hiPS-Zellen. Noch deutlicher waren die Expressionsunterschiede für den Endothelzellmarker CD31 (PECAM-1), einem Adhäsionsmolekül, das neben Endothelzellen auch von Leukozyten exprimiert wird. In den Endothelzellen war die Expression 5000-fach stärker als in hiPS-Zellen (s. Abbildung 3.21). Die Expression beider Marker wurde ausschließlich in Kardiomyozyten

Ergebnisse

bzw. Endothelzellen hochreguliert, in den jeweils drei anderen Zelltypen unterschied sich die Transkriptkonzentration dagegen nicht von der in hiPS-Zellen.

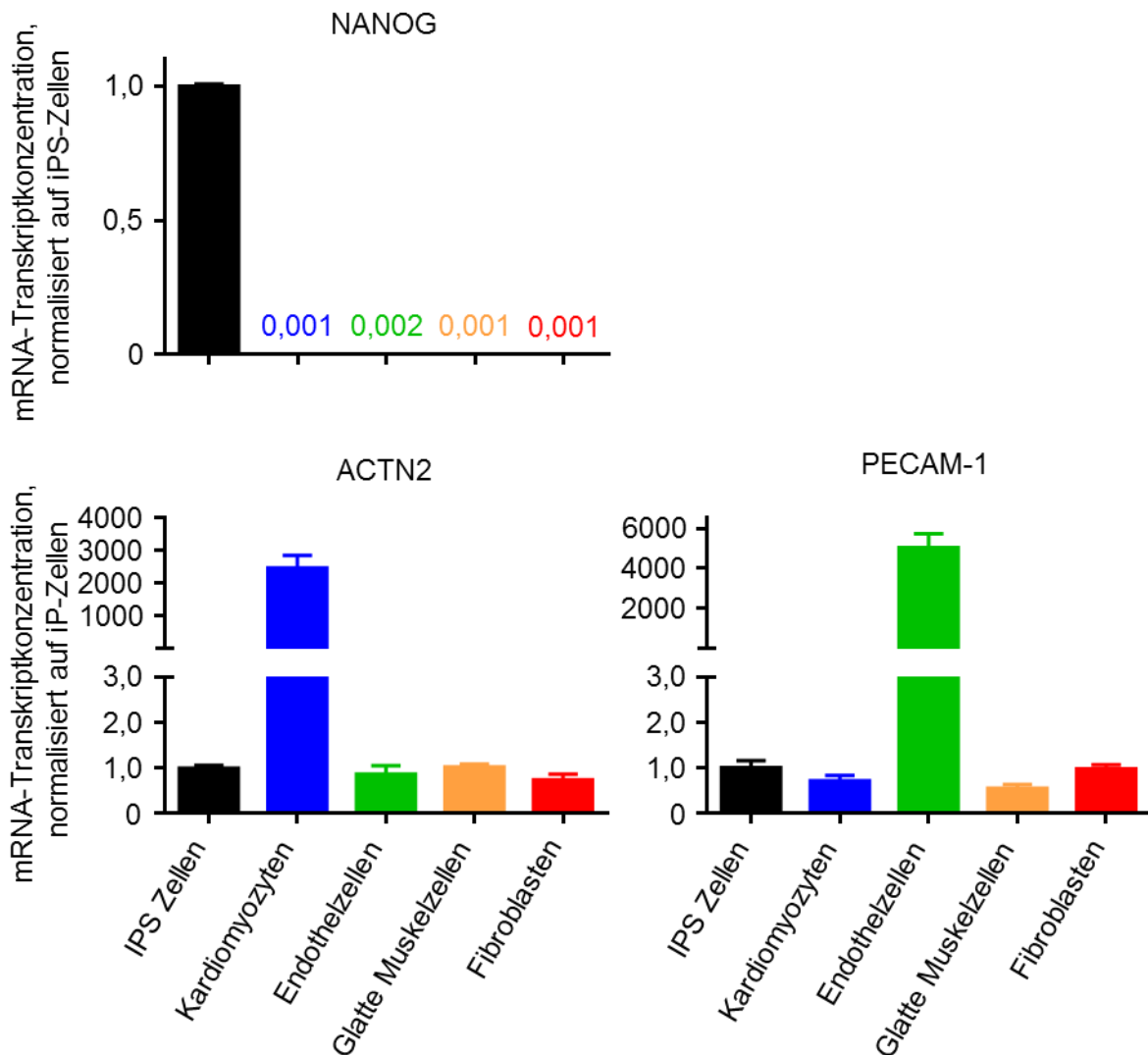


Abbildung 3.21: RT-qPCR von hiPS-Zellen und den vier daraus differenzierten Zelltypen (Teil 1). Zu sehen sind die relativen Transkriptkonzentrationen von NANOG, ACTN2 und PECAM-1, n=3 biologische Replikate pro Gruppe.

Für die Charakterisierung von Fibroblasten und glatten Muskelzellen wurden vier Markergene analysiert (s. Abbildung 3.22). Die Expression von Kollagen-I (COL1A1) war in Kardiomyozyten und Endothelzellen im Vergleich zu hiPS-Zellen nur geringfügig hochreguliert (2,5-fach bzw. 7-fach). Deutlich höher war die Expression in Fibroblasten (70-fach) und am höchsten in glatten Muskelzellen (110-fach höher als in hiPS-Zellen). Periostin (POSTN) wurde von Kardiomyozyten ebenfalls kaum exprimiert. In Endothelzellen und glatten Muskelzellen war die Expression 100- bzw. 140-fach höher als in hiPS-Zellen und Fibroblasten exprimierten am meisten Periostin (270-fach höher als in hiPS-Zellen). Die Expression von *Alpha Smooth Muscle Actin* (ACTA2) war in glatten Muskelzellen am stärksten und 2900-fach höher als in hiPS-Zellen. Fibroblasten exprimierten ähnlich viel ACTA2 wie Kardiomyozyten

Ergebnisse

(970-fach bzw. 860-fach mehr als hiPS-Zellen). Im Vergleich dazu war die Expression in Endothelzellen relativ gering (20-fach höher als in hiPS-Zellen). Calponin 1 (CNN1) war insgesamt weniger reguliert als die anderen Markergene. Die Expression war in Endothelzellen und Fibroblasten gering. In glatten Muskelzellen war sie 12-fach und in Kardiomyozyten 26-fach höher als in hiPS-Zellen.

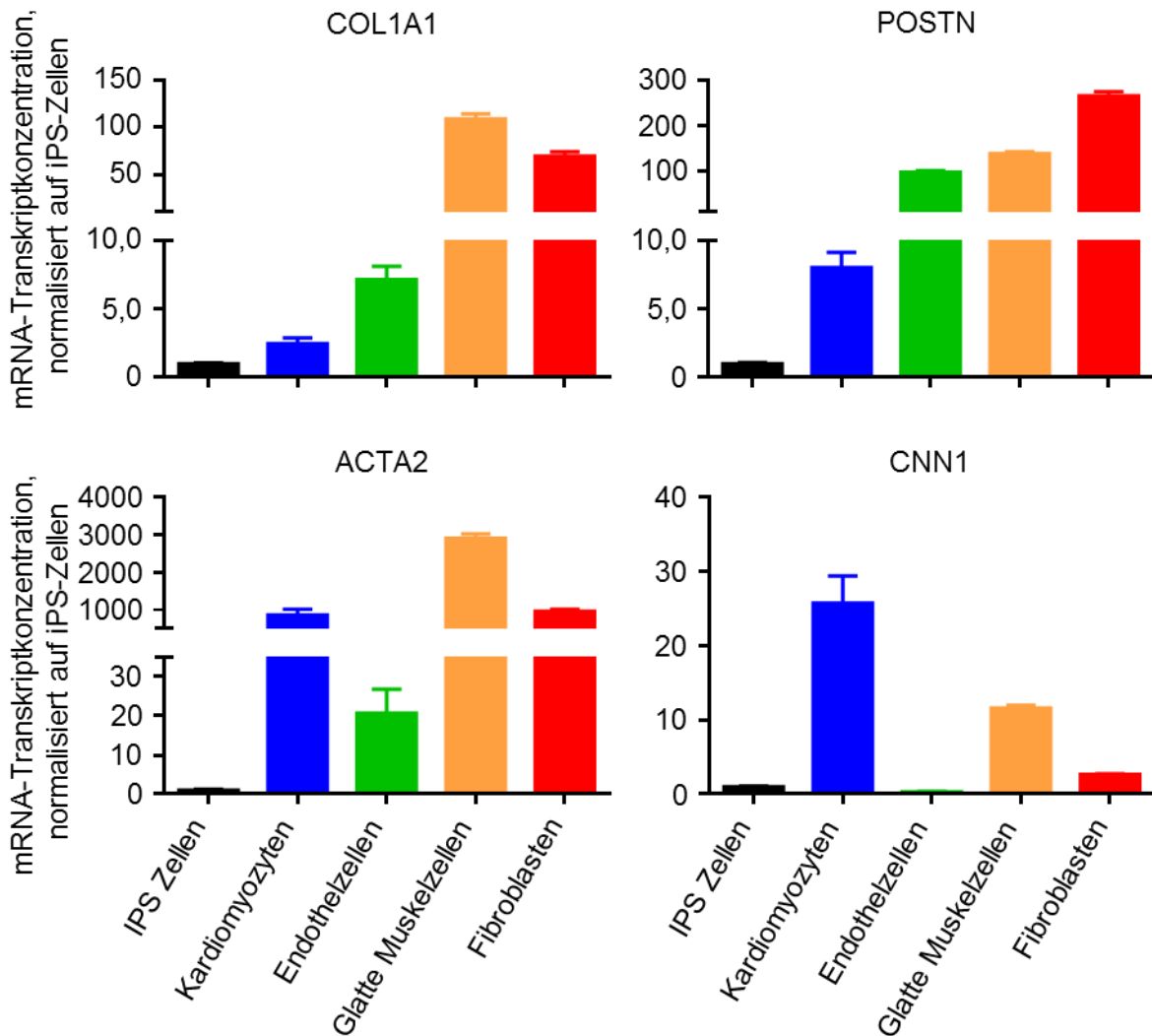


Abbildung 3.22: RT-qPCR von hiPS-Zellen und den vier daraus differenzierten Zelltypen (Teil 2). Zu sehen sind die relativen Transkriptkonzentrationen von COL1A1, POSTN, ACTA2 und CNN1, n=3 biologische Replikate pro Gruppe.

3.6.3 Gefäßbildung

Nachdem aus den ERC018-hiPS-Zellen erfolgreich Endothelzellen differenziert und aufgereinigt wurden (92% CD31-positiv), wurden die Zellen auf Matrigel ausgesät, um zu prüfen, ob sie in der Lage sind, Gefäß-ähnliche Strukturen zu formen. Als Positivkontrolle wurden GFP-transduzierte HUVECs und als Negativkontrolle wurden Fibroblasten verwendet, die ebenfalls aus hiPS-Zellen differenziert wurden.

Ergebnisse

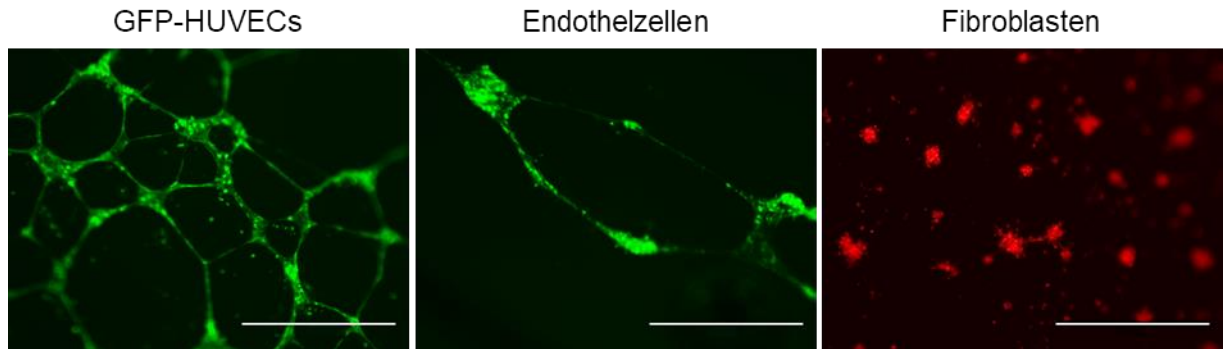


Abbildung 3.23: Epifluoreszenz von Endothelzellen und Fibroblasten nach 24-stündiger Inkubation zur Bildung Gefäß-ähnlicher Strukturen (der Maßstabsbalken entspricht 1 mm).

Die Fotos in Abbildung 3.23 zeigen, dass die differenzierten Endothelzellen ähnliche tubuläre Strukturen bildeten wie HUVECs, wobei jedoch die Zahl der Verzweigungen geringer war. Bei den Fibroblasten konnte dieses Verhalten nicht beobachtet werden, stattdessen migrierten diese Zellen vermehrt vertikal in die Matrix, wodurch nur ein Teil der im Sichtfeld liegenden Zellen im Fokus erschien.

3.6.4 Zellmigration

Zur weiteren Unterscheidung von Fibroblasten und glatten Muskelzellen wurde ein Assay durchgeführt, bei dem ein Teil des Zellrasens weggekratzt wurde, um festzustellen, wie schnell die Zellen die freie Fläche durch Migration erneut besiedeln. Die Fotos zu Beginn des Versuchs und nach 13 bzw. 33 Stunden sind in Abbildung 3.24 A zu sehen. Dabei zeigte sich, dass bei vergleichbarer Ausgangssituation die Fibroblasten schneller und in höherem Maße in die freie Fläche migrierten als die glatten Muskelzellen. Bei der quantitativen Auswertung in Abbildung 3.24 B ergab sich, dass bereits nach sechs Stunden etwa 20% der Ausgangsfläche wieder mit Fibroblasten besiedelt waren, was bei den glatten Muskelzellen war erst nach 13 Stunden der Fall. Nach 27 Stunden waren 60% der Fläche wieder mit Fibroblasten bewachsen und dieser Wert stieg danach nicht mehr weiter an. Die glatten Muskelzellen bedeckten nach 27 Stunden etwa 30% und nach 33 Stunden 40% der vorher freigelegten Fläche. Die statistische Auswertung belegt, dass sich die wiederbesiedelte Fläche über die Zeit änderte und dieser Faktor den größten Teil der Variation ausmachte. Die Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen und auch die Wechselwirkung beider Faktoren waren ebenfalls von statistischer Signifikanz, was darauf zurückzuführen ist, dass die Fibroblasten zunächst schneller wanderten und am Ende des Versuchszeitraums ein Maximum erreicht hatten, während die glatten Muskelzellen langsamer wanderten und die Werte über den gesamten Zeitraum stetig zunahmen.

Ergebnisse

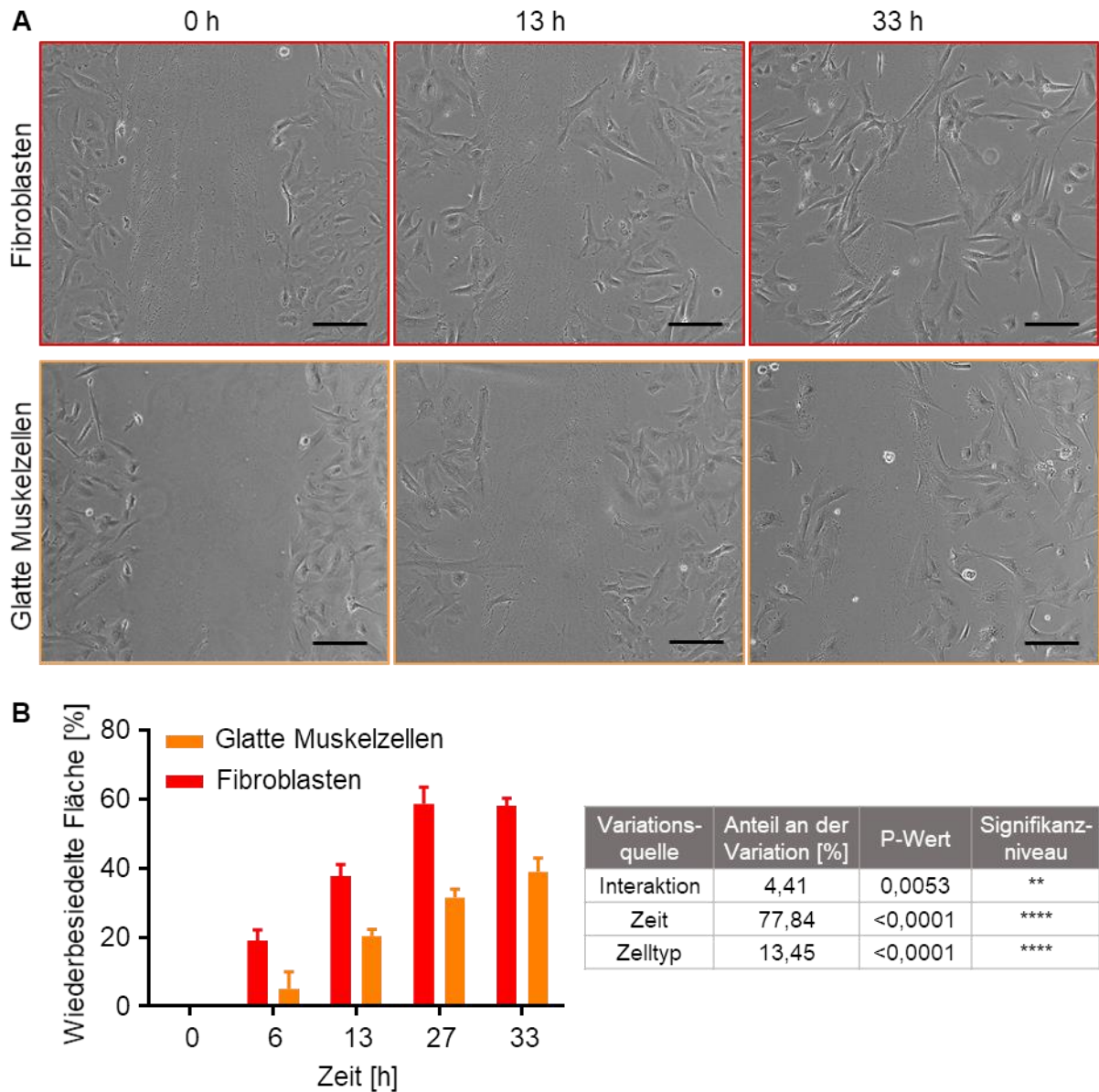


Abbildung 3.24: Fotos der freige kratzten Fläche im Zellrasen von Fibroblasten (oben) und glatten Muskelzellen (unten) über die Zeit (A; 0, 13 und 33 Stunden; Maßstabsbalken 200 μm) und die dazugehörige quantitative Auswertung (B; n=3 pro Gruppe). Die Tabelle zeigt die Ergebnisse des *Two-Way-ANOVA*-Tests der in (B) abgebildeten Daten.

3.6.5 TGF β -Stimulation

Die Aktivierbarkeit und die damit verbundene Änderung des Phänotyps sind weitere Merkmale von Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Um dies an den differenzierten epikardialen Zellen zu testen, wurden diese für 72 Stunden mit TGF β stimuliert und danach die Expression von ACTA2 und COL1A1 analysiert.

Ergebnisse

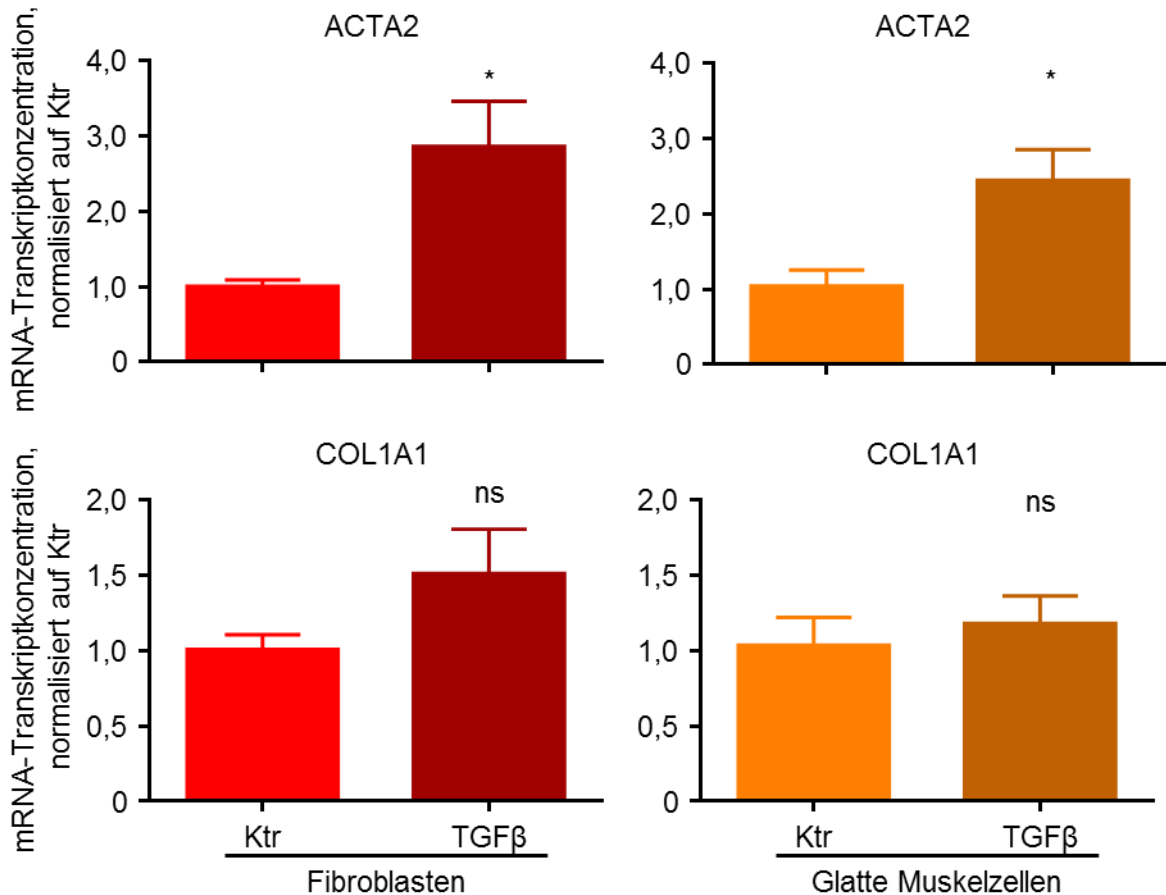


Abbildung 3.25: RT-qPCR von epikardialen Fibroblasten und glatten Muskelzellen nach 3-tägiger Stimulation mit TGF β , normalisiert auf die jeweilige Kontrolle. Zu sehen sind die relativen Transkriptkonzentrationen von ACTA2 und COL1A1, n=3 biologische Replikate pro Gruppe, *Student's t-test*, *p<0,05.

Die Ergebnisse der RT-qPCR in Abbildung 3.25 zeigen, dass die Expression von ACTA2 sowohl in Fibroblasten als auch in glatten Muskelzellen, die mit TGF β stimuliert wurden, höher war als in der jeweiligen unbehandelten Kontrolle. Die Expression von COL1A1 war bei beiden Zelltypen nicht signifikant verändert, die TGF β -stimulierten Fibroblasten exprimierten aber tendenziell mehr COL1A1 als die Kontrolle.

3.7 Multizelluläre EHTs

Nachdem sich die Zugabe von 5% Fibroblasten zumindest teilweise positiv auf die Kontraktilität von bizellulären EHTs auswirkte, wurden nun erstmalig multizelluläre EHTs aus Kardiomyozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten hergestellt. Damit sollte der Einfluss der verschiedenen Zelltypen auf die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von EHTs untersucht und das Modell physiologischen Bedingungen in nativem Herzgewebe angenähert werden.

3.7.1 Zellzusammensetzung

Nach der Differenzierung und Charakterisierung der vier Zelltypen wurden diese in einem möglichst physiologischen Verhältnis miteinander gemischt und multizelluläre EHTs aus 30% Kardiomyozyten, 50% Endothelzellen, 10% glatten Muskelzellen und 10% Fibroblasten hergestellt. Da diese EHTs aufgrund des niedrigen prozentualen Anteils nur 0,3 Mio. anstatt 1 Mio. Kardiomyozyten enthielten, wurden nicht nur EHTs mit einer Gesamtzellzahl von 1 Mio., sondern auch solche mit 2 Mio. Zellen pro EHT hergestellt, die dann 0,6 Mio. Kardiomyozyten enthielten. EHTs beider Bedingungen kontrahierten entweder nicht kohärent oder lenkten die Silikonstäbe nur so geringfügig aus, dass sie nicht analysiert werden konnten. Gleiches galt für EHTs aus 1 Mio. Zellen mit 50% Kardiomyozyten, 30% Endothelzellen, 10% glatten Muskelzellen und 10% Fibroblasten. Erst EHTs aus einer Mischung von 70% Kardiomyozyten, 20% Endothelzellen, 5% glatten Muskelzellen und 5% Fibroblasten entwickelten Kontraktionskräfte, die hoch genug waren, um analysiert werden zu können. Die parallel hergestellten unizellulären Kontroll-EHTs enthielten jeweils die gleiche Zahl an Kardiomyozyten wie die multizellulären EHTs, um die kontraktile Eigenschaften direkt vergleichen zu können. Die prozentualen Angaben der Zelltypen beziehen sich jeweils immer auf die eingesetzten Zellen aus den verschiedenen Differenzierungsprotokollen, ohne dass die unterschiedlichen Effizienzen berücksichtigt wurden.

Unabhängig von der eingeschränkten kontraktile Funktion wurden die EHTs über mehrere Wochen kultiviert und danach mit Kollagenase-II dissoziiert, um mittels Durchflusszytometrie festzustellen, ob das Verhältnis der Zellen sich im EHT über die Zeit veränderte oder konstant blieb. Die durchflusszytometrische Analyse eines EHTs aus 30% blauen Kardiomyozyten, 50% grünen Endothelzellen und jeweils 10% orangen glatten Muskelzellen und roten Fibroblasten ergab 76,5% mTagBFP-positive blaue Zellen (P1), 0,5% Venus-positive grüne Zellen (P2), 1,3% mOrange2-positive orange Zellen (P3) und 0,2% dKatushka2-positive rote Zellen (P4; s. Abbildung 3.26 oben). Dabei bestätigte sich außerdem, dass die mTagBFP-positiven Zellen relativ schwach fluoreszierten und weniger hell waren als die drei anderen Populationen, wie bereits zuvor bei den mikroskopischen Aufnahmen beschrieben. Dadurch war es schwierig, die Population mTagBFP-positiver Zellen klar abzugrenzen. Insgesamt konnten 22,6% der Zellen keinem der vier Kanäle zugeordnet werden. Hinzu kam, dass das Volumen und die Granularität der Partikel aus dem dissoziierten EHT variabel waren. Bei der Auftragung von Vorwärtsstreulicht (FSC-A) gegen Seitwärtsstreulicht (SSC-A) in Abbildung 3.26 konnten die lebenden Zellen jedoch relativ gut identifiziert werden. Außerdem ging aus den Auftragungen der einzelnen Fluorochrome gegeneinander hervor, dass die Populationen gut voneinander getrennt werden konnten. Es gab lediglich einige Partikel, die in der FACS-Analyse positiv für mOrange2 und gleichzeitig positiv für mTagBFP erschienen.

Ergebnisse

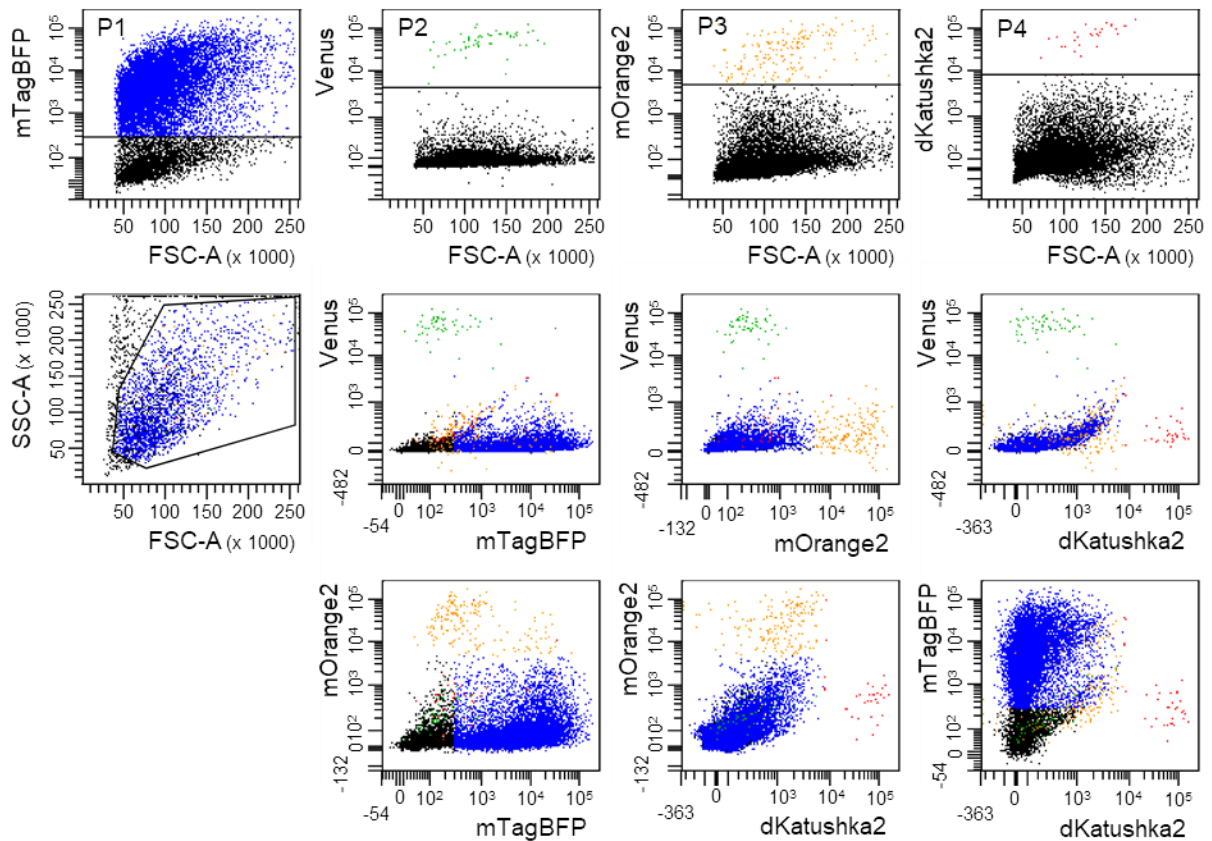


Abbildung 3.26: Durchflusszytometrie der vier Zellpopulationen eines dissoziierten EHTs aus 30% Kardiomyozyten (mTagBFP), 50% Endothelzellen (Venus), 10% glatten Muskelzellen (mOrange2) und 10% Fibroblasten (dKatushka2) nach 37 Tagen Kulturdauer.

Besonders gravierend war die Abnahme der im 2D-Format schnell proliferierenden, Venus-positiven Endothelzellen von 50% bei der EHT-Herstellung auf 0,5% in der durchflusszytometrischen Analyse fünf Wochen später. Die mikroskopische Betrachtung der EHTs ergab, dass zu Beginn der EHT-Kultur viele Venus-positive Endothelzellen vorhanden waren, zu einem späteren Zeitpunkt aber kaum noch Zellen im EHT gefunden wurden. Der Grund für den geringen Anteil an Endothelzellen lag also wahrscheinlich an den EHT-Zellkulturbedingungen.

3.7.2 Zellkulturbedingungen

Kaja Breckwoldt beschrieb in ihrer Dissertation (Breckwoldt 2015), dass die Optimierung eines geeigneten Zellkulturmediums für hiPSC-abgeleitete Endothelzellen schwierig war. Aufgrund dessen und der zuvor beschriebenen Ergebnisse wurden verschiedene Medien verglichen, um das EHT-Medium an die Bedürfnisse der verschiedenen Zelltypen anzupassen. Da nicht nur der Anteil von Endothelzellen, sondern auch der Fibroblasten in der durchflusszytometrischen Analyse gering war, wurde der Versuch an 2D-Kulturen beider Zelltypen durchgeführt.

Ergebnisse

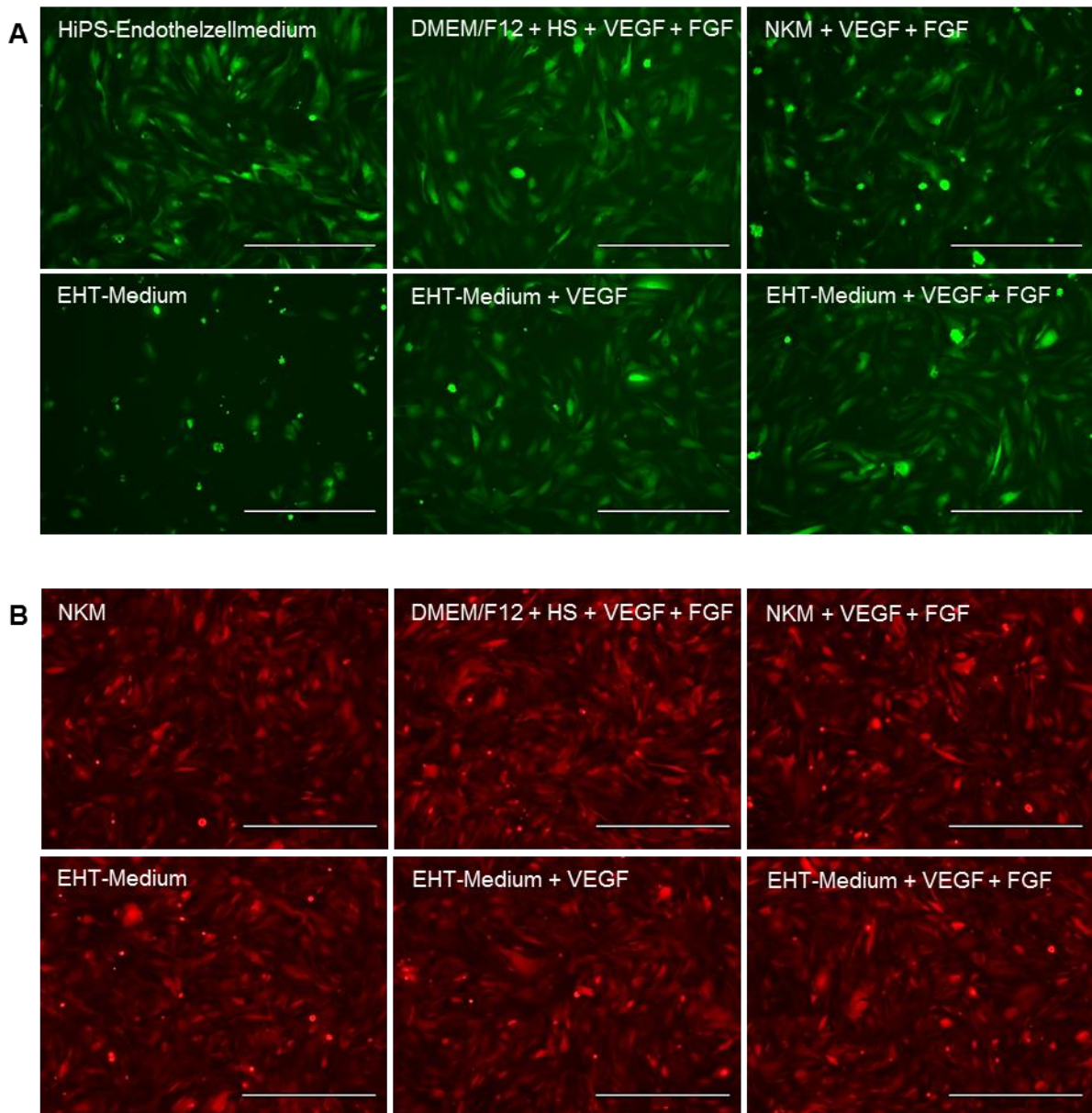


Abbildung 3.27: Epifluoreszenzfotos von Endothelzellen (A) und Fibroblasten (B) nach 24-stündiger Kultur in unterschiedlichen Zellkulturmedien (die Maßstabsbalken entsprechen 400 μm (A) bzw. 1000 μm für B).

In EHT-Medium waren bereits nach 24 Stunden nahezu alle Endothelzellen gestorben. In hiPSC-Endothelzellmedium und in allen anderen getesteten Medienkombinationen mit Wachstumsfaktoren überlebten und proliferierten die Zellen im Gegensatz dazu über die Versuchsdauer von fünf Tagen. Zellen, die in FCS-haltigem NKM oder EHT-Medium nur mit VEGF kultiviert wurden, sahen jedoch schlechter aus und proliferierten weniger als unter den drei anderen Bedingungen (s. Abbildung 3.27 A). Waren beide Wachstumsfaktoren im Medium enthalten, konnten zwischen hiPSC-Endothelzellmedium, EHT-Medium oder DMEM/F12 keine Unterschiede beobachtet werden. Die in Abbildung 3.27 B gezeigten Fibroblasten ließen sich in allen getesteten Medien kultivieren. In Medien mit FGF-Zusatz proliferierten sie schneller. Besonders deutlich war dies im Medium mit DMEM/F12 als Grundmedium. Weil

Ergebnisse

beide Zelltypen darin kultiviert werden konnten und die Abweichung zum Standard-EHT-Medium gering war, wurden multizelluläre EHTs und auch die unizellulären Kontroll-EHTs in allen weiteren Versuchen in EHT-Medium mit VEGF (30 ng/ml) und FGF (20 ng/ml) kultiviert.

3.7.3 Konfokale Mikroskopie

Eines der Hauptziele war es, die Struktur der multizellulären EHTs mit Hilfe der lentiviral transduzierten Fluoreszenzproteine in den verschiedenen Zelltypen aufzuklären. Dafür wurde an mehreren Zeitpunkten der EHT-Kultur ein lebendes EHT auf einen speziellen Objektträger mit Vertiefungen überführt und am konfokalen Mikroskop betrachtet.

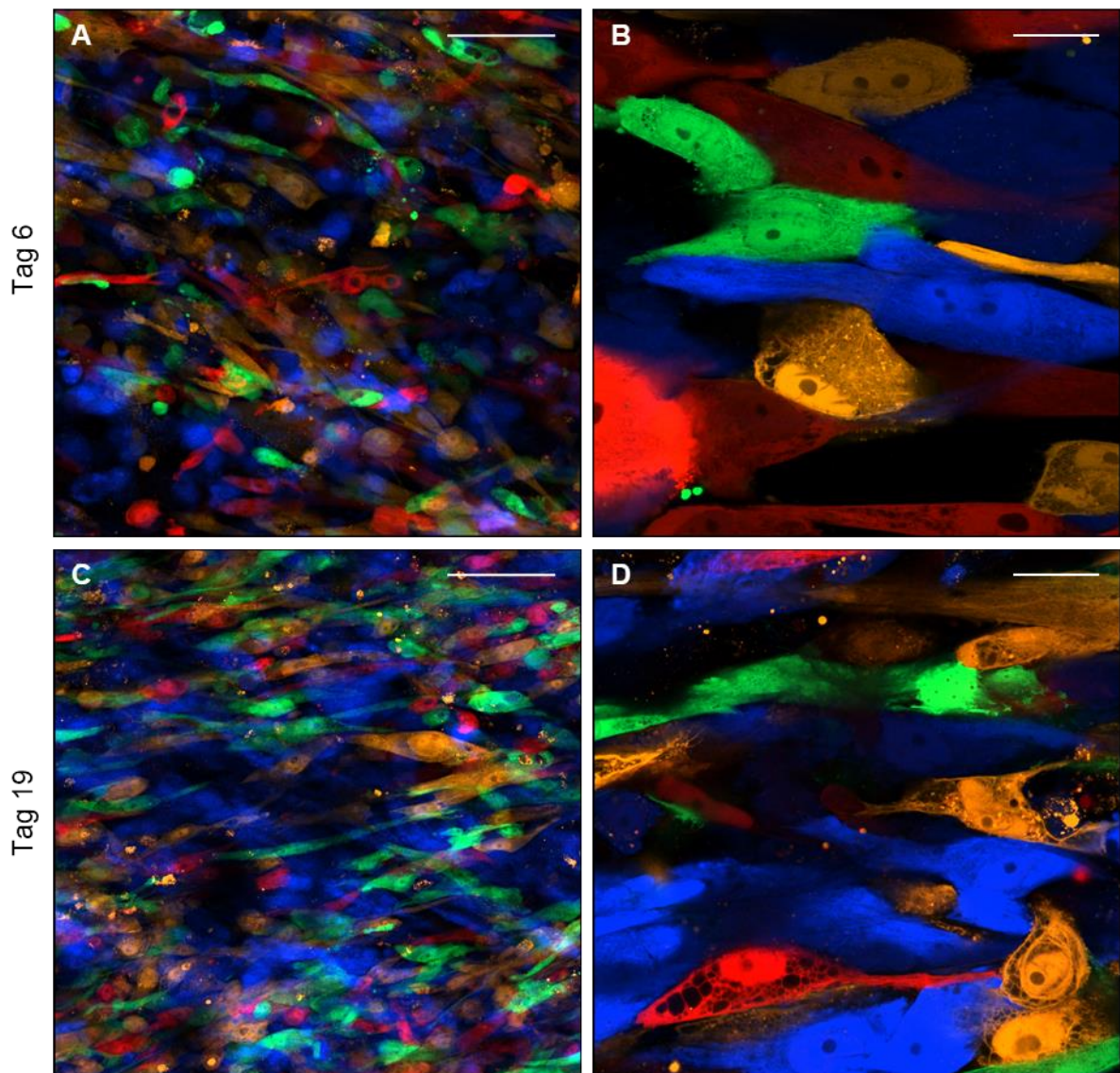


Abbildung 3.28: Konfokale Mikroskopie lebender multizellulärer EHTs aus 50% Kardiomyozyten (blau), 30% Endothelzellen (grün), 10% glatten Muskelzellen (orange) und 10% Fibroblasten (rot). Aufnahmen im Airyscan-Modus an Tag 6 und Tag 19 der EHT-Kultur bei niedriger (A und C, der Maßstabsbalken entspricht 100 μm) und hoher Vergrößerung (B und D, der Maßstabsbalken entspricht 20 μm).

Ergebnisse

Grundsätzlich zeigen die Bilder in Abbildung 3.28, dass durch den Zusatz von Wachstumsfaktoren zum EHT-Medium alle vier Zelltypen im EHT-Format überlebten und sich das Zahlenverhältnis über die Kulturdauer nicht drastisch veränderte. Methodisch ließen sich die vier Fluorochrome eindeutig voneinander trennen, was im Airyscan-Modus durch die Nanometer-genauen Einstellungsmöglichkeiten der zu filternden Wellenlängen besonders gut gelang. Alle vier Proteine waren sowohl nukleär als auch zytoplasmisch lokalisiert, so dass die Struktur der gesamten Zellen sichtbar war. Es wurde stets versucht, die Einstellungen so zu wählen, dass alle Zellen klar erkennbar waren. Aufgrund der unterschiedlichen Intensität der Fluoreszenz erschienen manche Zellen aber relativ dunkel, während andere Zellen des gleichen Zelltyps überbelichtet waren.

Vergleicht man die Bilder von Tag 6 und Tag 19 der EHT-Kultur, so sieht man, dass die Zellen sich über die Zeit an der Längsachse des EHTs ausrichteten und vermehrt langgestreckt und weniger kugelig aussahen. Außerdem waren an Tag 19 weniger zellfreie Bereiche vorhanden, und die Zellen waren durch den Abbau der Fibrinmatrix dichter gepackt. Die Struktur der blauen Kardiomyozyten war bei geringerer Vergrößerung nur schlecht zu erkennen, da ein Großteil dieser Zellen in einer anderen Fokusebene war. Bei höherer Vergrößerung war die Struktur besser erkennbar, bei einigen Kardiomyozyten konnten sogar ohne zusätzliche Kernfärbung eindeutig zwei Zellkerne identifiziert werden (vgl. Abbildung 3.28 B). Die Mikroskopie lebender EHTs sollte die möglichst Artefakt-freie Betrachtung des Gewebes gewährleisten. Daher wurden die EHTs lediglich in einem Tropfen Phenolrot-freiem DMEM auf den Objektträger gegeben und das Deckgläschen nur über Adhäsion befestigt. In Abbildung 3.28 D ist jedoch erkennbar, dass sich viele Vakuolen im Zytoplasma bildeten und die Zellen nach einiger Zeit bei Raumtemperatur und ohne kontrollierte Gasbedingungen in Apoptose gingen, so dass sie nur für einen Zeitraum von maximal 2 Stunden mikroskopiert werden konnten.

Die unterschiedliche Verteilung der Zellen im EHT wird anhand des Vergleichs von Abbildung 3.28 C und Abbildung 3.29 A deutlich. Es handelt sich um dasselbe EHT, fotografiert in der Mitte oder am Randbereich des Gewebes. Bei letzterem war eine klare äußere Schicht von Kardiomyozyten zu erkennen, die nahezu keine anderen Zelltypen enthielt. Methodisch zeigt der Vergleich der beiden Bilder außerdem die höhere Qualität und bessere Auflösung im Airyscan-Modus als im LSM-Modus.

Ergebnisse

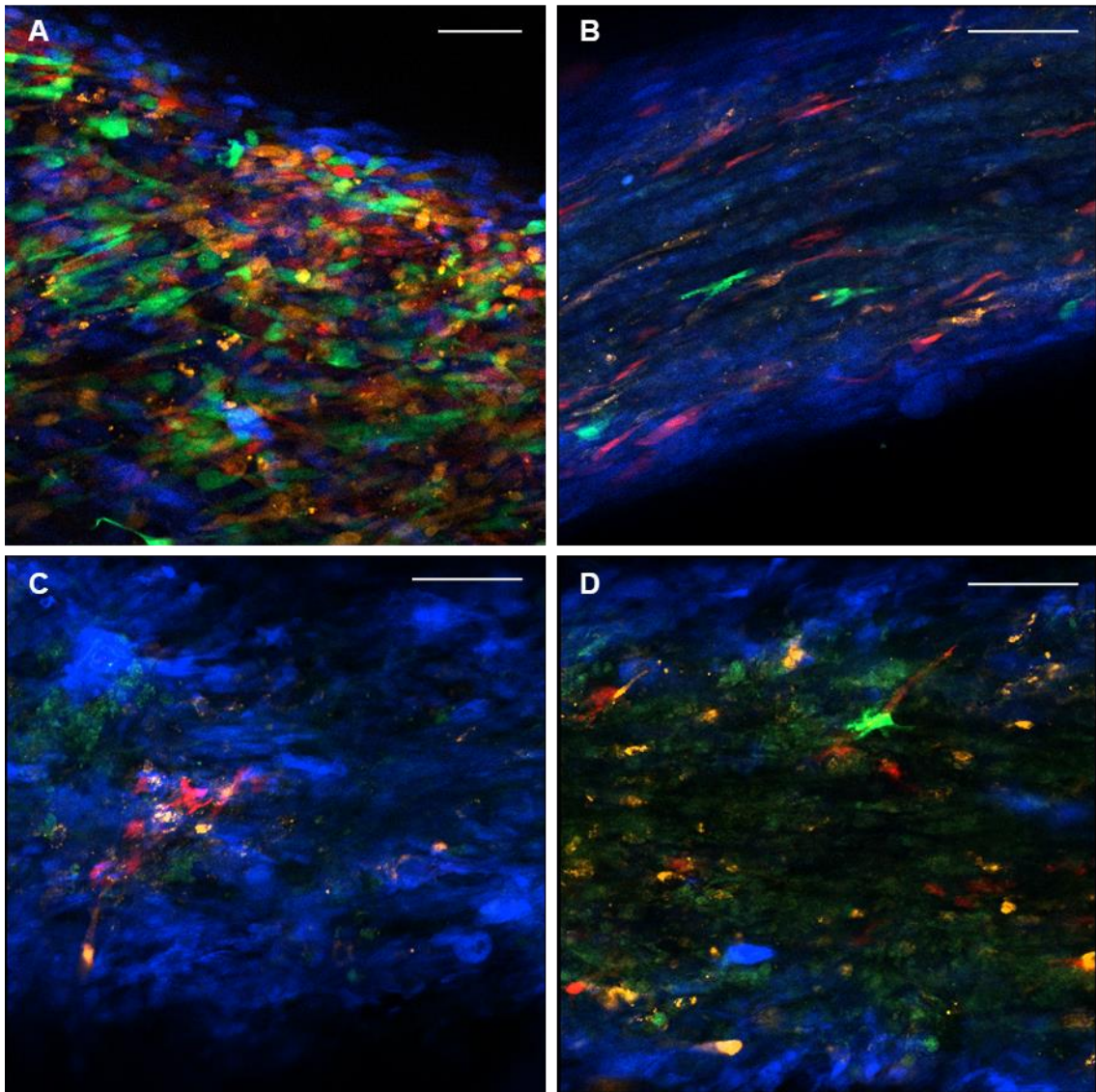


Abbildung 3.29: Konfokale Mikroskopie multizellulärer EHTs unter verschiedenen Bedingungen. Randbereich eines lebenden EHTs aus 50% Kardiomyozyten (blau), 30% Endothelzellen (grün), 10% glatten Muskelzellen (orange) und 10% Fibroblasten (rot) an Tag 19 im LSM-Modus (A). Aufnahme eines fixierten EHTs aus 70% Kardiomyozyten, 20% Endothelzellen, 5% glatten Muskelzellen und 5% Fibroblasten nach 21 Tagen EHT-Kultur im Airyscan-Modus (B). Aufnahmen des gleichen EHTs wie in (B) mit einem Objektiv mit großen Arbeitsabstand, dass es ermöglicht die Aufsicht (C) und das Innere des EHTs (D) gleichermaßen zu fokussieren (die Maßstabsbalken entsprechen 100 μm).

In Abbildung 3.29 B, C und D ist ein multizelluläres EHT aus 70% Kardiomyozyten, 20% Endothelzellen, 5% glatten Muskelzellen und 5% Fibroblasten zu sehen. Durch die Fixierung in 4% Histofix waren zwar höhere Laserintensitäten nötig, es konnten aber immer noch alle vier Fluorochrome problemlos mikroskopiert und voneinander getrennt werden. Während das Verhältnis von glatten Muskelzellen und Fibroblasten ausgewogen erschien und Kardiomyozyten eindeutig am Häufigsten vertreten waren, war die Zahl an (grünen) Endothelzellen sehr gering und entsprach nicht dem eingesetzten Zahlenverhältnis (vgl.

Ergebnisse

Abbildung 3.29 B). Die Verwendung eines Objektivs mit großem Arbeitsabstand ermöglichte es, bei gleicher Vergrößerung sowohl die Oberfläche als auch tiefer liegende Bereiche des EHTs zu fokussieren. Der Vergleich von Abbildung 3.29 C und D bestätigt anschaulich, dass die Kardiomyozyten eine äußere Hülle bildeten und die anderen Zelltypen sich darunter anordneten. Der innerste Bereich des EHTs enthielt kaum intakte Zellen, sondern hauptsächlich Venus-positive Überreste von Endothelzellen. Der Vergleich der Bilder des fixierten EHTs (wenig grüne Zellen) mit dem lebenden in Abbildung 3.29 A (viele grüne Zellen) lässt vermuten, dass das scheinbare Fehlen von Endothelzellen zumindest teilweise auf den Fixiervorgang zurückzuführen ist.

Aufgrund der gravierenden Unterschiede in der Zahl an Endothelzellen bei den mikroskopischen Aufnahmen wurde nach der Umstellung auf EHT-Medium mit VEGF und FGF die durchflusszytometrische Analyse zur Zellzusammensetzung (vgl. Abbildung 3.26) wiederholt. Dabei wurden zwei Dissoziationsprotokolle miteinander verglichen. Dafür wurde jeweils ein 2 Wochen altes EHT aus 70% Kardiomyozyten, 20% Endothelzellen und je 5% glatten Muskelzellen und Fibroblasten mit Kollagenase-II oder mit Papain dissoziiert. Die Durchflusszytometrie ergab für ersteres 64% Kardiomyozyten, 10% Endothelzellen, 18% glatte Muskelzellen und 7% Fibroblasten, wobei der Verdau unvollständig war und insgesamt nur wenig intakte Zellen analysiert werden konnten. Für die in Tabelle 12 zusammengefassten Werte wurden deshalb die Menge der lebenden und fluoreszierenden Einzelzellen als 100% gesetzt und die Anteile der verschiedenen Zelltypen daran berechnet. Die Dissoziation mit Papain ging schneller und resultierte in wesentlich mehr intakten Einzelzellen. Die Durchflusszytometrie ergab hierbei 79% Kardiomyozyten, 7% Endothelzellen, 8% glatte Muskelzellen und 6% Fibroblasten. In beiden Fällen war der Anteil an Endothelzellen geringer als in den Ausgangsbedingungen (Originaldaten s. Anhang zusätzliche Abbildungen 4 und 5).

Tabelle 12: Zellzusammensetzung multizellulärer EHTs bei Herstellung und nach Dissoziation

Zelltyp	Anteil bei EHT-Herstellung	Kollagenase-II-Dissoziation	Papain-Dissoziation
Kardiomyozyten	70%	64%	79%
Endothelzellen	20%	10%	7%
Glatte Muskelzellen	5%	18%	8%
Fibroblasten	5%	7%	6%

Aufgrund der schlechten Zellqualität nach der Kollagenase-II-Dissoziation wurde das Gating der durchflusszytometrischen Analyse von den mit Papain dissoziierten Zellen übernommen. Dabei konnte der Anteil der glatten Muskelzellen bei den mit Kollagenase-II dissoziierten Zellen technisch schlecht bestimmt werden und wurde vermutlich überschätzt.

Ergebnisse

3.7.4 Morphologie

Makroskopisch unterschied sich die Morphologie multizellulärer EHTs zu Beginn der EHT-Kultur stark von den unizellulären Kontrollen. Wie bereits bizelluläre EHTs aus Kardiomyozyten und Fibroblasten bauten diese EHTs die Fibrinmatrix schneller ab und hatten deshalb einen geringeren Durchmesser als die Kontrollen (vgl. Abbildung 3.8).

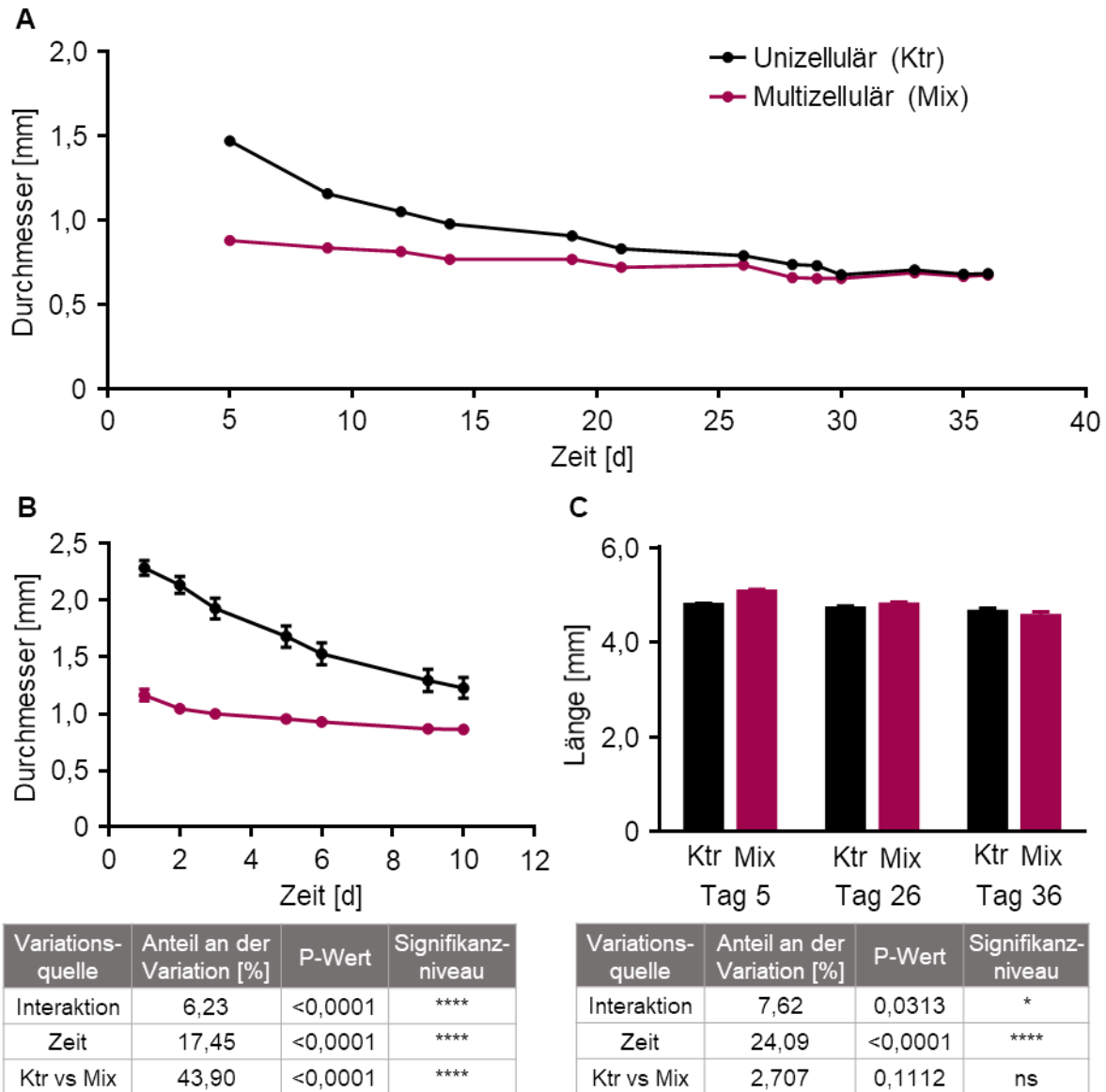


Abbildung 3.30: Morphologie von unizellulären und multizellulären EHTs. EHT-Durchmesser im Zeitverlauf über fünf Wochen (A; n=6-12 Gruppe) und in der Anfangsphase direkt nach der Herstellung (B, zwei unabhängige Versuche, n=24). Länge der EHTs zwischen den Silikonstäben an verschiedenen Zeitpunkten (C; n=6-12 pro Gruppe). Die Tabellen zeigen die Ergebnisse der *Two-Way-ANOVA*-Tests der in (B) und (C) abgebildeten Daten.

Die in Abbildung 3.30 und allen folgenden Abbildungen gezeigten Experimente wurden mit multizellulären EHTs aus 70% Kardiomyozyten, 20% Endothelzellen und je 5% glatten Muskelzellen und Fibroblasten durchgeführt. Diese multizellulären EHTs waren bereits an

Ergebnisse

Tag 5 nach der Herstellung weniger als 1 mm breit und hatten damit die Fibrin-Matrix so weit abgebaut, dass sie ihre finalen Dimensionen erreicht hatten und der Durchmesser sich über die Zeit nicht mehr veränderte. Die unizellulären Kontrollen waren an Tag 5 noch 1,5 mm breit, ihr Durchmesser nahm aber über die Zeit ab und am Ende der fünfwöchigen EHT-Kultur unterschieden sich die Durchmesser beider Gruppen nicht mehr (s. Abbildung 3.30 A). Da die Unterschiede in der Anfangsphase besonders deutlich waren, wurde diese in zusätzlichen Experimenten untersucht. Die multizellulären EHTs waren schon direkt am Tag nach der Herstellung mit 1,2 mm nur halb so dick wie die unizellulären Kontrollen mit durchschnittlich 2,3 mm. Über die Zeit veränderte sich der Durchmesser der multizellulären EHTs wiederum kaum noch, die Kurve der unizellulären EHTs näherte sich aber immer weiter an, so dass der Durchmesser an Tag 10 nur noch bei 1,2 mm lag. Am gleichen Tag war der Durchmesser der multizellulären EHTs bei 0,9 mm (Abbildung 3.30 B). Statistisch waren sowohl die Änderung über die Zeit, als auch die Unterschiede zwischen unizellulären und multizellulären EHTs hoch signifikant. Die Länge der EHTs in Abbildung 3.30 A wurde ebenfalls über den gesamten Zeitraum analysiert. Während an Tag 5 die multizellulären EHTs mit 5,1 mm etwas länger waren als die Kontroll-EHTs mit 4,7 mm unterschieden sie sich zu späteren Zeitpunkten nicht mehr. Die unizellulären Kontroll-EHTs waren über den gesamten Zeitraum nahezu gleich lang (Abbildung 3.30 C). Dennoch ergab die zweifaktorielle statistische Analyse, dass sich die Länge der EHTs zwischen den beiden Gruppen zwar nicht unterschied, wohl aber über die Zeit veränderte. Da sich die absoluten Werte jedoch nur geringfügig ändern, ist der Einfluss auf die Funktion der EHTs vermutlich ebenfalls geringfügig.

3.7.5 Kontraktilität

Über den gleichen Zeitraum wie die Morphologie wurde auch die Kontraktilität der EHTs analysiert. Die Kontraktionskräfte beider Gruppen waren mit maximal 0,24 mN für die unizellulären und 0,18 mN für die multizellulären EHTs gering im Vergleich zu anderen Experimenten. Der Zeitverlauf in Abbildung 3.31 A lässt erkennen, dass beide Gruppen in den ersten drei Wochen ähnliche Kräfte entwickelten. Ab Tag 21 waren die unizellulären Kontrollen stärker als die multizellulären EHTs. An Tag 31 kontrahierten die unizellulären EHTs mit 0,21 mN und die Kräfte der multizellulären EHTs lagen bei 0,16 mN (s. Abbildung 3.31 B). Die Relaxationszeiten unterschieden sich nicht, die Werte der Kontrollen waren bei 0,15 s, die der multizellulären EHTs bei 0,16 s (s. Abbildung 3.31 C).

Ergebnisse

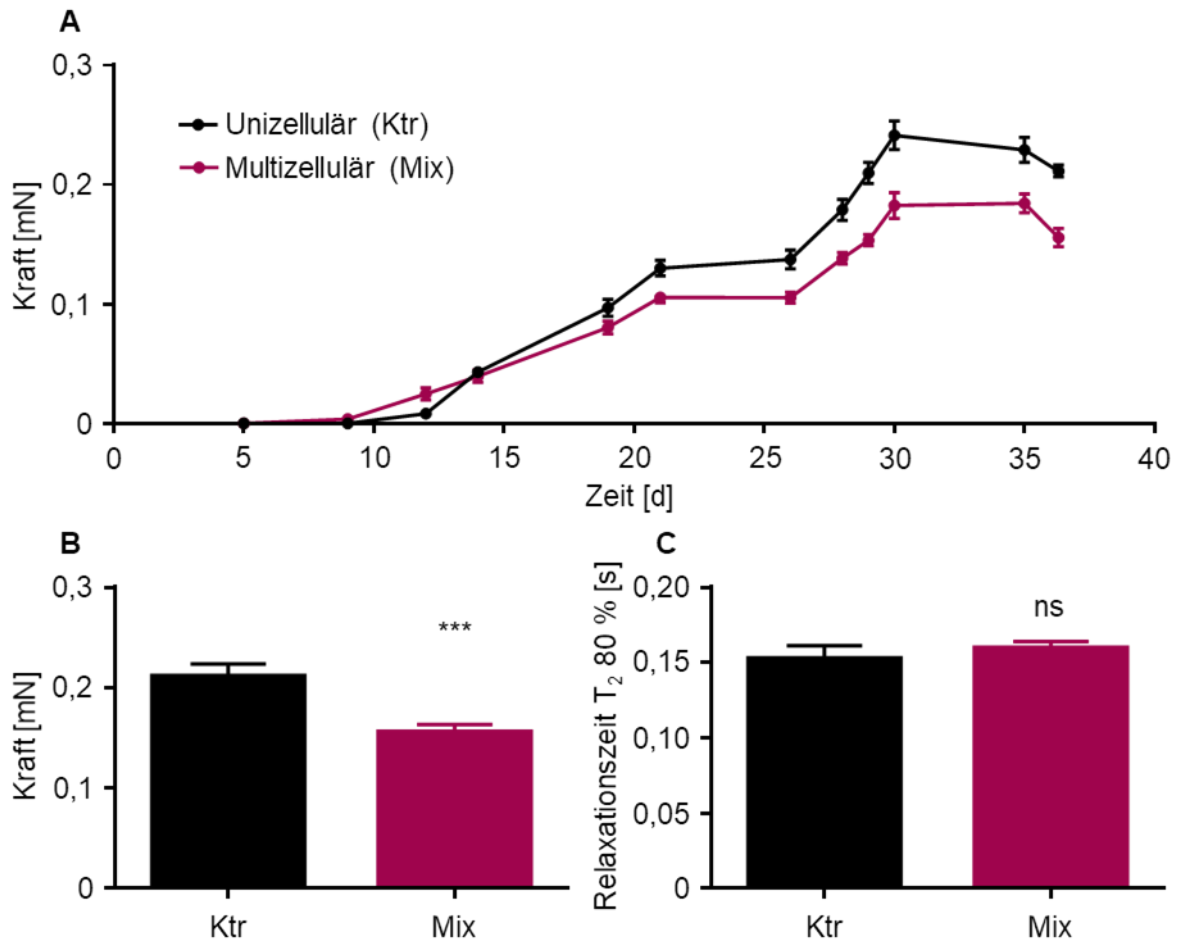


Abbildung 3.31: Kontraktionskraft von unizellulären und multizellulären EHTs über die Kulturdauer (A; n=6-10 EHTs pro Gruppe) und an Tag 36 (B), Relaxationszeiten an Tag 36 (C), n=6 EHTs pro Gruppe, *Student's t-test*, * $p < 0,05$.

3.7.6 Genexpression

Aus den Kontrollen und multizellulären EHTs wurde als nächstes die Gesamt-RNA extrahiert. Mit der Genexpressionsanalyse sollte festgestellt werden, ob die unterschiedliche Expression verschiedener Markergene, die bei den reinen Zellpopulationen gefunden wurde (vgl. Abbildung 3.21 und Abbildung 3.22), auch noch in der gemischten Zellpopulation multizellulärer EHTs nachvollzogen werden kann.

Ergebnisse

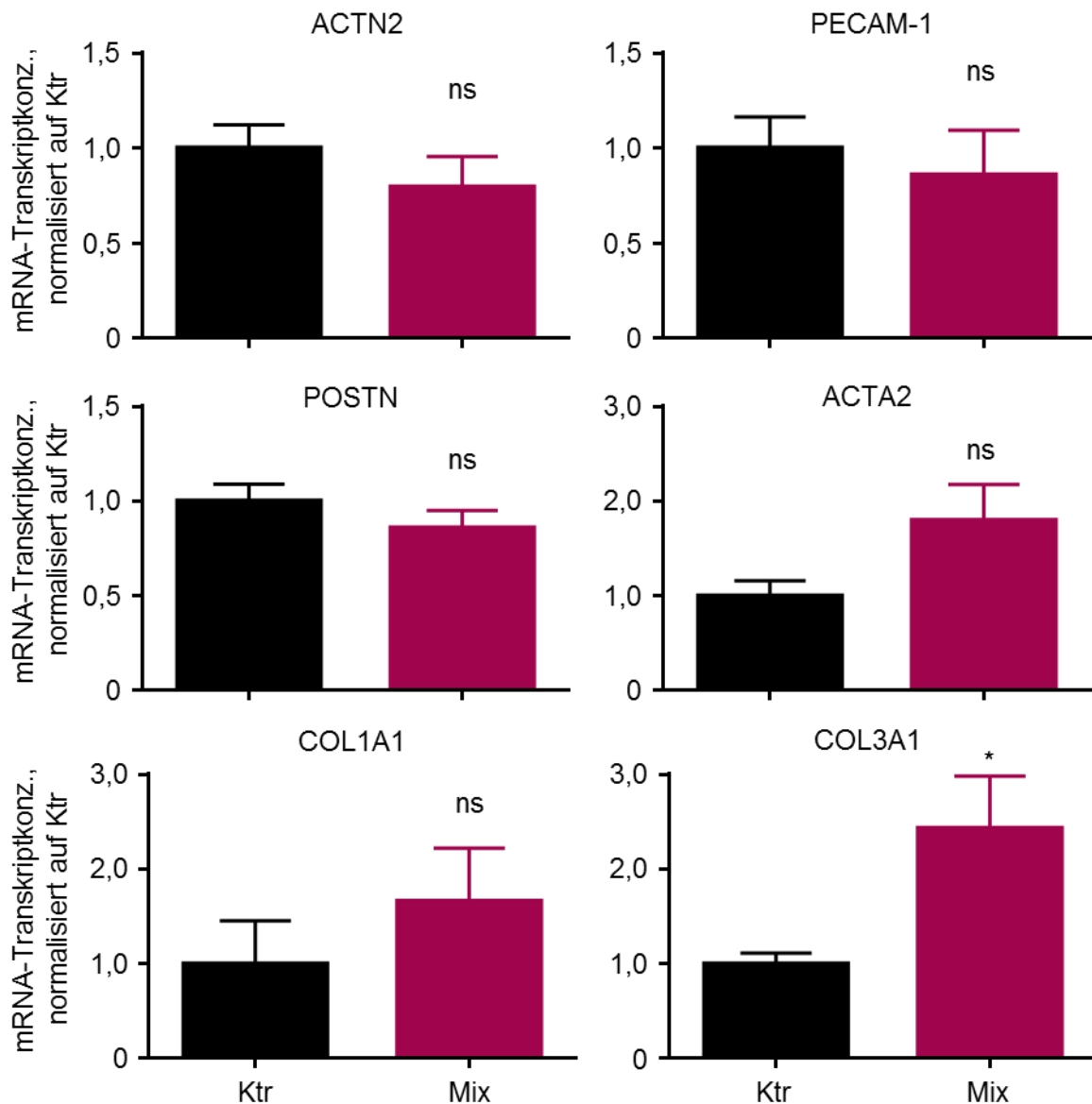


Abbildung 3.32: RT-qPCR von multizellulären EHTs, normalisiert auf die unizelluläre Kontrolle. Zu sehen sind die relativen Transkriptkonzentrationen von ACTN2, PECAM-1, POSTN, ACTA2, COL1A1 und COL3A1, n=5 EHTs pro Gruppe, *Student's t-test*, * $p < 0,05$.

Die Expression von α -Actinin (ACTN2) war bei gleicher Zahl an Kardiomyozyten in den multizellulären EHTs tendenziell etwas geringer als in den unizellulären Kontrollen, was auf den Anteil der anderen Zelltypen an der Gesamt-RNA zurückzuführen ist. Der Endothelzellmarker CD31 (PECAM-1) und der Fibroblastenmarker Periostin (POSTN) waren nicht unterschiedlich stark exprimiert. Im Gegensatz dazu war die Expression von ACTA2 und den Kollagenen-I und -III (COL1A1 und COL1A3) in den multizellulären EHTs höher als in den Kontrollen (s. Abbildung 3.32). Statistisch signifikant war dieser Effekt zwar nur für COL3A1, da der Anteil an glatten Muskelzellen und Fibroblasten aber insgesamt nur 10% der Zellen betrug, sollte dies im Folgenden trotzdem näher untersucht werden.

Ergebnisse

3.7.7 Histologie

Mittels immunhistologischer Färbung von Kollagen-I sollte festgestellt werden, ob sich die erhöhte Expression auf mRNA-Ebene auch auf Proteinebene widerspiegelt.

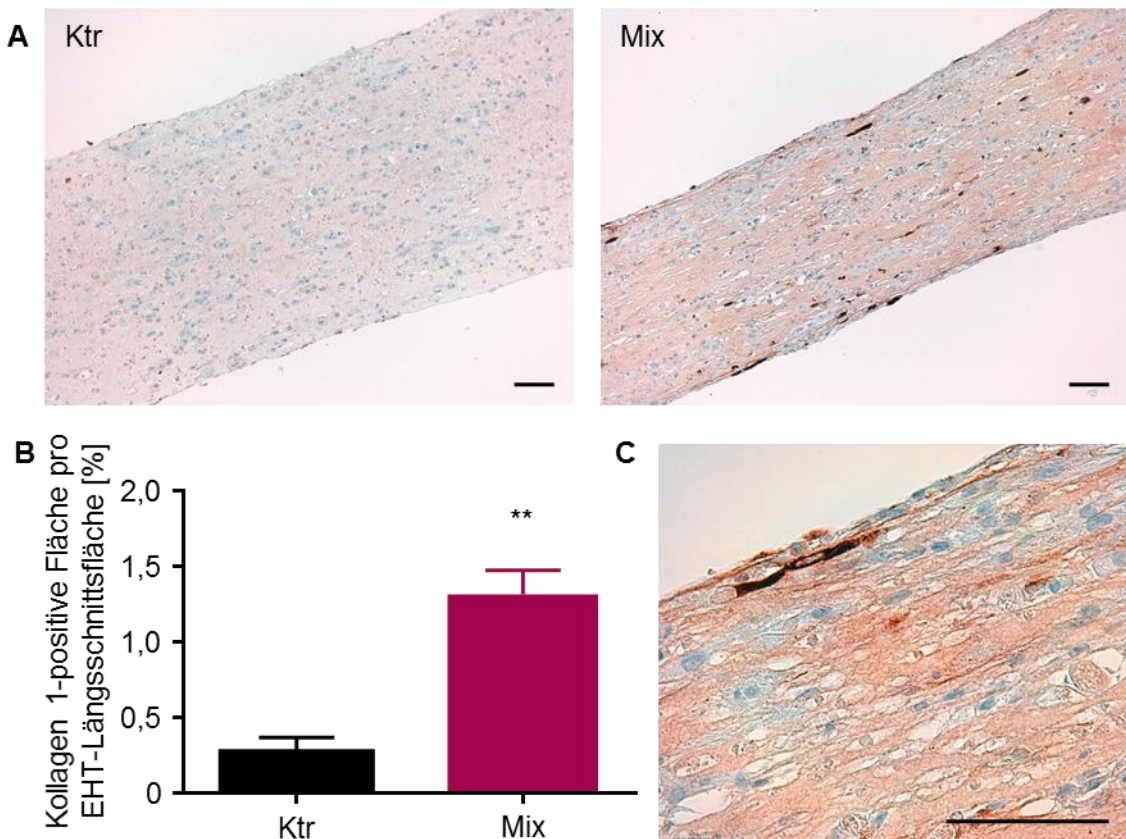


Abbildung 3.33: Fotos der Kollagen-I-Immunhistochemie von unizellulären (Ktr) und multizellulären (Mix) EHTs (A; der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m) und deren quantitative Auswertung (B; n=4-5 EHTs pro Gruppe, *Student's t-test*, **p<0,01). Vergrößerung eines multizellulären EHTs (C; Maßstabsbalken entspricht 100 μ m).

Dabei ergab sich, dass die Kontroll-EHT nahezu ungefärbt erschienen und bei den multizellulären EHTs eindeutig Kollagen-I-positive Zellen vorhanden waren (s. Abbildung 3.33 A). Außerdem waren auch nicht-zelluläre Bereiche der Matrix gefärbt, wie in der höheren Vergrößerung in Abbildung 3.33 C zu erkennen ist. Bei der quantitativen Auswertung ergab sich, dass bei den multizellulären EHTs 1,3% der Gesamtfläche Kollagen-I-positiv waren und damit 4-fach mehr als bei unizellulären Kontrollen mit nur 0,3%.

Weitere histologische Färbungen sollten zusätzliche Informationen über die Struktur und extrazelluläre Matrix der multizellulären EHTs geben und sind in Abbildung 3.34 zusammengefasst. Die exemplarischen Bilder der Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung zeigten in beiden Gruppen bläuliche Zellkerne, das Zytoplasma der Zellen in pink und die extrazelluläre Matrix in rosa. Die Zellen in den multizellulären EHTs sahen dabei etwas besser strukturiert und langgestreckt aus als in den Kontroll-EHTs. Dies ließ sich auch in der Masson-Goldner-

Ergebnisse

Färbung nachvollziehen. Die bei dieser Färbung roten Muskelzellen erschienen in den multizellulären EHTs ausgeprägter und kräftiger gefärbt. Matrixkomponenten wie Kollagen erscheinen in der Masson-Goldner-Färbung blau oder grün. Die EHT-Matrix war bei beiden Gruppen einheitlich blau gefärbt und es konnte nicht zwischen Fibrin und Kollagen differenziert werden.

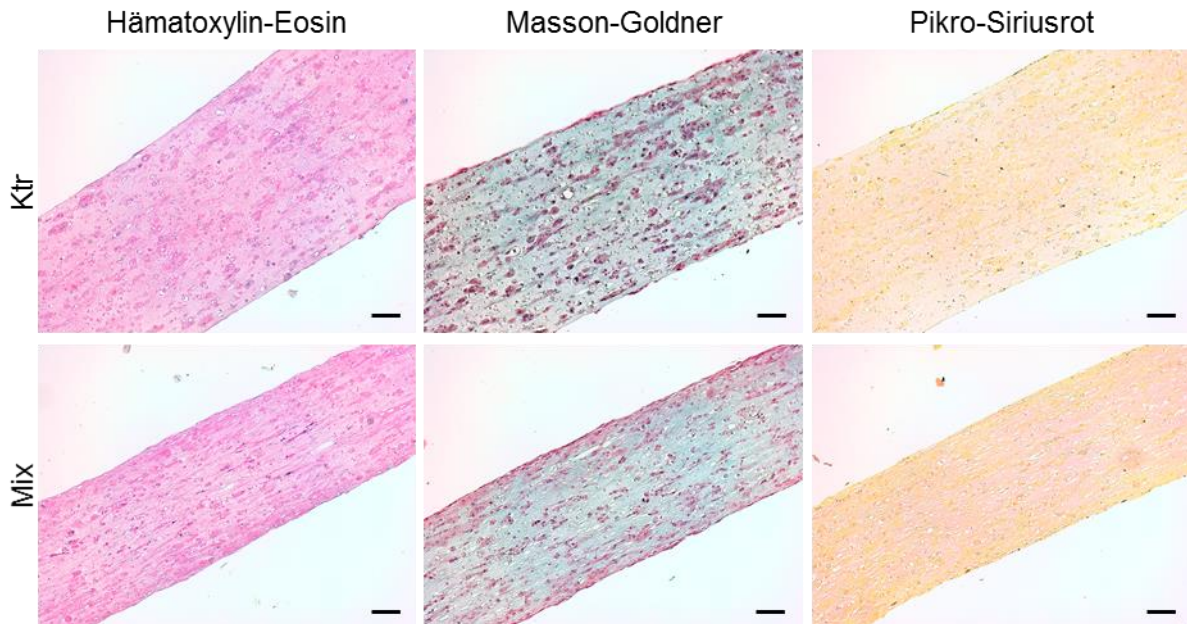


Abbildung 3.34: Histologische Färbungen von unizellulären (Ktr) und multizellulären (Mix) EHTs im Längsschnitt, der Maßstabbalken entspricht 100 μm .

Mit Pikro-Siriusrot wurden Muskelzellen gelb und Matrixproteine wie Kollagen pink angefärbt. Insgesamt war die Intensität der Färbung beim Vergleich der einzelnen Schnitten sehr unterschiedlich. Die Ergebnisse waren daher innerhalb beider Gruppen variabel, und schwieriger zu interpretieren als bei den beiden anderen Färbungen. Immerhin konnte man trotz der Variabilität bei beiden Gruppen die Kardiomyozyten in gelb erkennen. Die Matrix war schwach bis kräftig rosa gefärbt und der Hintergrund erschien ähnlich wie bei der Kollagen-Färbung in den multizellulären EHTs etwas intensiver gefärbt. Insbesondere in den Randbereichen der multizellulären EHTs gab es aber auch einige pink gefärbte Strukturen, die in den unizellulären EHTs weniger oft vorkamen (s. Abbildung 3.35) und deren Lokalisation in etwa mit den Kollagen-I-gefärbten Bereichen übereinstimmte.

Ergebnisse

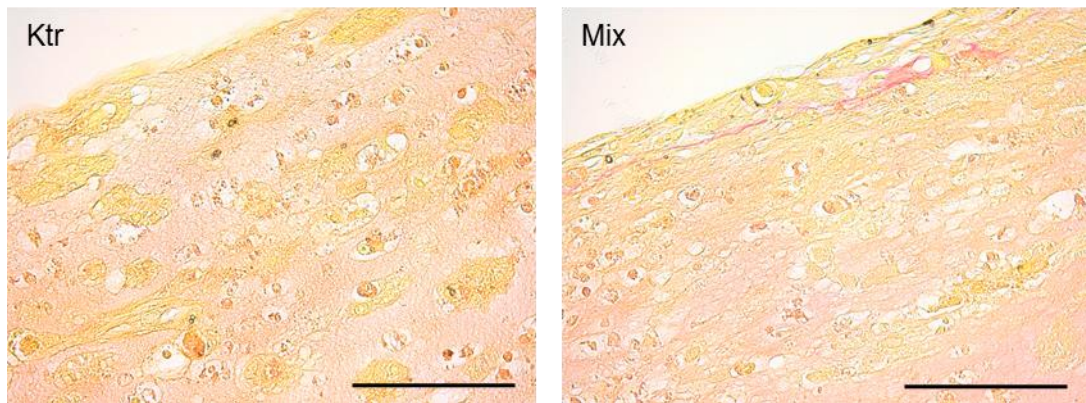


Abbildung 3.35: Picro-Siriusrot-Färbung von unizellulären (Ktr) und multizellulären (Mix) EHTs im Längsschnitt, der Maßstabbalken entspricht 100 μm .

Zusammenfassend konnten multizelluläre EHTs aus 70% Kardiomyozyten, 20% Endothelzellen, 5% glatten Muskelzellen und 5% Fibroblasten hergestellt und über mehrere Wochen kultiviert werden. Die verschiedenen Zelltypen konnten im EHT-Format mit Hilfe konfokaler Mikroskopie voneinander unterschieden und lokalisiert werden. Die EHTs kontrahierten schwächer als unizelluläre Kontrollen, zeigten einen schnelleren Abbau der Fibrinmatrix und exprimierten mehr Kollagen sowohl auf mRNA als auch auf Protein-Ebene.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden unizelluläre humane EHTs zweier unterschiedlicher Zelllinien mechanischer Nachlasterrhöhung ausgesetzt oder mit ET-1 behandelt. C25-EHTs kontrahierten nach der Nachlasterrhöhung zwar mit geringeren Kräften als Kontroll-EHTs, kardiale Hypertrophie konnte aber weder in C25- noch in ERC018-EHTs durch die beschriebenen Interventionen hervorgerufen werden. Daraufhin wurden bizelluläre EHTs aus hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten und verschiedenen Fibroblastentypen hergestellt, um deren Rolle im EHT-Modell zu untersuchen. Kardiale Fibroblasten wirkten sich dabei positiv auf die Kontraktionskraft der EHTs aus, während dermale Fibroblasten die Funktion und die Morphologie verschlechterten. Ein weiterer wichtiger Teil der Arbeit war die Etablierung eines Differenzierungsprotokolls für epikardiale Fibroblasten und glatte Muskelzellen aus hiPS-Zellen. Diese wurden gemeinsam mit hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten und Endothelzellen der gleichen Zelllinie für die Herstellung multizellulärer EHTs verwendet. Die vorherige lentivirale Transduktion der hiPS-Zellen mit verschiedenen Fluoreszenzproteinen ermöglichte es, die Zellzusammensetzung im EHT zu untersuchen und die einzelnen Zelltypen voneinander zu unterscheiden und im Gewebe zu lokalisieren.

4.1 Hypertrophe Interventionen in humanen EHTs

4.1.1 Zellkulturbedingungen

Zu Beginn des Projekts sollte das auf Ratten-EHTs basierende Modell für pathologische Hypertrophie auf humane EHTs übertragen werden. Dafür mussten zuerst die Kulturbedingungen an das experimentelle Design angepasst werden. Die humanen EHTs wurden nicht an den soliden Standard-Silikonhalterungen (Abbildung 1.1), sondern an hohlen Silikonschläuchen kultiviert, um das Einführen der Metallklammern zu ermöglichen (Abbildung 2.6). Trotz des etwa 3-fach höheren Widerstands, gegen den die EHTs kontrahierten, waren die Auslenkungen der Silikonschläuche vergleichbar mit denen bei weicheren Silikonstäben, so dass diese video-optisch gemessen und daraus die Kontraktionskräfte berechnet werden konnten. Die Korrelation zwischen Auslenkung der Silikonschläuche und der Kontraktionskraft wurde ausführlich von Nils Sörensen in seiner Dissertation beschrieben (Sörensen 2013). Ebenfalls von Nils Sörensen ausgearbeitet wurde das Serum-freie EHT-Medium, womit unspezifische Serum-Effekte während der Nachlasterrhöhung ausgeschlossen werden konnten. Die Kultur von humanen EHTs in diesem Medium hatte in frühen Versuchen keinen Einfluss auf die Kontraktilität. Nach dem Wechsel auf ERC018-EHTs und auf eine neue Charge Pferdeserum waren die Kontraktionskräfte der EHTs insgesamt geringer und es konnte mehrfach beobachtet werden, dass diese nach dem Wechsel auf Serum-freies Medium anstiegen. Dieser Effekt ist beispielweise in Abbildung 3.16 A zu sehen, die EHTs befanden

sich an Tag 19 offenbar in der Plateauphase, und es wurde keine weitere Kraftzunahme erwartet. Nach dem Wechsel auf Serum-freies Medium an Tag 20 waren die Kräfte jedoch nicht konstant, sondern stiegen an und waren am letzten Tag des Versuchs am höchsten (vgl. hierzu auch die zusätzlichen Abbildungen 1 und 2 im Anhang). Der Vergleich der älteren, der neuen und einer dritten Charge von Pferdeseren an Ratten-EHTs erbrachte jedoch keine eindeutigen Hinweise auf eine Beeinflussung der Kontraktilität oder unterschiedliche Qualitäten.

Ein anderer möglicher Faktor, der eine Rolle für die Kraftzunahme spielen könnte, ist das im Serum-freien Medium enthaltene Trijodthyronin (T_3). An Ratten-EHTs wurde gezeigt, dass der Zusatz unerlässlich ist, um die spontane Kontraktilität der Gewebe unter Serum-freien Bedingungen aufrechtzuerhalten (Hirt et al. 2012; Sörensen 2013). In 2D-Kultur von hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten führte die einwöchige Behandlung mit 20 ng/ml T_3 zu Anzeichen von physiologischer Hypertrophie und Reifung in den Zellen. Yang et al. (2014b) beschreiben unter anderem, dass die Zellen größer waren als Kontroll-Zellen, höhere Kräfte entwickelten und schnellere Ca^{2+} -Transienten aufwiesen. Die niedrige Konzentration von nur 0,5 ng/ml im EHT-Medium könnte ähnliche, aber weniger ausgeprägte Effekte verursacht haben, die sich nur unter suboptimalen Bedingungen, wie bei EHTs mit sehr niedrigen Kontraktionskräften oder bei besonders niedrigem T_3 -Gehalt im zuvor verwendetem Pferdeserum bemerkbar machten. Der Gehalt an freiem T_3 in Medium mit 10% Pferdeserum lag bei der Laborchemischen Analyse von Sörensen (2013) zwar leicht über dem von Serum-freiem Medium mit 0,5 ng/ml T_3 , Chargen-abhängige Schwankungen sind jedoch möglich und wurden nicht systematisch untersucht.

4.1.2 Nachlasterhöhung und Bestimmung der Kardiomyozytengröße

Aufgrund der mechanischen Nachlasterhöhung durch das Versteifen der Silikonschläuche, an denen die EHTs befestigt sind, waren bei C25-EHTs die Kontraktionskräfte vermindert, während die Kontraktionskinetik nicht beeinflusst wurde. Die Expression des fetalen/hypertrophen Genprogramms oder eine Kardiomyozytenhypertrophie konnten durch diese Intervention nicht provoziert werden. Die Expression von Kollagen-I war sogar in AE-EHTs statistisch geringer als in Kontroll-EHTs, bei Ct-Werten von teilweise über 30 und damit insgesamt sehr niedriger Expression ist die biologische Relevanz dieses Unterschieds jedoch fraglich. Bei ERC018-EHTs unterschieden sich AE-EHTs in keinem der untersuchten Parameter signifikant von Kontroll-EHTs. Unter den gegebenen Bedingungen konnte also in beiden Zelllinien keine kardiale Hypertrophie hervorgerufen werden. Dies könnte an genetischen oder epigenetischen Eigenschaften der hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten liegen, so dass wie bei Földes et al. (2014) die Entwicklung einer Hypertrophie gestört wird,

weil dafür wichtige Signalwege durch die Reprogrammierung oder Differenzierung beeinflusst wurden. Ebenfalls von Bedeutung sind wahrscheinlich auch der unreife Phänotyp der Zellen und der verhältnismäßig kurze Versuchszeitraum, verglichen mit dem Alter und der Zeitdauer über die sich eine pathologische Hypertrophie im Menschen entwickelt. Eine längere Kultur der EHTs könnte für eine bessere Ausreifung der Zellen förderlich sein (Kamakura et al. 2013) und in Kombination mit einer längeren hypertrophen Intervention eventuell zur Ausprägung eines pathologischen Phänotyps führen. In Hinblick auf das experimentelle Design und die Durchführung der Versuche ist dieser Ansatz jedoch nicht besonders vorteilhaft. Es bleibt außerdem noch zu klären, ob die mechanische Belastung durch die Kultur der EHTs an den Silikonhalterungen nicht bereits ausreicht, um eine Hypertrophie in den Zellen hervorzurufen, die durch weitere Interventionen schlicht nicht noch zusätzlich verstärkt werden kann. Dafür sollten möglichst EHTs mehrerer Zelllinien an verschiedenen harten Silikonhalterungen kultiviert und in Hinblick auf die kontraktile Funktion der EHTs und die Kardiomyozytengröße analysiert werden. Dadurch könnten gleichzeitig der Einfluss der mechanischen Belastung untersucht, und die Plastizität unterschiedlicher hiPSC-abgeleiteter Kardiomyozyten miteinander verglichen werden.

Methodisch war die Bestimmung der Kardiomyozytengröße anhand von Dystrophin-gefärbten EHT-Querschnitten ein zentraler Aspekt des Projekts, der zunächst einige Schwierigkeiten mit sich brachte. In Querschnitten von Ratten-EHTs lässt die membranständige Dystrophin-Färbung die Querschnitte einzelner Kardiomyozyten als klare Ringe erkennen, die leicht voneinander abgegrenzt und automatisch mit FIJI (ImageJ) analysiert werden können. Im Gegensatz dazu war die Färbung in humanen EHTs weniger eindeutig und die Zellen lagen häufig dicht in Gruppen beieinander, so dass eine automatische Auswertung durch die Software nicht möglich war (s. Abbildung 4.1 A und B). Stattdessen mussten die Zellgrößen zeitintensiv manuell bestimmt werden. Da es teilweise schwierig war, die einzelnen Zellen voneinander abzugrenzen, war es besonders wichtig, diese Analysen unter verblindeten Bedingungen durchzuführen, um eine mögliche Beeinflussung des Ergebnisses durch die Erwartungshaltung des Untersuchers zu vermeiden. Davon abgesehen ist die Bestimmung der Querschnittsflächen von longitudinal orientierten Kardiomyozyten in EHTs sicherlich physiologischer und inhaltvoller als die Flächenmessung von Kardiomyozyten in 2D-Kultur, wie sie zum Beispiel bei Yang et al. (2014b), Carlson et al. (2013) und anderen angewendet wird. Da die Zellen dabei ohne jegliche Begrenzung auf einer Plastikoberfläche sitzen, sind Form und Größe der Kardiomyozyten keineswegs mit den Bedingungen in nativem Gewebe vergleichbar. Im Gegensatz dazu befinden sich die Zellen im EHT-Format in einer zumindest näherungsweise normalen Matrix und bei multizellulären EHTs auch in Kontakt mit anderen Zelltypen, so dass eine gewisse Konkurrenz um den Platz vorhanden ist. Bei Ruan et al. (2016)

wurde die Kardiomyozytenhypertrophie in Längsschnitten von künstlichem Herzgewebe über die Messung der MYH7-positiven (schwere β -Myosin Kette) Gesamtfläche und anschließende Division durch die Anzahl der Zellen bestimmt. Diese Methode erscheint allerdings relativ ungenau und fehleranfällig, da auch hier die Abgrenzung der einzelnen Zellen voneinander und damit die Bestimmung der exakten Zellzahl nur schwer möglich ist. Im Vergleich der drei Methoden (vgl. Abbildung 4.1) ist die Bestimmung der Fläche von Kardiomyozyten in 2D-Kultur bei geringer Zelldichte die genaueste und eindeutigste, allerdings ist sie weit weg von physiologischen Bedingungen in nativem Herzgewebe, wodurch ihre Aussagekraft eingeschränkt ist. Die Analyse von miteinander in Kontakt stehenden und kohärent kontrahierenden Kardiomyozyten im 3-dimensionalen Gewebeverband ist zwar schwieriger, aber bedeutungsvoller als die Analyse in 2D. Die hier verwendete Methode an EHT-Querschnitten hat zudem den Vorteil, dass die Größe individueller Zellen gemessen wird, wohingegen Ruan et al. (2016) in den Längsschnitten nur die Gesamtfläche aller Zellen messen und daraus einen Mittelwert bestimmen.

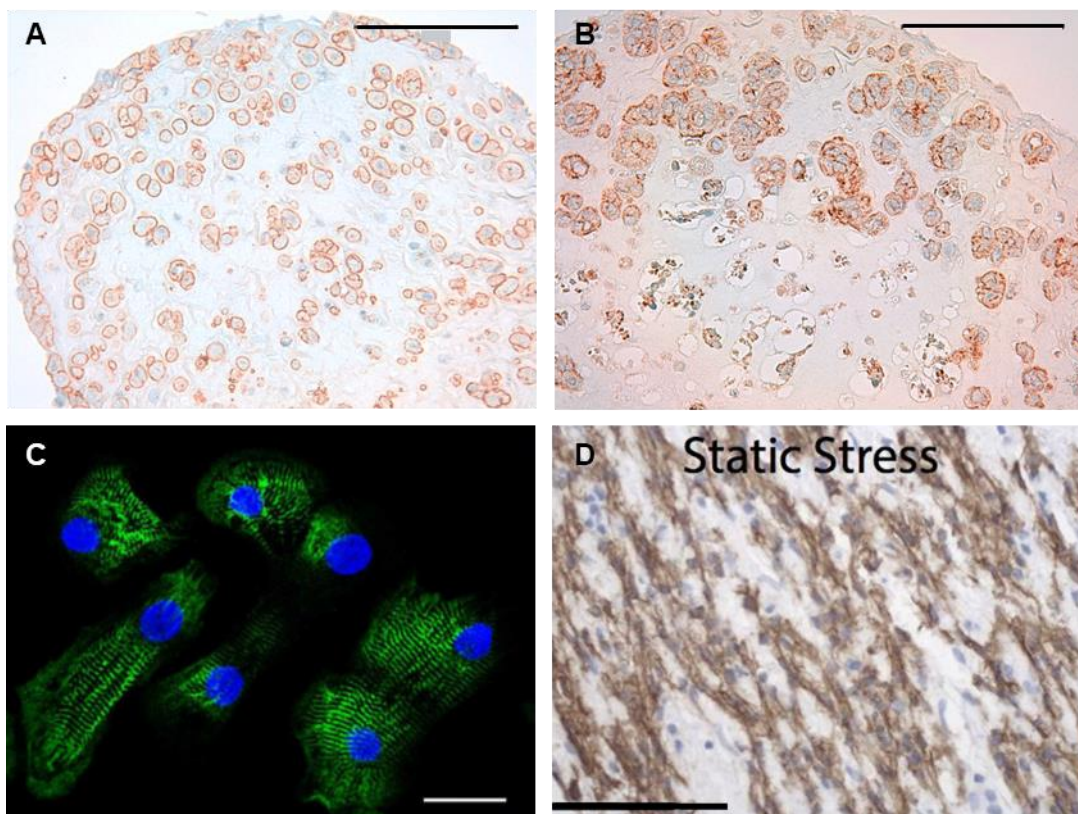


Abbildung 4.1: Mikroskopische Aufnahmen zur Bestimmung der Kardiomyozytengröße. Dystrophin-Immunhistochemie in Querschnitten von Ratten-EHTs (A; Stenzig et al. 2016) und humanen EHTs (B; Kapitel 3.1.1; Maßstabsbalken in A und B entspricht 100 μ m), α -Aktinin-Immunfluoreszenz von hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten in 2D-Kultur (C; Yang et al. 2014b; Maßstabsbalken 25 μ m) und MYH7-Immunhistochemie in Längsschnitten von humanem künstlichem Herzgewebe (D; Ruan et al. 2016; Maßstabsbalken 50 μ m).

Zusammengefasst stehen demnach verschiedene Methoden für die Messung von Zellgrößen *in vitro* zur Verfügung, anhand derer das Ausmaß einer Kardiomyozytenhypertrophie quantifiziert werden kann. Es bleiben jedoch Unterschiede bei Genauigkeit und Aussagekraft, die kritisch zu bedenken sind und bei der jeweiligen Fragestellung berücksichtigt werden sollten.

4.1.3 ET-1-Behandlung

In Ratten-EHTs konnte mit der oben genannten Methode unter mechanischer Nachlasterrhöhung oder durch einwöchige chemische Stimulation mit ET-1 (5 nM) oder PE (20 μ M) eine Größenzunahme der Kardiomyozyten von über 25% festgestellt werden (s. Abbildung 1.2). Als Kontrolle für die fehlende hypertrophe Reaktion von humanen EHTs auf den mechanischen Stimulus wurden diese in folgenden Versuchen daher auch chemisch stimuliert. Dass die Wahl dabei auf ET-1 und nicht PE fiel, wurde aufgrund der Publikation von Földes et al. (2014) entschieden. Darin wurden aus drei Linien embryonaler Stammzellen und sogar fünf Linien hiPS-Zellen Kardiomyozyten differenziert und diese in 2D-Kultur für 48 Stunden mit 10 μ M PE stimuliert. Während alle ES-abgeleiteten Kardiomyozyten mit Hypertrophie auf die Behandlung reagierten, war die Zellgröße bei allen hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten unverändert. Die Autoren schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen eine abnorme α -adrenerge Signalweiterleitung in hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten. Die Behandlung von humanen EHTs mit PE erschien daher nicht sinnvoll. Im Gegensatz dazu zeigten Carlson et al. (2013), dass die Behandlung von hiPSC-Kardiomyozyten in 2D-Kultur mit 10 nM ET-1 für 18 Stunden nicht nur Hypertrophie hervorrief, sondern dadurch auch die Expression hypertropher Gene, wie ANP, BNP und ACTA1 hochreguliert wurde, was für eine pathologische Form der Hypertrophie spricht. Als Limitation dieser Studie kann jedoch angeführt werden, dass alle Experimente an käuflich zu erwerbenden Kardiomyozyten nur einer Zelllinie (*iCell Cardiomyocytes; Cellular Dynamics International; CDI*) ohne zusätzliche Kontroll-Zellen durchgeführt wurden und die Autoren Angestellte der Firma CDI sind.

In dieser Arbeit wurden erstmals hiPSC-abgeleitete Kardiomyozyten in 3D-Kultur in Form von humanen EHTs zweier unterschiedlicher Zelllinien für eine Woche mit 100 nM ET-1 stimuliert. Die Kontraktilität oder Kardiomyozytengröße wurden durch diese Intervention nicht beeinflusst. Da bislang keine direkt vergleichbaren Studien an unizellulären künstlichen Geweben veröffentlicht wurden, sind weitere Versuche nötig, um herauszufinden, ob dies mit dem dreidimensionalen Kulturformat, den verwendeten Zelllinien oder evtl. der Konzentration an ET-1 zusammenhängt. Da es bereits unter Basisbedingungen eindeutige Unterschiede zwischen den EHTs der beiden Zelllinien, wie die längeren Relaxationszeiten von ERC018-EHTs oder die Größe der Kardiomyozyten im EHT-Querschnitt gab, ist anzunehmen, dass die

Zelllinien auch auf Interventionen unterschiedlich reagieren. Während C25-EHTs, bei denen die Kardiomyozytenflächen im Querschnitt etwa $80 \mu\text{m}^2$ betragen, unter Intervention zumindest tendenziell hypertroph reagierten, war dies bei ERC018-EHTs überhaupt nicht zu beobachten. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass die Zellen mit ca. $130 \mu\text{m}^2$ schon unter Basisbedingungen sehr groß waren und die Grenze der Plastizität vielleicht bereits erreicht war. Für die Etablierung eines auf hiPSC-Kardiomyozyten basierenden *in vitro*-Modells ist es daher unbedingt notwendig, mehrere Zelllinien zu testen, um eine möglichst breite Anwendbarkeit zu ermöglichen und fundierte Aussagen treffen zu können. Die weiterführende Fragestellung, ob die beobachteten Unterschiede zwischen den Zelllinien genetischen oder epigenetischen Ursprungs sind oder sich eventuell auf die verschiedenen Reprogrammierungsmethoden zurückführen lassen, war nicht Teil dieser Arbeit. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die auffällig großen Querschnittsflächen der ERC018-Kardiomyozyten und die fehlende Reaktion auf unterschiedliche Interventionen, sowohl in unizellulären als auch in bizellulären EHTs auf die genomische Instabilität der hiPS-Zellen zurückzuführen sind. Dazu zählen beispielweise epigenetische Methylierungsmuster, die von den parental somatischen Zellen an die hiPS-Zellen weitergegeben werden und bestehen bleiben. Zudem kommen Mutationen, die während der Reprogrammierung stattfinden können oder chromosomale Aberrationen, die im Laufe der Zellkultur durch häufiges Passagieren möglich sind und nur durch regelmäßige Kontrollen des Karyotyps ausgeschlossen werden können (Yoshihara et al. 2017).

4.1.4 *In vitro*-Modelle für kardiale Hypertrophie mit hiPSC-Kardiomyozyten

Bestehende Modelle für kardiale Hypertrophie in humanen hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten beruhen meist auf 2D-Kultur der Zellen, die dann entweder mit ET-1 stimuliert werden wie bei Carlson et al. (2013) oder einfach in sehr geringer Zelldichte ausgesät werden wie bei Uesugi et al. (2014). Die Vorteile dieser Modelle sind der relativ geringe experimentelle Aufwand und die Möglichkeit, sowohl einzelne Zellen zum Beispiel mittels *Live-Cell-Imaging* im Detail untersuchen zu können oder aber das System als Screening-Plattform zu verwenden, mit der viele verschiedene Bedingungen parallel getestet werden können. Wie bereits erwähnt, ist die Aussagekraft solcher 2D-Modelle wegen der unphysiologischen Bedingungen aber begrenzt, da sich hier der unreife Phänotyp der hiPSC-Kardiomyozyten besonders bemerkbar macht. Ergebnisse aus Experimenten, bei denen allein die Variation der Zelldichte ausreicht, um eine Hypertrophie der Kardiomyozyten hervorzurufen, sind vermutlich nur schwer zu interpretieren und zu reproduzieren, besonders wenn man in Betracht zieht, dass normale wachstumsbegrenzende Faktoren in diesen 2D-Kulturen anscheinend außer Kraft gesetzt sind. Außerdem ist bei diesen Untersuchungen in der Regel nicht klar, ob es sich tatsächlich um einen Volumenzunahme oder aber nur eine stärkere flächige Ausbreitung der

Zellen handelt. Die Kultur in dreidimensionalem künstlichem Herzgewebe hingegen führt zur Reifung dieser Zellen (Yang et al. 2014a; Yoshida and Yamanaka 2017) und ermöglicht zudem unter anderem die Analyse der kontraktilen Funktion der Zellen im Gewebeverband oder die Untersuchung zellulärer Interaktionen und eignet sich deshalb für sehr viele Fragestellungen unterschiedlicher Anwendungsbereiche (Vunjak Novakovic et al. 2014; Weinberger et al. 2017; Brandão et al. 2017).

Kardiale Hypertrophie in humanem künstlichem Herzgewebe wurde erstmals von Ruan et al. (2016) beschrieben. In dieser Studie nutzten die Autoren mechanische und elektrische Interventionen und fanden, dass die Stimulation zu einer besseren Gewebestruktur, höheren Kontraktionskräften und Kardiomyozytenhypertrophie führte. Allerdings wurden in dieser Studie vollständig entlastete Gewebe als Kontrolle genutzt, die keiner passiven Dehnung mehr ausgesetzt waren. Dass diese mechanische Spannung aber für die longitudinale Ausrichtung, Funktion und Reifung der Zellen notwendig ist, zeigen beispielweise die Experimente von Abilez et al. (2017). Auch in unserem Institut ist dieses Phänomen seit vielen Jahren bekannt. So hören beispielweise EHTs, die sich von einem der Silikonstäbe abgelöst haben und keinem gerichtetem Widerstand mehr ausgesetzt sind, schon nach kurzer Zeit auf zu kontrahieren und werden deshalb von uns auch aus allen Folgeanalysen ausgeschlossen. Insgesamt gibt es im noch jungen Feld des Tissue Engineerings mit hiPSC-Kardiomyozyten noch viele offene Fragen, die weiterer Forschung bedürfen. Dazu gehören in diesem Zusammenhang insbesondere die definierte Abgrenzung zwischen Maturierung der hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten und physiologischer Hypertrophie der Zellen, oder auch der Übergang von physiologischer zu pathologischer Hypertrophie. Das hier vorgestellte Modell hat das Potential, diese Fragen zu adressieren, da Silikonhalterungen mit unterschiedlichen elastischen Eigenschaften genutzt werden können, mit denen nach bisher unveröffentlichten vorläufigen Ergebnissen aus unserem Institut zunächst verschiedene Reifestadien in den Zellen hervorgerufen werden. Diese könnten dann mit der Nachlasterhöhung oder der Behandlung mit ET-1 noch zusätzlich stimuliert werden, um eventuell den Übergang und die Veränderungen zur pathologischen Hypertrophie genauer untersuchen zu können.

4.2 Bizelluläre EHTs aus Kardiomyozyten und Fibroblasten

Zu der Frage, ob Fibroblasten hilfreich oder gar notwendig bei der Herstellung künstlicher Herzgewebe sind, gibt es in der Literatur verschiedene Meinungen. Matsuura et al. (2011) beschreiben, dass ohne die Zumischung neonataler Maus-Fibroblasten keine funktionellen Gewebe aus murinen ES-abgeleiteten Kardiomyozyten hergestellt werden konnten, und auch bei Abilez et al. (2017) sind neben humanen ES- oder hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten humane Fibroblasten (IMR-90) enthalten. Bei EHTs aus hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten

ohne zugesetzte Fibroblasten wird teilweise angenommen, dass der Anteil an Zellen, der nicht zu Kardiomyozyten differenziert, Fibroblasten-ähnlich ist. Ob diese Zellen aber tatsächlich funktionellen Einfluss auf das Gewebe haben, sei er positiv oder negativ, ist nicht systematisch belegt. Eindeutig gezeigt wurde im Gegensatz dazu in einer Studie von Mannhardt et al. (2016), dass spontan kontrahierende Fibrin-basierte EHTs aus aufgereinigten hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten (*Cor.4U Cardiomyocytes*, Ncardia, ehemals AxioGenesis) hergestellt werden können, die mit Hilfe einer Puromycinresistenz unter Kontrolle des α MHC- (α -Form der schweren Myosinkette) Promotors selektioniert wurden. Diese Ergebnisse stehen in Konflikt mit der Arbeit von Tiburcy et al. (2017), in der aus Kardiomyozyten, die durchflusszytometrisch anhand des Oberflächenmarkers SIRPA (*Signal-regulatory Protein Alpha*) aufgereinigt wurden, keine funktionellen Kollagen-basierten künstlichen Gewebe hergestellt werden konnten. Die Autoren beschreiben außerdem, dass Konstrukte aus Kardiomyozyten, die metabolisch aufgereinigt wurden, nicht in der Lage waren, die Kollagen-Matrix abzubauen und hauptsächlich rundliche Kardiomyozyten enthielten. Für die metabolische Selektion wird den Zellen Laktat als einzige Stoffwechselquelle zur Verfügung gestellt, das nur von den Kardiomyozyten genutzt werden kann. Vergleicht man die Effizienz der drei Methoden, bleiben bei der Laktat- und der SIRPA-Aufreinigung einige Nicht-Kardiomyozyten übrig. In der Originalbeschreibung der SIRPA-basierten Methode ist die Rede von bis zu 98% ES-abgeleiteten Kardiomyozyten, für hiPSC-Kardiomyozyten war der Anteil sogar noch deutlich geringer (Dubois et al. 2011). Im Gegensatz dazu wirbt die Firma Ncardia mit der 100%igen Reinheit der *Cor.4U Cardiomyocytes*, was, wenn dies zutrifft, für die These spricht, dass die Anwesenheit von Nicht-Kardiomyozyten keine notwendige Bedingung für die Herstellung funktioneller künstlicher Herzgewebe darstellt. Neben der Methode, wie die Kardiomyozyten aufgereinigt wurden, spielt hier wohl hauptsächlich die unterschiedliche extrazelluläre Matrix in den beiden Modellen eine Rolle für die voneinander abweichenden Resultate. Die Fibrinmatrix kann von den Kardiomyozyten offensichtlich abgebaut werden, was durch die Zugabe von Fibroblasten allerdings noch beschleunigt wird, wie die Ergebnisse mit bizellulären EHTs zeigten. Die Kollagenmatrix hingegen kann von den Kardiomyozyten dem Anschein nach nicht so abgebaut werden, dass sie miteinander in Kontakt treten und als funktionelles Synzytium kontrahieren können. Stattdessen stellte sich heraus, dass Gewebe aus einer Zellzusammensetzung von 70% Zellen aus der Kardiomyozytendifferenzierung und 30% Fibroblasten sich am besten entwickelten und die höchsten Kontraktionskräfte erreichten. Unter Einbezug der Differenzierungseffizienz beschreiben Tiburcy et al. (2017) ein ungefähres 1:1 Verhältnis von Kardiomyozyten zu Nicht-Kardiomyozyten als optimal. Überträgt man diese Ergebnisse auf die hier beschriebenen bizellulären EHTs resultiert die Zugabe von 5% Fibroblasten, bei einer Differenzierungseffizienz von 70-90% Kardiomyozyten, eher in einem 3:1 oder noch höherem Verhältnis von Kardiomyozyten zu Nicht-Kardiomyozyten. In beiden

Fällen bleiben die Funktion und der Einfluss der fehl- oder nicht vollständig differenzierten Zellen unklar und sind aufgrund der Heterogenität dieser Zellpopulation schwierig zu untersuchen. Der positive Einfluss einer Kokultur mit Fibroblasten auf die Reifung und Struktur hiPSC-abgeleiteter Kardiomyozyten ist hingegen gut untersucht und wird nicht nur von den Daten von Tiburcy et al. (2017) belegt. Dies konnte unter anderem auch in verschiedenen Modellsystemen wie beispielweise den Mikrogeweben von Ravenscroft et al. (2016) oder mit Hilfe des besonderen Trägermaterials von Suhaeri et al. (2017) gezeigt werden. Dabei werden Kunststoffanteile mit biologischer extrazellulärer Matrix kombiniert und die Kokultur von Kardiomyozyten und Fibroblasten kann sowohl direkt als auch indirekt mittels parakriner Mechanismen untersucht werden.

4.2.1 Hypertrophe Interventionen in bizellulären EHTs

Die hypertrophen Interventionen in bizellulären EHTs durchzuführen, war ein vielversprechender Ansatz, weil fibrotische Veränderungen ein wichtiger Aspekt der pathologischen kardialen Hypertrophie sind. Neben der vermehrten Produktion extrazellulärer Matrix umfasst die Rolle der Fibroblasten auch zelluläre Interaktionen mit den Kardiomyozyten. Sie sekretieren beispielsweise FGF2, wodurch TGF β in Kardiomyozyten hochreguliert und auch von diesen freigesetzt wird. Weitere wichtige Interaktionen laufen über den Notch1-Signalweg und Trombospondin-1. Die Gesamtheit von parakrinen und autokrinen Signale induziert dann die Kardiomyozytenhypertrophie (Fujiu and Nagai 2014).

In den hier durchgeführten Versuchen an humanen EHTs unter Nachlasterrhöhung und ET-1-Behandlung konnten diesbezüglich jedoch nur bedingt Unterschiede zwischen unizellulären und bizellulären EHTs festgestellt werden. Die Zugabe von Fibroblasten genügte demnach nicht, um eine Kardiomyozytenhypertrophie in bizellulären EHTs hervorzurufen. Betrachtet man jedoch die Effektgröße der Nachlasterrhöhung in unizellulären und bizellulären C25-EHTs, war die kontraktile Dysfunktion in den bizellulären EHTs deutlich ausgeprägter (s. Abbildung 3.11). Dieser Unterschied belegt zum einen nochmal das unterschiedliche Verhalten der beiden untersuchten Zelllinien, weil sich bizelluläre ERC018-EHTs genau wie die unizellulären ERC018-Kontrollen verhielten und zum anderen deutet dies auf einen Fibroblastenspezifischen Effekt hin, der eventuell dosisabhängig ist und durch eine Anpassung der Zellzusammensetzung möglicherweise noch verstärkt werden kann. Dafür sprächen zumindest erneut die Ergebnisse von Tiburcy et al. (2017), die in ihren Konstrukten mit 30% Fibroblastenanteil nach einwöchiger Stimulation mit 10 nM ET-1 oder 1 μ M Norepinephrin neben einer kontraktile Dysfunktion auch eine Kardiomyozytenhypertrophie sowie eine geringere Kardiomyozytenanzahl im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen feststellen konnten. Die Ergebnisse sprechen also für eine pathologische Form der Hypertrophie. Die

Frage, ob diese auch durch einen mechanischen Stimulus hätte induziert werden können, wird in der Arbeit von Tiburcy et al. (2017) jedoch nicht adressiert.

4.2.2 Einteilung, Funktion und Aktivierung von Fibroblasten

Unter Basisbedingungen hatte die Zugabe von verschiedenen Fibroblastentypen unterschiedliche Auswirkungen auf die kontraktile Funktion humaner EHTs. Kardiale und hiPSC-abgeleitete epikardiale Fibroblasten verbesserten die Kontraktionskraft. Im Kontrast dazu verschlechterte sich die Funktion und Morphologie der EHTs, wenn dermale Fibroblasten zugesetzt wurden, weil diese schneller proliferierten als kardiale Fibroblasten und die Kardiomyozyten im EHT überwucherten. Einen Fibroblastentyp-spezifischen Effekt fanden auch Weeke-Klimp et al. (2010), in deren Studie nur epikardiale und nicht dermale Fibroblasten einen positiven Einfluss auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten zeigten. Mayourian et al. (2018) haben in diesem Zusammenhang parakrine Effekte untersucht und künstliche Herzgewebe mit konditioniertem Medium von kardialen oder dermalen Fibroblasten kultiviert. Dabei wurde ebenfalls eine Verbesserung der Kontraktilität durch sezernierte Faktoren von kardialen Fibroblasten festgestellt, während konditioniertes Medium von dermalen Fibroblasten keinen Effekt zeigte. Alle diese Ergebnisse stehen in Widerspruch mit der Arbeit von Tiburcy et al. (2017), in der dermale Fibroblasten verwendet wurden und diese die Funktion der künstlichen Herzgewebe verbesserten. Dies spricht dafür, dass die jeweiligen Ergebnisse offenbar vom verwendeten Modellsystem abhängig sind und neben dem Ursprung der Fibroblasten noch weitere Faktoren eine Rolle spielen.

In beiden Fällen, sowohl mit kardialen als auch mit dermalen Fibroblasten, relaxierten EHTs langsamer als unizelluläre Kontrollen, was vermutlich mit der Sekretion von Kollagen und anderen Matrixproteinen zusammenhängt, wodurch sich die elastischen Eigenschaften der extrazellulären Matrix veränderten. Auffällig war, dass murine 3T3-Fibroblasten zu einem früheren Zeitpunkt der EHT-Kultur die Relaxationszeit sogar verkürzten und die Frequenz der EHTs erhöhten (s. Anhang: Zusätzliche Abbildung 3), bevor sich der Effekt gegen Ende des Versuchs wieder relativierte. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in bizellulären EHTs elektrische Kopplung zwischen Fibroblasten und Kardiomyozyten möglich ist. Dafür spielt einerseits die Expression von Connexinen, hauptsächlich Connexin-43 und -45, in beiden Zelltypen eine Rolle, worüber interzelluläre Gap Junctions gebildet werden können, wie sie auch von Kofron et al. (2017) in einem ähnlichen Modell beschrieben werden. Ein weiterer möglicher Kommunikationsweg für elektrische Signale sind spannungsgesteuerte K^+ -Kanäle, die in beiden Zelltypen vorhanden sind und während der Interaktion aktiviert werden könnten (Kohl et al. 2005). Inwieweit dies jedoch tatsächlich stattfindet und ob eventuell noch ganz andere Spezies-spezifische elektrophysiologische Eigenschaften dazu beitragen, dass es bei

Diskussion

der Zugabe muriner Zellen zu einer Verkürzung der Relaxationszeit und nicht wie bei anderen Fibroblasten zu einer Verlängerung der selbigen kam, ist völlig unklar. Neben den Effekten auf die Kontraktilität waren besonders die morphologischen Unterschiede zwischen unizellulären und bizellulären EHTs bemerkenswert. Die Fibrinmatrix wurde von den Fibroblasten, unabhängig welcher Art, zu Beginn der EHT-Kultur sehr schnell abgebaut. Die Sekretion von Matrixproteinen und die Erhaltung des Gleichgewichts von Matrix Auf- und Abbau ist eine der Hauptaufgaben von Fibroblasten und konnte anhand der morphologischen Veränderungen im EHT-Modell sehr gut nachvollzogen werden.

Relativ schwierig gestaltet sich hingegen die detaillierte Definition dieses sehr wandelbaren und anpassungsfähigen Zelltyps. In ihrem neuesten Übersichtsartikel beschreiben Tallquist und Molkentin (2017) drei verschiedene Aktivierungszustände, den ruhenden und den aktivierten Fibroblasten sowie den Myofibroblasten. Da zu jedem dieser Zustände ein eigenes Genexpressionsprofil gehört, das wiederum fließend ineinander übergehen kann und von vielen Faktoren, wie zum Beispiel dem embryonalen Ursprung der Zellen, abhängig ist, ist es oft schwierig diese klar voneinander zu trennen. Neben der variablen Erscheinung der Zellen ist das Fehlen spezifischer und einheitlich verwendeter Markergene ein großes Problem, das in der Vergangenheit oft zu nicht-reproduzierbaren oder gar widersprüchlichen Ergebnissen geführt hat.

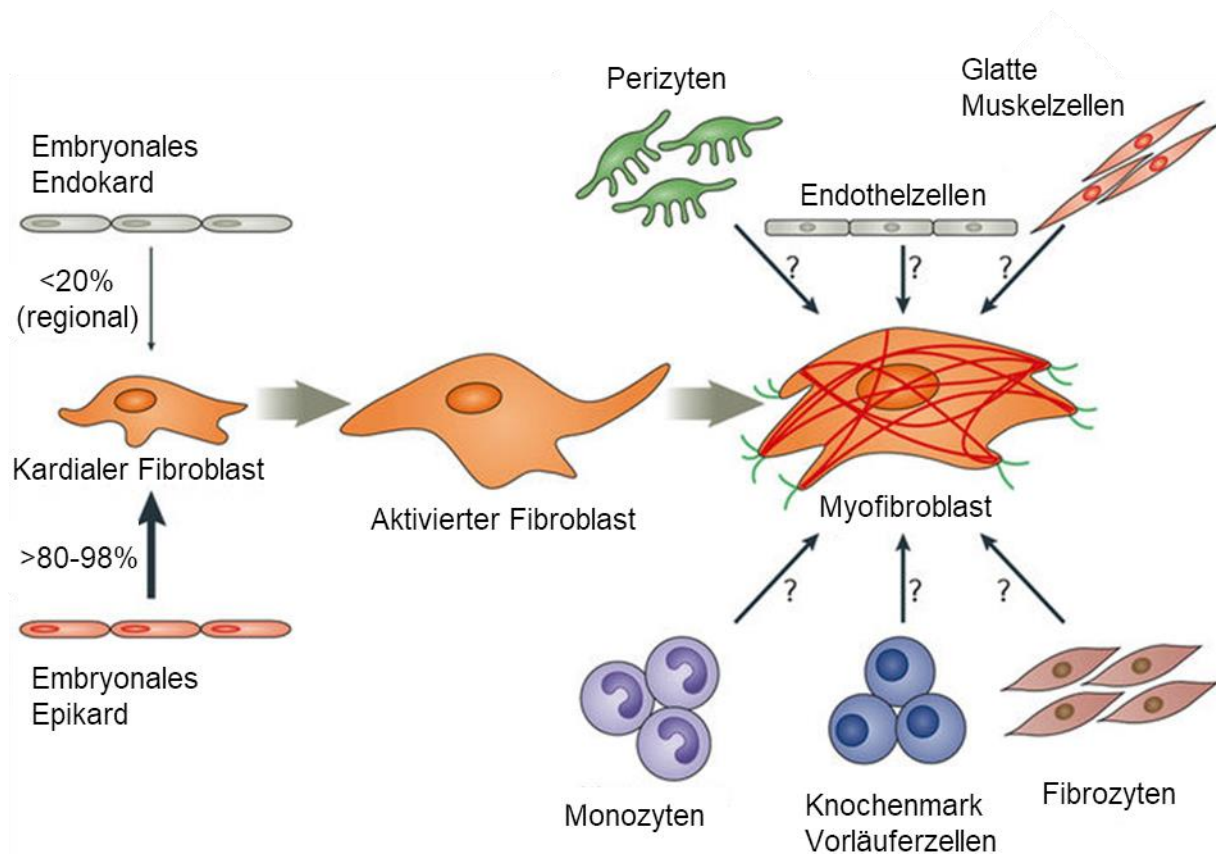


Abbildung 4.2: Entwicklungsbiologische und alternative Quellen von Fibroblasten. Modifiziert nach Tallquist und Molkentin (2017).

Als mögliche Quellen von Myofibroblasten sind viele verschiedene Zelltypen wie Perizyten, Endothelzellen oder Vorläuferzellen wie Fibrozyten oder Monozyten in der Literatur diskutiert worden. Nach neuestem Kenntnisstand führen diese Zellen allerdings, wenn überhaupt, nur zu einem sehr geringen Teil zu aktivierten Fibroblasten. Der Hauptteil entwickelt sich hingegen aus im Gewebe ansässigen ruhenden Fibroblasten, von denen wiederum die meisten während der Embryonalentwicklung aus dem Epikard hervorgehen (vgl. Abbildung 4.2; Tallquist und Molkentin 2017).

4.3 Differenzierung von epikardialen Zellen

In der Embryogenese entwickelt sich das Epikard während der Schlaufung des Herzens aus dem proepikardialen Organ und bildet die äußerste, das Herz umhüllende Zellschicht. Durch verschiedene Signale, wie TGF β , Wnt, Retinsäure oder FGF, ausgelöst, durchlaufen diese Zellen die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und differenzieren zu Fibroblasten oder vaskulären glatten Muskelzellen. Diese wandern dann ins Myokard ein und tragen dort zur strukturellen und vaskulären Entwicklung bei (Witty et al. 2014).

Diskussion

Dass sich epikardiale Zellen auch nach der Embryogenese noch positiv auf verschiedene Eigenschaften von Kardiomyozyten auswirken, haben Weeke-Klimp et al. (2010) in *in vitro*-Versuchen an isolierten Kardiomyozyten aus neonatalen Mausherzen gezeigt. Wurden die Kardiomyozyten mit epikardialen Zellen kokultiviert, proliferierten sie stärker als die Kontrollen, waren besser ausgerichtet und exprimierten mehr Connexin-43, was dafür spricht, dass die Zellen mechanisch und elektrisch besser miteinander in Verbindung standen. Dies zeigte sich auch in der Kontraktilität, da die Kardiomyozyten früher anfangen als funktionelles Synzytium zu kontrahieren, wenn sie gemeinsam mit epikardialen Zellen kultiviert wurden. Außerdem wurden Matrixproteine, insbesondere Kollagen-I, in den Kokulturen höher exprimiert und von den Zellen sekretiert. Die Produktion von extrazellulärer Matrix in Verbindung mit der erhöhten Expression von *Focal Adhesion Kinase* (FAK) ist dabei einer der Gründe für eine bessere Mechanotransduktion, Ausrichtung und Kontraktilität der Kardiomyozyten. Interessanterweise fanden Weeke-Klimp et al. (2010), dass sich nicht-kardiale, embryonale Fibroblasten anders verhielten und keinen positiven Effekt auf die Struktur und Funktion der Kardiomyozyten hatten, was sehr gut zu den hier gezeigten unterschiedlichen Effekten verschiedener Fibroblastentypen passt.

Die Differenzierung epikardialer Zellen aus hiPS-Zellen war eine elegante Methode, die mehrere Vorteile miteinander verband. Sie machte kardiale Fibroblasten verfügbar, die sonst nur schwer zugänglich sind, die aber sowohl nach den eigenen Ergebnissen mit bizellulären EHTs als auch nach den Ergebnissen in 2D-Kultur von Weeke-Klimp et al. (2010) einen positiven Effekt auf die kontraktile Funktion der EHTs erwarten ließen. Außerdem versprach die Arbeit von Witty et al. (2014), mit nur minimalen Veränderungen des Protokolls parallel Fibroblasten und glatte Muskelzellen differenzieren zu können und damit gleich zwei wichtige kardiale Zelltypen zu erhalten. Zudem konnte das Protokoll mit den gleichen hiPS-Zellen durchgeführt werden, die auch für die Kardiomyozytendifferenzierung verwendet werden, so dass alle Zellen in bizellulären bzw. multizellulären EHTs denselben genetischen Hintergrund hatten, wodurch unerwünschte oder unbekannte genetische Einflüsse ausgeschlossen werden konnten.

Auch methodisch sollte das Protokoll für die epikardiale Differenzierung an das bereits etablierte Protokoll der Kardiomyozyten angepasst werden, so dass möglichst wie bei Witty et al. (2014) die mesodermale Induktion für beide Protokolle identisch ist, was deutliche Vorteile in Bezug auf den Arbeits- und Zeitaufwand mit sich brachte. Das heißt, die Kultur der Stammzellen, Formation der EBs und mesodermale Induktion wurden wie bei Breckwoldt et al. (2017) durchgeführt. Dies beinhaltet, dass die verwendeten Medien nicht wie bei Witty et al. (2014) StemPro-34 basiert waren, sondern RPMI als Grundmedium für die Differenzierung

genutzt wurde, was anhand der Proliferation und Morphologie der Zellen nicht nachteilig zu sein schien und von Bao et al. (2017) ebenfalls verwendet wurde. Unterschiedlich gehandhabt wurde auch der Wechsel von 3D- zu 2D-Kultur nach der mesodermalen Induktion, weil bei der im Originalprotokoll beschriebenen Dissoziation der EBs mit TrypLE sehr viele Zellen starben oder diese nur schlecht anwuchsen. Daher wurden die Zellkulturflaschen wie bei der endothelialen Differenzierung mit Gelatine beschichtet und die intakten EBs ausgesät. Dabei wuchsen die Zellen ohne erkennbaren Zellverlust aus den EBs zu einer Einzelzellschicht, wie in Abbildung 3.10 (Tag 4 und Tag 7) zu sehen ist. Die Aktivierung des BMP4- und Wnt-Signalwegs in den mesodermalen Zellen induzierte die epikardiale Differenzierung, was an der typischen Kopfsteinpflaster-artigen Morphologie der Zellen und der Expression von epikardialen Markern wie WT1 und TBX18 nachvollzogen werden konnte (s. zusätzliche Abbildung 6 im Anhang). Abschließend wurde die EMT induziert, wobei glatte Muskelzellen durch viertägige Behandlung mit TGF β gefolgt von vier Tagen bFGF-Behandlung differenziert wurden und Fibroblasten durch die achttägige Stimulation mit bFGF.

Vergleicht man verschiedene epikardiale Differenzierungsprotokolle, stellt man zunächst fest, dass alle den prinzipiellen Abläufen der Embryogenese folgen und zunächst mesodermale Zellen bilden, die dann zu epikardialen Zellen differenziert werden und am Ende eine EMT durchlaufen. Methodisch unterscheiden sie sich zum Beispiel in der Wahl des Zellkulturformats, das hier und bei Witty et al. (2014) zunächst EB-basiert war und dann in 2D-Kultur überging, während bei Iyer et al. (2016) und Bao et al. (2017) eine durchgängige 2D-Kultur verwendet wurde. Die Differenzierung durchweg im 3D-Format durchzuführen, wie es hier zum Teil für Kardiomyozyten angewendet wurde, erscheint für epikardiale Zellen weniger geeignet und es ist kein derartiges Protokoll publiziert. Bei der Modulierung der Signalwege ließen sich ebenfalls Unterschiede feststellen. Die mesodermale Differenzierung konnte demnach mit einer Kombination von BMP4, Aktivin A und bFGF (Witty et al. 2014), einer Kombination von BMP4, FGF2 und dem Phosphoinositid 3-Kinase Inhibitor LY294002 (Iyer et al. 2016) oder nur mit dem Glykogensynthase-Kinase-3 Inhibitor CHIR99021 (Bao et al. 2017) induziert werden. Die darauffolgende epikardiale Differenzierung wurde in den drei Protokollen ebenfalls verschieden durchgeführt. Bei Bao et al. (2017) wurde nach zweitägiger Wnt-Inhibition wieder CHIR99021 für die Aktivierung des Wnt-Signalwegs eingesetzt, ohne dass eine zusätzliche Stimulation des BMP4-Signalwegs stattfand. Im Gegensatz dazu nutzten Iyer et al. (2016) neben der Aktivierung mit BMP4 und Wnt3A auch Retinsäure. Unabhängig von der Art der Stimulation wurden jedoch in allen Protokollen Kopfsteinpflaster-förmige WT1- und TBX18-positive epikardiale Zellen erhalten. Die EMT konnte anschließend mittels bFGF bzw. TGF β induziert werden (Witty et al. 2014; Bao et al. 2017). Im Protokoll von Iyer et al. (2016) wurde dabei für glatte Muskelzellen TGF β und PDGF und für Fibroblasten FGF und VEGF

verwendet. Trotz der bestehenden Unterschiede können anhand aller hier beschriebenen Protokolle beide Zelltypen differenziert werden. Aufgrund der fehlenden spezifischen Oberflächenmarker kann die Differenzierungseffizienz jedoch nicht einfach mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden, sondern es bedarf einer ausführlichen Charakterisierung der differenzierten Zellen.

4.4 Charakterisierung verschiedener aus hiPS-Zellen abgeleiteter Zelltypen

Die Charakterisierung hiPSC-abgeleiteter Kardiomyozyten erfolgte routinemäßig mittels durchflusszytometrischer Analyse für kardiales Troponin T (cTNT) oder α -Aktinin (ACTN2) wie bei Breckwoldt et al. (2017) beschrieben. Da diese Methode etabliert und standardisiert ist, soll die Charakterisierung der Kardiomyozyten hier nicht ausführlich diskutiert werden. Neben der durchflusszytometrischen Analyse können die spontan kontrahierenden Kardiomyozyten beispielsweise auch optisch identifiziert und die Expression kardialer Marker wie in Abbildung 3.21 mittels RT-qPCR bestimmt werden.

4.4.1 Epikardiale Fibroblasten und glatte Muskelzellen

Für die Charakterisierung und Unterscheidung epikardialer Zellen ist es hingegen notwendig, die Expression mehrerer Markergene zu analysieren und zu vergleichen. Die Ergebnisse der RT-qPCR in Abbildung 3.22 zeigen, dass im Vergleich der vier differenzierten Zelltypen die Fibroblasten Periostin am höchsten exprimierten und Kollagen-I von beiden epikardialen Zelltypen exprimiert wurde. Der Transkriptionsfaktor TCF21, der von Witty et al. (2014) als Marker für epikardiale Fibroblasten verwendet wird, war hier nicht nur in Fibroblasten, sondern auch in glatten Muskelzellen exprimiert. Der Marker war also nicht spezifisch für Fibroblasten, was in Übereinstimmung mit Iyer et al. (2016) und Bao et al. (2017) steht, die TCF21 nicht als Marker für Fibroblasten, sondern für epikardiale Zellen verwenden. Stattdessen zeigen Iyer et al. (2016) die Expression von Periostin, *Platelet Derived Growth Factor Receptor α* (PDGFRA) und *Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 2* (DDR2) und Bao et al. (2017) nutzen Vimentin und CD90 als Fibroblastenmarker. Ein direkter Vergleich der Genexpression zwischen Fibroblasten und glatten Muskelzellen fehlt jedoch in beiden Protokollen. Stattdessen werden die beiden Zelltypen nur unabhängig voneinander betrachtet, so dass sie nicht wirklich unterschieden werden können. Die Problematik, die beiden Zelltypen voneinander abzugrenzen, zeigt sich beispielsweise auch darin, dass Iyer et al. (2016) Vimentin nicht wie Bao et al. (2017) als Marker für Fibroblasten, sondern für glatte Muskelzellen einsetzen. Außerdem existieren viele andere Marker, die für die Charakterisierung von glatten Muskelzellen verwendet werden, wie ACTA2, Calponin, die schwere Kette des Myosins glatter Muskelzellen (SM-MHC; MYH-11), Transgelin (TAGLN) oder Smoothelin (SMTN). Diese Vielzahl an unterschiedlich eingesetzten Markern lässt auf die

Komplexität der Bestimmung dieser Zelltypen schließen und macht deutlich, dass neben der Genexpressionsanalyse eine funktionelle Charakterisierung von großer Bedeutung ist.

Dafür wurden in dieser Arbeit beide Zelltypen mit TGF β stimuliert, wodurch die Expression von ACTA2 hochreguliert wurde und in Fibroblasten auch die Expression von Kollagen-I erhöht wurde, was zeigt, dass beide Zelltypen aktivierbar sind. Außerdem waren beide Zelltypen fähig, eine künstliche Lücke im Zellrasen durch Migration zumindest teilweise zu schließen. Bei den Fibroblasten war diese Eigenschaft wie erwartet deutlicher ausgeprägt und sie wanderten nicht nur schneller, sondern auch weiter in den freien Bereich der Zellkulturschale (vgl. Abbildung 3.24). Mit einer dicken Matrigelschicht, auf der die Zellen ausgesät wurden, testeten Witty et al. (2014) die Invasionstiefe von Fibroblasten und glatten Muskelzellen und zeigten in diesen Versuchen, dass Fibroblasten besonders weit in die Matrix einwanderten. In den beiden anderen vorgestellten Studien fand keine funktionelle Charakterisierung der Fibroblasten statt. Iyer et al. (2016) als auch Witty et al. (2014) haben allerdings in glatten Muskelzellen Ca²⁺-Transienten nachgewiesen, die funktionell für die Kontraktion der Zellen wichtig sind, da sie letztendlich *in vivo* dazu dienen den Gefäßwiderstand zu regulieren. Vergleichbare Versuche wurden in dieser Arbeit ebenfalls durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass in glatten Muskelzellen unter Basisbedingungen nur vereinzelt Ca²⁺-Transienten auftraten, die jedoch durch Zugabe von 20 μ M Phenylephrin (PE) stimuliert werden konnten (vgl. die zusätzliche Abbildung 7 im Anhang). Allerdings muss der experimentelle Aufbau noch weiter verbessert werden, um eine Quantifizierung der Ergebnisse möglich zu machen. Die Zellen wurden in speziellen Zellkulturschalen mit Glasboden kultiviert, damit sie nach der Beladung mit dem Ca²⁺-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 mikroskopiert werden konnten. Die Hauptprobleme bestanden dabei zum einen in der Dauer des Versuchs, während der die Zellen bei Raumtemperatur und nicht-kontrollierten Gasbedingungen mikroskopiert wurden, und zum anderen lösten sich die Zellen während dieser Zeit teilweise von der Glasoberfläche, so dass häufig nicht die gleichen Zellen vor und nach der Stimulation mit PE analysiert werden konnten. Dabei spielt vermutlich die Gegenwart von Pluronic F-127 bei der Beladung mit Fluo-4 eine Rolle. Das Detergens dient dazu, die Membranen zu permeabilisieren, damit der Farbstoff von den Zellen besser aufgenommen werden kann, es wirkt sich aber gleichzeitig negativ auf die Adhäsion der Zellen an die Unterlage aus. Später während der mikroskopischen Aufnahmen muss die PE-Lösung daher besonders vorsichtig auf die Zellen pipettiert werden, damit sich die Zellen nicht ablösen oder die Zellkulturschale verschoben wird.

4.4.2 Endothelzellen

Weitaus unkomplizierter gestaltete sich die Charakterisierung der Endothelzellen, da hier mit CD31 ein spezifischer Oberflächenmarker zur Verfügung steht, der sowohl für die Bestimmung der Differenzierungseffizienz als auch für die Aufreinigung der Zellen verwendet werden kann.

Funktionell konnte gezeigt werden, dass die aus hiPS-Zellen differenzierten Endothelzellen genau wie HUVECs in der Lage sind, Gefäß-ähnliche Strukturen zu bilden. Der Versuchsaufbau wurde hierfür aus der Dissertation von Kaja Breckwoldt (2015) übernommen. Dieser wurde auch auf ähnliche Weise von Palpant et al. (2016) für die *in vitro*-Charakterisierung von Endothelzellen verwendet. In der Originalarbeit von White et al. (2013), die als Grundlage für das hier verwendete Differenzierungsprotokoll diente, wurden nicht nur solche *in vitro*-Versuche durchgeführt, sondern die Endothelzellen außerdem in einer Matrigelmatrix SCID-Mäusen subkutan injiziert und nach zwei Wochen untersucht, ob die Zellen auch *in vivo* dazu fähig waren, funktionelle Blutgefäße zu bilden. Dies konnte bestätigt werden, da nicht nur kapillare Strukturen gefunden wurden, sondern im Lumen dieser Gefäße auch Erythrozyten nachgewiesen werden konnten, was wiederum für einen funktionellen Anschluss der Strukturen an das vaskuläre System spricht.

4.5 Multizelluläre EHTs

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden aus den Fluoreszenz-markierten hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten multizelluläre EHTs hergestellt. Damit sollte zum einen das bestehende EHT-Modell physiologischer gestaltet werden und zum anderen eine Möglichkeiten geschaffen werden, zelluläre Interaktionen und die strukturelle Verteilung der verschiedenen Zelltypen in einen dreidimensionalem *in vitro*-Modell zu untersuchen.

4.5.1 Optimierung der Zellkulturbedingungen

Nach der Differenzierung und Charakterisierung der Zellen bestand die nächste Herausforderung darin, alle vier Zelltypen gemeinsam im EHT-Format zu kultivieren und Bedingungen zu finden, in denen nach Möglichkeit alle Zelltypen gleich gut überleben können. Bei anfänglichen Versuchen zeigte sich schnell, dass Endothelzellen unter den Standard-EHT-Bedingungen nicht kultiviert werden können. Bei einem Vergleich verschiedener Zellkulturmedien wurde festgestellt, dass Endothelzellen, die in VEGF- und bFGF-supplementiertem EHT-Medium kultiviert wurden, deutlich besser überlebten. Dass die Zugabe von Wachstumsfaktoren zum Medium bei der Kultur von multizellulärem künstlichem Herzgewebe notwendig ist, lässt sich auch an den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen nachvollziehen. So verwenden beispielsweise Giacomelli et al. (2017) für ihre Mikrogewebe

aus hES- oder hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten und Endothelzellen ebenfalls Medium, dem VEGF zugesetzt wird. Tiburcy et al. (2017) haben für die Zellkultur von künstlichem Herzgewebe aus hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten und dermalen Fibroblasten ein definiertes, Serum-freies Medium entwickelt, das B27 und die Wachstumsfaktoren IGF-1, FGF2, VEGF und TGF β enthält.

Die Ergebnisse von Stoehr et al. (2016) an murinen EHTs zeigen eindrucksvoll, dass Endothelzellen nicht nur im EHT-Format überleben können, sondern ein umfangreiches und verzweigtes Netzwerk bilden und dies sogar in Medium ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren. Dass in multizellulären humanen EHTs keine vaskulären Strukturen gefunden wurden, spricht daher für den unreifen Phänotyp hiPSC-abgeleiteter Zellen, die einer nativen Mischung primärer kardialer Zellen funktionell unterlegen sind. Neben den Zellen selbst könnte allerdings noch ein weiterer Faktor für die stark voneinander abweichenden Ergebnisse verantwortlich sein. Und zwar werden humane EHTs genau wie Ratten-EHTs bei 40% Sauerstoff, also unter hyperoxischen Bedingungen kultiviert, während murine EHTs unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Es ist demnach wahrscheinlich, dass im Inneren von murinen EHTs eher hypoxische Bedingungen herrschen, die sich positiv auf die Angiogenese auswirken und für die Bildung von Gefäßstrukturen förderlich sind. Ob humane EHTs dauerhaft unter normoxischen Bedingungen kultiviert werden können und wie sich dies auf die verschiedenen Zelltypen auswirkt, wurde in dieser Arbeit noch nicht untersucht.

4.5.2 Fluoreszenz-markierte Zellen

Die Verwendung Fluoreszenz-markierter hiPS-Zellen ist einer der besonderen Vorzüge des hier entwickelten Modells. Die lentiviralen Vektoren wurden für die sogenannte RGB-Markierung und damit für die Nachverfolgung individueller Zellen in ganz unterschiedlichen Systemen entwickelt (Cornils et al. 2014; Abramowski et al. 2015; Gomez-Nicola et al. 2015). Sie kombinieren mehrere Eigenschaften, die sie für den Einsatz in multizellulären EHTs attraktiv machten. Zuerst ermöglichen die ins Genom integrierenden lentiviralen Vektoren eine dauerhafte Expression der transduzierten Fluoreszenzproteine, die auch nach mehreren Wochen Differenzierung und EHT-Kultur nicht abnahm. Eine gleichermaßen wichtige Rolle spielt dabei der eF1 α -Promotor, der sowohl in hiPS-Zellen als auch während und nach der Differenzierung kontinuierlich aktiv ist, so dass die Fluoreszenz der Zellen in allen Stadien nachverfolgt werden konnte. Einen dritten Vorteil bringt die in den Vektoren enthaltene Puromycinresistenz mit sich. Durch die damit mögliche Selektion der Zellen kann sichergestellt werden, dass unabhängig von der ursprünglichen Transduktionseffizienz nahezu alle Zellen der vier unterschiedlichen Populationen das jeweilige Fluoreszenzprotein exprimieren. Außerdem kann das System flexibel und Zelltyp-unabhängig eingesetzt werden. Da von allen

vier Populationen transduzierter hiPS-Zellen Kryoproben vorhanden sind, könnten beispielweise für zukünftige Versuche Fibroblasten aus den etwas dunkleren blauen hiPS-Zellen und Kardiomyozyten aus den hellen roten hiPS-Zellen differenziert werden, wodurch die Struktur der Kardiomyozyten in multizellulären EHTs sicherlich besser abgebildet werden könnte. Insgesamt konnten die vier gewählten Fluoreszenzproteine sowohl bei der mikroskopischen Betrachtung als auch in der durchflusszytometrischen Analyse problemlos voneinander unterschieden werden und ermöglichen damit die Analyse multizellulärer EHTs, ohne dass zusätzliche Schritte wie die Fixierung, Permeabilisierung oder aufwändige Zelltyp-spezifische Färbungen notwendig wären.

4.5.3 Zellzusammensetzung

Eine der zentralen Fragestellungen war, in welchem Verhältnis die vier Zelltypen in den multizellulären EHTs zusammengemischt werden sollten. Dabei galt es einen Kompromiss zu finden zwischen einer möglichst physiologischen und mit nativem Herzgewebe vergleichbaren Zusammensetzung auf der einen Seite und einem im EHT-Modell anwendbarem Verhältnis auf der anderen Seite. Als limitierend stellte sich dabei heraus, dass eine Mindestzahl an Kardiomyozyten notwendig ist, damit die EHTs kohärent kontrahieren und die Silikonstäbe auslenken, die Gesamtzahl an Zellen pro EHT jedoch begrenzt ist. So haben beispielweise Versuche mit 1 und 2 Mio. Zellen pro EHT gezeigt, dass sich die höhere Zellzahl negativ auf die Entwicklung der EHTs auswirkte und viele Zellen im EHT-Inneren nicht überlebten, weil sie vermutlich nicht ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt wurden. Weitere Anhaltspunkte lieferten auch die Experimente mit bizellulären EHTs, die ergaben, dass bereits ein geringer Anteil von 5% Fibroblasten die Kontraktilität der EHTs deutlich beeinflussen kann. Als Ausgangszusammensetzung bei der Herstellung der EHTs wurden daher 70% Kardiomyozyten mit 20% Endothelzellen und jeweils 5% glatten Muskelzellen und Fibroblasten gemischt. Vergleicht man diese Zahlen mit den Ergebnissen von Pinto et al. (2016), die ca. 30% Kardiomyozyten und 50% Endothelzellen in humanem Herzgewebe identifiziert haben, unterscheiden sich diese zunächst. Beim Blick auf ähnliche *in vitro*-Modelle kardialer Kokultur in Tabelle 13 wird jedoch klar, dass sich die komplexe physiologische Zellzusammensetzung, wie sie im nativen Gewebe herrscht, nicht einfach übertragen lässt und der Kardiomyozytenanteil in allen Modellen hoch ist, unabhängig davon welche Zelltypen sonst noch enthalten sind.

Diskussion

Tabelle 13: Zelluläre Zusammensetzung verschiedener kardialer *in vitro*-Modelle
CM=Kardiomyozyten, EC=Endothelzellen, SMC=glatte Muskelzellen, Fibro=Fibroblasten,
MC=murale Zellen (Perizyten und glatte Muskelzellen)

Quelle	Zellzusammensetzung
Ergebnisteil dieser Arbeit	70% CM, 20% EC, 5% SMC 5% Fibro
Ravenscroft et al. 2016	57% CM, 15% EC, 25% Fibro
Giacomelli et al. 2017	85% CM, 15% EC
Tiburcy et al. 2017	70% CM, 30% Fibro
Masumoto et al. 2016	~50% CM, ~10% EC, ~15% MC

Ein besonderer Aspekt, der bei der Betrachtung von nativem Gewebe keine Rolle spielt, bei *in vitro*-Modellen aus iPSC-abgeleiteten Zellen jedoch nicht außer Acht gelassen werden darf, ist der Anteil der Zellen, der nicht richtig oder nicht vollständig differenziert wurde. Wie bei den bizellulären EHTs bereits diskutiert, ergibt sich dadurch beispielsweise aus dem eingesetzten Verhältnis von 70% Kardiomyozyten und 30% Fibroblasten bei Tiburcy et al. (2017) ein reales 1:1 Verhältnis von Kardiomyozyten zu Nicht-Kardiomyozyten. Gleiches gilt auch bei den multizellulären EHTs in diesem Projekt. Bei einer Effizienz der Kardiomyozytendifferenzierung von beispielsweise 70%, entsprach der reale Anteil an Kardiomyozyten in den EHTs eher 50%. Weniger Abweichung besteht bei den Endothelzellen, da hier dank der Aufreinigung etwa 92% der eingesetzten Zellpopulation CD31-positiv waren. Da für die epikardialen Zellen keine Differenzierungseffizienz bestimmt werden kann, ist hier der reale Anteil nicht exakt kalkulierbar. Es bleibt also bei allen scheinbar definierten Zellzusammensetzungen ein gewisser Anteil an undefinierten Nicht-Kardiomyozyten, deren funktionelle Eigenschaften unklar sind. Um die Zahl dieser Zellen möglichst gering zu halten, könnte man die Kardiomyozyten, genau wie die Endothelzellen, vor der Herstellung der EHTs mit einem MACS-basierten Kit (Miltenyi Biotec) aufreinigen. Durch diesen zusätzlichen Arbeitsschritt würden die experimentelle Durchführung und der zeitliche Ablauf zwar noch komplexer, die Ergebnisse der Versuche aber reproduzierbarer, aussagekräftiger und einfacher zu interpretieren.

Um zu klären, ob das zahlenmäßige Verhältnis der Zellen während der EHT-Kultur konstant blieb oder sich verschob, sollten EHTs dissoziiert und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass die epikardialen Zellen nicht sonderlich stark proliferierten und sich ihr Anteil kaum änderte. Allerdings konnten trotz der verbesserten Zellkulturbedingungen weniger Endothelzellen nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass hier weiterhin Optimierungsbedarf herrscht und diese Zellen nicht nur während der Kultur, sondern wahrscheinlich auch gegenüber den Dissoziationsbedingungen besonders empfindlich sind. Obwohl nach der Anpassung des EHT-Mediums mikroskopisch mehr

Diskussion

Endothelzellen in den EHTs zu sehen waren, war die Expression von CD31 in multizellulären EHTs im Vergleich zur unizellulären Kontrolle unverändert. Vergleicht man die Expressionsdaten der reinen Zelltypen mit denen der multizellulären EHTs (vgl. Abbildung 3.21 vs. Abbildung 3.32) wurde hier eigentlich erwartet, dass 20% Endothelzellen ausreichen, um eine erhöhte CD31-Expression in den EHTs abbilden zu können.

Stattdessen waren deutliche Unterschiede zwischen multizellulären und unizellulären EHTs in Bezug auf die epikardialen Marker sichtbar. ACTA2 und die Matrixproteine Kollagen-I und Kollagen-III waren in multizellulären EHTs höher exprimiert, was bei einem gemeinsamen Anteil von glatten Muskelzellen und Fibroblasten von nur 10% an der Gesamtzellzahl auf eine ausgeprägte funktionelle Aktivität dieser Zellen schließen lässt. Damit einher gehen auch die Expression von Kollagen-I auf Proteinebene, die in multizellulären EHTs mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden konnte, während sie in unizellulären EHTs nahezu vollständig fehlte sowie der schnelle Abbau der Fibrinmatrix und die damit verbundenen morphologischen Veränderungen in multizellulären EHTs. Da diese Ergebnisse alle auf Veränderungen im Gleichgewicht von Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix hinwiesen, sollte dies mit verschiedenen histologischen Färbungen genauer untersucht werden. Die an vielen natürlichen Geweben standardmäßig durchgeführten Matrixfärbungen Pikro-Siriusrot, Masson-Goldner und Elastika-van-Gieson zeigten an humanen EHT-Schnitten, wie zuvor auch schon an Schnitten von Ratten-EHTs (Hirt et al. 2012), leider keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Problematisch war dabei nicht nur, dass nur sehr vage Unterschiede zwischen unizellulären und multizellulären EHTs festgestellt wurden, sondern dass prinzipiell keine der drei Färbungen eine eindeutige Unterscheidung zwischen Fibrin und Kollagen erkennen ließ. Die Ergebnisse der Elastika-van-Gieson-Färbung wurden nicht abgebildet, da hierbei nur die Zellkerne in braun identifiziert werden konnten und das Zytoplasma der Zellen und die extrazelluläre Matrix gleichermaßen gelb gefärbt waren. Dies hebt die Wertigkeit der spezifischen immunhistochemischen Färbung von Kollagen-I für die histologische Analyse von EHTs besonders hervor.

Die Veränderungen der extrazellulären Matrix resultieren eventuell in einer steiferen Matrix und könnten daher zu einer geringen Auslenkung der Silikonstäbe und einer niedrigeren daraus berechneten Kontraktionskraft beitragen. Es gilt also noch herauszufinden, ob multizelluläre EHTs tatsächlich schwächer kontrahieren als unizelluläre EHTs, oder ob die video-optischen Messungen aufgrund der verschiedenen Matrixzusammensetzungen nur nicht direkt vergleichbar sind. Dazu könnte man die EHTs mit einem anderen System analysieren, das über einen Kraftaufnehmer verfügt, mit dem nicht nur die Kraft, sondern auch die mechanischen Eigenschaften, also die Steifheit des Gewebes, gemessen werden kann.

Erst nach dieser Analyse erscheint es sinnvoll, die zelluläre Zusammensetzung der multizellulären EHTs erneut zu variieren, um ein Verhältnis zu finden, dass sich möglichst positiv auf die Kontraktilität der EHTs auswirkt.

4.5.4 Kardiale multizelluläre dreidimensionale *in vitro*-Modelle

Es existieren einige Modellsysteme, die den hier vorgestellten multizellulären EHTs ähneln und nun kurz miteinander verglichen werden sollen (s. a. Tabelle 13). Dazu gehören die EB-artigen Mikrogewebe aus Kardiomyozyten und Endothelzellen (Giacomelli et al. 2017) oder aus Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten (Ravenscroft et al. 2016). Zu den großen Vorteilen dieser Modelle gehören die geringe erforderliche Zellzahl und die unkomplizierte Herstellung, da die Zellsuspensionen nur gemischt werden müssen und sich die Mikrogewebe daraus selbst aggregieren, ohne dass eine künstliche Matrix zugesetzt werden muss. Die Zellen stehen also in sehr engem Kontakt miteinander, wodurch eine gute Ausgangslage für die Untersuchung zellulärer Interaktionen geschaffen wird. Nachteilig ist hingegen die fehlende mechanische Belastung, wodurch die Kardiomyozyten sich nicht ausrichten und sich die Zellen nicht strukturell orientieren können. Hinzu kommen weitere negative Aspekte wie beispielweise, dass die Analyse der Kontraktilität in diesen Modellen schwierig ist oder dass die Mikrogewebe fixiert und gefärbt werden müssen, wenn die Verteilung der Zellen untersucht werden soll (vgl. Abbildung 4.3 A und B).

Die Studien von Masumoto et al. (2016) und Nakane et al. (2017) beinhalten zwar mit Kardiomyozyten, Endothelzellen und vaskulär-muralen Zellen, zu denen wiederum glatte Muskelzellen und Perizyten gehören, eine Mischung von Zellen, die am ehesten in der Lage sein sollte, vaskularisiertes künstliches Gewebe zu bilden. Leider gehen die Autoren in der groß angelegten Studie, in der unter anderem auch verschiedene Geometrien der Konstrukte getestet und Transplantationsversuche durchgeführt wurden, nicht ausführlich auf die Vaskularisierung oder die Funktionalität der Endothelzellen ein. Die kaum definierte Zusammensetzung der Zellen stellt jedoch den wohl größten Kritikpunkt dar. Kardiomyozyten und Endothelzellen werden gemeinsam nach einem ‚kardiovaskulären‘ Protokoll differenziert. Die muralen Zellen werden nur über die Expression eines einzigen Markers (*Platelet-derived Growth Factor Receptor β* ; PDGFR β) charakterisiert, dessen Spezifität zudem fraglich ist und ihr Anteil im künstlichen Gewebe wird mit 5-25% angegeben.

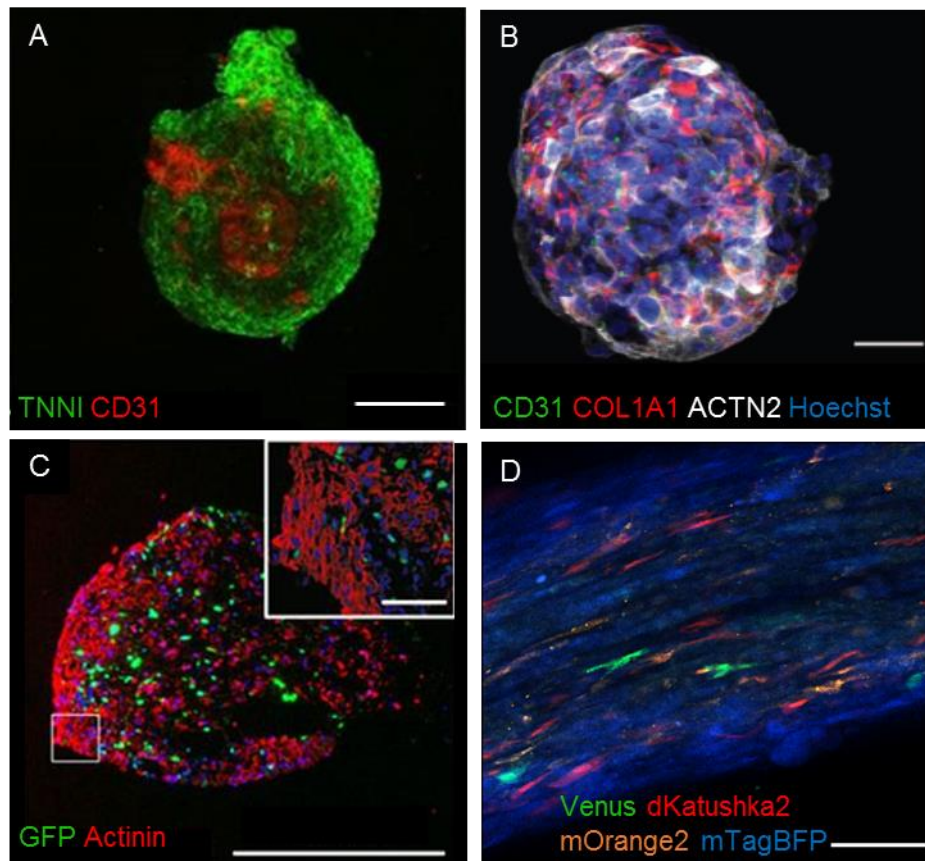


Abbildung 4.3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen künstlicher multizellulärer kardialer Gewebe. EB-artige Mikrogewebe aus Kardiomyozyten und Endothelzellen (A; Giacomelli et al. 2017; Maßstabsbalken 100 μm) bzw. aus Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten (B; Ravenscroft et al. 2016; Maßstabsbalken 50 μm). Querschnitt eines künstlichen Gewebes aus Kardiomyozyten und GFP-positiven Fibroblasten (C; Tiburcy et al. 2017; Maßstabsbalken 500 μm , Maßstabsbalken in der Vergrößerung 50 μm) und eines der hier vorgestellten multizellulären EHTs aus mTagBFP-positiven Kardiomyozyten, Venus-positiven Endothelzellen, mOrange2-positiven glatten Muskelzellen und dKatushka2-positiven Fibroblasten (D; vgl. Abbildung 3.29; Maßstabsbalken 100 μm).

Im Gegensatz dazu verwenden Tiburcy et al. (2017) in ihren Modell zwar nur Kardiomyozyten und Fibroblasten, aber das Modell ist hinsichtlich vieler Aspekte vergleichbar mit den multizellulären EHTs in dieser Arbeit (vgl. Abbildung 4.3 C und D). Unabhängig von der unterschiedlichen Geometrie der Konstrukte setzen Tiburcy et al. (2017) beispielweise den gleichen Anteil an Kardiomyozyten ein, die morphologischen Unterschiede in Bezug auf den Abbau der Matrix waren ebenfalls in beiden Modellen vorhanden und es wurden lentivirale Vektoren für die Fluoreszenzmarkierung der Zellen verwendet. Zu den Vorzügen der Arbeit von Tiburcy et al. (2017) gehört die Etablierung eines definierten und Serum-freien Mediums und die funktionelle Verbesserung bizellulärer Gewebe gegenüber unizellulären Kontrollen. Allerdings werden dafür 30% dermale Fibroblasten eingesetzt, wodurch sich das Modell doch stark von den Ergebnissen dieser Arbeit unterscheidet. Eine mögliche Ursache dafür könnte

die aus Kollagen an Stelle von Fibrin bestehende Matrix sein, deren strukturelle Eigenschaften sich womöglich anders auf die Aktivierung der Fibroblasten auswirkt.

Zusammengefasst zeichnen sich die hier entwickelten multizellulären EHTs durch die Verwendung der vier häufigsten kardialen Zelltypen, nämlich Kardiomyozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten aus. Die Zelltypen wurden zuvor Fluoreszenz-markiert, funktionell charakterisiert und können prinzipiell in einen beliebig definierbaren Verhältnis gemischt werden.

4.6 Ausblick

Der optimale Abschluss dieses Projekts wäre die Kombination der beiden Versuchsteile und ein humanes multizelluläres EHT-Modell, das mit einer möglichst physiologischen Zellzusammensetzung dazu dient, die Unterschiede und Gemeinsamkeiten physiologischer und pathologischer kardialer Hypertrophie auf zellulärer und molekularer Ebene aufzuklären.

Dafür müssen zunächst die multizellulären EHTs weiter optimiert werden. Insbesondere sind die Zellkulturbedingungen so zu verbessern, dass die Endothelzellen noch besser überleben und funktionell aktiv sind, ohne dass dadurch die Vitalität oder Funktion der anderen Zelltypen beeinträchtigt wird. Als nächstes sollte der Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Messung der Kontraktilität untersucht werden, damit die zelluläre Zusammensetzung anhand dieses wichtigen funktionellen Parameters weiter optimiert werden kann. Um die Aussagekraft des Modells noch weiter zu stärken, ist außerdem eine weiterführende Charakterisierung, insbesondere der epikardialen Zellen, unerlässlich. Hinzu kommt, dass die analytischen Möglichkeiten, die die Fluoreszenz-markierten Zellen bieten, noch besser genutzt werden könnten. Mit Hilfe eines neu ausgearbeiteten EHT-Dissoziationsprotokolls, bei dem das Verhältnis der Zellen nicht manipuliert wird, könnten bei FACS-Analysen beispielweise wichtige Ergebnisse zur Zellzusammensetzung im Zeitverlauf der EHT-Kultur gewonnen werden. Eventuell wäre es sogar möglich wie bei Tiburcy et al. (2017), anhand der durchflusszytometrischen Analyse die Zellgrößen so exakt zu ermitteln, dass eine Kardiomyozytenhypertrophie ohne aufwendige histologische Auswertung festgestellt werden kann. Ein anderer Aspekt der multizellulären EHTs, der noch verbessert werden kann ist die konfokale Mikroskopie. Durch Optimierung der experimentellen Bedingungen während der Fixierung könnte vermutlich die Helligkeit der Fluoreszenzproteine und damit auch die Qualität der Aufnahmen noch gesteigert werden.

Als nächstes gibt es noch einige Optionen, die Interventionen zu variieren, zu kombinieren und zu optimieren, um in humanen EHTs eine kardiale Hypertrophie hervorzurufen, die bislang

noch nicht systematisch getestet werden konnten, wie zum Beispiel die Kombination von AE und ET-1 oder ET-1 und PE. Davon abgesehen könnten weichere Silikonhalterungen verwendet werden, wodurch die Effektgröße der mechanischen Nachlasterrhöhung verstärkt werden würde. Damit könnte gegebenenfalls ausgeschlossen werden, dass die mechanische Belastung durch die Kultur an den Silikonhalterungen selbst schon zu einer Art Hypertrophie der Kardiomyozyten führt und deshalb bei der Messung der Zellgrößen keine Unterschiede festgestellt werden konnten. Auffällig waren jedoch die ungleichen Zellgrößen der beiden verschiedenen Zelllinien unter Kontrollbedingungen und es wäre interessant und hilfreich weitere Zelllinien in diesen Vergleich miteinzubeziehen, um mehr über die Eigenschaften und Plastizität hiPSC-abgeleiteter Kardiomyozyten zu erfahren.

Trotz vielfältiger Ansätze das bestehende Modell zunächst zu optimieren und die zellulären Vorgänge besser zu verstehen, gibt es natürlich bereits weiterführende Fragestellungen. Dazu gehört insbesondere die Erweiterung der Zusammensetzung multizellulärer EHTs. Zieht man zum Beispiel die schlechte Überlebensrate der Endothelzellen in Betracht, könnten Perizyten den entscheidenden Einfluss haben und die Differenzierung und Funktionalität der Endothelzellen fördern. Diesen Effekt beschreiben beispielsweise auch Orlova et al. (2014), die in ihrer Arbeit beide Zelltypen aus hiPS-Zellen differenzieren und die Funktion der Zellen in Kokulturversuchen testen. Würde man außerdem noch Makrophagen hinzufügen, ist vorstellbar, dass durch die Beseitigung von Zelldebris über Phagozytose die Funktion des gesamten EHTs verbessert wird. In der Literatur beschrieben ist außerdem der Einfluss von Makrophagen auf andere zelluläre Prozesse, wie Angiogenese oder Fibrose, mittels parakrinen Mechanismen oder über direkten Zell-Zell-Kontakt (Ilinykh und Pinto 2017). Da die Differenzierung von Makrophagen aus hiPS-Zellen bereits von Senju et al. (2011) beschrieben wurde, wäre es möglich neben den vier in dieser Arbeit beschriebenen Zelltypen auch noch Perizyten und Makrophagen aus den gleichen hiPS-Zellen zu generieren und zu den multizellulären EHTs hinzuzufügen.

5. Zusammenfassung

Der Ausgangspunkt dieser Arbeit war das auf Ratten-EHTs (von engl. *Engineered Heart Tissue*) beruhende *in vitro*-Modell der pathologischen kardialen Hypertrophie von Hirt et al. (2012). Dabei werden hohle Silikonhalterungen, an denen die EHTs befestigt sind, mit Metallklammern mechanisch versteift und so die Nachlast der EHTs erhöht. Dieses Modell sollte auf humane EHTs aus hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten übertragen werden, um die Untersuchung zellulärer und molekularer Vorgänge unter pathophysiologischen Bedingungen an künstlichem menschlichem Gewebe zu ermöglichen. Durch einwöchige Nachlasterhöhung oder durch Behandlung mit Endothelin-1 wurden jedoch nur teilweise eine kontraktile Dysfunktion und keine Kardiomyozytenhypertrophie oder veränderte Genexpression hervorgerufen.

Die diskrepanten Ergebnisse beider Modelle könnten darauf beruhen, dass Ratten-EHTs aus einer physiologischen Mischung von Herzzellen, humane EHTs dagegen fast ausschließlich aus hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten bestehen. Daher sollte als zweite Aufgabenstellung dieser Arbeit der Einfluss weiterer kardialer Zelltypen wie Fibroblasten, Endothelzellen und glatter Muskelzellen im humanen EHT-Modell untersucht werden. Zunächst wurden den humanen EHTs Fibroblasten verschiedenen Ursprungs beigemischt. Da nur kardiale Fibroblasten dabei die Kontraktilität der EHTs verbesserten, wurde ein Differenzierungsprotokoll für epikardiale Zellen aus hiPS-Zellen etabliert. Allerdings konnte auch an den aus Kardiomyozyten und Fibroblasten hergestellten, bizellulären humanen EHTs keine Hypertrophie hervorgerufen werden.

Im letzten Teil wurden dann multizelluläre EHTs aus 70% Kardiomyozyten, 20% Endothelzellen, 5% glatten Muskelzellen und 5% Fibroblasten hergestellt, die prinzipiell aber in jedem beliebigen Verhältnis im EHT kombiniert werden können. Diese Zelltypen wurden aus verschiedenfarbig fluoreszenz-markierten hiPS-Zellen differenziert und funktionell charakterisiert. Im multizellulären EHT-Modell zeigte sich anhand von fluoreszenzmikroskopischen, durchflusszytometrischen und histologischen Analysen, dass hiPSC-abgeleitete Endothelzellen nur bei Supplementierung des Mediums mit Wachstumsfaktoren in diesem Format kultiviert werden können. Epikardiale glatte Muskelzellen und Fibroblasten beschleunigten den Abbau der extrazellulären Matrix und veränderten deren Zusammensetzung durch die Sekretion von Kollagenen. Zukünftige Experimente sollen zeigen, ob ein humanes *in vitro*-Modell für pathologische kardiale Hypertrophie, basierend auf multizellulären EHTs etabliert werden kann.

6. Summary

The initial idea of this project is based on the *in vitro* model of cardiac pathological hypertrophy published by Hirt et al. (2012). Here, hollow silicone posts to which engineered heart tissue (EHT) are attached were mechanically stiffened by insertion of metal braces, which led to an increase of afterload for the EHTs. The goal was to transfer this experimental setup from rat EHTs to human EHTs consisting of iPS-derived cardiomyocytes to study cellular and molecular processes under pathophysiological conditions in engineered human tissue. One week of afterload enhancement or treatment with endothelin-1 did partly lead to contractile dysfunction, but no cardiac hypertrophy or changes in gene expression could be observed.

These discrepant results between rat and human EHTs may be explained by a different cellular composition, as rat EHTs are made from a native mixture of heart cells, whilst human EHTs mainly consist of iPSC-derived cardiomyocytes. Hence the next task of this project was to investigate the influence of other cardiac cell types, like fibroblasts, endothelial cells and smooth muscle cells on the human EHT model. For this part, we added different types of fibroblasts to human EHTs, and as only cardiac fibroblasts improved contractility, a differentiation protocol for epicardial cells from iPSCs was established. However, the presence of fibroblasts in bicellular human EHTs did not facilitate the development of pathological hypertrophy.

For the last section, multicellular EHTs were generated from 70% cardiomyocytes, 20% endothelial cell, 5% smooth muscle cells und 5% fibroblasts, although the cells can basically be combined in any defined ratio into human EHTs. These cell types have all been differentiated from different fluorescently labelled iPS cells and were functionally characterized. Analyses of multicellular EHTs based on fluorescence microscopy, flow cytometry and histological analysis showed that endothelial cells could only be cultured in EHT-format when medium was supplemented with growth factors. Despite that, epicardial cells accelerated matrix remodelling and influenced matrix composition by secreting collagens. Future experiments are necessary to fully establish a human *in vitro* model of pathological cardiac hypertrophy based on multicellular hiPSC-derived EHTs.

7. Literatur

- Abilez OJ, Tzatzalos E, Yang H, et al (2017) Passive Stretch Induces Structural and Functional Maturation of Engineered Heart Muscle as Predicted by Computational Modeling. *Stem Cells*. doi: 10.1002/stem.2732
- Abramowski P, Kraus O, Rohn S, et al (2015) Combined application of rgb marking and mass spectrometric imaging facilitates detection of tumor heterogeneity. *Cancer Genomics and Proteomics* 12:179–188.
- Ayoubi S, Sheikh SP, Eskildsen T V. (2017) Human induced pluripotent stem cell-derived vascular smooth muscle cells: differentiation and therapeutic potential. *Cardiovasc Res* 113:1282–1293. doi: 10.1093/cvr/cvx125
- Bao X, Lian X, Qian T, et al (2017) Directed differentiation and long-term maintenance of epicardial cells derived from human pluripotent stem cells under fully defined conditions. *Nat Protoc* 12:1890–1900. doi: 10.1038/nprot.2017.080
- Bergmann O, Zdunek S, Felker A, et al (2015) Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* 161:1566–75. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.026
- Bisping E, Wakula P, Poteser M, Heinzl FR (2014) Targeting cardiac hypertrophy: toward a causal heart failure therapy. *J Cardiovasc Pharmacol* 64:293–305. doi: 10.1097/FJC.000000000000126
- Brandão KO, Tabel VA, Atsma DE, et al (2017) Human pluripotent stem cell models of cardiac disease: from mechanisms to therapies. *Dis Model Mech* 10:1039–1059. doi: 10.1242/dmm.030320
- Breckwoldt K (2015) Kardiologie Gewebeersatztherapie mittels künstlichem Herzgewebe aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen. Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg
- 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. doi: 10.1038/nprot.2017.033
- Burridge PW, Matsa E, Shukla P, et al (2014) Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods* 11:855–60. doi: 10.1038/nmeth.2999
- Carlson C, Koonce C, Aoyama N, et al (2013) Phenotypic Screening with Human iPS Cell-Derived Cardiomyocytes. *J Biomol Screen* 18:1203–1211. doi: 10.1177/1087057113500812
- Cornils K, Thielecke L, Hüser S, et al (2014) Multiplexing clonality: Combining RGB marking and genetic barcoding. *Nucleic Acids Res*. doi: 10.1093/nar/gku081
- Dubois NC, Craft AM, Sharma P, et al (2011) SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*

- 29:1011–8. doi: 10.1038/nbt.2005
- Eder A, Vollert I, Hansen A, Eschenhagen T (2016) Human engineered heart tissue as a model system for drug testing. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 96:214–224.
- 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* 11:683–94.
- Földes G, Matsa E, Kriston-Vizi J, et al (2014) Aberrant α -adrenergic hypertrophic response in cardiomyocytes from human induced pluripotent cells. *Stem cell reports* 3:905–14. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.09.002
- Frank D, Kuhn C, Brors B, et al (2008) Gene Expression Pattern in Biomechanically Stretched Cardiomyocytes: Evidence for a Stretch-Specific Gene Program. *Hypertension* 51:309–318. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.098046
- Frey N, Olson EN (2003) Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 65:45–79. doi: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142243
- Fujiu K, Nagai R (2014) Fibroblast-mediated pathways in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 70:64–73. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.013
- Giacomelli E, Bellin M, Sala L, et al (2017) Three-dimensional cardiac microtissues composed of cardiomyocytes and endothelial cells co-differentiated from human pluripotent stem cells. *Development* 144:1008–1017. doi: 10.1242/dev.143438
- Gomez-Nicola D, Riecken K, Perry VH, Fehse B (2015) Multicolor RGB Marking Allows Morphometric and Functional Analysis of Hippocampal Granule Neurons at the Single-Cell Level. *Hum Gene Ther* 26:332–3. doi: 10.1089/hum.2015.010
- 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. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.211458
- Hill JA, Olson EN (2008) Cardiac plasticity. *N Engl J Med* 358:1370–80. doi: 10.1056/NEJMra072139
- 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* 74C:151–161. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.05.009
- Hirt MN, Hansen A, Eschenhagen T (2014b) Cardiac tissue engineering : State of the art. *Circ Res* 114:354–367. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.300522
- Hirt MN, Sörensen N a, Bartholdt LM, et al (2012) Increased afterload induces pathological cardiac hypertrophy: a new in vitro model. *Basic Res Cardiol* 107:307. doi: 10.1007/s00395-012-0307-z
- Hirt MN, Werner T, Indenbirken D, et al (2015) Deciphering the microRNA signature of pathological cardiac hypertrophy by engineered heart tissue- and sequencing-technology.

- J Mol Cell Cardiol 81:1–9. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.01.008
- Howard CM, Baudino TA (2014) Dynamic cell-cell and cell-ECM interactions in the heart. J Mol Cell Cardiol 70:19–26. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.10.006
- Ilinykh A, Pinto AR (2017) The Role of Cardiac Tissue Macrophages in Homeostasis and Disease. Springer, Cham, pp 105–118
- Ivey MJ, Tallquist MD (2016) Defining the Cardiac Fibroblast. Circ J 80:2269–2276. doi: 10.1253/circj.CJ-16-1003
- Iyer D, Gambardella L, Bernard WG, et al (2016) Robust derivation of epicardium and its differentiated smooth muscle cell progeny from human pluripotent stem cells. Development 143:904–904. doi: 10.1242/dev.136143
- Kamakura T, Makiyama T, Sasaki K, et al (2013) Ultrastructural maturation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a long-term culture. Circ J 77:1307–14.
- Kofron CM, Kim TY, King ME, et al (2017) Gq-activated fibroblasts induce cardiomyocyte action potential prolongation and automaticity in a three-dimensional microtissue environment. Am J Physiol Heart Circ Physiol 313:H810–H827. doi: 10.1152/ajpheart.00181.2017
- Kohl P, Camelliti P, Burton FL, Smith GL (2005) Electrical coupling of fibroblasts and myocytes: relevance for cardiac propagation. J Electrocardiol 38:45–50. doi: 10.1016/j.jelectrocard.2005.06.096
- Lajiness JD, Conway SJ (2014) Origin, development, and differentiation of cardiac fibroblasts. J Mol Cell Cardiol 70:2–8. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.11.003
- Lian X, Zhang J, Azarin SM, et al (2013) Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. Nat Protoc 8:162–75. doi: 10.1038/nprot.2012.150
- Mannhardt I, Breckwoldt K, Letuffe-Brenière D, et al (2016) Human Engineered Heart Tissue: Analysis of Contractile Force. Stem Cell Reports 7:29–42. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.04.011
- Mannhardt I, Eder A, Dumotier B, et al (2017) Blinded Contractility Analysis in hiPSC-Cardiomyocytes in Engineered Heart Tissue Format: Comparison With Human Atrial Trabeculae. Toxicol Sci 158:164–175. doi: 10.1093/toxsci/kfx081
- Masumoto H, Nakane T, Tinney JP, et al (2016) The myocardial regenerative potential of three-dimensional engineered cardiac tissues composed of multiple human iPSC cell-derived cardiovascular cell lineages. Sci Rep 6:29933. doi: 10.1038/srep29933
- Matsuura K, Masuda S, Haraguchi Y, et al (2011) Creation of mouse embryonic stem cell-derived cardiac cell sheets. Biomaterials 32:7355–7362. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.042
- Mayourian J, Ceholski DK, Gonzalez DM, et al (2018) Physiologic, Pathologic, and

- Therapeutic Paracrine Modulation of Cardiac Excitation-Contraction Coupling. *Circ Res* 122:167–183. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311589
- Metra M, Carubelli V, Ravera A, Stewart Coats AJ (2017) Heart failure 2016: still more questions than answers. *Int J Cardiol* 227:766–777. doi: 10.1016/J.IJCARD.2016.10.060
- Moretti A, Bellin M, Welling A, et al (2010) Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome. *N Engl J Med* 363:1397–1409. doi: 10.1056/NEJMoa0908679
- Münzel F, Mühlhäuser U, Zimmermann WH, et al (2005) Endothelin-1 and isoprenaline co-stimulation causes contractile failure which is partially reversed by MEK inhibition. *Cardiovasc Res* 68:464–474. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.06.020
- Nakane T, Masumoto H, Tinney JP, et al (2017) Impact of Cell Composition and Geometry on Human Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Engineered Cardiac Tissue. *Sci Rep* 7:45641. doi: 10.1038/srep45641
- Nourse MB, Halpin DE, Scatena M, et al (2010) VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: implications for tissue engineering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:80–9. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.194233
- Orlova V V, van den Hil FE, Petrus-Reurer S, et al (2014) Generation, expansion and functional analysis of endothelial cells and pericytes derived from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 9:1514–1531. doi: 10.1038/nprot.2014.102
- Palpant NJ, Pabon L, Friedman CE, et al (2016) Generating high-purity cardiac and endothelial derivatives from patterned mesoderm using human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 12:15–31. doi: 10.1038/nprot.2016.153
- Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, et al (2016) Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res* 118:400–9. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307778
- Ravenscroft SM, Pointon A, Williams AW, et al (2016) Cardiac non-myocyte cells show enhanced pharmacological function suggestive of contractile maturity in stem cell derived cardiomyocyte microtissues. *Toxicol Sci* 152:99–112. doi: 10.1093/toxsci/kfw069
- Ruan JL, Tulloch NL, Razumova M V., et al (2016) Mechanical Stress Conditioning and Electrical Stimulation Promote Contractility and Force Maturation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiac Tissue. *Circulation*. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014998
- Samak M, Fatullayev J, Sabashnikov A, et al (2016) Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. *Med Sci Monit Basic Res* 22:75–9. doi: 10.12659/MSMBR.900437
- Schaaf S, Shibamiya A, Mewe M, et al (2011) Human engineered heart tissue as a versatile tool in basic research and preclinical toxicology. *PLoS One* 6:e26397. doi: 10.1371/journal.pone.0026397

- Schäfer M, Oeing CU, Rohm M, et al (2015) Ataxin-10 is part of a cachexokine cocktail triggering cardiac metabolic dysfunction in cancer cachexia. *Mol Metab.* doi: 10.1016/j.molmet.2015.11.004
- Senju S, Haruta M, Matsumura K, et al (2011) Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripotent stem cells aiming at cell therapy. *Gene Ther* 18:874–883. doi: 10.1038/gt.2011.22
- Sörensen NA (2013) Entwicklung eines Herzhypertrophiemodells in vitro basierend auf künstlichem Herzmuskelgewebe. UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF
- Stenzig J, Hirt MN, Loeser A, et al (2016) DNA methylation in an engineered heart tissue model of cardiac hypertrophy: common signatures and effects of DNA methylation inhibitors. *Basic Res Cardiol.* doi: 10.1007/s00395-015-0528-z
- Stoehr A, Hirt MN, Hansen A, et al (2016) Spontaneous Formation of Extensive Vessel-Like Structures in Murine Engineered Heart Tissue. *Tissue Eng Part A* 22:326–35. doi: 10.1089/ten.TEA.2015.0242
- Stoehr A, Neuber C, Baldauf C, et al (2014) Automated analysis of contractile force and Ca²⁺ transients in engineered heart tissue. *AJP Hear Circ Physiol* 306:H1353–H1363. doi: 10.1152/ajpheart.00705.2013
- Suhaeri M, Subbiah R, Kim S-H, et al (2017) Novel Platform of Cardiomyocyte Culture and Coculture via Fibroblast-Derived Matrix-Coupled Aligned Electrospun Nanofiber. *ACS Appl Mater Interfaces* 9:224–235. doi: 10.1021/acsami.6b14020
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al (2007) Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131:861–872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126:663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Tallquist MD, Molkentin JD (2017) Redefining the identity of cardiac fibroblasts. *Nat Rev Cardiol* 14:484–491. doi: 10.1038/nrcardio.2017.57
- 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. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024145
- Tulloch NL, Muskheli V, Razumova M V, et al (2011) Growth of engineered human myocardium with mechanical loading and vascular coculture. *Circ Res* 109:47–59. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.237206
- Uesugi M, Ojima A, Taniguchi T, et al (2014) Low-density plating is sufficient to induce cardiac hypertrophy and electrical remodeling in highly purified human iPS cell-derived cardiomyocytes. *J Pharmacol Toxicol Methods* 69:177–188. doi:

- 10.1016/J.VASCN.2013.11.002
- Varga I, Kyselovič J, Galfiova P, Danisovic L (2017) The Non-cardiomyocyte Cells of the Heart. Their Possible Roles in Exercise-Induced Cardiac Regeneration and Remodeling. Springer, Singapore, pp 117–136
- Vunjak Novakovic G, Eschenhagen T, Mummery C (2014) Myocardial Tissue Engineering: In Vitro Models. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4:a014076–a014076. doi: 10.1101/cshperspect.a014076
- Wang G, Jacquet L, Karamariti E, Xu Q (2015) Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Physiol* 593:3013–30. doi: 10.1113/JP270033
- Weeke-Klomp A, Bax NAM, Bellu AR, et al (2010) Epicardium-derived cells enhance proliferation, cellular maturation and alignment of cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 49:606–616. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.07.007
- 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 LP-363ra148. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf8781
- Weinberger F, Mannhardt I, Eschenhagen T (2017) Engineering Cardiac Muscle Tissue: A Maturing Field of Research. *Circ Res* 120:1487–1500. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310738
- White MP, Rufaihah AJ, Liu L, et al (2013) Limited gene expression variation in human embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells. *Stem Cells* 31:92–103. doi: 10.1002/stem.1267
- Wijnker PJM, Friedrich FW, Dutsch A, et al (2016) Comparison of the effects of a truncating and a missense MYBPC3 mutation on contractile parameters of engineered heart tissue. *J Mol Cell Cardiol* 97:82–92. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.03.003
- Witty AD, Mihic A, Tam RY, et al (2014) Generation of the epicardial lineage from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 32:1–12. doi: 10.1038/nbt.3002
- Yamanaka S, Blau HM (2010) Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465:704–712. doi: 10.1038/nature09229
- Yang L, Geng Z, Nickel T, et al (2016) Differentiation of Human Induced-Pluripotent Stem Cells into Smooth-Muscle Cells: Two Novel Protocols. *PLoS One* 11:e0147155. doi: 10.1371/journal.pone.0147155
- Yang X, Pabon L, Murry CE (2014a) Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res* 114:511–23. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.300558
- Yang X, Rodriguez M, Pabon L, et al (2014b) Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol* 72:296–304. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.04.005

Literatur

- Yoshida Y, Yamanaka S (2017) Induced Pluripotent Stem Cells 10 Years Later: For Cardiac Applications. *Circ Res* 120:1958–1968. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311080
- Yoshihara M, Hayashizaki Y, Murakawa Y (2017) Genomic Instability of iPSCs: Challenges Towards Their Clinical Applications. *Stem Cell Rev* 13:7–16. doi: 10.1007/s12015-016-9680-6
- Zhang M, Schulte JS, Heinick A, et al (2015) Universal Cardiac Induction of Human Pluripotent Stem Cells in Two and Three-Dimensional Formats: Implications for In Vitro Maturation. *Stem Cells* 33:1456–1469. doi: 10.1002/stem.1964

8. Bildnachweis

Alle nicht aufgeführten Abbildungen wurden selbst erstellt oder unter Angabe der Quelle modifiziert.

Abbildung 1.1: EHT Technologies GmbH. Abgerufen am 26.10.2017 unter <http://eht-technologies.com/technology.html>

Abbildung 2.4 (B): EHT Technologies GmbH. Abgerufen am 26.10.2017 unter <http://eht-technologies.com/technology.html>

Abbildung 2.5: EHT Technologies GmbH. Abgerufen am 26.10.2017 unter <http://eht-technologies.com/technology.html>

Abbildung 2.7: Dissertation von Nils Sörensen (Sörensen 2013)

Abbildung 2.8: Chroma Technology Corporation. Abgerufen am 19.12.2017 unter <https://www.chroma.com/spectra-viewer>

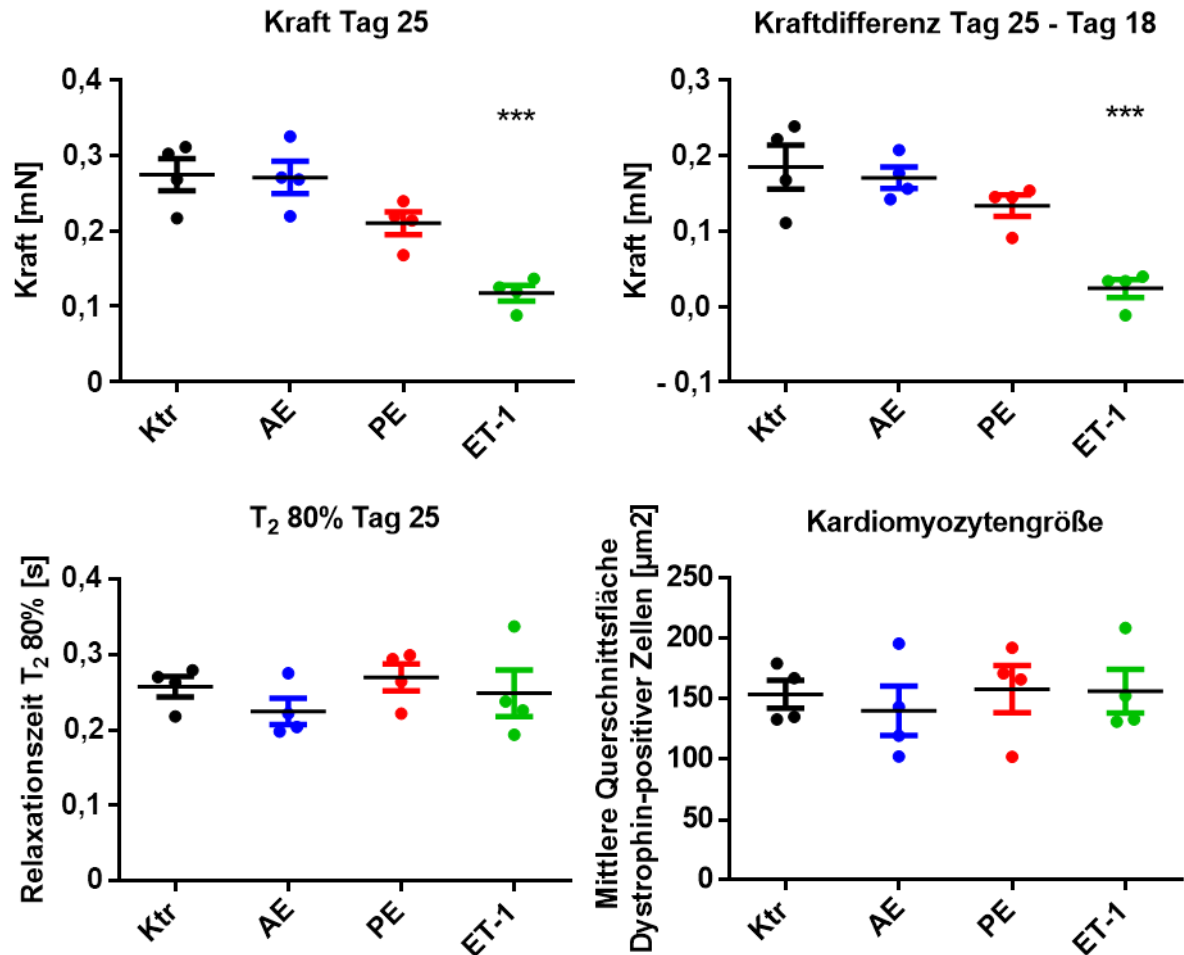
Abbildung 2.9: Carl Zeiss Microscopy GmbH. Abgerufen am 19.12.2017 unter https://www.zeiss.de/content/dam/Microscopy/Products/laser-scan/LSM%20800/lsm-800_beampath-detail.jpg

Abbildung 3.18 B: Chroma Technology Corporation. Abgerufen am 05.01.2018 unter <https://www.chroma.com/spectra-viewer>

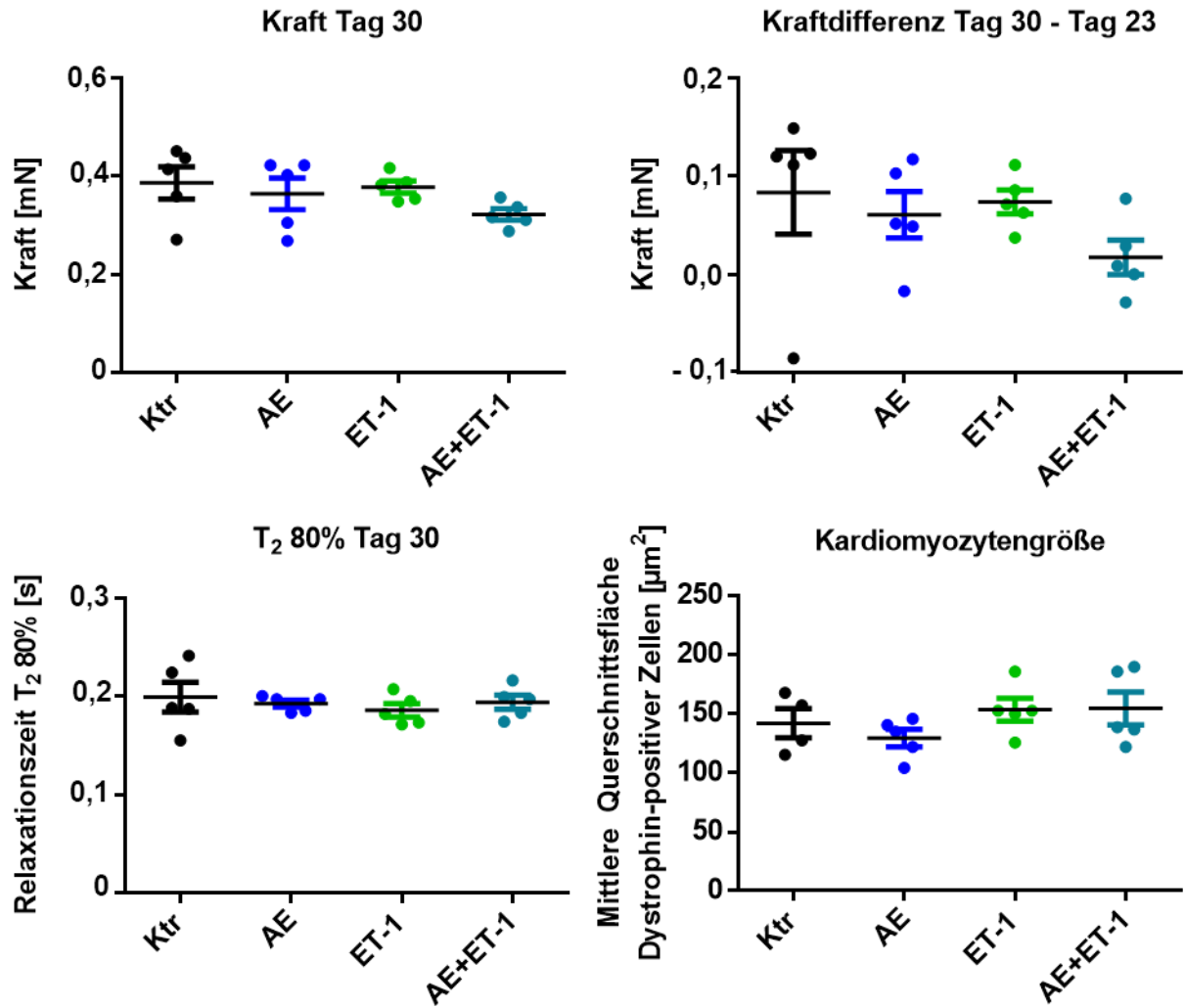
9. Anhang

9.1 Zusätzliche Abbildungen

In den folgenden Abbildungen sind supplementäre und teils präliminäre Daten gezeigt, die Aussagen und Abbildungen im Ergebnisteil ergänzen.

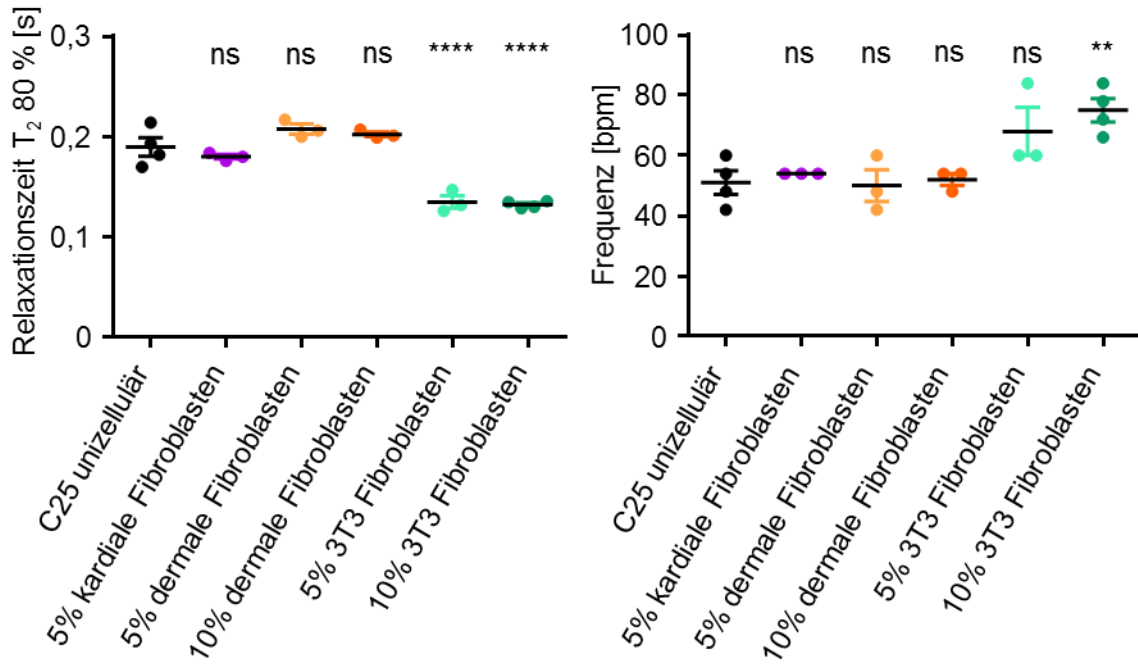


Zusätzliche Abbildung 1: Funktionelle Ergebnisse von ERC018-EHTs an Tag 25 nach einer Woche Nachlastverstärkung (AE) bzw. Behandlung mit ET-1 oder Phenylephrin (PE; 20 µM) verglichen mit unbehandelten Zeitkontrollen (Ktr). Abgebildet sind außerdem die Differenzen der Kräfte nach (Tag 25) und vor (Tag 18) der Intervention und die Ergebnisse der Zellgrößenbestimmung, n=4 EHTs pro Gruppe, *One-Way-ANOVA* mit *Dunnett's-Multiple-Comparison-Test*.



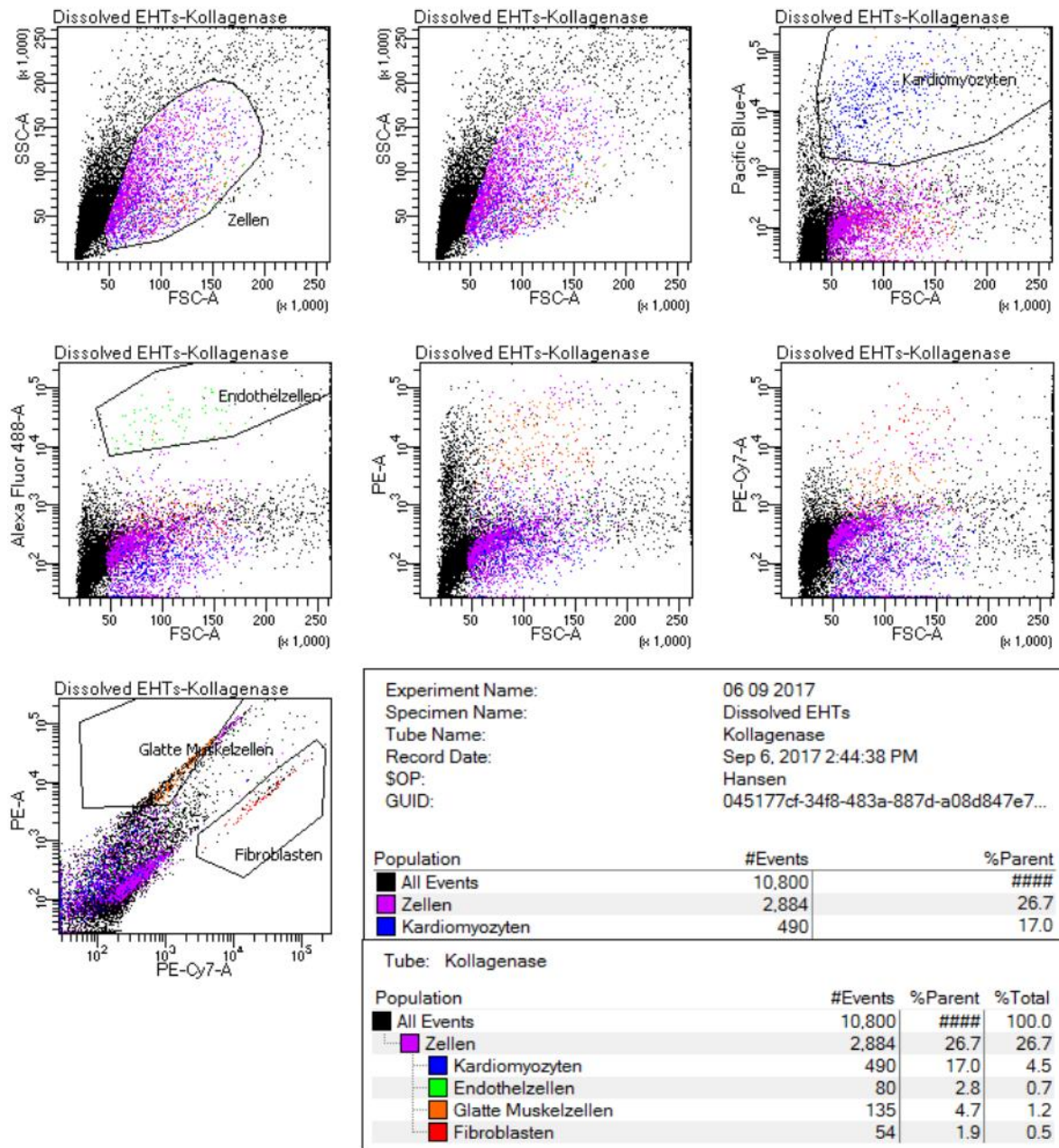
Zusätzliche Abbildung 2: Funktionelle Ergebnisse von ERC018-EHTs an Tag 30 nach einer Woche Nachlastverstärkung (AE) bzw. Behandlung mit ET-1 oder beiden Interventionen in Kombination verglichen mit unbehandelten Zeitkontrollen (Ktr). Abgebildet sind außerdem die Differenzen der Kräfte nach (Tag 30) und vor (Tag 23) der Intervention und die Ergebnisse der Zellgrößenbestimmung, n=5 EHTs pro Gruppe, *One-Way-ANOVA* mit *Dunnett's-Multiple-Comparison-Test*, keine signifikanten Unterschiede.

Anhang - Zusätzliche Abbildungen



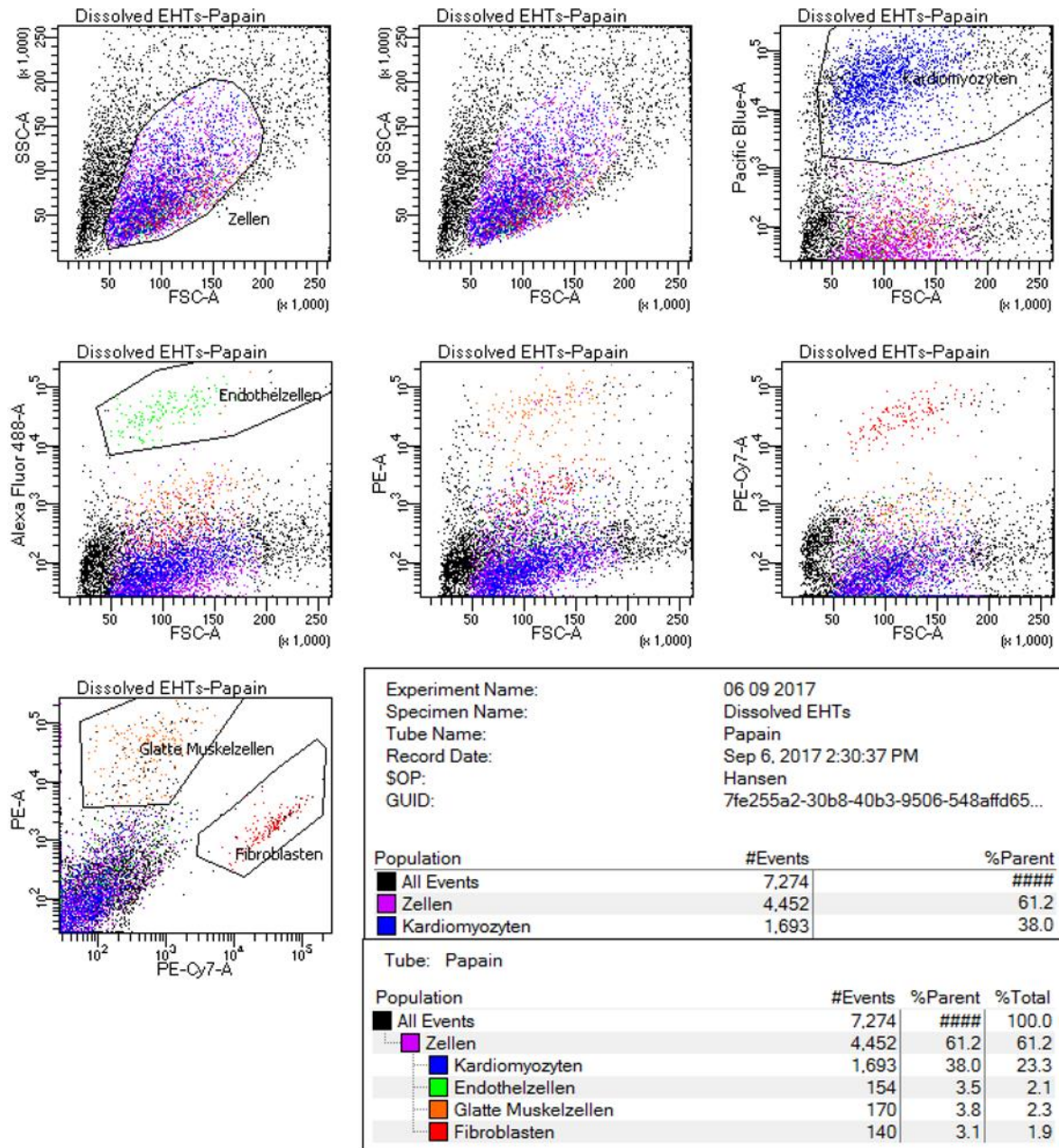
Zusätzliche Abbildung 3: Relaxationszeit und Frequenz von C25-EHTs mit verschiedenen Fibroblasten an Tag 20, n=3-4 pro Gruppe, One-Way-ANOVA mit *Dunnett's-Multiple-Comparison-Test*, **p<0,01, ****p<0,0001.

Anhang - Zusätzliche Abbildungen

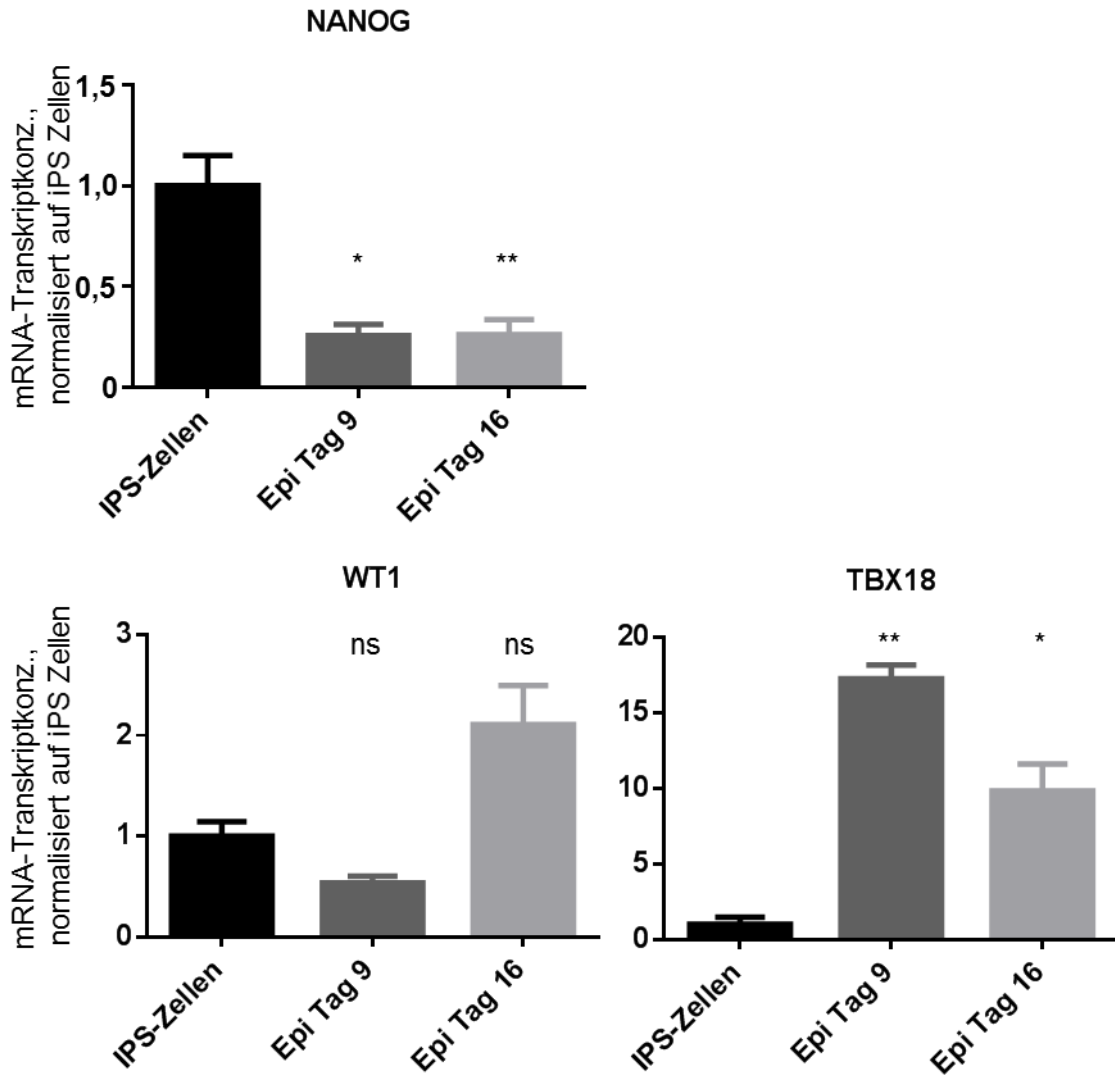


Zusätzliche Abbildung 4: Durchflusszytometrie der vier Zellpopulationen eines mit Kollagenase-II dissoziierten EHTs aus 70% Kardiomyozyten (mTagBFP), 20% Endothelzellen (Venus), 5% glatten Muskelzellen (mOrange2) und 5% Fibroblasten (dKatushka2) nach 14 Tagen Kulturdauer.

Anhang - Zusätzliche Abbildungen

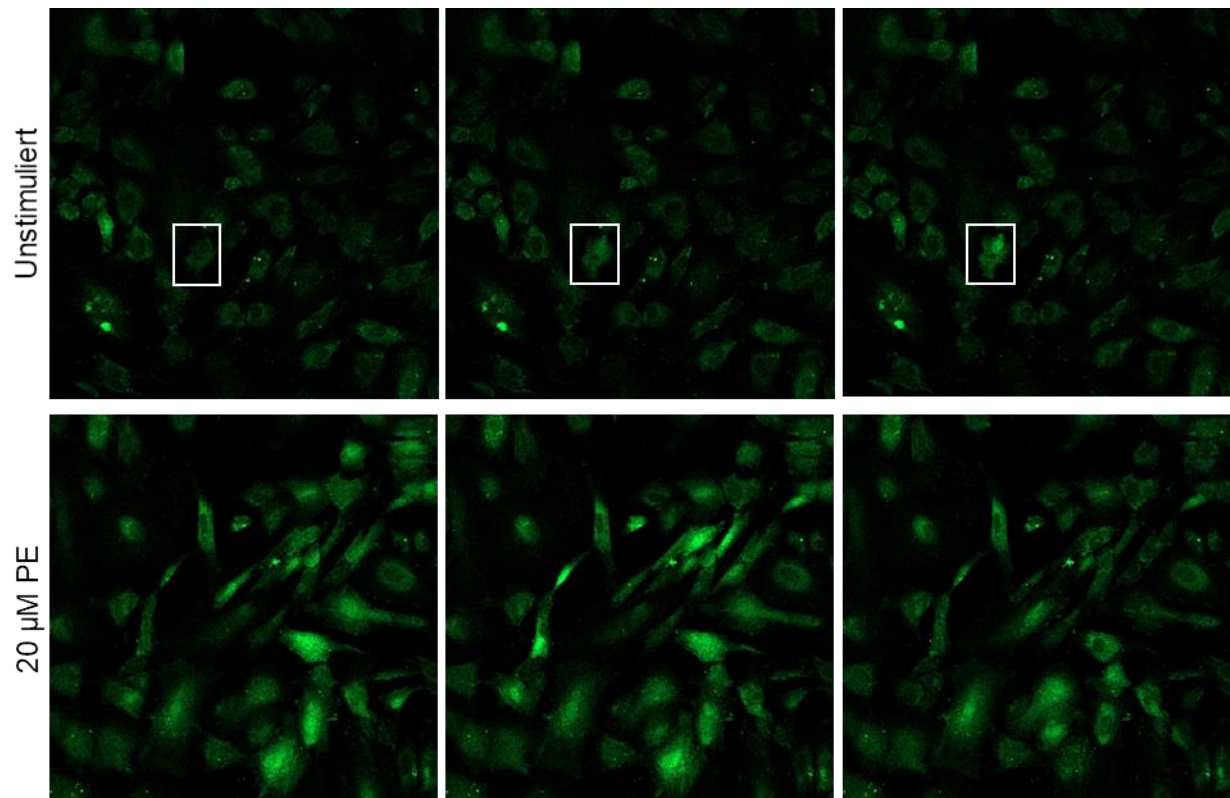


Zusätzliche Abbildung 5: Durchflusszytometrie der vier Zellpopulationen eines mit Papain dissoziierten EHTs aus 70% Kardiomyozyten (mTagBFP), 20% Endothelzellen (Venus), 5% glatten Muskelzellen (mOrange2) und 5% Fibroblasten (dKatushka2) nach 14 Tagen Kulturdauer.



Zusätzliche Abbildung 6: RT-qPCR verschiedener Zeitpunkte der epikardialen Differenzierung, normalisiert auf undifferenzierte iPS-Zellen. Zu sehen sind die relativen Transkriptkonzentrationen von NANOG, WT1 und TBX18, n=2-3 biologische Replikate, *One-Way-ANOVA* mit *Dunnett's-Multiple-Comparison-Test*, *p<0,05, **p<0,01.

Anhang - Zusätzliche Abbildungen



Zusätzliche Abbildung 7: Ca^{2+} -Transienten in iPS-abgeleiteten glatten Muskelzellen. Gezeigt sind jeweils drei konfokale Aufnahmen eines Zeitverlaufs von zuvor mit Fluo-4 beladenen 2D-Kulturen glatter Muskelzellen, unter Basisbedingungen (oben) und nach Stimulation mit Phenylephrin (PE; unten). In der oberen Reihe mit der weißen Umrandung markiert, ist eine der wenigen Zellen, die auch unter Basisbedingungen Ca^{2+} -Transienten zeigte.

9.2 Abkürzungsverzeichnis

A

α -MHC	<i>α-myosin heavy chain</i> , α -Isoform der schweren Myosinkette
ActA	Aktivin A
ACTA1	<i>Skeletal muscle α-Actin</i> , α -Aktin skelettaler Muskelzellen
ACTA2	<i>Smooth muscle α-Actin</i> , α -Aktin glatter Muskelzellen
ACTN2	α -Actinin 2
AE	<i>Afterload enhancement/afterload enhanced</i> , Nachlasterhöhung
ANP	Atriales natriuretisches Peptid

B

BDM	2,3-Butanedionmonoxim
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
β -MHC	<i>β-myosin heavy chain</i> , β -Isoform der schweren Myosinkette
BMP4	<i>Bone-morphogenetic protein 4</i>
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
bpm	<i>Beats per minute</i> , Schläge pro Minute
BSA	Bovines Serumalbumin
BTS	4-Methyl-N-(phenylmethyl)benzenesulfonamid

C

Ca^{2+}	Calcium-Ion
cDNA	Komplementäre DNA
CD31	<i>Cluster of Differentiation 31</i>
CNN1	Calponin-1
CM	<i>Cardiomyocyte</i> , Kardiomyozyte
COL1A1	Alpha-1-Kette von Kollagen-I
Ct	<i>Cycle threshold</i> (qPCR)
cTNT	<i>Cardiac troponin T</i>

D

d	<i>Day</i> , Tag
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonuclein acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat

E

EB	<i>Embryoid Body</i> , Embryodkörperchen
EC	<i>Endothelial cell</i> , Endothelzelle
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHT	<i>Engineered heart tissue</i> , künstliches Herzgewebe
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
ET-1	Endothelin-1
ES/ESC	Embryonale Stammzellen

Anhang - Abkürzungsverzeichnis

F

FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> , Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FAK	Focal adhesion kinase
FCS	Fetales Kälberserum
Fibro	Fibroblast
FTDA	bFGF, TGF β 1, Dorsomorphin und Activin A basiertes Zellkulturmedium
Fwd	<i>Forward</i> , 5'-3' Primer

G

GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Gsk3	Glykogensynthase-Kinase-3
GUSB	Glucuronidase β

H

h	<i>Hour</i> , Stunde
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HE	Hämatoxylin und Eosin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
hiPSC	humane induziert-pluripotente Stammzellen
HS	Horse serum, Pferdeserum
HUVECs	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>

I

IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IHC	Immunhistochemie
IP3	Inositoltrisphosphat
iPS/iPSC	Induziert-pluripotente Stammzellen

K

Klf4	<i>Kruppel-like factor 4</i>
Ktr	Kontrolle

M

MC	Mural cells, Zellen der Gefäßwand (glatte Muskelzellen und Perizyten)
min	Minute
mN	Millinewton, Kraft: 1 kg*m*s-2
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>Messenger ribonuclein acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MRTF	<i>Myocardin-related Transcription Factors</i>
MYH7	Schwere β -Myosin-Kette
MYH11	Schwere Myosin-Kette glatter Muskelzellen

N

n	Anzahl der untersuchten Proben, biologische Replikate
NKM	Nicht-Kardiomyozyten Medium
ns	Nicht signifikant

Anhang - Abkürzungsverzeichnis

O

Oct4 *Octamer-binding transcription factor 4*

P

p p-Wert, Signifikanzniveau

PBS *Phosphate Buffered Saline*, Phosphatgepufferte Salzlösung

PCR *Polymerase Chain Reaction*, Polymerase-Kettenreaktion

PDGF *Platelet Derived Growth Factor*

PDGFR α *Platelet Derived Growth Factor Receptor α*

PDGFR β *Platelet Derived Growth Factor Receptor β*

PE Phenylephrin

POSTN Periostin

PPP *Platelet-poor Plasma*, Plättchen-armes Plasma

PVA Polyvenylalkohol

Q

qPCR *Quantitative real time polymerase chain reaction*, quantitative Echtzeit-PCR

R

Rev *Reverse*, 3'–5' Primer

RNA Ribonukleinsäure

rpm *Revolutions per minute*, Umdrehungen pro Minute

RPMI *Roswell Park Memorial Institute Medium*

RT Raumtemperatur

RT-PCR Reverse Transkriptions-PCR

S

s Sekunde

S100A4 *Fibroblast-specific Protein-1* (FSP1)

SEM *Standard Error of the Mean*, Standardfehler

Serca2a Sarco/endoplasmatische Ca²⁺-ATPase 2, Typ P-ATPase

SMC *Smooth Muscle Cell*, glatte Muskelzelle

Smtn Smoothelin

Sox2 *Sex determining region Y-box 2*

T

T₂ Relaxationszeit

T₃ Trijodthyronin

TAC *Transverse aortic constriction*

TAGLN Transgelin

TBS *Tris Buffered Saline*

TGF β *Transforming Growth Factor β*

TU *Transducing Units*

V

VEGF *Vascular Endothelial Growth Factor*

VSMC Vaskuläre glatte Muskelzelle

9.3 Geräte, Materialien und Substanzen

9.3.1 Geräte

Abi Prism 7000HT (Applied Biosystems)
Analysenwaage Genius (Sartorius AG)
BD LSRFortessa Zellanalysegerät (BD Biosciences)
Combispin FVL-2400N mit Vortex (PeqLab)
Dampfsterilisator Varioklav (Medi-Tech)
Digitalwaage Ohaus Precision Advanced (Ohaus)
Entwässerungsautomat HM325 (Microm)
Fluoreszenzmikroskop EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fischer)
Inkubatoren für die Zellkultur (Thermo Fischer)
Konfokales Laser Scan Mikroskop LSM 800 (Zeiss)
Magnet-/Heizplatte IKA Combimag RET (Janke und Kunkel GmbH und Co KG)
Magnetplatte Variomag/ Cimarec Biosystem Direct (Thermo Scientific)
Magnetplatte Variomag/ Cimarec Biosystem 4 Direct (Thermo Scientific)
Mikroskop Axiovert 25 (Zeiss) mit Kamera (Jenoptik)
Mikroskop DMD108 (Leica)
Mikroskop IX81 (Olympus)
Paraffineinbette EG 1120 (Leica)
pH-Meter, digital (Mettler Toledo)
Pipetten 10/100/1000 µl (Eppendorf, Peqlab)
Pipettierhilfe Accu-jet pro (Brand)
Qubit 3 Fluorometer (Invitrogen)
Sicherheitswerkbank HERAsafe (Heraeus)
Sicherheitswerkbank Safe2020 (Thermo Scientific)
Thermal Cycler PCR Sprint (Hyboid)
Thermal Cycler vapo.protect (Eppendorf)
Thermomixer 5436 (Eppendorf)
Tissue Lyser (Qiagen)
Videooptische Messapparatur (EHT Technologies) mit Kamera A602f (Basler) und Kamera-Achsenführung (IAI Corporation)
Ventana BenchMark XT (Roche)
Wärmeschrank Kelvitron (Heraeus)
Wasserbad 25900 (Medax)
Zellzähler CASY (Schärfe System)
Zentrifuge 5415 R (Eppendorf)

Zentrifuge 5810 R (Eppendorf)
Zentrifuge Rotanta/RP (Hettich)
Zentrifuge Universal 30 RF (Hettich)

9.3.2 Materialien

250 ml Vacuum Filtration "rapid"-Filtermax (TPP, 99250)
500 ml Vacuum Filtration "rapid"-Filtermax (TPP, 99500)
Absaugpipetten aus Glas (Sarstedt, 86.1252.011)
FACS Röhrchen (Sarstedt, 55.1579)
MACS MultiStand (Miltenyi Biotec, 130-042-303)
MACS Separation Columns (Miltenyi Biotec, 130-042-401 und 130-042-201)
Metallklammern für AE (GAC Nubryte Wire type 304)
MidiMACS Separator (Miltenyi Biotec, 130-042-302)
Neubauer-Zählkammer (Karl-Hecht KG)
Objekträger mit Vertiefung (Thermo Scientific/Menzel Gläser)
Objekträger Superfrost/Plus (Hecht-Assistent)
Pipettenspitzen (Sarstedt)
Pipettenspitzen mit Filter Biosphere (Sarstedt)
Positiv-Formen, Teflon (eigene Herstellung oder EHT Technologies)
Reaktionsgefäße konisch 15 ml, 50 ml (Sarstedt)
Reaktionsgefäße Safe Lock 0,2 bis 2 ml (Eppendorf)
Röhrchen mit Rundboden (Greiner, 163160)
Serologische Pipetten (Sarstedt)
Silikon-Matten für 24-Well-Zellkulturschalen (Jäger Gummi und Kunststoff GmbH & Co. KG und Siltec GmbH)
Spinner Flaschen (INTEGRA Biosciences AG, 182 051 und 182 101)
Sterilfilter Filtropur S 0,2 µm (Sarstedt)
Tissue Lyser Stahlkugeln (Qiagen)
Zellkulturflaschen 75 und 175 cm² (Sarstedt)
Zellkulturflaschen mit ultra-niedriger Zelladhäsion 75 cm² (T75, Corning, 3814)
Zellkulturschalen, 6-Well, 12-Well, 24-Well, 96-Well (Nunc)
Zellkulturschalen, 6-Well (Greiner)
Zellschaber (Sarstedt)
Zellsieb, 100 µm (Falcon, 352360)

9.3.3 Kits

CD31 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, 130-091-935)
dNTP mix (Thermo Scientific, R1121)

Anhang - Geräte, Materialien und Substanzen

EvaGreen (Biotium, 31000)

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

Qiagen RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, 74136)

Qubit RNA BR Assay Kit (Qubit Q10211)

Split RNA Extraction Kit (Lexogen, 008.48)

UltraView Universal DAB Detection Kit (Roche)

9.3.4 Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
FACS-Puffer	PBS 5% FCS 1,5 mM EDTA
Fibrinogen	0.9%-NaCl Lösung 200 mg/ml Fibrinogen
Kollagenase-II-Lösung	HBSS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Kollagenase II, 200 units/ml 10 mM HEPES 10 µM Y-27632 30 µM BTS sterilfiltrieren 0,2 µM
Kollagenase-II-Blockierlösung	RPMI oder DMEM DNase, 6 µl/ml
Papain-Lösung	HBSS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 10 U/mL Papain (Sigma, ref 76220) 1 mM EDTA (Roth, ref 8043.2)
Papain-Blockierlösung	HBSS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 10% FCS
Trijodthyronin (T ₃)	1 ml 1 N NaOH + 49 ml DMEM T ₃ 20 µg/ml
Thrombin	60% PBS + 40% Aqua ad injectabilia 100 U/mL Thrombin

9.3.5 Zellkulturmedien und Seren

DMEM (Biochrom, F0415)

DMEM/F12 (Gibco, 21331-046)

DMEM ohne Phenolrot (Gibco, 11880028)

Fetales Kälberserum (Biochrom, S0615)
Human Endothelial-SFM (Gibco, 11111044)
Pferdeserum (Life technologies, 26050088)
Plättchen-armes Plasma (Biomedical Technologies, BT-214)
RPMI 1640 (Gibco, 21875)
StemPro-34 (Gibco, 10639011)

9.3.6 Substanzen

10x DMEM (Gibco, 52100-021)
2-Propanol (Merck Millipore, 107022)
2,3-Butanedione Monoxime (Sigma-Aldrich, B0753)
4-Methyl-N-(phenylmethyl)benzenesulfonamid (Tocris, 1870)
Agarose (Invitrogen, 15510-027)
B-27 mit Insulin (Gibco, 17504-044)
B-27 ohne Insulin (Thermo Scientific, A1895601)
CHIR99021 (Cayman Chemical, 13122)
DMSO (Sigma-Aldrich, D4540)
Dorsomorphin (Tocris, 3093)
EDTA (Roth, 8043.2)
Eosin Y Lösung (AppliChem, A0822)
Ethanol, absolut (J.T. Baker, JT9229-3C)
Fluoromount-G (Southern Biotech 0100-01)
Formaldehyd (Merck Millipore, 107022)
Fluo-4/AM (Sigma-Aldrich, 93596)
Gelatine (Sigma-Aldrich, G1890)
Geltrex (Gibco, A1413302)
HEPES (Sigma-Aldrich, 9105.4)
Histofix (Roth, P087.3)
KY-021111 (Tocris, 7431)
L-Glutamin (Gibco, 25030-081)
Lipidmix (Sigma-Aldrich, L5146)
Magnesium Ascorbyl-Phosphat (Merck)
Matrigel (Corning, 354234)
Mayer's Hämatoxylin (Sigma-Aldrich, 51275)
Mounting Medium (Tissue Tec)
MTG (Sigma-Aldrich, M6145)
Natriumazid (Sigma-Aldrich, 71290)

Na-Selenit (Sigma-Aldrich, T8158)
(R)-(-)-Phenylephrinhydrochlorid (Sigma-Aldrich, P6126)
SB-431542 (Sigma-Aldrich, S4317)
Paraffin (Sigma-Aldrich, 327204)
Penicillin/ Streptomycin (Gibco, 15140)
Phosphoascorbat (2-Phospho-L-ascorbic acid trisodium salt, Sigma-Aldrich, 49752)
Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich, P2443)
Puromycin (Thermo Scientific A1113802)
PVA (Sigma-Aldrich, P8136)
Säurefuchsin (Sigma-Aldrich, A-3908)
TBS (Sigma-Aldrich, T6664)
Trichlormethan (Sigma-Aldrich, C7559)
TRIzol (Life Technologies, 15596026)
Trypan-Blau (Biochrom, L 6323)
XAV-939 (Tocris, 3748)
Xylolersatz Roti-Histol (Roth, 6640)
Y-27632 (Biaffin, PKI-Y27632-010)

9.3.7 Proteine

Activin A (R&D Systems, 338-AC)
Aprotinin (Sigma-Aldrich, F4753)
bFGF (basic FGF, R&D Systems, 233-FB)
Bovines Serumalbumin (Roth, 8076.3)
BMP4 (R&D Systems, 314-BP)
DNase (Sigma-Aldrich, D8764)
Endothelin-1 (Sigma-Aldrich, E7764)
Fibrinogen (Sigma-Aldrich, F8630)
Humanes Serumalbumin (Biological Industries, 05-720-1B)
Hydrocortison (Sigma-Aldrich, H4001)
Insulin (Sigma-Aldrich, I9278)
Kollagenase-II (Worthington, LS004176)
TGF β 1 (Peprotech, 100-21)
Thrombin (Sigma-Aldrich, T7513)
Transferrin (Sigma-Aldrich, S5261)
Trijodthyronin (European Commission – Joint Research Center)
TrypLE Select (Gibco, 12563-011)
Trypsin-EDTA 0,5% (Gibco, 15400054)

VEGF165 (R&D Systems, 293-VE)

9.3.8 Primer

Alle verwendeten Primer für die quantitative PCR wurden mit dem NCBI Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) komplementär zur cDNA entworfen. Bei den untersuchten Genen überspannte der amplifizierte Bereich mindestens ein Intron (*Intron spanning*), wenn möglich lag der Primer zusätzlich im Bereich zweier aneinandergrenzender Exons (*Exon-Exon-Junction*) und die Länge des PCR-Produkts lag zwischen 150 und 200 Basenpaaren. Sämtliche Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG/Eurofins gekauft.

Tabelle 14: Primer für die quantitative PCR

Gensymbol	Beschreibung	RefSeq Nummer	Primer
ACNT2	α -Actinin	NM_001103.3	Fwd: AAGGGGTGAAACTGGTGTCC Rev: AGCAGACCTTCTTTGGCAGAT
ACTA2	Aktin glatter Muskelzellen	NM_001141945.1	Fwd: TGGAAAAGATCTGGCACCCT Rev: GGCATAGAGAGACAGCACCG
CNN1	Calponin-1	NM_001299.5	Fwd: TTAAGAACAAGCTGGCCCAGAAG Rev: ATCTTCTTCACGGAGCCTGG
COL1A1	Kollagen-I	NM_000088.3	Fwd: TGGGATTCCCTGGACCTAAAG Rev: GGGAGACCCTGGAATCCG
COL3A1	Kollagen-III	NM_000090.3	Fwd: GGACACAGAGGCTTCGATGG Rev: CTCGAGCACCGTCATTACCC
GUSB	Glucuronidase- β (Referenz)	NM_000181.3	Fwd: ACGATTGCAGGGTTTCACCA Rev: CACTCTCGTTCGGTACTGTT
NANOG	NANOG	NM_024865.1	Fwd: GATTTGTGGGCCTGAAGAAA Rev: AAGTGGGTTGTTTGCCTTTG
NPPA	ANP	NM_006172.3	Fwd: GCTGCTTCGGGGGCAGGATG Rev: TGCAGCAGAGACCCCAGGGG
PECAM-1	CD31	NM_000442.3	Fwd: GGTTCTGAGGGTGAAGGTGA Rev: GGGTTTGCCTCTTTTTCTC
POSTN	Periostin	NM_006475.2	Fwd: GAGGCTTGGGACAACCTTGA Rev: ACAGTGACAACCCCATTAGGA
S100A4	FSP-1	NM_002961.2	Fwd: TCTTGTTTTGATCCTGACTGCT Rev: GTCCTTTTCCCCAAGAAGCTG
TBX18	T-box 18	NM_001080508.2	Fwd: CTCCCATCAAGCCTGTTCCA Rev: CAAACCCATTCTGTTGCGCC
WT1	Wilms-Tumor-Protein	NM_000378.4	Fwd: AGCCCGCTATTCGCAATCA Rev: GAGTACTGCTGCTCACCCAG

9.4 Sicherheitsinformationen

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

Tabelle 15: Sicherheitsinformationen zu allen verwendeten Substanzen, Bedeutung der H- und P-Sätze siehe Kapitel 9.4.1 und 0

Substanz	CAS Nummer	H-Sätze	P-Sätze
2-Propanol	67-63-0	H: 225, 319, 336	P: 210, 261, 305+351+338
CHIR99021	252917-06-9	H: 302-315-318-361	P: 264-280-362+364-201-202-281-301+312-330-302+352-P332+313-305+351+338-310-308+313
Dorsomorphin	866405-64-3	H: 302, 312, 332	P: 301+312, 304+340, 302+352, 261, 280, 264, 270, 271, 330, 501, 363
EDTA	60-00-4	H: 319	P: 305+351+338
Ethanol, absolut	64-17-5	H: 225, 319	P: 210, 240, 305+351+338, 403+233
Fluoromount-G		H: 303	P: 262, 264+270, 312, 501
Formaldehyd	50-00-0	H: 351-331-311-301-314-317	P: 301+310-303+361+353-305+351+338 320-361-405-501
Hämatoxylin	517-28-2	H: 315-319-335	P: 261-305+351+338-302+352-321-405-501
Hydrocortison	50-23-7	H: 361	P: 280
Lipidmix	64-17-5	H: 225, 319	P: 261, 305+351+338
Methanol	67-56-1	H: 225-331-311-301-370	P: 210-233-280-302+352
Natriumazid	26628-22-8	H: 300-400-410	P: 273-309-310
Natriumhydroxid	1310-73-2	H: 314	P: 280-301+330+331-309-310-305+351+338
(R)-(-)-Phenylephrinhydrochlorid	61-76-7	H: 302-315-319-335	P: 261-305+351+338

Anhang - Sicherheitsinformationen

Penicillin	61-33-6	H: 317	P: 280
Roti-Histofix 4%	50-00-0 67-56-1	H: 302, 317, 341, 350	P: 261, 280, 302+352, 308+313
Puromycin	58-58-2	H: 302	
Salzsäure	7647-01-0	H: 314-335	P: 260-301+330+331- 303+361+353- 305+351+338-405-501
Säurefuchsin	3244-88-0	H: 315-319-335	P: 261-305+351+338
Streptomycin	57-92-1	H: 302	
Thrombin	9002-04-4	H: 315, 319, 334, 335	P: 261, 305+351+338, 342+311
Trichlormethan	67-66-3	H: 302-331-315-319- 351-361d-336-372	P: 261-281-305+351+338-311
Trijodthyronin	6893-02-3	H: 315-319-335	P: 261-305+351+338
TRIZOL-Reagenz	108-95-2 593-84-0 1762-95-4	H: 301+311+331, 314, 335, 341, 373, 412	P: 201, 261, 261, 280, 273, 301+310, 302+352
Trypanblau	72-57-1	H: 350	P: 201-308+313
XAV939	284028-89-3	H301-H319	P301+310-305+351+338
Xylol-Ersatz	64742-49-0	H: 304-226-400-410- 315-317	P210-280-273-301+310- 303+361+353-332+313
Y-27632	331752-47-7	H302, 312, 332	P: 280

9.4.1 H-Sätze

H200 Instabil, explosiv.

H201 Explosiv, Gefahr der Massenexplosion.

H202 Explosiv; große Gefahr durch Splitter, Sprengund Wurfstücke.

H203 Explosiv; Gefahr durch Feuer, Luftdruck oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.

H204 Gefahr durch Feuer oder Splitter, Sprengund Wurfstücke.

H205 Gefahr der Massenexplosion bei Feuer.

H220 Extrem entzündbares Gas.

H221 Entzündbares Gas.

H222 Extrem entzündbares Aerosol.

H223 Entzündbares Aerosol.

H224 Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.

H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.

H226 Flüssigkeit und Dampf entzündbar.

H228 Entzündbarer Feststoff.

H240 Erwärmung kann Explosion verursachen.

H241 Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen.

H242 Erwärmung kann Brand verursachen.

H250 Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.

H251 Selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.

H252 In großen Mengen selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.

H260 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können.

H261 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase.

H270 Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.

H271 Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.

Anhang - Sicherheitsinformationen

H272 Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.	(Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H280 Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.	H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt)
H281 Enthält tiefgekühltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder –Verletzungen verursachen.	(Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.	H360 F Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H300 Lebensgefahr bei Verschlucken.	H360 D Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H301 Giftig bei Verschlucken.	H360 FD Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.	H360 Fd Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.	H360 Df Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.	H361 Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H311 Giftig bei Hautkontakt.	H361 f Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.	Anhang - Sicherheitsinformationen 177
H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.	H361 d Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H315 Verursacht Hautreizungen.	H361 fd Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.	H362 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
H318 Verursacht schwere Augenschäden.	H370 Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H319 Verursacht schwere Augenreizung.	H371 Kann die Organe schädigen (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem
H330 Lebensgefahr bei Einatmen.	
H331 Giftig bei Einatmen.	
H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.	
H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.	
H335 Kann die Atemwege reizen.	
H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.	
H340 Kann genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).	
H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).	
H350 Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).	
H350i Kann bei Einatmen Krebs erzeugen.	
H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen	

Anhang - Sicherheitsinformationen

anderen Expositionsweg besteht).

H372 Schädigt die Organe (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H373 Kann die Organe schädigen (alle betroffenen

Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

9.4.2 P-Sätze

P101 Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.

P102 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.

P103 Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.

P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P202 Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.

P210 Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.

P211 Nicht gegen offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen.

P220 Von Kleidung /.../ brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.

P221 Mischen mit brennbaren Stoffen /... unbedingt verhindern.

P222 Kontakt mit Luft nicht zulassen.

P223 Kontakt mit Wasser wegen heftiger Reaktion und möglichem Aufflammen unbedingt verhindern.

P230 Feucht halten mit

P231 Unter inertem Gas handhaben.

P232 Vor Feuchtigkeit schützen.

P233 Behälter dicht verschlossen halten.

P234 Nur im Originalbehälter aufbewahren.

P235 Kühl halten.

P240 Behälter und zu befüllende Anlage erden.

P241 Explosionsgeschützte elektrische Betriebsmittel / Lüftungsanlagen / Beleuchtung /... verwenden.

P242 Nur funkenfreies Werkzeug verwenden.

P243 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.

P244 Druckminderer frei von Fett und Öl halten.

P250 Nicht schleifen / stoßen /.../ reiben.

P251 Behälter steht unter Druck: Nicht

durchstechen oder verbrennen, auch nicht nach der Verwendung.

P260 Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.

P261 Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.

P262 Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.

P263 Kontakt während der Schwangerschaft / und der Stillzeit vermeiden.

P264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen.

P270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.

P271 Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.

P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.

P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

P280 Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

P281 Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.

P282 Schutzhandschuhe / Gesichtsschild / Augenschutz mit Kälteisolierung tragen.

P283 Schwer entflammbare / flammhemmende Kleidung tragen.

P284 Atemschutz tragen.

P285 Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.

P231 + P232 Unter inertem Gas handhaben. Vor Feuchtigkeit schützen.

P235 + P410 Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen.

P301 Bei Verschlucken:

P302 Bei Berührung mit der Haut:

P303 Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):

Anhang - Sicherheitsinformationen

- P304 Bei Einatmen:
- P305 Bei Kontakt mit den Augen:
- P306 Bei kontaminierter Kleidung:
- P307 Bei Exposition:
- P308 Bei Exposition oder falls betroffen:
- P309 Bei Exposition oder Unwohlsein:
- P310 Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P311 Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P312 Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P313 Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P314 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P315 Sofort ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P320 Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P321 Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P322 Gezielte Maßnahmen (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P330 Mund ausspülen.
- P331 Kein Erbrechen herbeiführen.
- P332 Bei Hautreizung:
- P333 Bei Hautreizung oder -ausschlag:
- P334 In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.
- P335 Lose Partikel von der Haut abbürsten.
- P336 Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben.
- P337 Bei anhaltender Augenreizung:
- Anhang - Sicherheitsinformationen
179
- P338 Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
- P340 Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P341 Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P342 Bei Symptomen der Atemwege:
- P350 Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
- P351 Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
- P352 Mit viel Wasser und Seife waschen.
- P353 Haut mit Wasser abwaschen / duschen.
- P360 Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
- P361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
- P362 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
- P363 Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
- P370 Bei Brand:
- P371 Bei Großbrand und großen Mengen:
- P372 Explosionsgefahr bei Brand.
- P373 Keine Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe / Gemische / Erzeugnisse erreicht.
- P374 Brandbekämpfung mit üblichen Vorsichtsmaßnahmen aus angemessener Entfernung.
- P375 Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P376 Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
- P377 Brand von ausströmendem Gas: Nicht löschen, bis Undichtigkeit gefahrlos beseitigt werden kann.
- P378 ... zum Löschen verwenden.
- P380 Umgebung räumen.
- P381 Alle Zündquellen entfernen, wenn gefahrlos möglich.
- P390 Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
- P391 Verschüttete Mengen aufnehmen.
- P301 + P310 Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P301 + P312 Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P301 + P330 + P331 Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.
- P302 + P334 Bei Kontakt mit der Haut: In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.
- P302 + P350 Bei Kontakt mit der Haut: Behutsam

Anhang - Sicherheitsinformationen

mit viel Wasser und Seife waschen.

P302 + P352 Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.

P303 + P361 + P353 Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.

P304 + P340 Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.

P304 + P341 Bei Einatmen: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.

P305 + P351 + P338 Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

P306 + P360 Bei Kontakt mit der Kleidung: Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.

P307 + P311 Bei Exposition: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P308 + P313 Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P309 + P311 Bei Exposition oder Unwohlsein: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P332 + P313 Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P333 + P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P335 + P334 Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen /nassen Verband anlegen.

P337 + P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P342 + P311 Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P370 + P376 Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.

P370 + P378 Bei Brand: ... zum Löschen verwenden.

P370 + P380 Bei Brand: Umgebung räumen.

P370 + P380 + P375 Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.

P371 + P380 + P375 Bei Großbrand und großen Mengen: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.

P401 ... aufbewahren.

P402 An einem trockenen Ort aufbewahren.

P403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

P404 In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.

Anhang - Sicherheitsinformationen
180

P405 Unter Verschluss aufbewahren.

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

P407 Luftspalt zwischen Stapeln / Paletten lassen.

P410 Vor Sonnenbestrahlung schützen.

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

P412 Nicht Temperaturen von mehr als 50 °C aussetzen.

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

P420 Von anderen Materialien entfernt aufbewahren.

P422 Inhalt in / unter ... aufbewahren

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

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

P403 + P235 Kühl an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

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

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

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

P501 Inhalt / Behälter ... zuführen.

9.5 Kongressbeiträge

81st Annual Congress of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT), 10/2015:

“Establishment of a human *in vitro* model of pathological cardiac hypertrophy”,
Posterpräsentation

22nd World Congress of the International Society for Heart Research (ISHR), 04/2016:

“Transferring an *in vitro* model of pathological cardiac hypertrophy from rat to human engineered heart tissue”, Posterpräsentation

4th Annual Conference of the German Stem Cell Network (GSCN), 09/2016:

“Transferring an *in vitro* model of pathological cardiac hypertrophy from rat to human engineered heart tissue”, Posterpräsentation

34th Annual Meeting of the European Section of the ISHR, 07/2017:

“Generation of multicoloured engineered heart tissue containing human iPSC-derived cardiomyocytes, endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts”, Posterpräsentation

5th Annual Conference of the German Stem Cell Network, 09/2017:

“Generation of multicoloured engineered heart tissue containing human iPSC-derived cardiomyocytes, endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts”, Posterpräsentation

10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern danken, die mit einer besonderen Erziehungskombination aus Behütung und Laissez-faire den Grundstein für meine charakterliche Entwicklung gelegt haben. Ich bin mir der privilegierten Situation bewusst, dass ich immer meine eigenen Entscheidungen treffen durfte und mir dabei stets der Unterstützung meiner Eltern sicher sein konnte. Dieses unendliche Vertrauen in mich und meine Fähigkeiten hat es mir ermöglicht, diesen Weg zu gehen und nicht nur das Studium, sondern auch die Promotion abzuschließen.

Einen nicht unerheblichen Anteil daran hatte auch Marc Hirt, der für mich der beste Betreuer war, den ich mir hätte wünschen können. Die Zusammenarbeit mit Marc war durchweg produktiv, reibungslos und geprägt von gegenseitiger Wertschätzung. Mit einer ähnlichen Philosophie wie meine Eltern, gab er mir viel Freiraum meine experimentelle Arbeit zu gestalten und war gleichzeitig immer da, wenn ich mal nicht weiter wusste.

Im persönlichen und beruflichen Bereich konnte ich mich dadurch zu der unabhängigen und selbstbewussten Frau und Wissenschaftlerin entwickeln, die sich nun bald nach Australien aufmachen wird, um sich dort neuen Herausforderungen und Fragestellungen zu widmen.

Besonderer Dank gilt natürlich Thomas Eschenhagen, der mir nicht nur die Möglichkeit gegeben hat, dieses spannende Thema in einem großartigen wissenschaftlichen Umfeld zu bearbeiten, sondern der mit seinem enormen Wissen auch ein großes Vorbild für mich ist.

Bei Elke Oetjen möchte ich mich für ihren Einsatz als Betreuerin im Fachbereich Chemie, die Erstellung des zweiten Gutachtens und für den Vorsitz der Prüfungskommission bedanken. Für ihre Unterstützung durch die Mitgliedschaft in der Prüfungskommission danke ich außerdem Boris Fehse und Peter Heisig.

Hervorheben möchte ich die besonderen Beiträge zu dieser Arbeit von Jutta Starbatty, Kristin Hartmann und Kristoffer Riecken. Jutta danke ich für ihre wertvolle Unterstützung bei der EHT-Kultur und den molekularbiologischen Versuchen, Kristin hat in der HEXT Mauspathologie phantastische Arbeit geleistet und ohne Kristoffers Expertise hätte ich die Experimente mit fluoreszenzmarkierten hiPS-Zellen nicht durchführen können.

Nicht zu vergessen alle anderen Kollegen, die sich in den letzten vier Jahren mit mir über experimentelle Erfolge gefreut und mich bei Rückschlägen zum Weitermachen animiert haben und von denen viele von Kollegen zu Freunden geworden sind. Vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit und ihr seid natürlich alle herzlich eingeladen, mich am anderen Ende der Welt zu besuchen!

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Tessa Ruth Werner
Geburtsdatum und Geburtsort: 31. März 1988 in Coburg
Aktueller Wohnsitz: Luruper Weg 20
20257 Hamburg
Telefon: +49 151 56140703
E-Mail: tessa.werner@gmx.net



Hochschulstudium

01.02.2014 - Heute Promotion (Dr. rer. nat.)
Universität Hamburg
Titel der Dissertation: „Humanes künstliches Herzgewebe aus mehreren Zelltypen zur Untersuchung kardialer Hypertrophie“

01.10.2014 - 06.12.2016 Aufbaustudium Molekularbiologie (Zertifikat)
Universität Hamburg

01.10.2011 - 21.01.2014 Masterstudium (M.Sc.)
Universität Hamburg
Titel der Masterarbeit: „Auswirkungen microRNA-basierter Interventionen auf pathologische kardiale Hypertrophie künstlicher Herzmuskelgewebe“

01.10.2008- 30.09.2011 Bachelorstudium (B.Sc.)
Universität Bremen
Titel der Bachelorarbeit: „Präparation von rekombinantem Perlucin A fusioniert mit Maltose-bindendem Protein“

Schulbildung

1998-2008 Gymnasium Ernestinum Coburg

Publikationen

- Breckwoldt K, Letuffe-Brenière D, ... Werner T, ... Hansen A (2017) Differentiation of cardiomyocytes and generation of human engineered heart tissue. *Nat Protoc* 12:1177–1197. doi: 10.1038/nprot.2017.033
- Barallobre-Barreiro J, Gupta SK, ... Werner T, ... Mayr M (2016) Glycoproteomics Reveals Decorin Peptides with Anti-Myostatin Activity in Human Atrial Fibrillation. *Circulation*. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016423
- Mannhardt I, Breckwoldt K, ... Werner T, ... Hansen A (2016) Human Engineered Heart Tissue: Analysis of Contractile Force. *Stem Cell Reports* 7:29–42. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.04.011
- Stenzig J, Hirt MN, ... Werner T, ... Eschenhagen T (2016) DNA methylation in an engineered heart tissue model of cardiac hypertrophy: common signatures and effects of DNA methylation inhibitors. *Basic Res Cardiol*. doi: 10.1007/s00395-015-0528-z
- Schäfer M, Oeing CU, ... Werner T, ... Herzig S (2015) Ataxin-10 is part of a cachexokine cocktail triggering cardiac metabolic dysfunction in cancer cachexia. *Mol Metab*. doi: 10.1016/j.molmet.2015.11.004
- Hirt MN, Werner T, Indenbirken D, et al (2015) Deciphering the microRNA signature of pathological cardiac hypertrophy by engineered heart tissue- and sequencing-technology. *J Mol Cell Cardiol* 81:1–9. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.01.008

Hamburg, den

12. Eidesstattliche Erklärung

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

„Humanes künstliches Herzgewebe aus mehreren Zelltypen zur Untersuchung kardialer Hypertrophie“

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

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

Hamburg, den