

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

# Kardiomyozyten aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen

-

## Untersuchungen zur Reliabilität im 3D-Format und Anwendung als biologischer Schrittmacher

---

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Fakultät für  
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
Fachbereich Chemie  
der Universität Hamburg  
vorgelegt von  
Mirja L. Schulze

Hamburg, 2019



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

Datum der Disputation: 24.05.2019

Datum der Druckfreigabe: 24.05.2019

Diese Arbeit wurde von Frau Dr. Bärbel Ulmer praktisch betreut.



## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Das humane Herz .....	1
1.1.1 Herzzellen .....	2
1.1.2 Der primäre Schrittmacher .....	3
1.1.2.1 Die Funktion .....	3
1.1.2.2 Der Aufbau .....	4
1.1.3 Das Erregungsleitungssystem .....	6
1.1.4 Die elektromechanische Kopplung.....	8
1.2 Künstliche Schrittmacher .....	9
1.2.1 Der elektrische Schrittmacher .....	10
1.2.2 Der biologische Schrittmacher .....	10
1.3 Künstliches Herzgewebe - <i>Engineered Heart Tissue</i> .....	12
1.4. Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs) .....	13
1.4.1 Differenzierung von Kardiomyozyten aus hiPSCs.....	15
1.4.2 Gütekriterien hiPSC-basierter Studien .....	17
2 Zielsetzung und Versuchskonzept.....	21
3 Material und Methoden .....	23
3.1 Zellkulturmedien.....	23
3.2 Zellkultur humaner induzierter pluripotenter Stammzellen (hiPSCs) .....	25
3.2.1 Master-Zellbank .....	26
3.2.2 Hochdurchsatz-Detektion von Pluripotenzmarker-Immunhistologie .....	27
3.2.3 PluriTest.....	28
3.2.4 Spontane Differenzierung .....	29
3.2.5 Kardiale Differenzierung (hiPSC-CMs) .....	29
3.3 Neonatale Rattenpräparation .....	32
3.4 Künstliches Herzgewebe - <i>Engineered Heart Tissue</i> (EHT) .....	32

## Inhaltsverzeichnis

3.4.1 Herstellung von humanen EHTs .....	32
3.4.2 Herstellung neonataler Ratten-EHTs mit/ohne humanem EB .....	32
3.4.3 Video-optische Kontraktionsaufnahmen der EHTs .....	33
3.5 Funktionelle Analysen humaner EHTs .....	35
3.5.1 Calciumkonzentrations-Wirkungskurve .....	36
3.5.2 Kraft-Frequenzbeziehung .....	36
3.5.3 Wirkung von Isoprenalin und Carbachol .....	36
3.5.4 Post-Pausenbeziehung .....	37
3.5.5 Kontraktionsregularität .....	37
3.6 Funktionelle Analysen der Ratten-EHTs/+EB .....	38
3.6.1 Ivabradin .....	38
3.7 Messung von Calciumtransienten .....	38
3.8 Messung von Aktionspotenzialen .....	40
3.9 Immunhistologie .....	41
3.9.1 Immunhistochemie .....	41
3.9.2 Immunfluoreszenz .....	42
3.9.3 Auswertung der Immunhistochemie .....	43
3.10 RNA-Präparation und quantitative <i>real time</i> PCR .....	43
3.11 Statistik .....	46
4 Ergebnisse .....	49
4.1 Untersuchungen zur Reliabilität von hiPSC-CMs im 3D-Format .....	49
4.1.1 Generierung der hiPSCs .....	49
4.1.2 Herstellung der MCB und hiPSC-Charakterisierung .....	49
4.1.4 EHT-Entwicklungsphase .....	57
4.1.5 Funktionelle Analysen der EHTs nach Standardvorgehensweise .....	58
4.1.5.1 Calciumkonzentrations-Wirkungskurve .....	61
4.1.5.2. Kraft-Frequenzbeziehung .....	64

## Inhaltsverzeichnis

4.1.5.3 Post-Pausenbeziehung .....	66
4.1.5.4 Kontraktionsregularität.....	70
4.1.5.5 Wirkungen von Isoprenalin und Carbachol.....	73
4.1.5.6 Technische Variabilität der Experimente .....	76
4.1.6 Kardiale Genexpressionsanalyse.....	77
4.2 Untersuchungen zur Anwendung von hiPSC-CMs als biologischer Schrittmacher.....	80
4.2.1 Herstellung und Entwicklung des kardialen Organoid-Modells .....	80
4.2.2 Kontraktionsmuster .....	81
4.2.3 Human-spezifische Genexpressionsanalyse .....	84
4.2.4 HCN-Inhibierung durch Ivabradin.....	86
4.2.5 Calciumtransienten .....	87
4.2.6 Messungen von Aktionspotenzialen.....	90
4.2.7 Migration .....	92
4.2.8 Charakterisierung der Übergangszone .....	94
5 Diskussion .....	97
5.1 Untersuchungen zur Reliabilität von hiPSC-CMs im 3D-Format .....	97
5.1.1 Qualitätsüberprüfung von hiPSC-MCBs.....	97
5.1.2 Reliabilität von hiPSC-CMs im 3D-Format .....	100
5.1.3 Reliabilität der funktionellen Tests .....	103
5.1.4 Die Definition eines gesunden Phänotyps im 3D-Format.....	105
5.1.5 Ausblick .....	108
5.2 Untersuchungen zur Anwendung von hiPSC-CMs als biologischer Schrittmacher.....	109
5.2.1 Einfluss des unreifen hiPSC-CM-Phänotyps.....	110
5.2.2 Schrittmacher-Mechanismen .....	111
5.2.3 Kopplungsprozesse .....	112
5.2.4 Ausblick .....	115

## Inhaltsverzeichnis

6 Zusammenfassung .....	117
7 Summary .....	118
8 Literaturverzeichnis .....	119
9 Anhang .....	134
9.1 Zusätzliche Abbildungen .....	134
9.2 Zusätzliche Tabellen .....	135
9.3 Abkürzungsverzeichnis .....	139
9.4 Geräte, Materialien und Substanzen.....	144
9.4.1 Geräte .....	144
9.4.2 Materialien .....	145
9.4.3 Puffer und Lösungen.....	146
9.4.4 Zellkulturmedien und Seren .....	148
9.4.5 Substanzen .....	148
9.4.6 Proteine .....	150
9.4.7 Primer .....	150
9.4.8 NanoString Expression Codeset .....	152
9.5 Sicherheitsinformationen.....	153
9.5.1 H-Sätze .....	156
9.5.2 P-Sätze .....	159
9.5 Tagungen, wissenschaftlicher Austausch und Publikationen.....	165
9.5.1 Tagungen.....	165
9.5.2 Wissenschaftlicher Austausch .....	165
9.5.3 Publikationen .....	166
10 Danksagung .....	167
12 Eidesstattliche Erklärung .....	169



## 1 Einleitung

### 1.1 Das humane Herz

Das Herz spielt im menschlichen Organismus eine tragende Rolle, da es die Versorgung aller Organe, Gewebe und Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen über den Blutkreislauf gewährleistet. Dabei sorgt die rechte Herzhälfte für die Oxygenierung des Bluts im Lungenkreislauf, welches aus der Lunge über die linke Herzhälfte in den Körperkreislauf geleitet wird und so den gesamten Organismus erreicht. Die beiden Kreisläufe verlaufen im Herzen getrennt voneinander, was sich in dem Aufbau des Herzens widerspiegelt: die rechte und linke Herzhälfte (i) sind durch eine Herzscheidewand (Septum) voneinander getrennt und (ii) bestehen aus jeweils einer hohlen Herzkammer (linker und rechter Ventrikel), die das Blut in den entsprechenden Kreislauf pumpt und jeweils einem hohlen Vorhof (linke und rechte Atrien), die das Blut aus dem entsprechenden Kreislauf aufnimmt (Abbildung 1.1). Die Aufrechterhaltung des Herz-Kreislauf-Systems wird durch den konstanten und rhythmischen Herzschlag ermöglicht (Katz 2011).

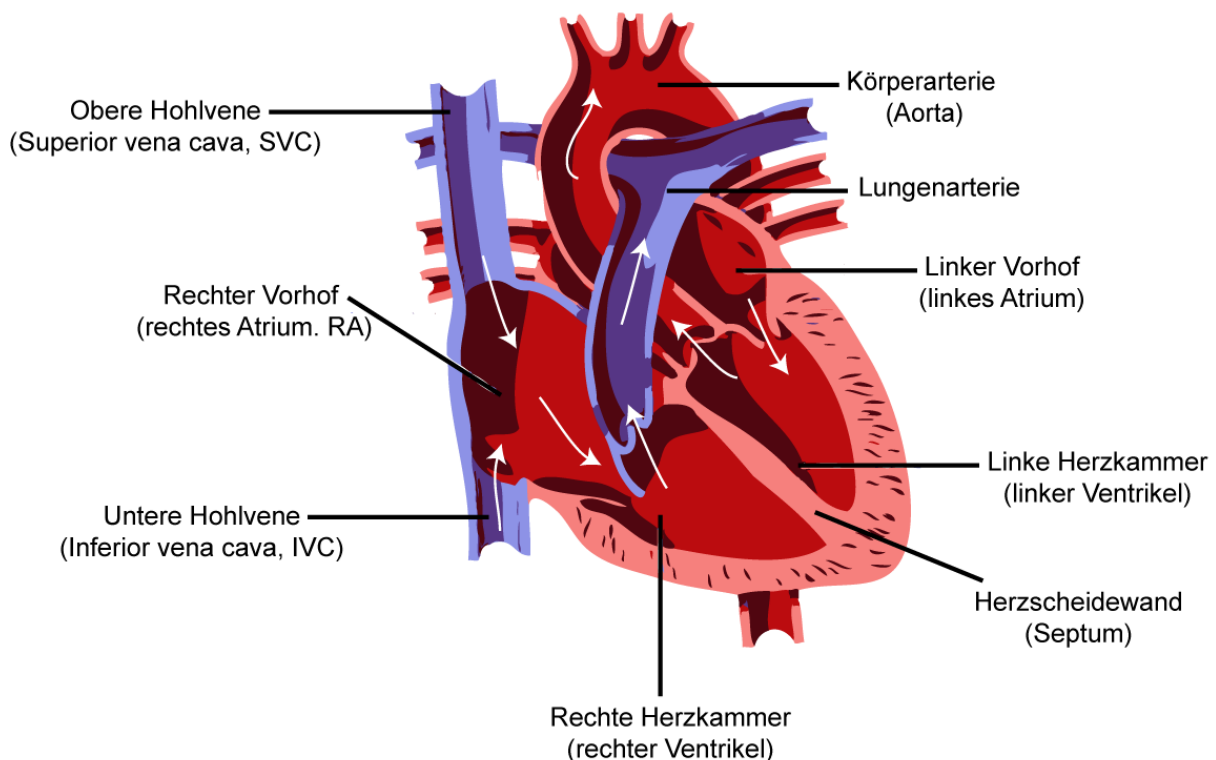


Abbildung 1.1: Das humane Herz. Schematische Darstellung der Anatomie. Blaue Gefäße führen sauerstoffarmes Blut, rote Gefäße sauerstoffreiches Blut.

### 1.1.1 Herzzellen

Die Vorhöfe und Herzkammern sind aus einer dreischichtigen Herzwand aufgebaut, dem Endokard (innen), Myokard (mittig) und Epikard (außen). Das Myokard, die Muskelschicht der Herzwand, macht hierbei den Großteil der Herzwand aus und ist aus Blutgefäßen, Bindegewebe und unterschiedlichen Zelltypen zusammengesetzt. Etwa 70% des Myokards werden von Zelltypen wie vaskuläre glatte Muskelzellen, Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten gebildet. Den größten Masseanteil machen jedoch Kardiomyozyten (CMs) aus. Diese können weiterhin in Arbeits-CMs (ventrikuläre und atriale CMs), Überleitungszellen und Zellen der Purkinje Fasern, des Atrioventrikularknotens (AV-Knoten) und des Sinusknotens eingeteilt werden und unterscheiden sich in strukturellen und (elektro-)physiologischen Eigenschaften (Nag 1980; Katz 2011). Unterschiede zwischen Arbeits-CMs und Sinusknotenzellen schließen u.a. ein, dass Arbeits-CMs ein stabiles Ruhepotenzial, Sinusknotenzellen dagegen eine spontane Depolarisierung aufzeigen (Abbildung 1.2). Diese Unterschiede sind für den erfolgreichen Ablauf des Herzschlags von Bedeutung.

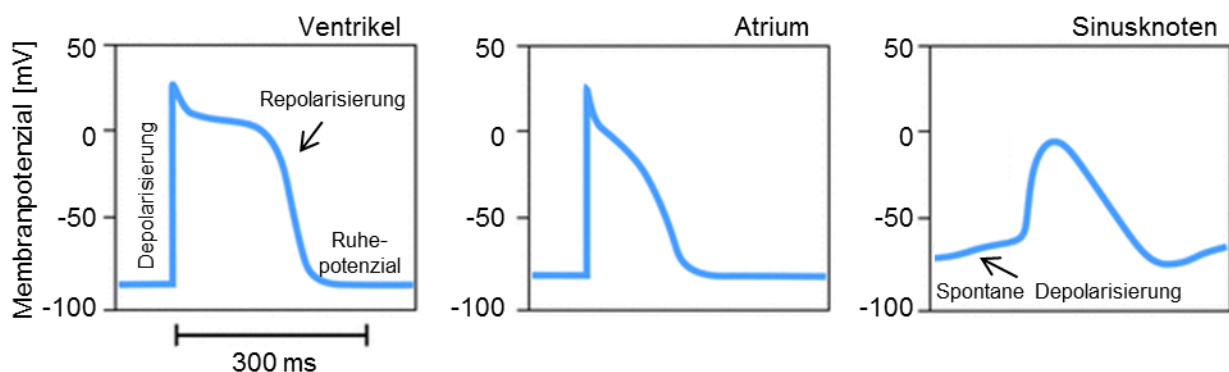


Abbildung 1.2: Elektrophysiologische Eigenschaften von Herzzelltypen. Ventrikuläre und atriale CMs (Arbeits-CMs) zeigen andere elektrophysiologische Eigenschaften als Sinusknotenzellen auf. Arbeits-CMs weisen ein Ruhepotenzial auf, Sinusknotenzellen stattdessen eine spontane Depolarisierung (verändert nach Thaemert und Beckerly 2011).

### 1.1.2 Der primäre Schrittmacher

#### 1.1.2.1 Die Funktion

Der Herzschlag entsteht im Sinusknoten, dem primären Schrittmacher, und breitet sich von dort im Herzen aus. Die Funktion des Sinusknotens ist daher essenziell für eine normale kardiale Physiologie. Grundlage seiner Funktion ist seine Automatik, die auf der spontanen Depolarisierung der Sinusknotenzellen beruht (Abbildung 1.2, 1.3). Schrittmacherzellen haben kein stabiles Ruhemembranpotenzial und hyperpolarisieren nach einem Aktionspotenzial nur auf ca. -60 mV, wodurch sich Spannungs-abhängige, Hyperpolarisations-aktivierte Kationenkanäle (sogenannte *Funny Channels*, HCN) öffnen. Durch den resultierenden Kationeneinstrom ( $I_f$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) und anschließender Unterstützung der L-Typ- und T-Typ-Calciumkanäle (Calciumeinstrom,  $I_{\text{Ca}}$ ) wird ein Aktionspotenzial initiiert (Brown et al. 1979; Eisner und Cerbai 2009; Chen et al. 2010). Der im Sinusknoten dominanten HCN-Isoform HCN4 wird hierbei eine wichtige Rolle zugeschrieben, da sich durch eine spezifische HCN-Inhibierung (z.B. durch Ivabradin) die Herzfrequenz senken lässt (Eisner und Cerbai 2009; Koncz et al. 2011). Synchron zu diesem Spannungs-abhängigen (*Membrane Clock*) Mechanismus fungiert ein Calcium-abhängiger (*Calcium Clock*) Mechanismus zur Initiierung des Herzschlags (Abbildung 1.3; Bogdanov et al. 2001). Dieser beschreibt den spontanen Einstrom von Calcium in das Zytoplasma in dem Fall, dass die Calciumkonzentration im Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) einen Grenzwert überschreitet. Das aus dem SR einströmende Calcium wird über den Ryanodinrezeptor (RyR) reguliert (als 1 gekennzeichnet in Abbildung 1.3). Die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration wiederum aktiviert den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX), dessen elektrogener  $I_{\text{NCX}}$  (3  $\text{Na}^+$ -Influx gegen 1  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux) zu einer spontanen Depolarisierung und zu der Initiierung eines Aktionspotenzials beiträgt (2). Die ATP-abhängige Calciumpumpe des SRs (SERCA), die durch Phospholamban (PLB) moduliert wird, sorgt für einen anschließenden in das SR gerichteten Calciumtransport (3), der die Basis für die Initiierung eines neuen Zyklus ist (4; Chen et al. 2010).

## Einleitung

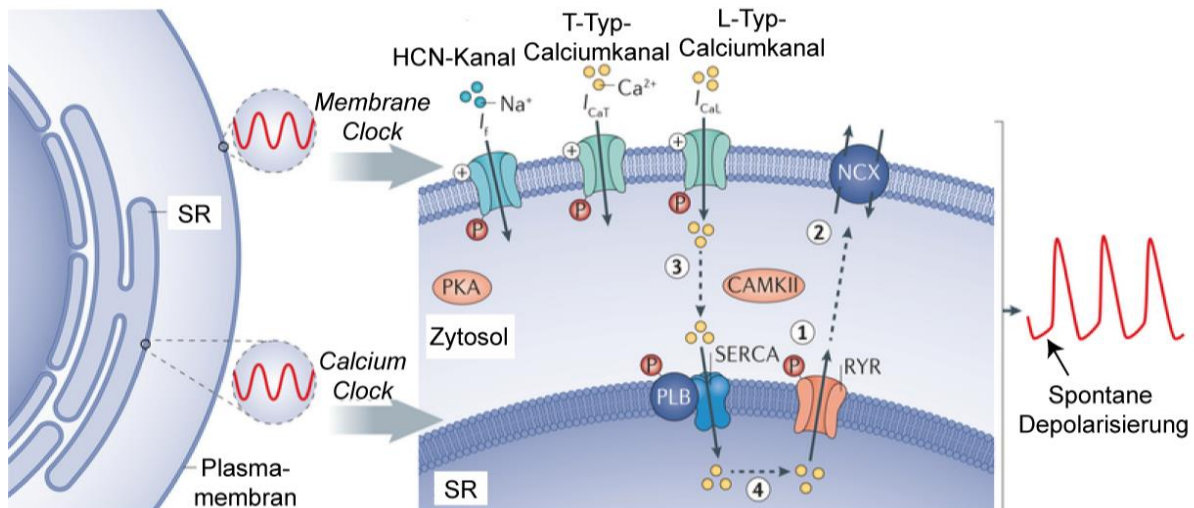


Abbildung 1.3: Mechanismen zur Sinusknotenautomatik. Der Spannungs-abhängige (*Membrane Clock*) und der synchron verlaufende Calcium-abhängige (*Calcium Clock*) Mechanismus führen zur spontanen Depolarisierung und der daraus folgenden Initiierung des Aktionspotenzials (AP). SR, Sarkoplasmatisches Retikulum; SERCA, ATP-abhängige Calciumpumpe des SR; RyR, Ryanodinrezeptor; NCX, Natrium-Calcium-Austauscher; CM, Kardiomyozyte (verändert nach Cingolani et al. 2017).

### 1.1.2.2 Der Aufbau

Der Sinusknoten liegt im rechten Atrium im Bereich der Mündung der oberen Hohlvene angrenzend zur Crista terminalis, einer sichelförmigen Struktur des rechten Atriums, die während der Embryogenese durch die Fusion des Sinus venosus mit dem primitiven Atrium entsteht (Henry Gray, 2013; Unudurthi, Wolf, & Hund, 2014). Der Sinusknoten ist durch eine heterogene Struktur charakterisiert, die in die Bereiche Peripherie (per), Zentrum (cen) und Hauptposition der Schrittmacherfunktion (\*) unterteilt werden kann (Abbildung 1.4A). Diese Hauptposition der Schrittmacherfunktion kann sich je nach Kondition verlagern und wird von Neurotransmittern des Sympathikus (vor allem Noradrenalin) und des Parasympathikus (Acetylcholin) und dem systemisch regulierten Nebennierenmark-Hormon Adrenalin beeinflusst. Als Folge dieser Positionsverschiebungen konnte eine Veränderung der Herzfrequenz beobachtet werden (Mackaay et al. 1980; Boineau et al. 1983; Boyett et al. 2000). Die Heterogenität des Sinusknotens spiegelt sich in den elektrophysiologischen und strukturellen Eigenschaften der drei Bereiche wider (Dobrzynski et al. 2005, 2007; Fedorov et al. 2009). So kann vom Zentrum bis zur Peripherie des Sinusknotens ein Gradient in Zellgröße (Sinusknotenzentrum <

## Einleitung

Peripherie), Aktionspotenzialdauer (Sinusknotenzentrum > Peripherie) und Aufstrichgeschwindigkeit (Sinusknotenzentrum < Peripherie) ausgemacht werden. Dessen zelluläre Grundlage wird noch stets mit zwei vorgeschlagenen Modellen debattiert: dem Mosaik- und dem Gradienten-Modell (Abbildung 1.4B). Das Mosaik-Modell basiert auf der Annahme, dass der Gradient durch eine mosaikartige Anordnung von atrialen Zellen und Sinusknotenzellen zustande kommt. Durch eine Zunahme des Anteils an atrialen Zellen zur Sinusknotenperipherie entsprechen die abgeleiteten strukturellen und elektrophysiologischen Eigenschaften zunehmend denen des Atriums. Das Gradienten-Modell hingegen erklärt den Gradienten mit dem Vorkommen von qualitativ unterschiedlichen Sinusknotenzellen, deren strukturelle und elektrophysiologische Eigenschaften sich zur Sinusknotenperipherie hin ändern (Zhang et al. 2001). Viele der experimentellen Daten und Computer-Modellierungen sprechen für die Theorie des Gradienten-Modells (Boyett et al. 2000; Zhang et al. 2001; Lovell et al. 2004; Cloherty et al. 2005; Dobrzynski et al. 2005), dennoch zeigten kürzlich veröffentlichte Studien Elemente des Mosaik-Modells (Dobrzynski et al. 2005; Gratz et al. 2018). Beide Modelle vereint der bestehende Gradient zur Peripherie, der für eine erfolgreiche Weiterleitung des vom Sinusknoten initiierten Aktionspotenzials von Bedeutung ist.

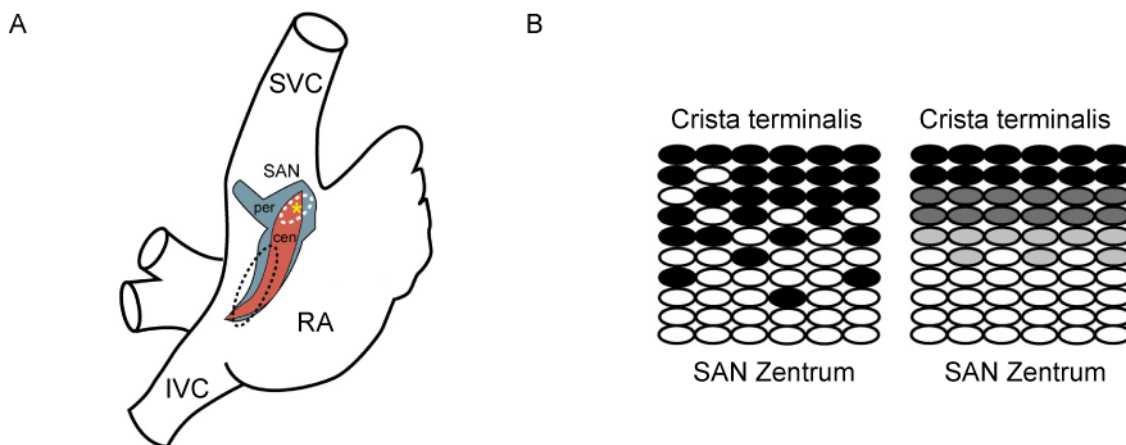


Abbildung 1.4: Der Sinusknoten (SAN). (A) Schematische Darstellung seiner Lage im Herzen und der Bereiche Peripherie (per), Zentrum (cen) und der Hauptposition des Schrittmachers (\*). (B) Schematische Darstellung der Modelle zur Beschreibung der strukturellen und physiologischen Heterogenität des Sinusknotens: Mosaikmodell (links, SAN Zellen weiß, atriale Zellen schwarz) und Gradienten-Modell (rechts; unterschiedliche SAN Zellen unterschiedlich dunkel; verändert nach Unudurthi et al. 2014).

### 1.1.3 Das Erregungsleitungssystem

Bemerkenswert ist, dass eine so kleine Struktur wie die des Sinusknotens die umliegende, viel größere Struktur des Atriums als Schrittmacher kontrolliert, ohne von dieser in seiner Funktion unterdrückt zu werden. Vieles ist in Bezug auf den zugrundeliegenden Mechanismus noch unklar, allerdings konnten mehrere strukturelle Eigenschaften des Sinusknotens ausgemacht werden, die eine erfolgreiche Weiterleitung des Aktionspotenzials begünstigen.

Ein wichtiges Merkmal scheint hierbei die funktionelle Isolation des Sinusknotens mit der Ausnahme von sogenannten Ausgangspfaden (*Exit Pathways*) zu sein, die eine Kommunikation zwischen Sinusknoten und atrialem Gewebe erlauben (Fedorov et al. 2009, 2010, 2012; Nikolaidou et al. 2012). Diese Isolation, die zum Schutz der Schrittmacherautomatik (spontane Depolarisierung) vor dem hyperpolarisierten atrialen Myokards dient, wird unter anderem einer Bereichs-abhängigen Kopplung durch Connexine (Cx) zugeschrieben (ten Velde et al. 1995; Sánchez-Quintana et al. 2005; Unudurthi et al. 2014). Connexine sind transmembrane Kopplungsproteine, die als *Gap Junctions* für die elektrische Weiterleitung verantwortlich sind (Beyer et al. 1990; Kléber und Rudy 2004).

So wurde im Zentrum des Sinusknotens eine sehr geringe Kopplung der Zellen gefunden, die laut numerischer Modellierungen essentiell für die Schrittmacherfunktion ist. Joyner et al. (2007) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass sowohl der negative Effekt des hyperpolarisierten Atriums als auch die nötige Größe des Sinusknotens umso geringer sind, je geringer die elektrische Kopplung im Sinusknoten ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Sinusknotengröße abermals mit Bestehen einer Übergangszone reduziert werden konnte, die einen Gradienten zwischen Atrium und Sinusknotenzentrum in strukturellen und elektrophysiologischen Eigenschaften erzeugt. Diese Übergangszone mit intermediärer Kopplung wurde auch als essentiell für den Schutz des Sinusknotens vor dem hyperpolarisierten Atrium befunden (Joyner und van Capelle 1986). Eine stärkere Kopplung zwischen Atrium und Sinusknoten hingegen würde zu einem Abbruch der Schrittmacherfunktion führen (Watanabe et al. 1995). Im Einklang zu diesen Simulationen befinden sich Untersuchungen zur Kopplung in Form von Cx-Expressionsanalysen, die aufzeigten, dass das schnell leitende Cx43

## Einleitung

im Sinusknotenzentrum nicht nachzuweisen ist, intermediär in der Peripherie und stark im Atrium exprimiert wird. Das intermediär exprimierte Cx43 in der Peripherie kann hierbei als Zell-Zell-Kopplung und Übergangszone zwischen langsam leitendem Sinusknotenzentrum und schnell leitendem Atrium angesehen werden (Dobrzynski et al. 2005). Passend hierzu konnte im Sinusknotenzentrum statt Cx43 eine Expression des langsam leitenden Cx45 nachgewiesen werden. Diese unterschiedlich leitenden Connexine tragen zu der Entstehung eines Gradienten in der elektrischen Leitgeschwindigkeit von Sinusknotenzentrum zu Peripherie bei (Dobrzynski et al. 2005; Inada et al. 2014).

Durch diese Mechanismen kann das im Sinusknoten entstandene Aktionspotenzial erfolgreich aus dem Sinusknoten geleitet werden und über das Erregungsleitungssystem, bestehend aus Sinusknoten, AV-Knoten und His-Purkinje System, ins Myokard übertragen werden. Hierbei erreicht die elektrische Erregung als Ionenfluss über *Gap junctions* zunächst das Vorhofmyokard und erzeugt eine Vorhofkontraktion (Diastole/Vorhofsystole). Über den AV-Knoten und das His-Purkinje System wird die Kontraktion anschließend in die Ventrikel weitergeleitet, in dem sich die elektrische Erregung ausbreitet und eine Kontraktion (Systole) verursacht. Die auf eine Depolarisation folgende Refraktärzeit, in der die Zellen elektrisch nicht erregbar sind, gewährleistet eine unidirektionale Ausbreitung der elektrischen Erregung und ist für die wechselnde Pump-Saug-Funktion des Herzens (Diastole/Systole) unerlässlich. Die Strukturen des Erregungsleitungssystems sind in der Lage selbst Schrittmacherpotenziale mit abnehmender Grundfrequenz zu erzeugen. Der Frequenzgradient ermöglicht, dass die Aktionspotenziale vom Sinusknoten die nächst untergeordnete Schrittmacherstruktur (z.B. AV-Knoten) erregen, bevor dieser ein eigenes Schrittmacherpotenzial generieren kann. Fällt der primäre (schnellste) Schrittmacher jedoch aus, würde die nächst untergeordnete Schrittmacherstruktur übernehmen (Cingolani et al. 2018). Einhergehend mit dem Frequenzgradienten breitet sich auch der Gradient in der Aktionspotenzialdauer vom Sinusknoten über das gesamte Erregungsleitungssystem aus (z.B. His-Purkinje System > Ventrikel) und scheint ein Schutzmechanismus gegen eine verfrühte erneute Erregung (*Reentry*) zu sein (Boyett et al. 1999).

## Einleitung

### 1.1.4 Die elektromechanische Kopplung

Erreicht das Aktionspotenzial über das Erregungsleitungssystem das Myokard, wird es in eine mechanische Muskelkontraktion übersetzt. Dieser Vorgang wird als elektromechanische Kopplung bezeichnet (Abbildung 1.5). Die Übertragung der elektrischen Erregung in den intrazellulären kontraktilen Apparat geschieht über in die Sarkolemma integrierte, tief in die Zelle reichende Einbuchtungen (T-Tubuli). Die Erregung der T-Tubuli hat zur Folge, dass sich Spannungs-abhängige L-Typ-Calciumkanäle öffnen und extrazelluläres Calcium in die Zelle strömt (als 1 gekennzeichnet in Abbildung 1.5). Die erhöhte zytosolische Calciumkonzentration führt wiederum zur Aktivierung der RyR, die durch die Freisetzung von Calcium aus dem SR eine zusätzliche Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration einleiten (Calcium-induzierte Calciumfreisetzung). Calcium wird im SR durch Calsequestrin (CASQ2) gespeichert (2). Durch die Bindung des zytosolischen Calciums an Troponin C, einem Teil des regulatorischen Troponin-Komplexes des dünnen Filaments, kommt es zu einer Konformationsänderung von Tropomodulin, was um das Aktinfilament geschlungen ist und nach Calcium-Bindung von Troponin C seine Position so ändert, dass eine Interaktion von Myosin und Aktin möglich wird. Diese Interaktion von Aktin und Myosin im Sarkomer führt zu einer mechanischen Kontraktion (3). Die Relaxation der Muskelzelle erfolgt durch einen Rückgang der Calciumkonzentration, die vor allem durch die SR-Calcium-ATPase SERCA erfolgt. Diese initiiert einen SR-gerichteten Calciumtransport, der eine sinkende zytosolische Calciumkonzentration zur Folge hat (4). Weiteres zytosolisches Calcium wird durch NCX (zu einem kleinen Teil) und in die Sarkolemma integrierte Calcium-ATPasen (PMBCA) aus der Zelle transportiert. Die niedrige Calciumkonzentration verhindert eine weitere Interaktion von Myosin und Aktin. Mechanismen, die die zytosolische Calciumkonzentration erhöhen, führen auch zu einer Erhöhung der Herzleistung. So bewirkt eine Stimulation der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade (z.B. durch sympathische Nerven oder Isoprenalin) neben einer Kontraktionssteigerung (positiv inotrop) und Relaxationssteigerung (positiv lusitrop), auch eine Erhöhung der Herzfrequenz (positiv chronotrop) und Erregungsleitung (positiv dromotrop).



## Einleitung

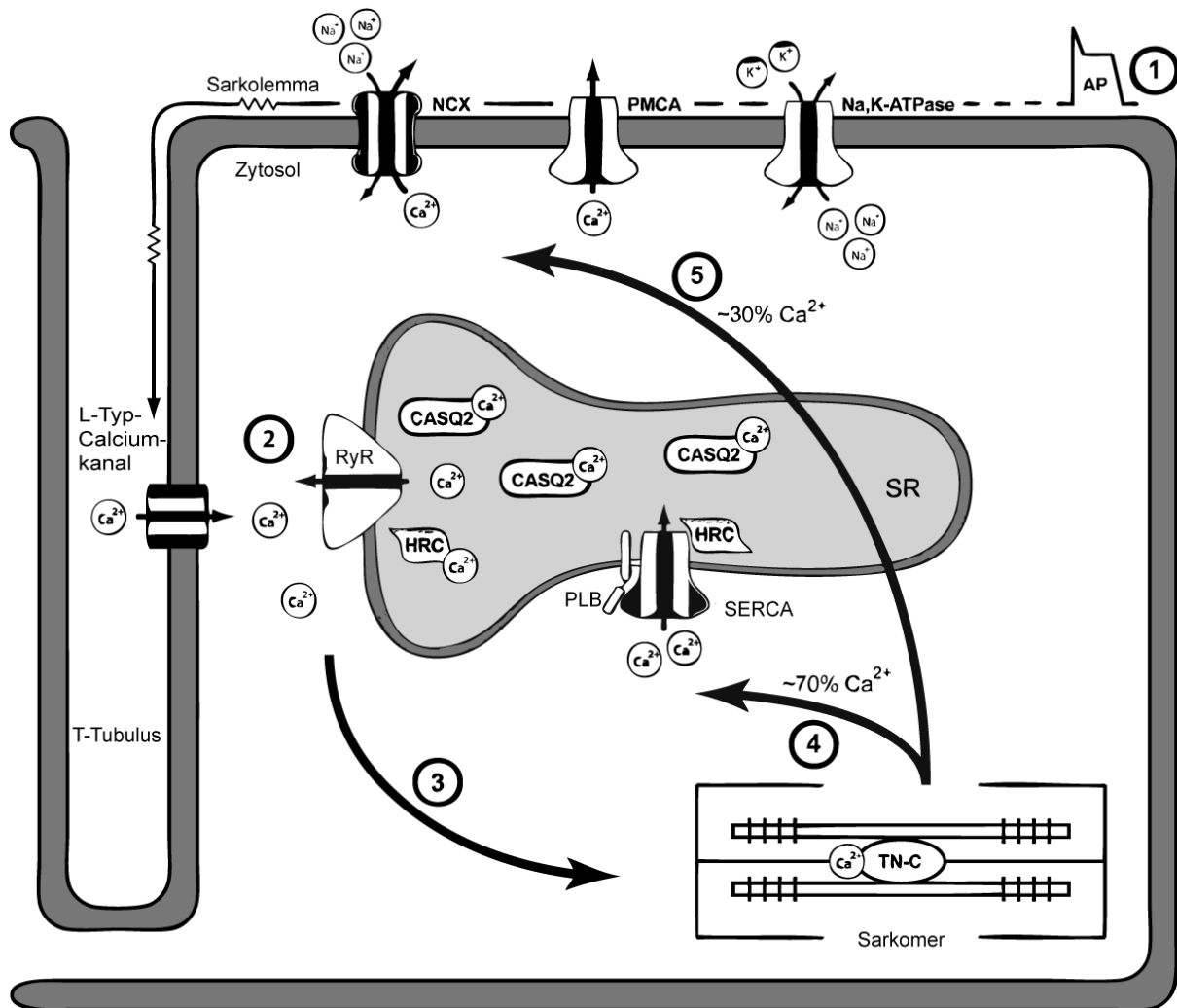


Abbildung 1.5: Elektromechanische Kopplung. (1) ein Aktionspotenzial (AP) erregt die Sarkolemma, wodurch L-Typ-Calciumkanäle Calcium in die Zelle transportieren. (2) Durch eine Calcium-induzierte Calciumfreisetzung erhöht sich die intrazelluläre Calciumkonzentration (3) und es kommt zu einer Kontraktion. Die Calciumkonzentration reduziert sich über den (4) SR-gerichteten Calciumtransport durch die ATP-abhängige Calciumpumpe des SR (SERCA) und (5) durch in die Sarkolemma integrierte Calciumkanäle (Natrium-Calcium-Austauscher, NCX; Calcium-ATPase der Sarkolemma, PMCA). RyR, Ryanodinrezeptor; CASQ2, Calsequestrin Isoform 2; PLB, Phospholamban; TN-C, Troponin-C (verändert nach Gorski et al. 2015).

### 1.2 Künstliche Schrittmacher

Störungen im Erregungsleitungssystem können zu einer Herzrhythmusstörung (Arrhythmie) führen, die sich in einer Abweichung von der normalen Herzfrequenz manifestiert. Das menschliche Herz besitzt eine Frequenz von 50 bis 100 Schlägen pro Minute (BPM). Eine Herzfrequenz von <50 BPM bezeichnet man als verlangsamt (Bradykardie), eine Herzfrequenz von >100 BPM als erhöht (Tachykardie). Die

## Einleitung

häufigste klinisch relevante Herzrhythmusstörung ist ein unregelmäßiger Herzschlag aufgrund von Vorhofflimmern. Generell nehmen Herzrhythmusstörungen mit dem Alter zu, können aber auch z.B. genetisch bedingt in früheren Jahren eintreten. Zu den Therapiemöglichkeiten zählen die Einnahme von Medikamenten und in schweren Fällen der Einsatz eines Kardioverters/Defibrillators oder elektrischen Schrittmachers.

### 1.2.1 Der elektrische Schrittmacher

Elektrische Schrittmacher werden seit den 1950er Jahren erfolgreich eingesetzt und nehmen in der stetig älter werdenden Gesellschaft einen immer wichtigeren Stellenwert ein (Bradshaw et al. 2014). Die Technologie elektrischer Schrittmacher hat sich kontinuierlich weiterentwickelt und erlaubt mittlerweile u.a. eine Konditionsabhängige Anpassung an die Herzfrequenz durch z.B. den Einbau spezifischer Sensoren und eine Herzkompartment-spezifische Schrittmacherfunktion (Mond et al. 2012). Neben den Errungenschaften bringen elektrische Schrittmacher jedoch auch Komplikationen mit sich. Zu diesen zählen u.a. eine Batterieabhängigkeit, Komplikationen, die durch die OP entstehen (z.B. Infektionen), und die Schwierigkeit, Kinder mit elektrischen Schrittmachern zu therapieren. Letzteres ist einerseits der Größe des Implantats zuzuschreiben und andererseits der Problematik, dass sich das Implantat dem Wachstum des Kindes nicht anpassen kann (Rosen et al. 2011). Um diesen Nachteilen entgegenzuwirken, hat sich in den letzten 15 Jahren ein neues Forschungsfeld aufgetan, das sich mit der Entwicklung einer Alternative/Ergänzung zum elektrischen Schrittmacher befasst: dem biologischen Schrittmacher.

### 1.2.2 Der biologische Schrittmacher

Biologische Schrittmacher sind zellulärer Basis und sollten, theoretisch betrachtet, viele der Komplikationen von elektrischen Schrittmachern (z.B. Batterieabhängigkeit) vermeiden. Die Entwicklungsansätze hierzu können grob eingeteilt werden in (i) eine direkte Manipulation residenter Zellen und (ii) die Implantation von Zellen, die entweder genetisch verändert oder intrinsisch spontan schlagen (Abbildung 1.6). Strategien zur genetischen Manipulation konzentrieren sich auf Transkriptionsfaktoren und/oder Ionenkanäle. So konnte z.B. gezeigt werden, dass TBX18-transduzierte Zellen von Schweineherzen bei komplettem Herzblock

## Einleitung

Schrittmacheraktivität zeigten und eine bemerkenswert geringe Ersatzstimulation durch elektrische Schrittmacher benötigten (Hu et al. 2014). Auch die Implantation verschiedener Zelltypen zeigten vielversprechende Ergebnisse. Humane mesenchymale Stammzellen, die HCN2 überexprimierten, wiesen eine stabile Impulsinitiierung in Kaninchenherzen auf (Potapova et al. 2004; Plotnikov et al. 2007), und aus humanen embryonalen Stammzellen differenzierte CMs koppelten einerseits strukturell und elektromechanisch an Ratten-CMs und waren andererseits in der Lage, Schweineherzen mit einem kompletten atrioventrikulären Herzblock elektrisch zu stimulieren (Kehat et al. 2004). In diesem Zusammenhang konnte auch für CMs aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (siehe 1.4.1) eine Schrittmacherfunktion in Ratten- und Hundeherzen nachgewiesen werden (Chauveau et al. 2014; Protze et al. 2016). Zur besseren Visualisierung der zugrunde liegenden Kopplungsprozesse zwischen Impulsgeber und Substrat wurden einerseits ventrikuläre Herzschnitte von Nagetieren (Maus, Ratte) *ex vivo* verwendet. Andererseits wurden hierfür adhärenzte Kulturen von Ratten-CMs und aus humanen Stammzellen differenzierte CMs genutzt (Plotnikov et al. 2007; Chauveau et al. 2014; Protze et al. 2016).

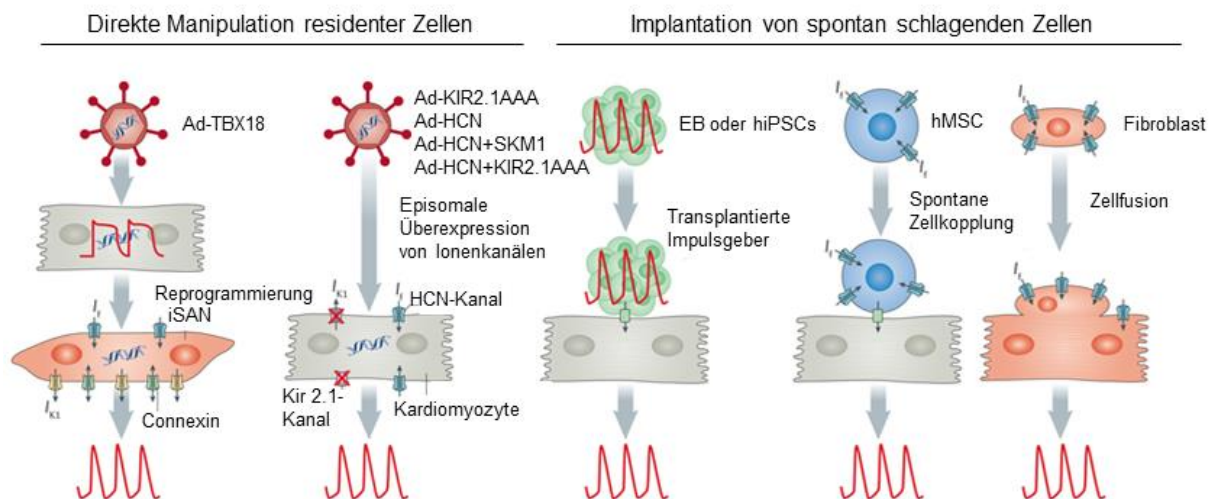


Abbildung 1.6: Entwicklung von biologischen Schrittmachern. Strategien können in (i) die direkte Manipulation von residenten Zellen und (ii) die Implantation von spontan schlagenden Zellen eingeteilt werden. hMSC, humane mesenchymale Stammzellen; EB, Embryoidkörperchen (verändert nach Cingolani et al. 2017).

### 1.3 Künstliches Herzgewebe - *Engineered Heart Tissue*

So wie das Potential von Zellimplantationen und -manipulationen zur Organregeneration untersucht wird, beschäftigt sich ein weiteres Forschungsfeld mit der Herstellung künstlichen Gewebes (*Tissue Engineering*), und dessen *in vivo* Regenerationspotenzial. *In vitro* dienen sie als Modellsystem zur prädiktiven Toxikologie und zur Modellierung von Krankheitsphänotypen. Im kardialen *Tissue Engineering* wurde 1997 ein wichtiger Meilenstein mit dem ersten künstlichen dreidimensionalen (3D) Herzgewebe (*Engineered Heart Tissue*, EHT) gesetzt, dessen Rhythmus und Kraft pharmakologisch und genetisch manipuliert werden konnte (Eschenhagen et al. 1997). Optimierungsschritte der spontan schlagenden EHTs umfassten u.a. den Austausch einer Collagen-basierten Matrix durch eine Fibrin-basierte und der ursprünglich an Glasröhrchen befestigten streifenförmigen Gewebestruktur durch eine erst ringförmige (Zimmermann et al. 2002) und schlussendlich wieder streifenförmige, aber an flexible Silikonhalterungen befestigte Gewebestruktur (Hansen et al. 2010). Letztere wurde auf ein 24-Well-Format zugeschnitten (Abbildung 1.7), das eine maßangefertigte, automatisierte Auswertung ermöglicht (Hansen et al. 2010). Als wichtigster Vorteil der dreidimensionalen Herzgewebe gegenüber einer 2D-Kultur wird eine erhöhte CM-Reifung der sich meist im fetalen/neonatalen Stadium befindenden CMs gesehen (Fink et al. 2000; Ulmer et al. 2018). Diese erlaubt eine bessere Vergleichbarkeit zu den morphologischen und funktionellen Eigenschaften nativer Herzmuskulatur. EHTs wurden aus Herzventrikelpräparationen von Hühnern, Mäusen und Ratten generiert (Eschenhagen et al. 1997; Stöhr et al. 2013; Hirt et al. 2014). Letztere sind durch ein spontanes arrhythmisches Schlagmuster, bestehend aus nicht-kontraktilen Perioden (10-40 s) und Perioden mit hoher Frequenz (10-30 s, ~4Hz), charakterisiert (Eder et al. 2014). Ein reguläres Schlagmuster hingegen kann in den kürzlich etablierten humanen EHTs gesehen werden, in denen aus embryonalen oder induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte CMs (siehe 1.4.1) verarbeitet wurden (Schaaf et al. 2011; Breckwoldt et al. 2017).

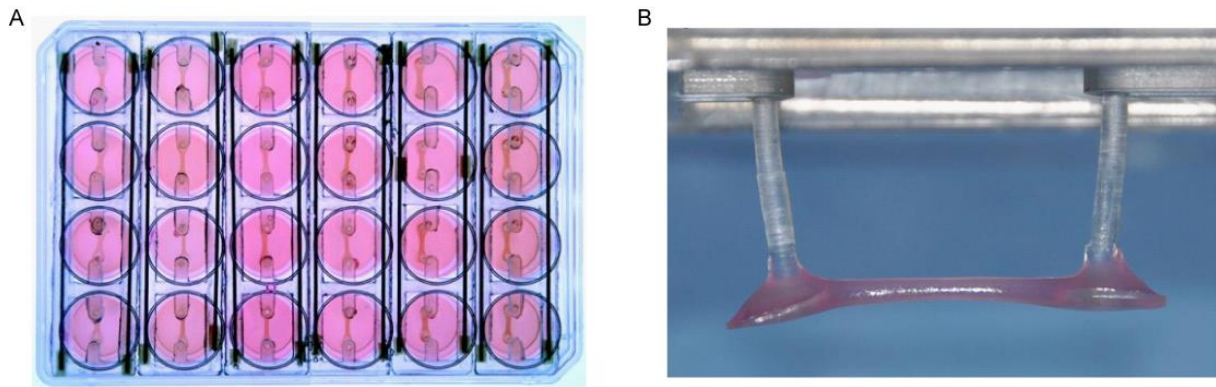


Abbildung 1.7: Künstliches Herzgewebe (EHT). (A) Aufnahme einer 24-Well-EHT-Kulturplatte (Hansen et al. 2010). (B) Aufnahme eines EHTs, das an zwei flexiblen Silikonhalterungen befestigt ist (Weinberger et al. 2016).

### 1.4. Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs)

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die sich theoretisch unbegrenzt teilen und somit unbegrenzt vermehren können. Embryonale Stammzellen zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Differenzierung in Zellen aller drei Keimblätter (Entoderm, Mesoderm, Ektoderm) aus. Durch dieses Merkmal werden sie als pluripotent klassifiziert und bilden eine wichtige Grundlage der embryonalen Entwicklung. Nur die in der anfänglichen Embryogenese auftretenden totipotenten Zellen (Zygote) weisen ein größeres Differenzierungspotenzial auf, indem sie neben den drei Keimblättern auch in der Lage sind, den extraembryonalen Trophoblasten zu bilden. Dieser bildet u.a. die Plazenta. Adulte Stammzellen hingegen zeigen eine begrenztere Differenzierungsfähigkeit als embryonale Stammzellen und sind je nach Potenzial als multi- oder unipotente Zellen für die Regeneration der Organe verantwortlich.

Durch ihr Differenzierungspotenzial weisen Stammzellen eine elegante Möglichkeit auf, sie für sonst schwer zugängliche Gewebe- und human-spezifische Studien zu verwenden. Letzteres ist von Bedeutung, da sich viele biomedizinische Zusammenhänge zwischen Spezies unterscheiden und sich dadurch oftmals in den gängigen Tiermodellen gefundene Aspekte nicht auf den Menschen übertragen lassen. Größtes Hindernis von Stammzell-basierten Studien waren jahrzehntelang die ethischen Bedenken humane embryonale Zellen zu verwenden, aus denen sich sonst ein Mensch hätte entwickeln können. Außerdem wurde die Forschung durch

## Einleitung

den schweren Zugang zu anderen differenzierungspotenten Zellen, die wiederum Keimblatt-spezifisch ein geringeres Anwendungsspektrum aufweisen, ausgebremst.

Eine der größten Errungenschaften der biomedizinischen Forschung des letzten Jahrzehnts stellt daher die Generierung induzierter pluripotenter Stammzellen (hiPSCs) dar. Yamanaka und Kollegen schafften es, ausdifferenzierte Fibroblastenzellen der Maus und anschließend des Menschen in einen pluripotenten Status, der dem von embryonalen Stammzellen weitestgehend gleicht, zurückzusetzen/zu reprogrammieren (Takahashi und Yamanaka 2006; Takahashi et al. 2007). Die Verwendung adulter Zellen für die Herstellung ermöglicht die Vermeidung der oben genannten Schwachpunkte der Stammzell-basierten Forschung und führte zu der breiten Verwendung von hiPSC-Derivaten für unterschiedlichste Zell- und Organ-spezifische Studien (Abbildung 1.8).

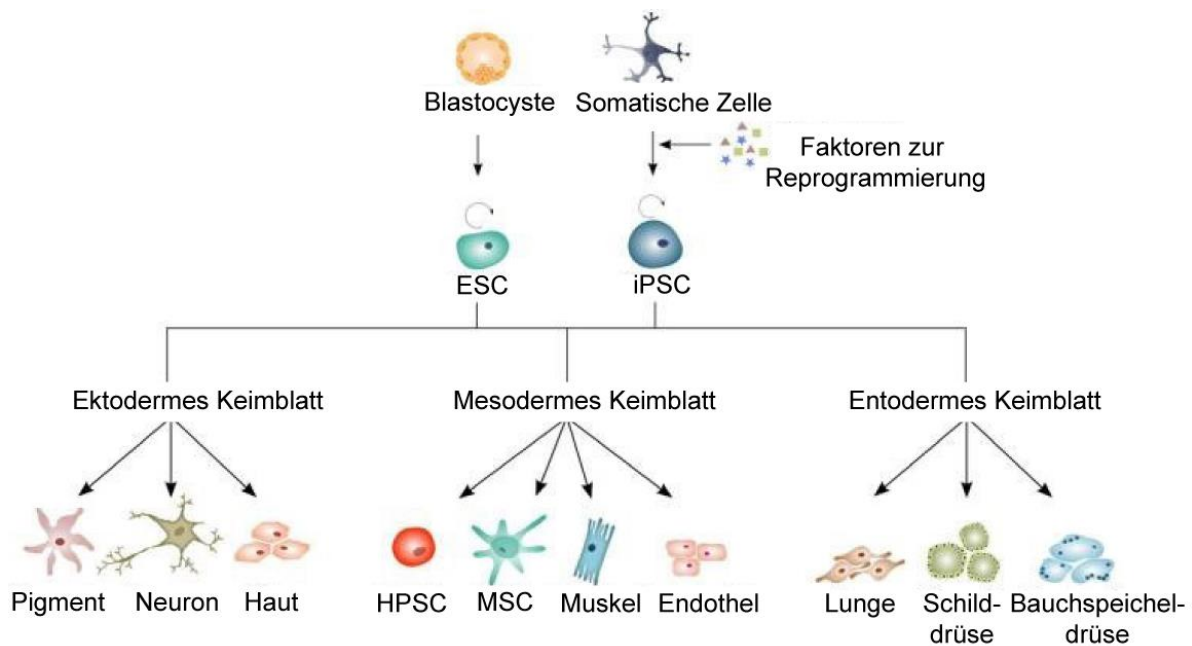


Abbildung 1.8: Differenzierungspotenzial von embryonalen Stammzellen (ESCs) und induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs). ESCs stammen aus dem Embryoblasten des Blastocyten, iPSCs können unter der Verwendung von Reprogrammierungsfaktoren aus somatischen Zellen hergestellt werden. ESCs und iPSCs sind in der Lage verschiedenste Zelltypen der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Entoderm) zu generieren. HPSC, hämatopoetische Stammzellen; MSC, mesenchymale Stammzellen. Verändert nach Kaebisch et al. 2015.

Die Zellreprogrammierung gelang Yamanaka und Kollegen durch eine retrovirale Transduktion der Zellen mit den vier Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, Klf4, und c-Myc. Etwa drei Wochen nach der Transduktion konnte die Bildung von Zellkolonien beobachtet werden, aus denen jeweils Zellen zur weiteren Kultivierung/Charakterisierung isoliert wurden. Jeder entstandene Koloniezellhaufen entspricht hierbei einem iPSC-Klon. Über die Jahre wurde das Protokoll weiter optimiert, und statt Lentiviren wurden u.a. Retroviren (z.B. Sendai) verwendet, die nicht ins Genom integrieren. Vektoren, in die die Transkriptionsfaktoren integriert wurden, gelangen hierbei über den Virus-spezifischen Mechanismus in die Zelle, in der sie zeitlich begrenzt zu Proteinen umgeschrieben werden. Mit dieser Strategie kann die Gefahr einer willkürlichen Integration der Faktoren ins Genom und deren fortdauernde Genexpression umgangen werden. Letztere könnte sich auf das spätere Differenzierungspotenzial auswirken (Martinez-Fernandez et al. 2014). Außerdem konnte das Protokoll neben Fibroblasten auch auf andere somatische Zelltypen wie Blutzellen, Keratinozyten und Epithelzellen aus dem Urin ausgeweitet werden (Aasen et al. 2008; Haase et al. 2009; Zhou et al. 2012).

### 1.4.1 Differenzierung von Kardiomyozyten aus hiPSCs

Besonders für das kardiovaskuläre Forschungsfeld sind gute Modellsysteme unabdingbar, da Gewebe sowohl von Patienten als auch gesunden Probanden schwer zugänglich sind. Die Forschung war daher jahrzehntelang auf die überwiegende Verwendung von Tiermodellen beschränkt, weswegen zu CMs differenzierte hiPSCs eine wichtige Alternative bieten, sowohl human- als auch Patienten-spezifisch zu arbeiten. Folglich kam es zu der schnellen Etablierung von hiPSC-CMs in Studien zur prädiktiven Toxikologie, der Modellierung von Krankheitsphänotypen und der Regeneration (Abbildung 1.9).



## Einleitung

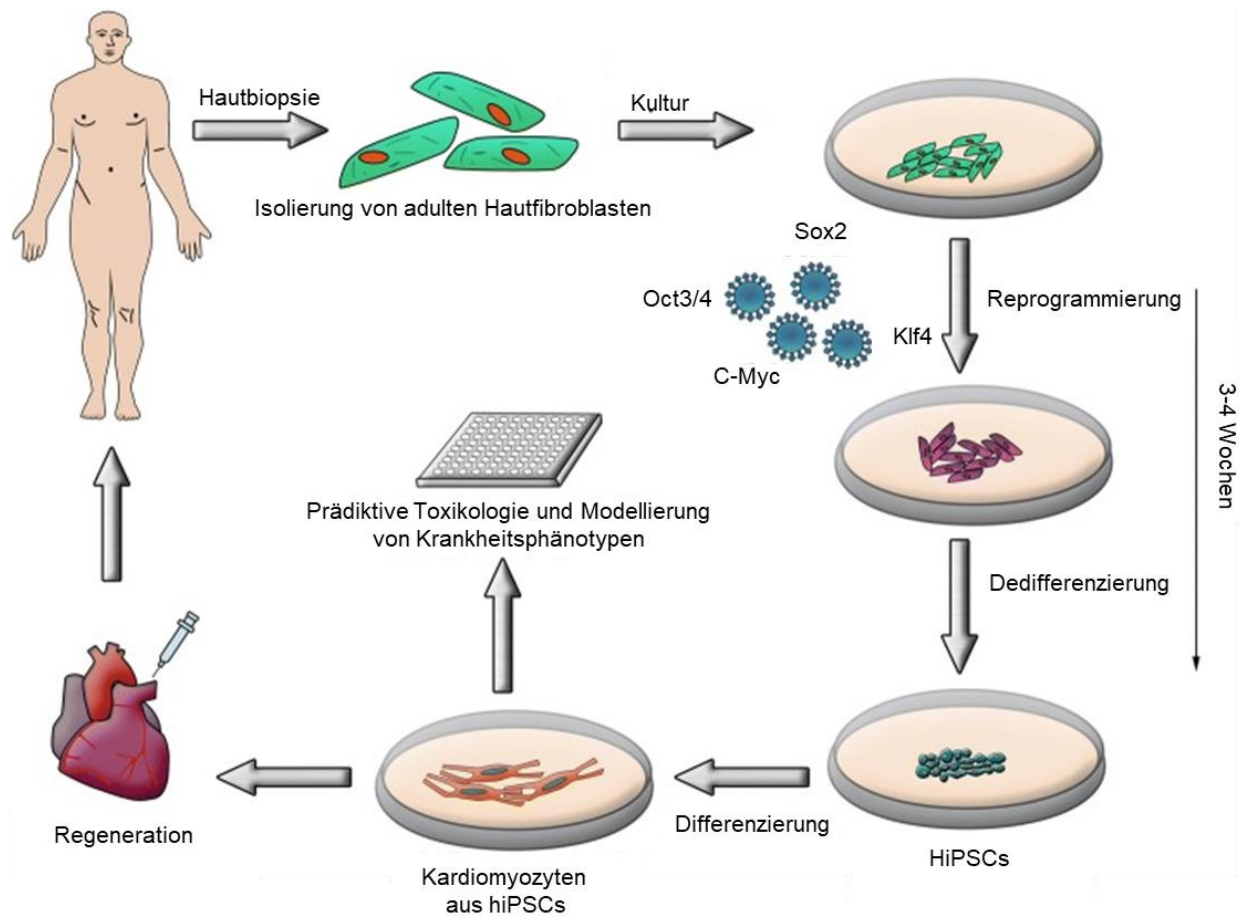


Abbildung 1.9: Anwendungsmöglichkeiten von hiPSC-CMs. Schematische Darstellung zur Herstellung von hiPSC-CMs aus einer Hautbiopsie und ihre mögliche Anwendung zur prädiktiven Toxikologie, Modellierung von Krankheitsphänotypen und Regeneration (verändert nach Abou-Saleh et al. 2018).

Die Protokolle zur Differenzierung von hiPSC-CMs sind von den Prinzipien der Embryogenese inspiriert. Über eine biphasische Modulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs wird durch dessen anfängliche Aktivierung die mesodermale Entwicklung eingeleitet, aus dessen anschließender Inhibierung die kardiale Differenzierung folgt. Trotz dieser grundlegenden Gemeinsamkeit unterscheiden sich die Differenzierungsprotokolle in einem hohen Maße in ihrem experimentellen Aufbau und können grob in 2D- und 3D-basierte Kulturformatbedingungen eingeteilt werden. 2D-Kulturformate schließen Kulturkombinationen aus hiPSCs und anderen Zelltypen (Mummery et al. 2002), hiPSC-beschränkte und einlagige Kulturen (Laflamme et al. 2007) sowie hiPSC-beschränkte aber mehrlagige „Sandwich“-Kulturen ein (Zhang et al. 2012). 3D-Kulturformate basieren hingegen auf kleinen Zellaggregaten, auch Embryoidkörperchen (EBs) genannt (Burridge et al. 2007; Breckwoldt et al. 2017) und ermöglichen eine erleichterte Verwendung von höheren Zellzahlen im Vergleich



zu 2D-basierten Protokollen. Ein Nachteil der differenzierten hiPSC-CMs ist ihr unreifer Phänotyp, der mit fetalen CMs vergleichbar ist. Durch eine konstante elektrische Stimulierung und eine Kultivierung in einem 3D-Herzgewebeformat (z.B. EHT) kann dieser jedoch verbessert werden (Hirt et al. 2014; Ulmer et al. 2018).

### 1.4.2 Gütekriterien hiPSC-basierter Studien

Das große Anwendungsspektrum von hiPSCs und seinen Derivaten beruht auf der Annahme, dass sie den Phänotyp derjenigen Person widerspiegeln, deren Ausgangsmaterial zur Reprogrammierung der Zellen verwendet wurde. Besonders bei der Modellierung von Krankheitsphänotypen, die oftmals auf kleinsten Mutationen im Genom beruhen, muss man hier aber darauf vertrauen, dass biologische Unterschiede zwischen Patienten-spezifischen Phänotypen nicht durch technische Schwankungen und der langen Kultivierung während der komplexen Arbeitsprozesse verfälscht oder verschleiert werden. Die Arbeitsprozesse können in (i) hiPSC-Herstellung durch Reprogrammierung, Isolation von hiPSC-Klonen und deren Expansion (6-7 Wochen), (ii) hiPSC-Differenzierung zu Derivaten (2-3 Wochen) und (iii) Derivatkultivierung, mit anschließender (iv) funktioneller Charakterisierung (3-4 Wochen), eingeteilt werden. Auch wenn mittlerweile viele hiPSC-basierte Studien einen Krankheits-spezifischen Phänotypen aufzeigen konnten (u.a. Lee et al. 2009; Urbach et al. 2010; Mosqueira et al. 2018), wurde auch eine gewisse Variabilität in hiPSCs und deren Derivaten festgestellt, die sich negativ auf die Qualität hiPSC-basierter Studien niederschlagen könnte.

Zu den Arbeitsschritten (i) und (ii) ist verhältnismäßig viel zur Variabilität beschrieben worden. So wurde gezeigt, dass sowohl technische Schwankungen als auch (epi-)genetische Veränderungen während der Reprogrammierung, Expansion und Differenzierung den Phänotyp von hiPSCs und ihren Derivaten beeinflussen können (Lister et al. 2011; Kim et al. 2011a; Martins-Taylor und Xu 2012; Nazor et al. 2012; Sgodda und Cantz 2013; Tapia und Schöler 2016). Andere wiederum beobachteten eine hohe Variabilität zwischen hiPSC-Linien in Bezug auf genetische Modifikationen und Differenzierungskapazität (Young et al. 2012; Rouhani et al. 2014; Burrows et al. 2016), die aber zum großen Teil dem Spender-spezifischen Genotyp zuzuschreiben war (~50%) und weniger auf technischen Schwankungen der Prozesse beruhen soll (Carcamo-Orive et al. 2017; Kilpinen et al. 2017).

## Einleitung

Zu hiPSC-Derivaten (Arbeitsschritt iii) wurde im kardiovaskulären Kontext herausgefunden, dass die Variabilität im Transkriptom zwischen Klonen geringer war als zwischen Spendern (Matsa et al. 2016). Eine besonders hohe Variabilität wurde jedoch in der Genexpression kardial-spezifischer Ionenkanäle zwischen Differenzierungsrunden des gleichen hiPSC-Klons (*Batch*) gefunden (Huo et al. 2016).

Zur Variabilität von funktionellen Parametern (Arbeitsschritt iv) von hiPSC-CMs wurde bisher nur sehr wenig publiziert. Es konnten relativ hohe Schwankungen zwischen *Batches* kommerziell erhältlicher hiPSC-CMs in den grundlegenden Kontraktionsparametern wie Frequenz und Relaxationskinetik, aber auch in der Wirkung von Ionenkanalinhibierungen gefunden werden. HiPSC-CMs wurden hierbei im 2D- oder im 3D-Format (EHT) kultiviert (Huo et al. 2016; Mannhardt et al. 2017).

Die beschriebenen Publikationen fokussierten sich auf einzelne Aspekte der Variabilität von hiPSC(-CM)-basierten Arbeitsschritten, jedoch sind zum vollständigen Verständnis systematisch durchgeführte Studien nötig, die sich mit der Fragestellung beschäftigen, inwieweit hiPSC-CMs die Gütekriterien eines Modellsystems einhalten. So ist z.B. wenig bekannt über die Validität, welche die Gültigkeit der Ergebnisse des Modellsystems beurteilt, und die Reliabilität, welche die formale Zuverlässigkeit, d.h. die technische Genauigkeit des Modellsystems beschreibt. Beide Gütekriterien müssen jedoch hoch sein, damit ein biologisches Merkmal präzise mit einem Modellsystem abgebildet werden kann (Abbildung 1.10).

# Einleitung

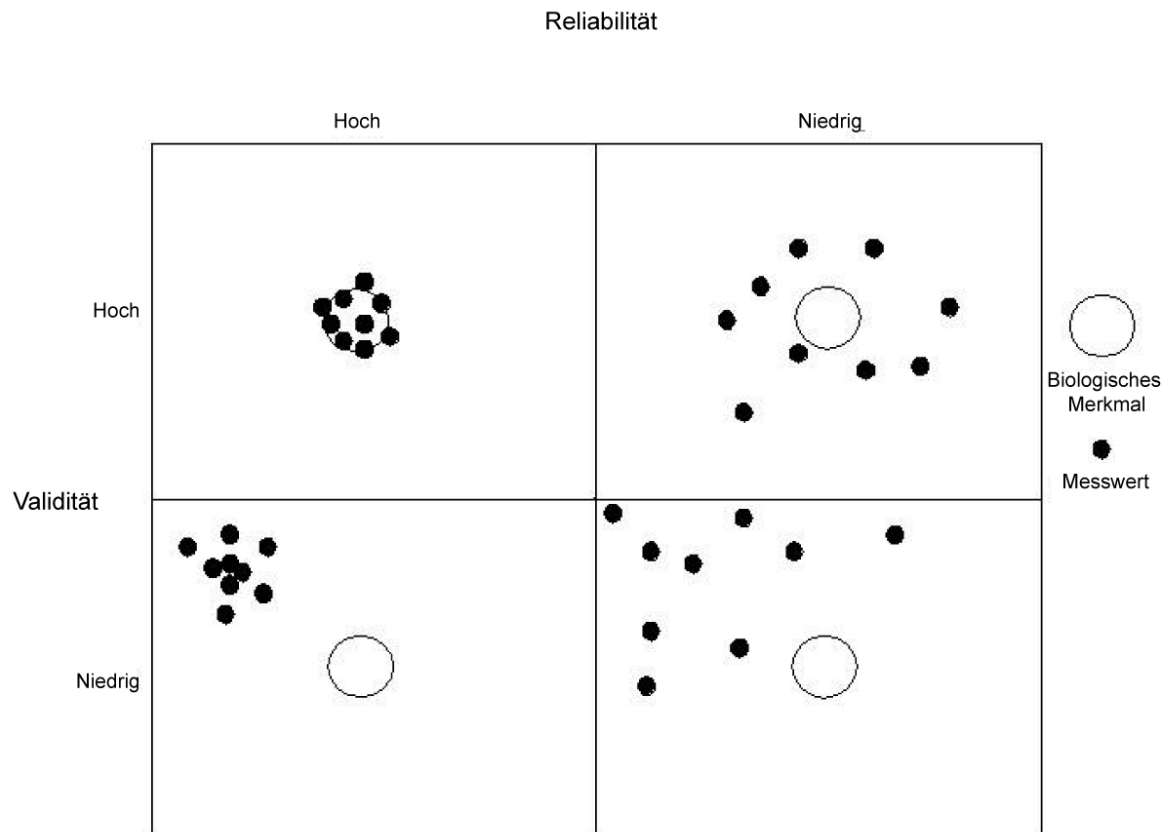


Abbildung 1.10: Wechselbeziehung zwischen Reliabilität und Validität. Um ein biologisches Merkmal (z.B. Krankheitsphänotyp) präzise abbilden zu können, muss ein Modellsystem sowohl eine hohe Reliabilität als auch eine hohe Validität aufzeigen. Verändert nach Theobald (2000).



### 2 Zielsetzung und Versuchskonzept

Im Kontext der hiPSC-CMs impliziert die Frage der Validität, ob man mit ihnen den Patienten-spezifischen klinischen Phänotyp abbilden kann. Die Reliabilität hingegen gibt Auskunft, wie zuverlässig und reproduzierbar die in hiPSC-CMs erhobenen Ergebnisse sind. Zur Untersuchung der Gütekriterien des hiPSC-CM-Modellsystems konnte Prof. Eschenhagen einen Forschungszuschuss der *European Research Council* (ERC) einwerben. 40 gesunde Probanden/Spender und 20 genetisch-bedingte Herzkrankte (Dilatative Kardiomyopathie, DCM; Hypertrophe Kardiomyopathie, HCM) wurden für diese Studie (IndivuHeart) rekrutiert und neben einer klinischen Phänotypisierung einer Hautbiopsie unterzogen. Diese wurden verblindet und doppeltkodiert an das Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie (IEPT) weitergegeben und zur Generierung der hiPSCs genutzt. Die hiPSCs dienten als Basis für die Beantwortung von:

(i) der Validität. Hierfür wurden die hiPSCs aller rekrutierten gesunden und herzkranken Studienteilnehmer zur kardialen Differenzierung verwendet und die resultierenden hiPSC-CMs im 3D-Format (EHT) funktionell auf die gängigen durch Kardiomyopathien veränderten Parameter untersucht. Durch die Verblindung wurde eine objektive Untersuchung gewährleistet. Die Validität des Modellsystems zur Krankheitsmodellierung wird nach Entblindung durch die Korrelation der EHT-kultivierten hiPSC-CMs und der Patientendaten analysiert.

(ii) der Reliabilität. Die Untersuchung zur Reliabilität des hiPSC-CM-Modellsystems bildete die Grundlage eines der beiden Themen, die in dieser Arbeit bearbeitet wurden. Hierfür erfolgte eine Entblindung von drei gesunden Spendern des ERC-Projekts, aus denen jeweils drei Klone pro Spender und drei kardiale Differenzierungs-*Batches* pro Klon hergestellt und im EHT-Format funktionell und genexpressorisch untersucht wurden (Abbildung 2.1). Die gesunden Spender galten hierbei als biologische Replikate, hiPSC-Klone als technische Replikate der Spender und *Batches* als technische Replikate der hiPSC-Klone. Die Nomenklatur wurde entsprechend der Richtlinien des hiPSCreg gewählt (Kurtz et al. 2018) mit Institution (UKE), Zelllinientyp (i=induzierte pluripotente Stammzelle), Identifikationsnummer des Donors (1-3) und einem Buchstaben pro Klon (A-C).

## Zielsetzung und Versuchskonzept

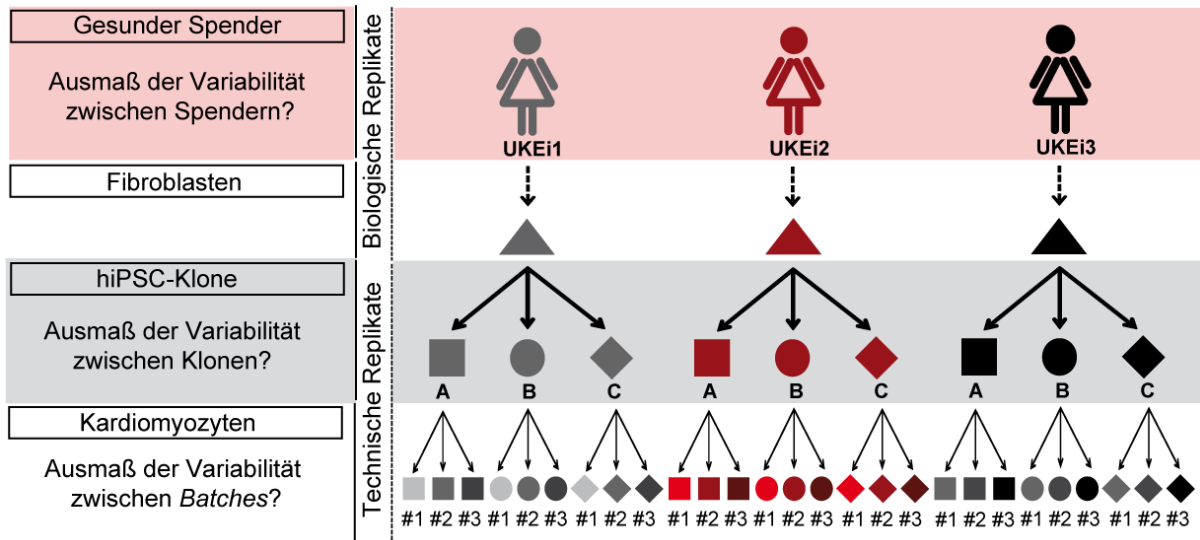


Abbildung 2.1: Projektkonzept. Von drei Spendern (UKEi1, grau; UKEi2, rot; UKEi3, schwarz), wurden jeweils drei hiPSC-Klone gewählt (-A, Quadrat; -B, Kreis; -C, Raute), die für jeweils drei kardiale Differenzierungen verwendet wurden (*Batches*; #1, #2, #3). Die Variabilität wurde auf den drei Ebenen Spender, Klone und *Batches* bestimmt, wobei die gesunden Spender als biologische Replikate galten, hiPSC-Klone als technische Replikate der Spender und *Batches* als technische Replikate der hiPSC-Klone. Nomenklatur: Institution (UKE) induzierte pluripotente Stammzellen (i) Spenderidentifikationsnummer (1-3)-Klonbuchstabe (A-C) #Batch-Nummer (1-3).

Neben der Untersuchung des Modellsystems wurden auch die Tests zur Analyse der funktionellen Parameter auf ihre Reliabilität untersucht, die die gängigen durch Kardiomyopathien veränderten Parameter abbilden sollten. Diese schließen  $\beta$ -adrenerge Sensitivität, Calciumzyklus und -homöostase und Kraft-Frequenzbeziehungen ein.

Für das zweite in dieser Arbeit behandelte Thema wurden die qualitätskontrollierten hiPSC-CMs auf ihre Anwendbarkeit als biologischer Schrittmacher untersucht. Hierfür wurde ein kardiales Organoid-Modell entwickelt, für das sich das arrhythmische Ratten-EHT als Substrat zu Nutze gemacht wurde, um regulär schlagende EBs als potenziellen Impulsgeber zu testen. Von besonderem Interesse waren in diesem Zusammenhang die möglichen zugrundeliegenden Kopplungsprozesse des Modells.

### 3 Material und Methoden

Weitere Details zu Substanzen, Geräten und Materialien können dem Anhang entnommen werden.

#### 3.1 Zellkulturmedien

Alle Medienzusammensetzungen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung aller verwendeten Medien.

Medium	Zusammensetzung
FTDA	DMEM/F-12 ohne Glutamin 2 mM L-Glutamin 1:1000 Lipid mix 5 mg/l Transferrin 5 µg/l Selenium 0,1% Humanes Serumalbumin 5 µg/ml Insulin 2,5 ng/ml Activin-A 30 ng/ml bFGF 50 nM Dorsomorphin 0,5 ng/ml TGFβ1
<i>Stage 0</i> -Medium	FTDA 4 mg/ml Polyvinylalkohol 10 µM Y-27632 30 ng/ml bFGF
<i>Stage 1</i> -Medium	RPMI 1640 4 mg/ml Polyvinylalkohol

## Material und Methoden

	1:1000 Lipidmix 250 µM Phosphoascorbat 5 mg/l Transferrin 5 µg/l Selenium 10 µM Y-27632 5 ng/ml bFGF 10 ng/ml BMP4 3 ng/ml Activin A
<i>Stage 2-Medium I</i>	RPMI 1640 0,5% Penicillin/Streptomycin 4 mg/ml Polyvinylalkohol 1:1000 Lipidmix 250 µM Phosphoascorbat 5 mg/l Transferrin 5 µg/l Selenium 1 µM Y-27632 1 µM XAV 939
<i>Stage 2-Medium II</i>	RPMI 1640 2% (v/v) B27 mit Insulin 10 mM HEPES 0,5% (v/v) Penicillin/Streptomycin 500 µM 1-Thioglycerol 1 µM Y-27632 1 µM XAV-939
<i>Stage 2-Medium III</i>	RPMI 1640



## Material und Methoden

	2% (v/v) B27 mit Insulin 10 mM HEPES 0,5% (v/v) Penicillin/Streptomycin 500 µM 1-Thioglycerol 1 µM Y-27632
EHT Medium	DMEM 1% Penicillin/Streptomycin 10% Pferdeserum 10 µg/ml Insulin 33 µg/ml Aprotinin
Einfriermedium (HiPSCs und Kardiomyozyten)	90% Fetales Rinderserumalbumin 10% DMSO
Differenzierungspotenzialmedium	IMDM 20% Fetales Rinderserumalbumin 1% Nicht-essentielle Aminosäuren 1:1000 1-Thioglycerol

### 3.2 Zellkultur humaner induzierter pluripotenter Stammzellen (hiPSCs)

Hautbiopsien wurden von 3 gesunden, weiblichen Spendern der ERC IndivHeart-Kohorte isoliert, bei denen eine bestehende kardiovaskuläre Erkrankung mit einer klinischen Phänotypisierung (u.a. durch Magnetresonanztomographie, Echokardiographie) ausgeschlossen werden konnte. Die Entnahme der Hautbiopsie und die klinische Phänotypisierung erfolgten am Universitären Herzzentrum Hamburg (Leitung Prof. Stefan Blankenberg) durch Dr. Sabrina Schäfer und Dr. Mahir Karakas.

Hautfibroblasten wurden aus den Hautbiopsien isoliert, in Kultur genommen und mithilfe der Sendaivirus-Reprogrammierungs-Technologie (CytoTune-iPS *Sendai Reprogramming Kit*, #A1377801, *Life Technologies*) nach Herstellerangaben zu

hiPSCs reprogrammiert. Die hiPSCs wurden gepickt und bei einer Passage von ~5 erfolgte eine erste Kryokonservierung von mindestens 2 Gefriergefäßen pro Klon. Sowohl die Reprogrammierung als auch die Kultivierung der jungen Klone wurden von Dr. Aya Domke-Shibamiya und Dr. Sandra Laufer aus der HEXT Zellabteilung, UKE, durchgeführt. Zur Kultivierung der generierten hiPSCs wurde das kürzlich in unserem Institut etablierte und von Breckwoldt et al. (2017) publizierte Protokoll angewandt, mit der Ausnahme, dass die Zellen statt mit EDTA, enzymatisch mit Akkutase passagiert wurden. Wie im Protokoll beschrieben, wurde FTDA als Medium verwendet und die Zellen bei 100%iger Konfluenz passagiert. Die Kultivierung fand bei 5% CO<sub>2</sub> und 5% O<sub>2</sub> statt (Breckwoldt et al. 2017).

Um stabil fluoreszierende hiPSCs und resultierende hiPSC-CMs herzustellen, wurde das Fluoreszenzprotein Venus verwendet. Venus ist eine Variante des verbesserten GFPs, eGFP, dessen Anregung bei 514 nm und Emission bei 527 nm erfolgt. Es wurden 500.000 hiPSCs bei einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 0,2 mit dem selbstaktivierenden lentiviralen Vektor LeGO-EF1a-V2-Puro+ transduziert (Weber et al. 2010). Bei der Vektorkonstruktion wurde das Venusgen mit dem Gen *pac* über eine 2A-Sequenz verknüpft, dessen Expression zu einer Puromycinresistenz führt. Den beiden Genen wurde der Promoter EF1 $\alpha$  vorgeschaltet. Die Vektorkonstruktion und Austestung wurde von Dr. Kristoffer Riecken aus der Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation, UKE, durchgeführt. Dr. Tessa Werner, ehemals Doktorandin im IFEP, stellte die stabil exprimierende Venus-hiPSC-Linie her, die im Rahmen dieser Doktorarbeit expandiert und differenziert wurde.

### 3.2.1 Master-Zellbank

HiPSCs wurden unter ständiger Qualitätsdokumentation der Morphologie und Teilungsrate bis Passage ~20 expandiert und anschließend geerntet. Hierfür wurden hiPSCs zweimal in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und mit 10-minütiger Inkubation in Akkutase von der Kultivierungsoberfläche gelöst. ~20 Gefriergefäße, mit jeweils  $1 \times 10^6$  hiPSCs pro Zelllinie, wurden als Master-Zellbank (MCB) mit dem *Mr. Frosty* Gefrierbehälter (ThermoFisher Scientific) wie publiziert eingefroren (Breckwoldt et al. 2017). Die Generierung der 9 MCBs erfolgte mit der Unterstützung von Dr. Bärbel Ulmer (IEPT). MCBs wurden mit dem Durchflusszytometer auf Pluripotenz überprüft. Als Pluripotenzmarker diente *Stage-*

*specific Embryonic Antigen 3* (SSEA3). Für die Überprüfung wurden hiPSCs für 30 Minuten bei 4 °C in Anti-SSEA3 Antikörper (1:5, PBS mit 5% fetalem Rinderserum) inkubiert, anschließend zweimal in PBS gewaschen und mit auf Eis gekühltem Methanol für 20 Minuten bei 4 °C fixiert. Zwei weitere Waschschrte in PBS folgten. *PE Rat IgM Control* (BD, #553943, 1:80) wurde als Negativkontrolle verwendet. Proben wurden mit dem *BD FACSCanto II* Durchflussszytometer und der *BD FACSDiva Software 6.0* analysiert. SSEA3 Messungen wurden hauptsächlich von Birgit Klampe, IFEP, und Dr. Aya Domke-Shibamiya, HEXT Zellabteilung, UKE, durchgeführt. Die Pluripotenzanalyse wurde mit einer Analyse der spontanen Differenzierungspotenz (3.2.4.) verifiziert. Neben der Pluripotenz als wichtiges Qualitätsmerkmal wurden MCBs sowohl einer Karyotypisierungsanalyse (Chromosomenanalyse nach Giemsa-Färbung; Dr. Sigrid Fuchs, Institut für Humangenetik, UKE), als auch einer qPCR zur Verifizierung, dass hiPSCs frei von möglichen Sendaivirus-Restpartikeln sind (Dr. Aya Domke-Shibamiya, HEXT Zellabteilung, UKE), unterzogen. Zum Nachweis einer allgemeinen Sterilität der MCBs wurde eine Kontaminationskontrolle kultiviert, indem bei MCB-hiPSCs mehrere Tage kein Medium gewechselt wurde und potenzielle Kontaminationen so leichter unter dem Mikroskop zu detektieren gewesen wären. Die MCBs dienten als Grundlage jeder weiteren Analyse und Expansion, für die jeweils hiPSCs wie publiziert aufgetaut wurden (Breckwoldt et al. 2017).

### 3.2.2 Hochdurchsatz-Detektion von Pluripotenzmarker-Immunhistologie

Die Hochdurchsatz-Detektion von Pluripotenzmarker-Immunhistologie wurde von dem Kooperationspartner Dr. Ole Pless (Frauenhofer IME *Screening Port*, Hamburg) realisiert. Zusammenfassend wurden MCB-hiPSCs bei einer Dichte von 1000-4000 Zellen/96-well kultiviert und in 4% Paraformaldehyd fixiert. 0,1% Triton X-100 wurde zur 10-minütigen Permeabilisierung verwendet, nachdem die hiPSCs zunächst in 3-5% Serum-haltigen PBS für 30 Minuten geblockt und dann in der Primärantikörper- und 3-5% Serum-haltigen PBS-Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert wurden. Primärantikörper und deren Verdünnung können der Tabelle 3.2 entnommen werden. Als Sekundärantikörper wurde Alex Fluor 488 (1:500 in 3-5% serumhaltiger PBS-Lösung) bei RT für 4 Stunden lichtgeschützt inkubiert. Nukleusgegenfärbungen wurden mit 2 µM Hoechst 33258 (Invitrogen) durchgeführt. Zwischen allen

beschriebenen Arbeitsschritten erfolgte ein dreifacher Waschschrift mit PBS. Das *Opera High Content Imaging System* in Verbindung mit dem *Columbus Image Data Storage und Analysis System* (Software Version 2,6, PerkinElmer) wurden zur automatisierten Analyse verwendet. Dabei wurde auf den Mittelwert der Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle normalisiert (%). Für jede Probe wurden 2 Replikate analysiert.

Tabelle 3.2: Zur Pluripotenzanalyse verwendete Antikörper und ihre Handhabung.

Antigen	Verdünnung	Antikörper (Hersteller)
Oct3/4	1:500	sc-8629 (Santa Cruz Biotechnology)
Sox2	1:100	sc-17320 (Santa Cruz Biotechnology)
Lin28	1:300	11724-1-AP (Proteintech)
Nanog	1:500	ab109250 (Abcam)

### 3.2.3 PluriTest

PluriTest ist eine das ganze Genom abdeckende Expressionsanalyse, bei der die anhand eines Referenzpools festgelegten Faktoren „Pluripotenz“ und „Neuheit“ für die analysierten Proben kalkuliert und einander gegenübergestellt werden (Müller et al. 2008, 2011). Der *PluriTest* wurde von dem Kooperationspartner Dr. Ole Pless (Frauenhofer IME *Screening Port*, Hamburg) realisiert. Zusammenfassend wurde RNA von MCB-hiPSCs isoliert und 200-500 ng RNA mit dem *TargetAmp – Nano Labeling Kit* für *Illumina Expression BeadChip* (Epicentre) amplifiziert und biotinyliert. 750 ng der resultierenden Biotin-aRNA wurde mit *HumanHT12v4-Expression BeadChip* bei 58 °C und für 16-20 Stunden hybridisiert. Nach weiteren Wasch- und Färbeschritten, für die das Protokoll des Herstellers befolgt wurde, wurden die BeadChips mit der iScan Apparatur (Illumina) gescannt und Rohdaten (\*.idat Dateien) zur weiteren PluriTest Analyse unter [www.pluritest.org](http://www.pluritest.org) hochgeladen. PluriTest Ergebnisse wurden unter der Verwendung eines publizierten Skripts (<https://github.com/pluritest/pluritestCompared.git>) normalisiert. Für jede Probe wurden 2 Replikate analysiert. Zur Kalkulierung der Faktoren „Neuheit“ und

„Pluripotenz“ wird die Abweichung der gemessenen Probe zu einem Pool an Referenzproben bestimmt. Die Pluripotenz der Referenzproben wird hierbei als Standard genommen, von diesem abweichende Proben verhalten sich anders und sind daher für die Software „neu“. Die graphische Darstellung des PluriTests hebt den Bereich der pluripotenten Referenzwerte in rot hervor, teilweise pluripotente Zellen werden in hellblau und differenzierte Zellen in blau unterlegt dargestellt.

### 3.2.4 Spontane Differenzierung

MCB-hiPSCs wurden aufgetaut und einmal passagiert, bevor 90-100% konfluent gewachsene Zellen mit 6 µl/ml DNAase (2000 U/ml) enthaltener Kollagenase II von der Kultivierungsoberfläche gelöst wurden. Meistens geschah dies nach einstündiger Inkubation und als Zellteppich. Der Zellteppich wurde vorsichtig zweimal in RPMI 1640 (Biological Industries, 05-720-1B, zuzüglich 6 µl/ml DNase und 0,5% humanes Serumalbumin) gewaschen und in das Differenzierungspotenzialmedium überführt. Durch diese Arbeitsschritte verfiel der Zellteppich in kleinere Teile, die sich über Nacht zu EBs abrundeten. EBs wurden für sieben Tage in Kultur behalten und alle 2-3 Tage gefüttert. Proben für die anschließende qPCR wurden am Tag der Zellverarbeitung zu EBs und am siebten Tag entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die spontane Differenzierung wurde von Birgit Klampe (IEPT) durchgeführt.

### 3.2.5 Kardiale Differenzierung (hiPSC-CMs)

Für die Differenzierung der MCB-hiPSC zu CMs wurde ein EB-Format- und Wachstumsfaktor-basiertes Protokoll verwendet, das in unserem Institut etabliert und 2017 veröffentlicht wurde (Breckwoldt et al. 2017). Einen Überblick über die wesentlichen Arbeitsschritte zeigt Abbildung 3.1. Um mit einer großen hiPS-Zellanzahl die Differenzierung einleiten zu können, wurde 3 Wochen vor Differenzierungsbeginn mit dem Auftauen der MCB-hiPSCs und deren Expansion begonnen. Am ersten Tag der Differenzierung (*Stage 0*), wurden die expandierten und konfluent gewachsenen hiPSCs mit EDTA von der Kulturflaschenoberfläche gelöst, gezählt und  $30 \times 10^6$  Zellen pro 100 ml Medium in eine Magnetrührflasche überführt, deren Rotieren der Suspension über Nacht zur Bildung von EBs führte. Am folgenden Tag wurde die mesodermale Zellentwicklung durch die Aktivierung des

Wnt-Signalwegs eingeleitet (*Stage 1*). Hierfür wurden EBs zunächst aus der Magnetrührflasche entnommen und gewaschen. Daraufhin wurde das EB-Volumen in skalierten 15 ml-Reaktionsgefäßen geschätzt und ca. 200 µl EBs pro T175-Flasche in *Stage 1*-Medium mit enthaltenen Wachstumsfaktoren FGF, BMP4 und Activin-A kultiviert. *Stage 1*-Medium, wie auch alle folgenden Medien, wurde täglich gewechselt. Die *Stage 1*-Kultivierung fand für 3 Tage und unter hypoxischen Bedingungen statt. Der mesodermalen Zellentwicklung folgte die kardiale Induktion durch Wnt-Signalweginhibierung (*Stage 2*, Tag 5 der Differenzierung). Hierfür wurden die EBs gewaschen, um die Wnt-Signalweg-aktivierenden Wachstumsfaktoren FGF, BMP4 und Activin-A zu entfernen. Das EB-Volumen wurde wie in *Stage 1* geschätzt und in *Stage 2*-Medium I mit Wnt-Inhibitor XAV aufgenommen. Kultivierung ab diesem Stadium fand unter normoxischen Bedingungen statt. Nach 3 Tagen wurde zu einem *Stage 2*-Medium II gewechselt, das B27 mit Insulin und den Wnt-Inhibitor XAV enthielt. In diesem Medium konnten ab Tag 10 die ersten kontrahierenden EBs beobachtet werden. Ab Tag 11 wurde ein XAV-freies Medium, aber B27 und Insulin-enthaltendes Medium verwendet (*Stage 2*-Medium III). An Tag 17 der Differenzierung wurden die kontrahierenden EBs mit HBSS gewaschen und anschließend für 3-4 Stunden mit Kollagenase-II, 10 µM Y-27632 und BTS dissoziiert. Die Reaktion wurde nach dem erfolgreichen Zerfall der EBs zu Einzelzellen mit DNase in RPMI abgestoppt, woraufhin die Zellen gezählt und entweder zur Herstellung von EHTs genutzt oder eingefroren wurden. Zum Einfrieren der Kardiomyozyten wurden Zellen in Einfriermedium (10% DMSO-haltiges FCS) aufgenommen und mit einem *Mr. Frosty* Gefrierbehälter (ThermoFisher Scientific) nach Herstellerangaben zunächst bei -80 °C und in einem weiteren Schritt bei -150 °C gefroren und gelagert. Die kardiale Differenzierung, bzw. die vorherige hiPSC-Expansion, wurde teilweise von Dr. Bärbel Ulmer, Birgit Klampe und Thomas Schulze (IEPT) unterstützt.

## Material und Methoden



Abbildung 3.1: Fließschema der kardialen Differenzierung. Dargestellt sind die wichtigsten Schritte des Protokolls bezüglich der Zeitpunkte, Kulturformate, Medien und Kulturbedingungen.

Die Differenzierungsreinheit wurde mit der Durchflusszytometrie überprüft. Hierfür wurde der Kardiomyozyten-spezifische kardiale Troponin T (cTNT) Antikörper (Miltenyi Biotech) verwendet. Abbildung 3.2 dient als Beispielanalyse.

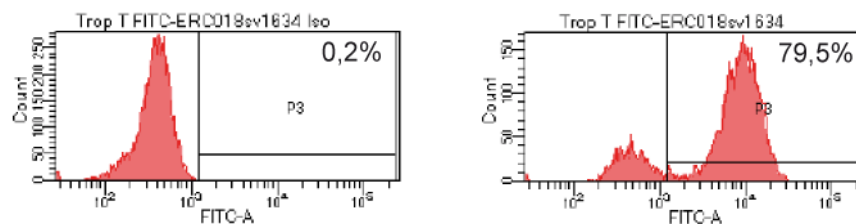


Abbildung 3.2. Reinheit der kardialen Differenzierung. Repräsentatives Durchflusszytometrie-Ergebnis für die kardial-gerichtete Differenzierung. Als kardialer Marker diente kardiales Troponin (cTNT). Beispielergebnis der Isotyp-Kontrolle (0,2%) und der Differenzierungsprobe (79,5%).

### 3.3 Neonatale Rattenpräparation

Die Präparation von neonatalen Rattenherzen erfolgte wie in Hansen et al. (2010) beschrieben. Von neonatalen Wistar-Ratten (0-3 Tage nach der Geburt) wurde der Ventrikel mechanisch abgetrennt und mehrere Male mit DNase und Trypsin verdaut und anschließend in NKM aufgenommen. Die Rattenpräparation wurde von June Uebeler und Thomas Schulze durchgeführt (IEPT).

### 3.4 Künstliches Herzgewebe - *Engineered Heart Tissue* (EHT)

#### 3.4.1 Herstellung von humanen EHTs

Die Herstellung der humanen EHTs erfolgte wie kürzlich publiziert (Breckwoldt et al. 2017). Es wurden sowohl frisch dissoziierte als auch aufgetaute hiPSC-Kardiomyozyten für die EHT-Herstellung verwendet. Zunächst wurden EHT-Gussformen hergestellt. Hierfür wurde 1,5 ml flüssige Agarose (2% PBS, aufbewahrt bei 60 °C) in 24-Well Platten vorgelegt, in die Positivformen aus Polyetrafluoethylen (PTFE) platziert wurden. Sobald die Agarose aushärtete, konnten die PTFE-Formen aus der Agarose gezogen werden und Silikonmatten in die neu geformten Gussformen gehängt werden. Der EHT-Mastermix wurde bis auf die Zugabe von Thrombin in einem Zentrifugenröhrchen vermischt. Die genaue Zusammensetzung kann der Tabelle 3.3 entnommen werden. Kurz vor dem Gießen eines jeden EHTs wurden 3 µl Thrombin in 100 µl aufgenommen und vor der Koagulation des Mastermix in die jeweilige EHT-Gussform pipettiert. Zur Polymerisierung wurden die EHTs bei 37 °C für eine Stunde inkubiert, dann mit DMEM überschichtet und nach einer weiteren halben Stunde Inkubationszeit aus der Gussform in eine mit EHT-Medium gefüllte Kulturschale überführt. EHTs wurden bei 37 °C, 7% CO<sub>2</sub>, 40% O<sub>2</sub>, und 98% rH in EHT Medium kultiviert. Das Medium wurde dreimal pro Woche gewechselt.

#### 3.4.2 Herstellung neonataler Ratten-EHTs mit/ohne humanem EB

Die Herstellung der neonatalen Ratten-basierten EHTs entspricht in großen Teilen der Herstellung der humanen EHTs (siehe 3.4.1.). Wie der Tabelle 3.3 zu entnehmen, unterscheidet sich der *Mastermix* der Ratten-EHTs jedoch in der Zellzahl. Zusätzlich sind keine Matrixverstärkung durch Matrigel und kein Zusatz von



Y-27632 für das Überleben der Zellen notwendig. Das Verhältnis von 2xDMEM, Fibrinogen und Thrombin ist in beiden Ansätzen jedoch dasselbe.

Um EHTs+EB herzustellen, wurden EBs zur besseren Sichtbarkeit aus den, für die Differenzierung verwendeten, T175 Flaschen in 6-Well Zellkulturschalen überführt. Deren Herstellung wurde in 3.2.5 beschrieben. EBs wurden in der aus Agarose bestehenden EHT-Gussform platziert, bevor der *Mastermix* hinzugefügt wurde. Hierfür wurde jeweils ein EB mit einer 100 µl Pipettenspitze aus der Zellkulturschale entnommen und in die Nähe eines der beiden in die Gussform ragenden Silikonstäbchen mittig pipettiert. Um die Position des EBs durch das Zufügen des *Mastermix* nicht zu beeinträchtigen, wurde dieser vorsichtig in die der EB-gegenüberliegenden Seite, in die Nähe des zweiten Silikonstäbchens, pipettiert.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des *Mastermix* für ein EHT inkl. 10% Pipettierfehler.

Komponente	Humanes EHT	Ratten-EHT
Zellzahl	880.000	625.000
NKM	86,9 µl	98 µl
2xDMEM	6,2 µl	6,2 µl
10% Matrigel	11 µl	-
0,1 % Y-27632	0,11 µl	-
Fibrinogen	2,8 µl	2,8 µl
Thrombin	3 µl	3 µl

### 3.4.3 Video-optische Kontraktionsaufnahmen der EHTs

Mithilfe der im Haus etablierten video-optischen Messapparatur und der dazugehörigen CTMV-Software (Consulting Team Machine Vision, Pforzheim) wurden kardiale Parameter wie Kraft und Kontraktionskinetik aufgenommen. Details

zur Funktionsweise dieser Apparatur können der Publikation Hansen et al. (2010) und der Homepage der Firma EHT Technologies, durch die diese Apparatur vermarktet wird (<http://www.eht-technologies.de>), entnommen werden. Zur video-optischen Aufnahme wurden EHTs in einen, mit Glasdeckel ausgestatteten und bei 37 °C, 7% CO<sub>2</sub>, 72% N<sub>2</sub> und 21% O<sub>2</sub> eingestellten, Inkubator überführt. Die X, Y und Z-Achsen einer über dem Glasdeckel angebrachte Videokamera wurde adjustiert, um ein geeignetes Video jedes einzelnen EHTs aufzunehmen (Abbildung 3.3). Die Videos wurden in die CTMV-Software eingelesen, die anhand von Figurerkennung die Bewegung eines definierten Bereichs im EHT über die Videoaufnahmezeit misst und, unter Berücksichtigung der Elastizität der Silikonstäbchen, als Kontraktionskurve ableitet (Abbildung 3.3). Neben der Höhe der Kraft werden so Kontraktions-/Relaxationszeiten (TTP/RT) und –geschwindigkeiten und auch die Frequenz und Kontraktionsregularität berechnet.

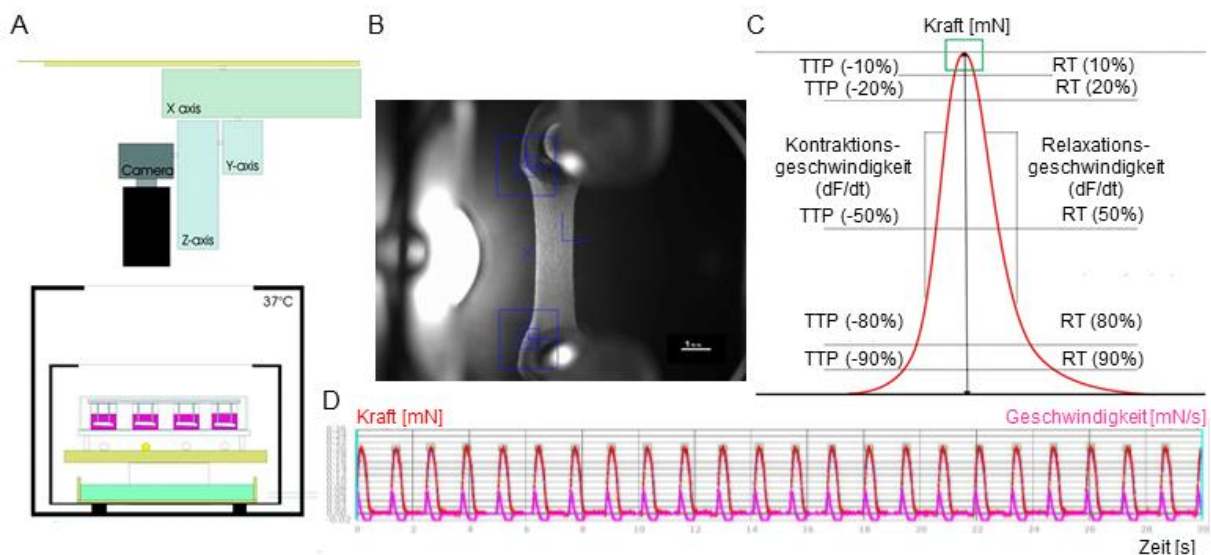


Abbildung 3.3: Video-optische Kontraktionsaufnahme der EHTs (adaptiert von Hansen et al. 2010). (A) Schematische Darstellung der Messapparatur, in der eine EHT-Kulturschale unter definierten Parametern (Temperatur, Gaseinstrom) analysiert wird, indem eine über dem Glasdeckel angebrachte Kamera von EHT zu EHT fährt. (B) Beispiel eines aufgenommenen EHTs. (C) EHT-Kontraktionsparameter, die von der Software CTMV berechnet werden. (D) Beispiel einer Kontraktionsmessung, die durch die Videoaufnahme eines EHTs über die Zeit erstellt wird.

### 3.5 Funktionelle Analysen humaner EHTs

Sobald die EHTs die Plateauphase der Kraftentwicklung erreichten (~Tag 21), wurde mit der funktionellen Analyse begonnen. Kraftmessungen zur Bestimmung der Kraftplateauphase wurden zweimal wöchentlich in EHT Medium durchgeführt, funktionelle Analysen in modifizierter Tyrodelösung. Die Tyrodelösung wurde in den Messplatten über Nacht im Inkubator bei 37 °C, 7% CO<sub>2</sub>, 40% O<sub>2</sub>, und 98% rH präequilibriert. Die Kraftmessungen wurden von der Masterstudentin Ina Hansi unterstützt.

Sofern nicht anders angegeben, wurden EHTs zunächst in 1,8 mM Calcium-haltiger Tyrodelösung (= physiologische Calciumkonzentration) gemessen, um einen Kraftreferenzwert zu erhalten. Daraufhin wurden die EHTs für 30 Minuten in 0,6 mM Calcium-haltiger Tyrode ( $\approx$  EC<sub>50</sub>) gewaschen und in eine weitere, vorbereitete Messplatte mit 0,6 mM Calcium-haltiger Tyrode überführt, in der die experimentelle Intervention durchgeführt wurde. Diese gewählte Calciumkonzentration erlaubte die Messung sowohl positiv- als auch negativ-inotroper Effekte je nach Intervention. In jeder Calciumkonzentration wurden EHTs sowohl unstimuliert als auch elektrisch stimuliert (1,5 Hz) gemessen.

Die elektrische Stimulation erfolgte durch in die Messplatte integrierte Karbonblöcke, die an einen Elektrostimulator mit den Standardeinstellungen (elektrische Spannung: 2,5 V, biphasischer Puls: 4 ms) angeschlossen wurden. Die genaue Prozedur wird in Hirt et al. (2014) beschrieben. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde eine Stimulationsfrequenz von 1,5 Hz verwendet (spontane EHT Frequenz  $\times$  ~1,5).

Für die funktionellen Analysen der 18 *Batches* wurde eine Standardvorgehensweise befolgt. Zunächst wurde angestrebt, die Experimente pro *Batch* innerhalb von 5 Tagen umzusetzen. Außerdem wurden die Experimente immer in der gleichen Reihenfolge durchgeführt ( $\triangleq$  Reihenfolge der hier aufgeführten Ergebnisse) und, sofern möglich, EHTs pro *Batch* alternierend verwendet, d.h. es wurden dieselben EHTs pro *Batch* nur jeden zweiten Tag für Experimente verwendet. Zur weiteren Verbesserung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse fand die elektrische Stimulation für alle EHTs bei 1,5 Hz statt. Ausschlusskriterien für die funktionellen Analysen waren (i) eine EHT-Plateaukraft von unter 0,1 mN im Medium, (ii) EHTs, die nicht bei 1,5 Hz folgten.

### 3.5.1 Calciumkonzentrations-Wirkungskurve

Nach der initialen Bestimmung des Kraftreferenzwertes in 1,8 mM Calcium-haltiger Tyrodelösung unter (un)stimulierten Bedingungen, wurden EHTs in einer 0,3 mM Calcium-haltigen Tyrodelösung gewaschen bis sich eine stabile EHT-Kraft von ~0,2 mN eingestellt hat (nach ~10-30 Minuten). EHTs wurden daraufhin in eine weitere Messplatte mit 0,3 mM Calcium-haltiger Tyrodelösung überführt und elektrisch stimuliert gemessen. Anschließende Messungen erfolgten ausschließlich elektrisch stimuliert und in Tyrodelösung mit ansteigender Calciumkonzentration von 0,4, 0,5, 0,6, 1,0, 1,2, 1,4, 1,8, 2,4, 3,3 und 5,5 mM Calcium. Die gemessenen Kräfte in Abhängigkeit zur Calciumkonzentration wurden zur Erstellung einer Calciumkonzentrations-Wirkungskurve und Berechnung des Calcium EC<sub>50</sub>-Wertes verwendet.

### 3.5.2 Kraft-Frequenzbeziehung

Zur Analyse der Kraft-Frequenzbeziehung wurden EHTs in 0,6 mM Calcium-haltiger Tyrodelösung bei ansteigender Frequenz gemessen. Angefangen bei 0,7 Hz wurde die Frequenz in 15-minütigen Schritten um je 0,2 Hz erhöht, bis die EHTs der Frequenz der elektrischen Stimulation nicht mehr folgten.

### 3.5.3 Wirkung von Isoprenalin und Carbachol

Die Messung der EHTs nach einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation erfolgte in 0,6 mM Calcium-haltiger Tyrodelösung nach der Zugabe von 100 nM Isoprenalin (Stammlösung: 10  $\mu$ M gelöst in Tyrodelösung) und einer ~15-minütigen Inkubationszeit. Im Anschluss wurde die Wechselwirkung von 10  $\mu$ M Carbachol (Merck, 212385, Stammlösung: 1 mM gelöst in Tyrodelösung) nach ~15-minütiger Inkubationszeit analysiert. Relative Effektgrößen (Abbildung 3.4) wurden wie folgt berechnet:

Kraftdifferenz (mN) unter

- a) Isoprenalin - 0,6 mM Calcium
- b) 1,8 mM Calcium - 0,6 mM Calcium
- c) Isoprenalin - Carbachol

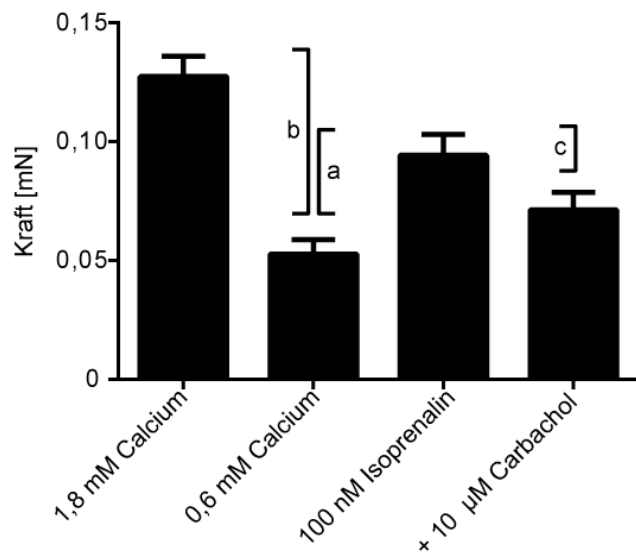


Abbildung 3.4: Berechnung der relativen Effektgrößen.

Relative Isoprenalin Effektgrösse (%) =  $a/b \cdot 100$

Relative Carbachol Effektgrösse (%) =  $c/a \cdot 100$

### 3.5.4 Post-Pausenbeziehung

Zur Analyse der Post-Pausenbeziehung wurden EHTs in 0,6 mM Calcium-haltiger Tyrodelösung für 120 Sekunden bei der höchstmöglichen Frequenz stimuliert, bei der EHTs noch folgten. Nach 120 Sekunden wurde die elektrische Stimulation unterbrochen und erst wieder initiiert, nachdem die erste spontane Kontraktion des EHTs erfolgt war. Sowohl die Kraftdifferenz zwischen zuletzt stimulierter und erster spontanen EHT-Kontraktion, als auch die Pause zwischen diesen beiden genannten Kontraktionen wurde ermittelt.

### 3.5.5 Kontraktionsregularität

Die Entstehung von Arrhythmien wurde über einen Messzeitraum von 10 Stunden analysiert. Hierfür wurden die zu messenden EHTs in 2 Gruppen geteilt und entweder in 1,8 mM oder in 3 mM Calcium-haltige Tyrodelösung überführt. Die

Messung fand unstimuliert statt. Zur Auswertung wurde der *RR' scatter* als Parameter für Kontraktionsregularität verwendet. Der *RR' scatter* entspricht dabei dem Interdezilbereich der medianen Abweichung der Zeit zwischen den spontanen Kontraktionskurven.

### 3.6 Funktionelle Analysen der Ratten-EHTs/+EB

Ab dem Beginn kohärenter Kontraktionen, die nach etwa sieben bis zehn Tagen zu erkennen waren, wurden die EHTs+EB und Kontroll-EHTs zweimal pro Woche gemessen. Anhand dieser Messungen wurde bestimmt, ab welchem Tag die EHTs+EB das humane Schlagmuster übernommen haben. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle im Folgenden aufgeführten funktionellen Analysen durchgeführt.

#### 3.6.1 Ivabradin

Die Wirkung von Ivabradin auf EHTs+EB und Kontroll-EHTs wurde sowohl in 1,8 mM Calcium-haltiger Tyrodelösung (siehe 9.4.3) als auch in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (Zusatz von 1,8 mM  $\text{CaCl}_2$ ) gemessen. Beide Medien wurden einen Tag vor dem geplanten Experiment in 24-Well-Messplatten überführt und über Nacht im Inkubator äquilibriert (37 °C, 7%  $\text{CO}_2$ , 40%  $\text{O}_2$ , 98% rH). EHTs+EB und Kontroll-EHTs wurden in die vorbereiteten 24-Well-Platten überführt und in der Messapparatur platziert. Nach 30-minütiger Inkubationszeit wurde die Messung des Referenzwertes durchgeführt. Darauf folgend wurde ein Teil der EHTs+EB und Kontroll-EHTs mit 1  $\mu\text{M}$  Ivabradin versetzt, der andere Teil diente als Zeitkontrolle. EHTs+EB und Kontroll-EHTs wurden halbstündlich über 2,5 Stunden gemessen.

### 3.7 Messung von Calciumtransienten

Die Calciumtransienten wurden in 1,8 mM Calcium-haltiger Tyrodelösung gemessen, welche über Nacht bei 37 °C, 7%  $\text{CO}_2$ , 40%  $\text{O}_2$ , 98% rH äquilibriert wurde. Zunächst wurden EHTs+EB in 1,8 mM Calcium-haltiger Tyrodelösung für 15 Minuten gewaschen, woraufhin sie in eine neue Messplatte mit 1,8 mM Calcium-haltiger Tyrodelösung, 30  $\mu\text{M}$  des unpolaren Calciumindikators Fluo-4 (AM Ester) und 0,02% Pluronic (zur besseren Dispergierung) überführt wurden. Nach 30 Minuten wurden Calciumtransienten bei ~34 °C mit einem konfokalen Mikroskop (Nikon A1), das mit einem 10x Air Objektiv und Resonanzscanner (256x512 Pixel) ausgestattet war,

aufgenommen. 488 nm wurden zur Fluo-4-Erregung verwendet, 500-550 nm für dessen Emission. Videoaufnahmen wurden mit der *NIS Elements Advanced Research*-Software von Nikon analysiert und X- und Y-justiert, um Artefakte der Kontraktionsbewegung zu minimieren. Die Messungen wurden zusammen mit Alexander Fischer (Institut für Biochemie und Molekularbiologie, UKE, Hamburg) durchgeführt. Die *DVDVideoSoftFree-Studio* Software wurde verwendet, um die Videoaufnahmen in einzelne Bilder zu konvertieren (Abbildung 3.5A), die daraufhin mit *ImageJ* ausgerichtet wurden. Diese wurden verwendet, um zur Quantifizierung Calciumsignalintensitäten in EB, Übergangszone und Ratten-EHT zu messen. Hierfür wurden Messrechtecke spezifisch im EB, Übergangszone und Ratten-EHT positioniert, um über die Zeit (T1, T3) Pixelintensitäten zu messen. Von diesen wurde das jeweilige Positions-spezifische Hintergrundrauschen an Zeitpunkt T0/*Baseline* BL abgezogen (Abbildung 3.5B). Die resultierende Pixelintensitäten wurden schließlich für jedes EHT+EB auf 0 und die höchste Pixelintensität normalisiert. Für jedes gemessene EHT+EB wurden sowohl für T0, T1 als auch T3 drei aus dem Video exportierte Einzelbilder verwendet, um einen möglichen Bias bei der Auswahl der Bilder zu minimieren. Des Weiteren wurden Calciumsignalintensitäten mit dem *ImageJ Plugin HeatMap Histogram* in eine *Heatmap* konvertiert.

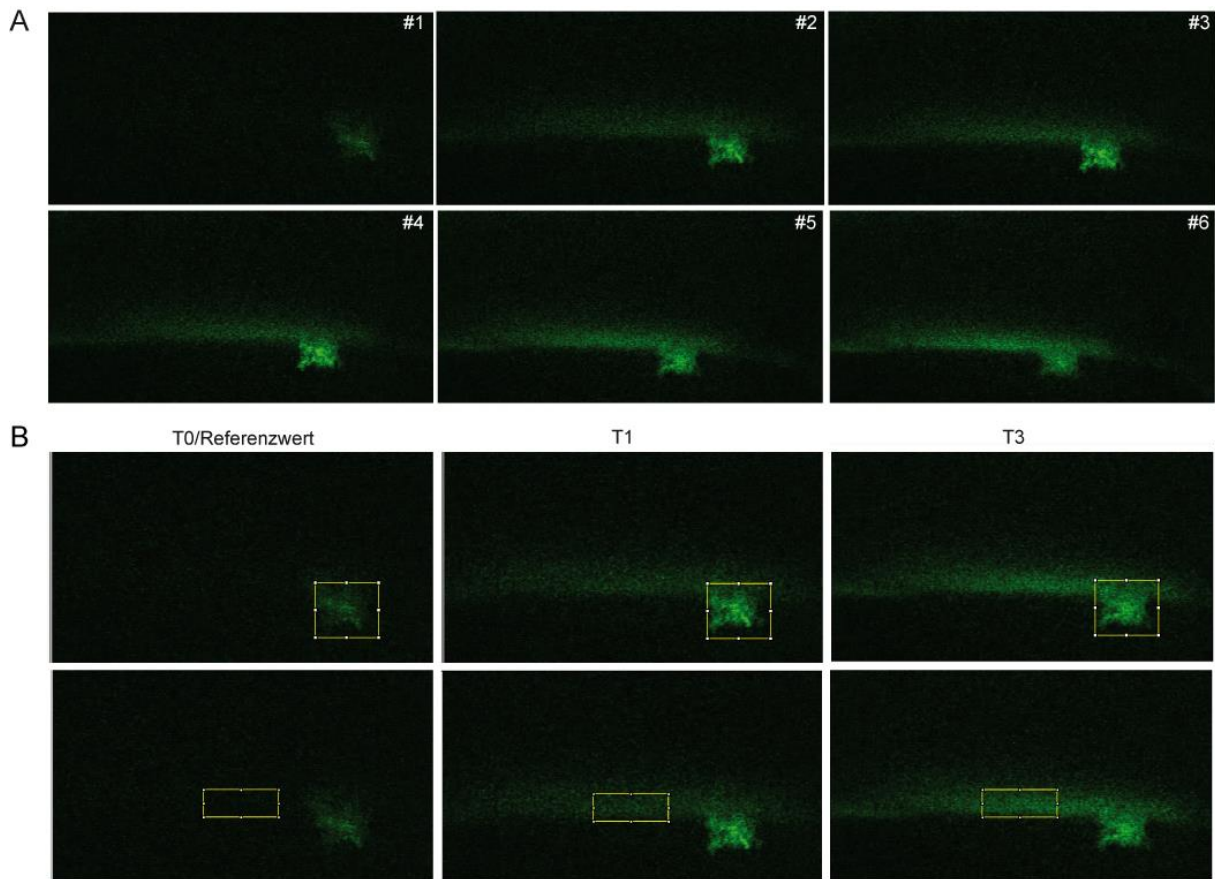


Abbildung 3.5. Analyse der Calciumtransienten. (A) Konvertierung der Videoaufnahme zu Einzelbildern. (B) *ImageJ*-Analyse. Zur Quantifizierung der Calciumsignalintensitäten gesetzte Messbereiche (gelb) im EB und Rattengewebe (Pixelintensitäten  $\triangleq$  Calciumsignalintensität) über die Zeit (T0-T3).

## 3.8 Messung von Aktionspotenzialen

Aktionspotenziale wurden wie kürzlich publiziert (Lemoine et al. 2017, 2018) aufgenommen. *Standard Sharp* Mikroelektroden wurden verwendet, um intakte EHTs+EB in 1,8 mM Calcium-haltiger Tyrodelösung bei  $36,5 \pm 0,5$  °C zu messen. Die Tyrodelösung unterschied sich geringfügig von der für die übrigen Experimente verwendeten und ist folgendermaßen zusammengesetzt (in mmol/l): NaCl 127; KCl 5,4;  $MgCl_2$  1,05; Glucose 10;  $NaHCO_3$  22;  $NaHPO_4$  0,42 und äquilibriert bei  $36,5 \pm 0,5$  °C, 5  $CO_2$ , pH 7,4. Borosilikatglaspipetten (äusserer Diameter 1,5 mm, innerer Diameter 0,87 mm) wurden auf einen DMZ-Universal Puller (Zeitz) gezogen. Die Pipetten hatten einen Widerstad von 20-50 M $\Omega$  bei 3 mol/l KCl. Die Pipetten wurden an einen hydraulischen Mikromanipulator montiert, um eine vorsichtige Handhabe der EHTs zu gewährleisten. Signale wurden mit einem BA-1s npi Amplifiziergerät verstärkt. Für die Messungen wurden EHTs von ihren



Silikonhalterungen entfernt und ohne Streckung in der Apparatur befestigt. Die Positionen von EB, Übergangszone und Ratten-EHT wurden durch ein, an der Apparatur angebrachtes, Stereomikroskop (Olympus SZ61) lokalisiert. Mithilfe der *Lab-Chart* Software (ADInstruments) wurden Aktionspotenziale aufgenommen und verarbeitet. Sowohl die Messung als auch die Analyse der Aktionspotenziale wurden von Marc Lemoine (IEPT) durchgeführt.

### 3.9 Immunhistologie

Sowohl für Immunhistofluoreszenz- als auch Immunhistochemiefärbungen wurden EHTs+EB nach ~30 Tagen Kultivierung zunächst in PBS gewaschen und dann über Nacht bei 4 °C an den Silikonhalterungen in Formaldehyd (Roti-Histofix 4%, Carl Roth, P087.3) fixiert. Nach der Fixierung wurden die EHTs+EB vorsichtig mit einer Pinzette von den Silikonhalterungen gestreift und in TBS überführt. Im Anschluss wurden diejenigen EHTs, die quer geschnitten werden sollten, zur besseren Ausrichtung in 4%iger Agarose eingebettet. Entwässerung, Einbettung in Paraffin, Anfertigung der 4 µm tiefen Längs- und Querschnitte wurden von Kristin Hartmann aus der HEXT Mauspathologie, UKE, durchgeführt.

#### 3.9.1 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen wurden von Kristin Hartmann aus der HEXT Mauspathologie, UKE, angefertigt. Nukleusgegenfärbungen mit Hämatoxylin I und Bluing-Reagent (Ventana) wurden standardisiert für 4 Minuten inkubiert. Für die immunhistologischen Färbungen wurden die Paraffinschnitte zunächst, je nach Antikörper, für 30-60 Minuten mit einem Zitrat-haltigen Puffer (pH 6,0) antigendemaskiert und anschließend mit dem Färbevollautomaten Ventana BenchMark XT (Roche) gefärbt (Tabelle 3.4). Bis auf Ku80 wurden alle Antikörper mit dem auf Multimer-Technologie basierten *UltraView Universal DAB Detection Kit* (Roche) visualisiert. Mikroskopische Aufnahmen der Färbungen wurden mit einem Leica DMD 108 Mikroskop angefertigt.

Tabelle 3.4: Immunhistologisch verwendete Antikörper und deren Handhabung.

Antigen	Antigendemaskierung (Dauer in Minuten)	Verdünnung	Antikörper (Hersteller)
$\alpha$ -Actinin	30	1:200	M0874 (Dako)
Cx43	30	1:100	610061 (BD Biosciences)
Cx45	30	1:300	MBS248865 (MyBioSource)
Ku80	60/12	1:500	2180 (CellSignalingTech.)
N-cad	60	1:200	610921 (BD Biosciences)
HCN4	12	1:100	73150 (NeuroMab)

### 3.9.2 Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenzfärbungen wurden sowohl von Kristin Hartmann (HEXT Mauspathologie, UKE), als auch von Katharina Scherschel (Institut für Kardiologie-Elektrophysiologie, Herzzentrum, UKE) durchgeführt, wodurch sich die Protokolle leicht unterscheiden.

Die Ku80 und HCN4 Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen wurden angefertigt wie kürzlich publiziert (Jungen et al. 2017). Zur Antigendemaskierung wurden Paraffinschnitte für 12 Minuten im 10 mM Zitratpuffer (pH 6)-haltigen Druckkochtopf inkubiert. Daraufhin wurden Schnitte für 10 Minuten in 0,1% Triton X-100-haltigen TBS-Puffer permeabilisiert und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur in 3% Rinderserumalbumin-haltigem TBS geblockt. Um Autofluoreszenz zu minimieren, wurden die Schnitte zusätzlich in 0,25% *Sudan Black* B-verdünnter 70%iger EthanolLösung (Roth) inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit TBS wurden die primären Antikörper Ku80 und HCN4 in 1% BSA/TBS verdünnt und die Proben in dieser Verdünnung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden die Schnitte mit den fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern (Alexa Fluor Ziege anti-Kaninchen 488 und Alexa Fluor Ziege anti-Maus igg1 568, Life

Technologies) für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nachdem die Schnitte mit DAPI Fluoromount G (Southern Biotech) eingebettet wurden, konnten Aufnahmen nach einer kurzen Trocknungszeit mit dem konfokalen Mikroskop (Zeiss LSM 800) angefertigt werden.

Zur Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Ku80 und  $\alpha$ -Actinin wurden die Schnitte eine Stunde im 10 mM Zitratpuffer (pH 6)-haltigen Druckkochtopf Antigen-demaskiert. Nach mehreren Waschschritten in Wasser und Tris-Puffer folgte eine Inkubation in 0,25% *Sudan Black B*-verdünnter 70%iger Ethanollösung, um die Autofluoreszenz zu minimieren. Diese wurde durch das Waschen mit Wasser entfernt. Anschließend wurden die Schnitte in *Blocker BL Fluorescent* Puffer (ThermoFisher Scientific) geblockt. Derselbe Puffer wurde verwendet, um die primären Antikörper zu verdünnen, in dem die Schnitte über Nacht bei 4 °C inkubierten. Nach mehreren Waschschritten in Tris-Puffer wurden die Schnitte mit den fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern (Alexa Fluor Ziege anti-Kaninchen 488 und Alexa Fluor Ziege anti-Maus 555) für 1,5 Stunden bei RT inkubiert. Nachdem die Schnitte mit Tris-Puffer gewaschen wurden, wurden sie mit DAPI Fluoromount G (Southern Biotech) eingebettet. Aufnahmen erfolgten nach einer kurzen Trocknungszeit mit dem konfokalen Mikroskop (Zeiss LSM 800).

### 3.9.3 Auswertung der Immunhistochemie

Um die Cx43 Färbungen zu quantifizieren, wurden die Aufnahmen mit *ImageJ* bearbeitet und analysiert. Die Aufnahmen wurden zunächst im HBS-*Stack* geöffnet und die Helligkeitsebene genutzt, um den Kontrast zu erhöhen. Anhand einer konsekutiven Ku80 Färbung wurden die Bereiche EB, Überganzzone und Rattengewebe identifiziert und die jeweiligen Flächenanteile (ROI) dem HBS-*Stack*-geöffneten Bild zugewiesen. Durch eine Farberkennung (schwarze Färbung von Cx43) wurde mithilfe von *ImageJ* der Färbeanteil in dem jeweiligen ROI quantifiziert (%).

### 3.10 RNA-Präparation und quantitative *real time* PCR

Die RNA-Aufreinigung erfolgte mit dem *RNeasy Plus Mini Kit* (QIAGEN). Zu jedem schockgefrorenen EHT wurden 350  $\mu$ l RLT Plus Puffer, versetzt mit 2-Mercaptoethanol, pipettiert. Eine Stahlkugel wurde zu jedem 2 ml Reaktionsgefäß

gegeben, mit dem das EHT in einem *Tissue Lyser* (QIAGEN) für 2 Minuten und bei 30 Hz homogenisiert wurde. Das Lysat wurde anschließend auf eine gDNA-Eliminierungssäule gegeben und das Protokoll des Herstellers zur weiteren Aufreinigung befolgt. Resultierende RNA-Konzentrationen wurden für die weitere Analyse mit der *NanoString Technology* mit dem Qubit RNA Broad Range Assay Kit (Qubit) gemessen, zur weiteren quantitativen *real time* PCR-Analyse (qPCR) mit dem Nanodrop™ ND-1000 Photometer (ThermoFisher Scientific Inc.). Zur Genexpressionsanalyse mit der *NanoString Technology* wurden 50 ng RNA zunächst mit, für unser Institut hergestellten, kundenspezifischen *Gene Expression CodeSets* (NanoString) hybridisiert und anschließend in den *nCounter SPRINT Profiler* zur Analyse überführt (Prondzynski et al. 2017). Die Transkription wurde mit der Nanostring nSolver™ Software 4.0 auf fünf Haushaltsgene normalisiert. Das verwendete CodeSet ist der Tabelle 9.3 im Anhang zu entnehmen (9.4.8). Die normalisierten Transkriptionsdaten wurden mit der Software Perseus Version 1.6.1.3. (<https://maxquant.net/perseus/>) zur Erstellung von *Heatmap*, *Volcano Plot*, *Principal Component Analysis* (PCA) verwendet (Tyanova et al. 2016). Für die PCA wurde der Benjamini-Hochberg (FDR:  $p < 0,05$ ) verwendet, die *Volcano Plot Analysis* erfolgte mit einem zweiseitigen *Student's t-Test* und einer FDR mit  $p < 0,05$ . Zur Erstellung der *Heatmap* wurden die Rohwerte verwendet, um eine Pearson Korrelation durchzuführen.

Um eine qPCR durchführen zu können, wurde die RNA zunächst mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) und *random RT-Primer* (Applied Biosystems) in einer reversen Transkription (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierbei wurde das vom Hersteller angegebene Protokoll verwendet. Der PCR-Ansatz ist in Tabelle 3.5 gezeigt.

## Material und Methoden

Tabelle 3.5: Reaktionsansatz der reversen Transkriptase.

Komponente	Volumen pro Reaktion
10x RT Puffer	2,5 µl
25x dNTP Mix	1,0 µl
10x random RT-Primer	2,5 µl
OneStep RT-PCR Enzym	1,0 µl
RNA	500 ng
Nuklease-freies Wasser	ad 25 µl

Nach dem in Tabelle 3.6 verwendeten PCR-Programm lag die cDNA in einem 25 µl Reaktionsgemisch gelöst vor.

Tabelle 3.6: Ablauf der reversen Transkriptase.

Zeit (min)	Temperatur (°C)	Beschreibung
10	25	Initiation
120	37	Reverse Transkriptase
5	85	Denaturierung
∞	4	Programmende

Die darauf folgende qPCR wurde mit einem ABI PRISM 7900HT *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) laut Herstellerhandbuch umgesetzt. Die Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit wurde mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes (*EvaGreen*; Solis Biodyne; verwendet nach Herstellerempfehlung) realisiert, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert. Auf technische Ungenauigkeiten, wie

## Material und Methoden

Pipettierfehler, wurde mit der Expression des Haushaltgens  $\beta$ -Glucuronidase (GUSB) normalisiert. Außerdem wurde jede Probe in dreifacher Ausfertigung analysiert.

Tabellen 3.7 und 3.8 zeigen die Zusammensetzung des qPCR-Mastermix und den entsprechende Programmablauf.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung des qPCR-Mastermix.

Komponente	Volumen pro Reaktion ( $\mu$ l)
<i>EvaGreen Mastermix</i>	2,0
<i>Primer</i> vorwärts/revers-komplementär	0,5
cDNA	2,0
Nuklease-freies Wasser	5,5

Tabelle 3.8: Ablauf der qPCR.

Zyklen	Zeit (s)	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Beschreibung
1	120 600	50 95	Initialisierung der Polymerase
40	15 60	95 60	Denaturierung, Primeranlagerung, Elongation
1	15 15 15	95 60 95	Dissoziationsphase

### 3.11 Statistik

Alle Daten wurden mit der GraphPad Prism 6 Software ausgewertet und sind zur besseren Sichtbarkeit (siehe Abbildung 3.6) als arithmetischer

Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) in den graphischen Abbildungen gezeigt. Tabellen zeigen den arithmetischen Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SD).

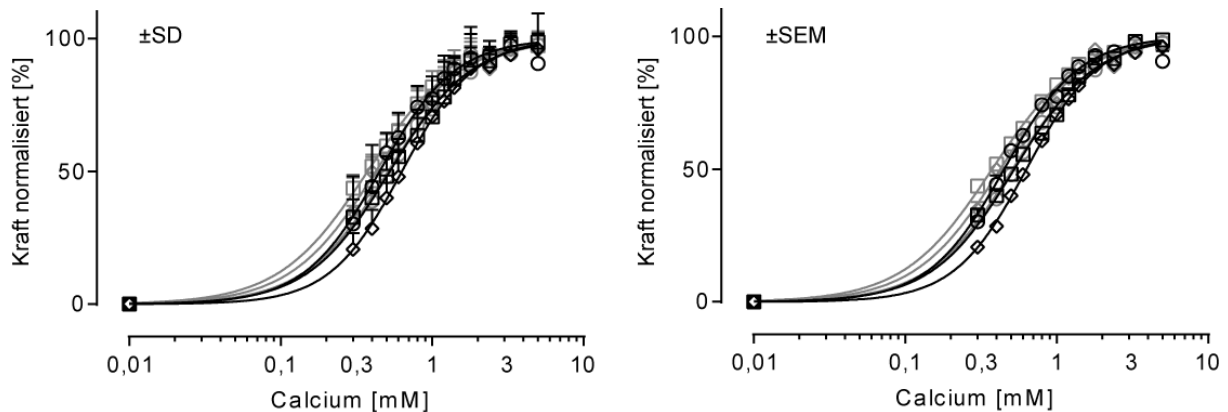


Abbildung 3.6: Calciumsensitivität der Klone in arithmetischen Mittelwerten  $\pm$  SD (links) und in arithmetischen Mittelwerten  $\pm$  SEM (rechts) dargestellt.

Die n-Zahl bezieht sich auf die Anzahl der EHTs oder die Einzelversuche/-proben. Als statistische Analyse für ungepaarte Vergleiche zweier Versuchsgruppen wurden *Student's t-Tests* und für mehr als 2 Versuchsgruppen *One-way ANOVA* mit anschließenden *Bonferroni's Post-Tests* durchgeführt. Für Vergleiche mehrerer Versuchsgruppen und Bedingungen wurde der *Two-way ANOVA* mit anschließendem *Bonferroni's Post-Test* verwendet. P-Werte kleiner als 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. Die Signifikanzberechnungen auf Klonebene beziehen sich auf Berechnungen innerhalb eines Spenders, die Signifikanzberechnungen auf *Batch*-Ebene beziehen sich auf Berechnungen innerhalb eines Klons. Die Signifikanzberechnungen auf Spenderebene beziehen sich auf Berechnungen zwischen Spendern.

Die Mehrebenenanalyse wurde von Maria Stark und Dr. Susanne Sehner (Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, UKE) durchgeführt. Hierfür wurde eine Intra-Klassen-Korrelation (ICC) verwendet. Der ICC definiert den Varianzanteil der untersuchten Ebenen in Abhängigkeit der Gesamtvarianz. Um die Variabilität zwischen Spendern, Klonen und *Batches* zu berechnen, wurde ein Mehrebenenmodell ohne definierte Effekte mit folgender *Nested Random Intercept* Struktur angewandt: EHTs wurden den *Batches* zugeordnet, *Batches* den Klonen

und Klonen den Spendern. Der Variationskoeffizient (Standardabweichung des Mittelwerts) wurde angewandt, um die Varianz der Tests untereinander vergleichen zu können. Beide Analysen erfolgten mit der Software R Version 3.5.0 und dem R-Zubehör lme4 Version 1.1-18-1.



### 4 Ergebnisse

#### 4.1 Untersuchungen zur Reliabilität von hiPSC-CMs im 3D-Format

##### 4.1.1 Generierung der hiPSCs

Eine Entblindung der IndivuHeart-Kohorte erfolgte für 3 gesunde Frauen (UKEi1, UKEi2, UKEi3). Wie alle anderen IndivuHeart-Studienteilnehmer wurden UKEi1-UKEi3 einer ausführlichen klinischen und instrumentellen (EKG, Echo, Magnetresonanztomographie) Untersuchung unterzogen, um eine klinisch abnormale kardiale Funktion ausschließen zu können. Außerdem wurden Hautbiopsien von UKEi1-UKEi3 entnommen und zur hiPSC-Reprogrammierung verwendet. Klone wurden gepickt und bei einer Passage von ~5 erfolgte eine erste Kryokonservierung von mindestens 2 Gefriergefäßen pro Klon.

##### 4.1.2 Herstellung der MCB und hiPSC-Charakterisierung

Aufgrund von Morphologie und konstanter Wachstumsrate wurden 3 Klone pro Spender ausgewählt (-A, -B, -C, siehe Kapitel 2, Abbildung 2.1). Diese 3 Klone pro Spender (n=9) wurden aufgetaut, weiter expandiert und bei einer Passage von 20-25 als MCB eingefroren (n≥17 Gefriergefäße pro MCB mit je 1 Mio. hiPSCs pro Gefriergefäß). Die MCBs dienten als Basis jeder weiteren Analyse und hiPSC-Verarbeitung, wie zum Beispiel der kardialen Differenzierung dreier *Batches* pro Klon (#1, #2, #3, n=27, siehe Kapitel 2, Abbildung 2.1) und wurden daher zunächst einer stringenten Qualitätskontrolle unterzogen.

Qualitätskontrollen beinhalteten eine Karyotypisierung (Abbildung 4.1), eine Verifizierung, dass hiPSCs frei von Virusrestpartikeln der Reprogrammierung (Abbildung 4.2A), Mykoplasmen und Bakterien sind, eine Überprüfung der Wachstumsrate in der Expansionsphase (Abbildung 4.2B) und eine SSEA-3-basierte quantitative Pluripotenzanalyse, die vor jeder kardialen Differenzierung wiederholt wurde (siehe 4.1.3).

## Ergebnisse

Die Karyotypisierung zeigte für alle sechs UKEi1- und UKEi3-Klone ein normales Karyogramm (46, XX), wohingegen alle 3 UKEi2-Klone karyotypische Abnormalitäten aufwiesen (Abbildung 4.1).

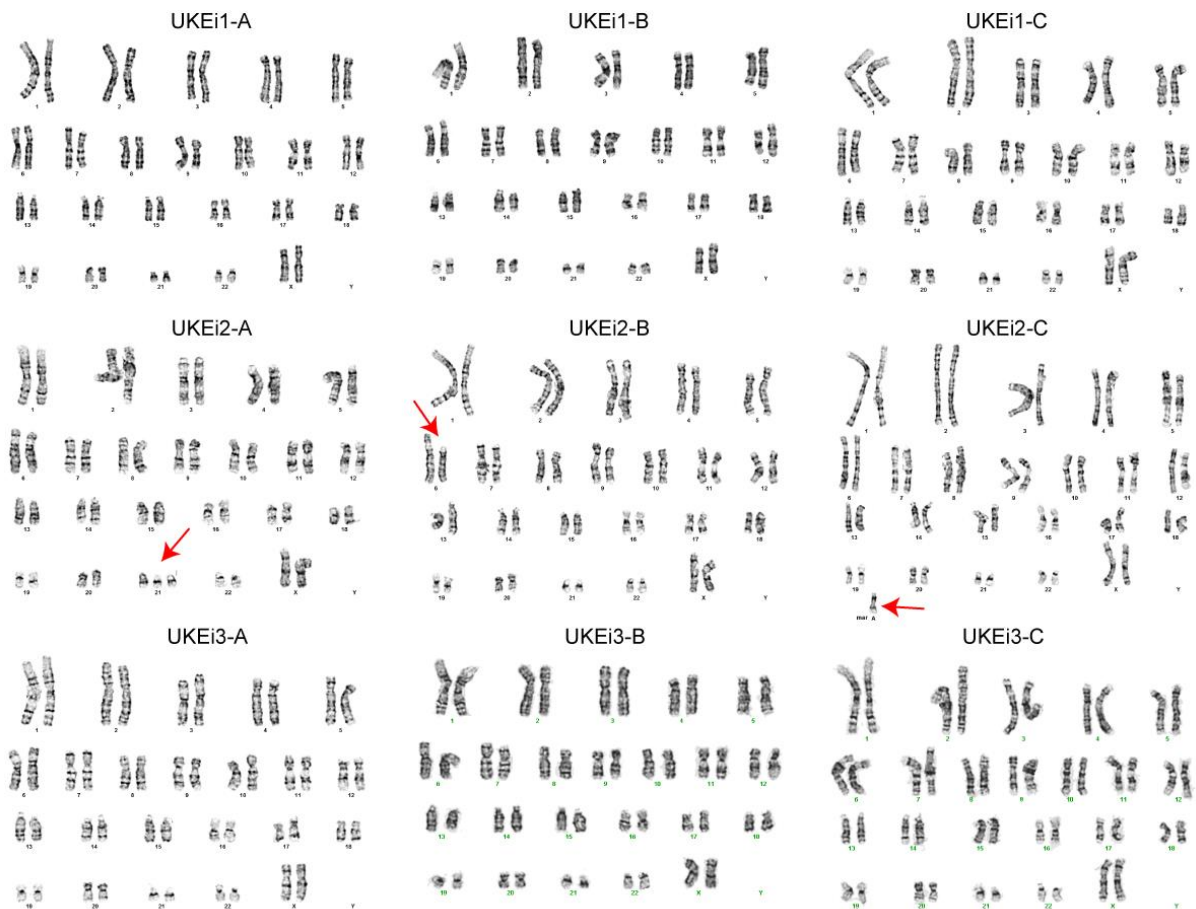


Abbildung 4.1: Karyotypisierung. UKEi1- und UKEi3-Klone zeigten einen normalen Karyotyp (46, XX), UKEi2-Klone waren karyotypisch abnormal (UKEi2-A: mos 47,XX,+21[6]/46,XX[9], 6 von 15 analysierte Metaphasen besaßen ein zusätzliches Chromosom 21; UKEi2-B: 46,XX,del(6), alle Zellen besaßen eine Deletion in Chromosom 6, UKEi2-C: 47,XX,+mar: alle Zellen besaßen einen Teil eines zusätzlichen Chromosoms). Karyotypisch abnormale Strukturen in UKEi2-Klonen sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

Virusrestpartikel konnten mithilfe einer qPCR zur Detektion des Sendaivirus-Rückgrats ausschließlich in UKEi2-C gefunden werden (Abbildung 4.2A). Wachstumsraten (Wachstum/Tag) waren in UKEi1- und UKEi3-Klonen höher als in UKEi2-Klonen ohne signifikante Unterschiede zwischen Klonen eines Spenders. Auf Spenderebene konnte eine signifikant höhere Wachstumsrate für UKEi1 und UKEi3 im Vergleich zu UKEi2 festgestellt werden (UKEi1 vs. UKEi2:  $**p<0,01$ ; UKEi3 vs. UKEi2:  $*p<0,05$ ; Abbildung 4.2B).

## Ergebnisse

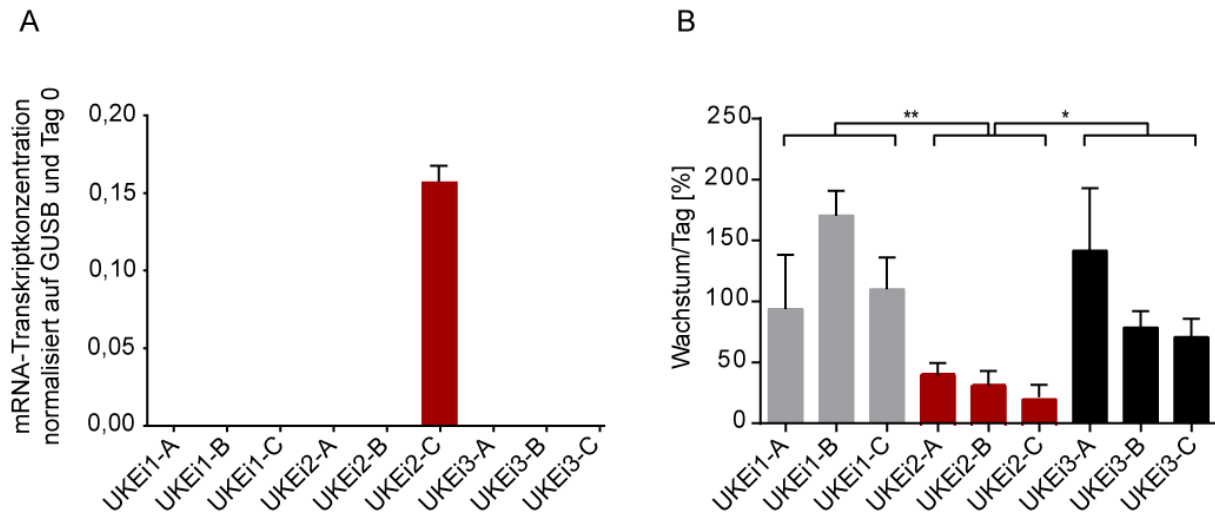


Abbildung 4.2: MCB-Qualitätsanalysen. (A) QPCR-Ergebnisse zur Untersuchung, ob hiPSCs frei von Virusrestpartikeln der Reprogrammierung sind. In UKEi2-C konnte eine geringe Expression des Sendaivirus-Rückgrats gefunden werden. QPCR-Expressionswerte wurden auf das Haushaltsgen GUSB und den Beginn der Kultivierung (Tag 0) normalisiert. Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 technischen Replikaten. (B) HiPSC-Wachstumsraten. Keine signifikanten Unterschiede in der Wachstumsrate (Wachstum/Tag in %) zwischen Klonen eines Spenders. Signifikanzen auf Spenderebene: UKEi1 vs. UKEi2 (\*\* $p < 0,01$ ), UKEi3 vs. UKEi2 (\* $p < 0,1$ ). *One-way ANOVA with Bonferroni's Post-Test*, \* $p < 0,05$ . Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n \geq 3$  Passagen.

Des Weiteren wurden MCB-hiPSCs auf ihre Nukleusmorphologie und Pluripotenz untersucht. Die Nukleusrundheit (Abbildung 4.3A) und -fläche (Abbildung 4.3B) war heterogen zwischen den Klonen. UKEi2-B konnte als Ausreißer in Bezug auf die Nukleusrundheit ausgemacht werden, UKEi2-A hingegen in Bezug auf die Nukleusfläche. Auf Spenderebene konnte eine signifikant höhere Nukleusrundheit in UKEi1 und UKEi3 festgestellt werden als in UKEi2 (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Die Nukleusfläche war in UKEi1 signifikant größer als in UKEi2 und UKEi3 (UKEi1 vs. UKEi3: \* $p < 0,05$ ; UKEi1 vs. UKEi2: \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

## Ergebnisse

Die Immunhistologiedetektion der Pluripotenzmarker *Octamer Binding Transcription Factor 4* (Oct3/4), *Sex Determining Region Y-Box 2* (Sox2), Nanog und Lin28 im Hochdurchsatzverfahren ergab ein insgesamt homogenes, hohes Expressionsmuster aller Marker ohne signifikante Unterschiede zwischen den Klonen und Spendern (Abbildung 4.3C).

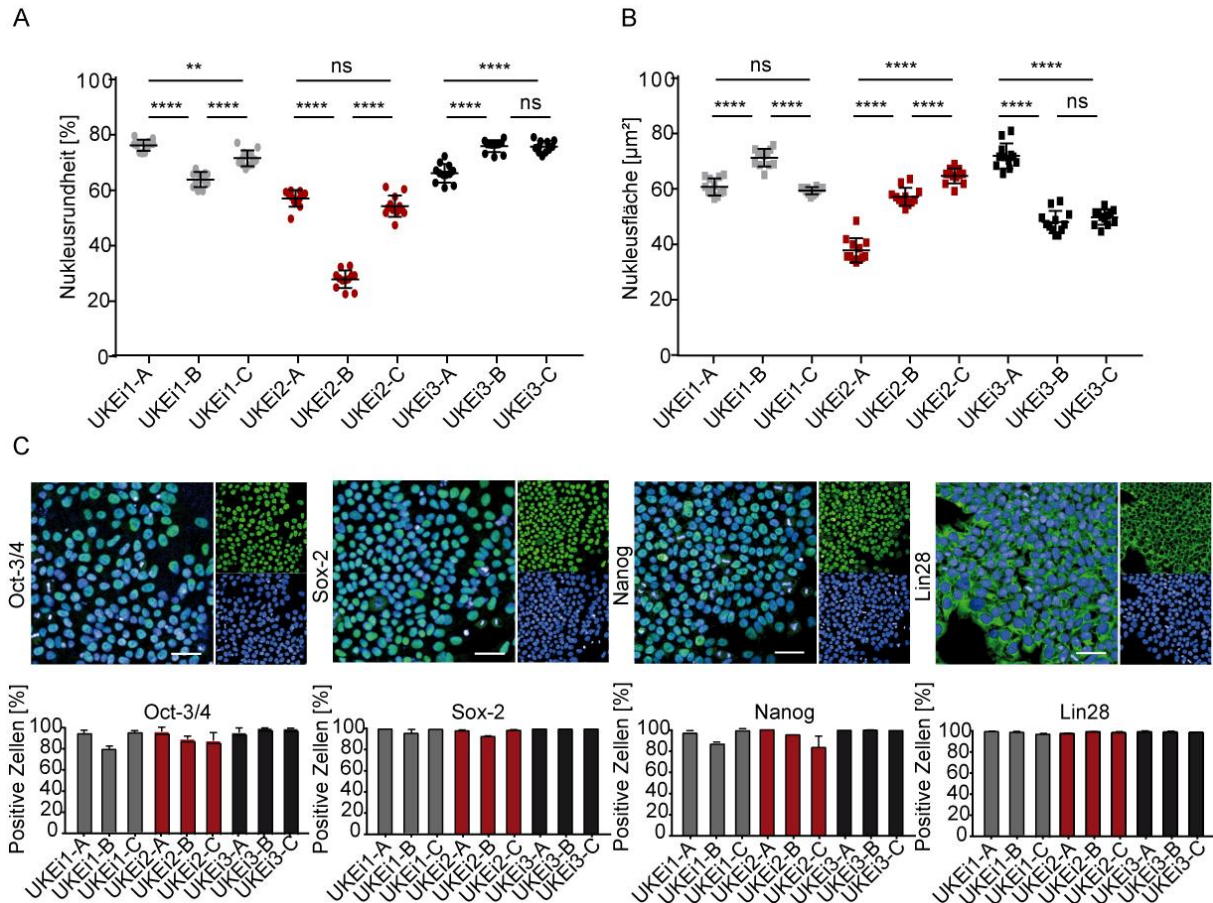


Abbildung 4.3: Hochdurchsatzanalysen zur Charakterisierung der hiPSC-Klone. Morphologieanalysen zur (A) Nukleusrundheit [%] und (B) Nukleusfläche [µm²]. (C) Immunhistologiedetektion der Pluripotenzmarker *Octamer Binding Transcription Factor 4* (Oct3/4), *Sex Determining Region Y-Box 2* (Sox2), Nanog und Lin28. Für jeden hiPSC-Klon wurden 2 technische Replikate untersucht. Als repräsentatives Färbebeispiel dienen die Ergebnisse von UKEi3-B. *One-way ANOVA* mit *Bonferroni's Post-Test*, \* $p < 0,05$ . Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## Ergebnisse

Neben der Hochdurchsatz-Immunhistologiedetektion wurde die Expression von Pluripotenzgenen auch genomweit anhand des PluriTests analysiert (Abbildung 4.4). UKEi1- und UKEi3-Klone konnten dem Referenzpool angrenzenden Bereich zugeordnet werden, der eine hohe Pluripotenz mit geringer Neuheit impliziert. Beide technischen Replikate von UKEi2-B hingegen lagen unter dem berechneten Pluripotenzgrenzwert ( $\leq 20$ ) und über dem akzeptierten Neuheitsgrenzwert ( $\geq 1,7$ ). Außerdem lag ein analysiertes Replikat von UKEi2-C über und ein analysiertes Replikat von UKEi2-A knapp unter dem akzeptierten Neuheitsgrenzwert. Die UKEi2-B- und UKEi2-C-Klone wurden somit vollständig oder teilweise durch den PluriTest als nur geringfügig pluripotente Zellen klassifiziert. UKEi2-A bestand knapp den PluriTest. Auf Klonebene lag der Pluripotenzwert von UKEi2-B signifikant unter dem der restlichen UKEi2-Klone (UKEi2-B vs. UKEi2-A:  $**p < 0,01$ , UKEi2-B vs. UKEi2-C:  $*p < 0,05$ ). Auf Spenderebene wurden keine signifikanten Unterschiede für den Faktor Pluripotenz berechnet, jedoch für den Faktor Neuheit, der für UKEi2 verhältnismäßig hoch lag (UKEi2 vs. UKEi1/UKEi3:  $**p < 0,01$ ).

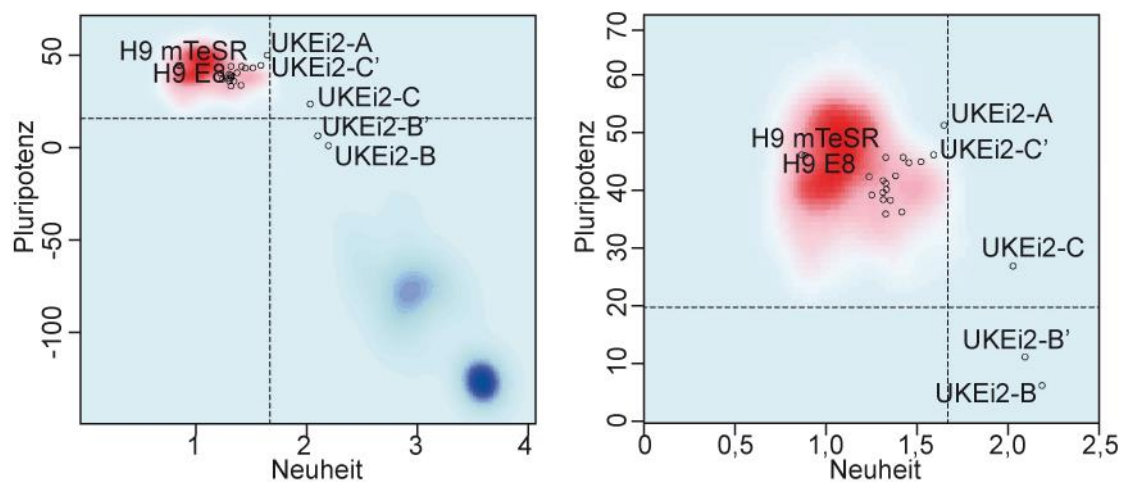


Abbildung 4.4: PluriTest-Analyse (links), Detailansicht des Referenzbereichs für eine hohe Pluripotenz (rechts). Die embryonale Stammzelllinie H9 (kultiviert in mTeSR und E8) liegt im Referenzbereich für eine hohe Pluripotenz und eine geringe Neuheit (rot). Dem hellblauen Bereich zugeordnete Zellen werden als geringfügig pluripotent, dem dunkelblauen Bereich zugeordnete Zellen als nicht pluripotent klassifiziert. Es wurden 2 Replikate (X, X') pro hiPSC-Klon analysiert.

## Ergebnisse

### 4.1.3 Spontane und kardiale Differenzierung

Die Differenzierungskapazität und -variabilität wurde anhand einer spontanen, ungerichteten und einer kardialen Differenzierung untersucht. Zur spontanen Differenzierung wurden MCB-hiPSCs als EBs für sieben Tage in einem FCS-haltigen Medium kultiviert und die Differenzierungskapazität für die 3 Keimblätter (Ektoderm, Entoderm, Mesoderm) anhand einer qPCR überprüft. Abbildung 4.5 zeigt, dass alle Klone zumindest einen der beiden analysierten Marker für das ektoderme (*Paired Box Protein 6*, Pax6; *Tubulin Beta 3*, TUBB3), entoderme (*Alpha-Fetoprotein*, AFP; *SRY-Related HMG Box 17*, Sox17) und mesoderme (*Brachury*; cTNT) Keimblatt exprimierten, wenn auch mit hoher Variabilität.

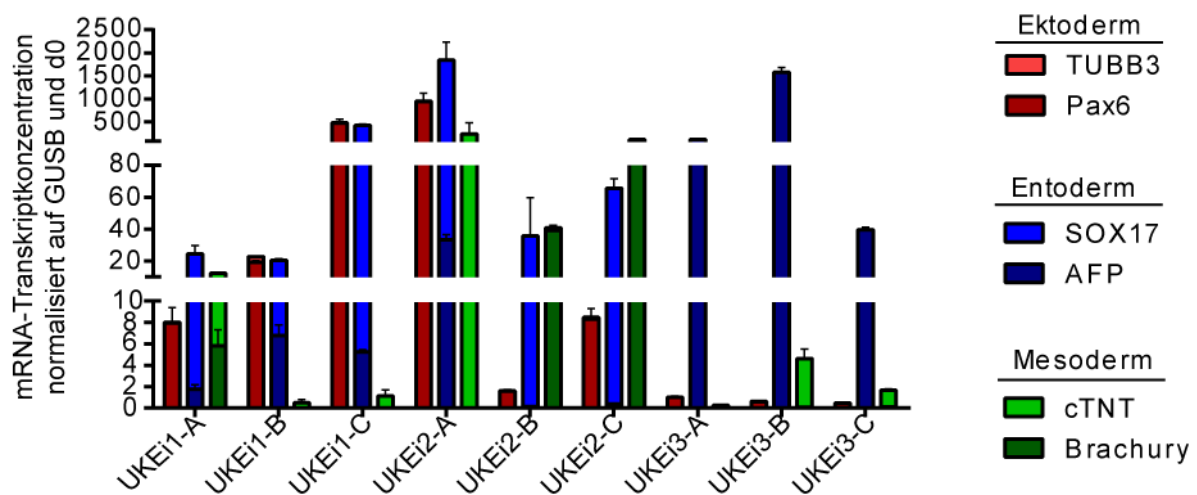


Abbildung 4.5: Spontanes Differenzierungspotenzial der hiPSC-Klone. QPCR-Ergebnisse zur spontanen, ungerichteten Differenzierung. Analysiert wurden jeweils 2 Marker der 3 Keimblätter Ektoderm (*Paired Box Protein 6*, Pax6; *Tubulin Beta 3*, TUBB3), Entoderm (*Alpha-Fetoprotein*, AFP; *SRY-Related HMG Box 17*, Sox17) und Mesoderm (*Brachury*; kardiales Troponin, cTNT). Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM von in Triplikaten analysierten Proben.

Zur kardialen Differenzierung wurde ein EB-Format- und Wachstumsfaktor-basiertes Protokoll verwendet. Für jeden Klon wurden mindestens 3 Differenzierungen durchgeführt (#1, #2, #3,  $n \geq 27$ ), die mit dem Auftauen jeweils eines MCB-Gefriergefäßes zur hiPSC-Expansion begann ( $n = 24/27$ ). Ausnahmen waren UKEi3-B #1 und UKEi3-C #1-2, die vor der Etablierung der MCBs in unserem Institut, differenziert wurden ( $n = 3/27$ ). Die Pluripotenz der zu differenzierenden, expandierten MCB-hiPSCs wurde mit einer SSEA3-Pluripotenzzanalyse kontrolliert, die für alle MCB-Differenzierungen eine hohe SSEA-3-Expression zeigte und keine signifikanten



## Ergebnisse

Unterschiede zwischen *Batches*, Klonen und Spendern aufwies (Abbildung 4.6A). Die kardiale Differenzierung zeigte keine signifikanten Unterschiede im CM-Reinheitsgrad auf *Batch*- und Klonebene, aber auf Spenderebene (Abbildung 4.6B). Differenzierungen von UKEi1 und UKEi3 wiesen signifikant höhere CM-Marker-positive Zellpopulationen auf als UKEi2 (cTNT;  $78\pm 9\%$  bzw.  $84\pm 14\%$  vs.  $16\pm 23\%$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ ). Der im IEPT festgelegte Grenzwert des CM-Reinheitsgrads zur weiteren Verwendung liegt bei  $\geq 60\%$ , so dass UKEi1 und UKEi3 deutlich darüber, UKEi2 aber darunter lag. Der Zellertrag der Differenzierung (absolute Anzahl an differenzierten Zellen/Differenzierungsläufe) zeigte eine leichte Abhängigkeit zum CM-Reinheitsgrad und war in UKEi2 geringer als in UKEi1 und UKEi3 ( $28\times 10^6$  vs.  $58\times 10^6$  bzw.  $62\times 10^6$ , nicht signifikant bzw. \* $p<0,05$ ; Abbildung 4.6C). Für diesen Parameter, aber auch für die kardiale Differenzierungseffizienz (cTNT-positive Zellen/hiPSCs, Abbildung 4.6D) wurden keine signifikanten Unterschiede auf *Batch*- und Klonebene gefunden. In UKEi1-A #1 war jedoch eine Tendenz zu einer höheren Differenzierungseffizienz als in UKEi1-A #3 zu sehen. Auf Spenderebene hingegen, und passend zum CM-Reinheitsgrad, zeigten UKEi1 und UKEi3 eine signifikant höhere Differenzierungseffizienz als UKEi2 auf ( $35,5\pm 23,6\%$  bzw.  $37,4\pm 14,1\%$  vs.  $3,9\pm 5,9\%$ ; \*\* $p<0,01$  bzw. \*\*\* $p<0,001$ ). Der Differenzierungsmisserfolg für UKEi2 ließ sich auch nicht durch zusätzliche Differenzierungsläufe verbessern (UKEi2-A: insgesamt  $n=4$ ; UKEi2-B: insgesamt  $n=5$ ; UKEi2-C: insgesamt  $n=5$ ).

## Ergebnisse

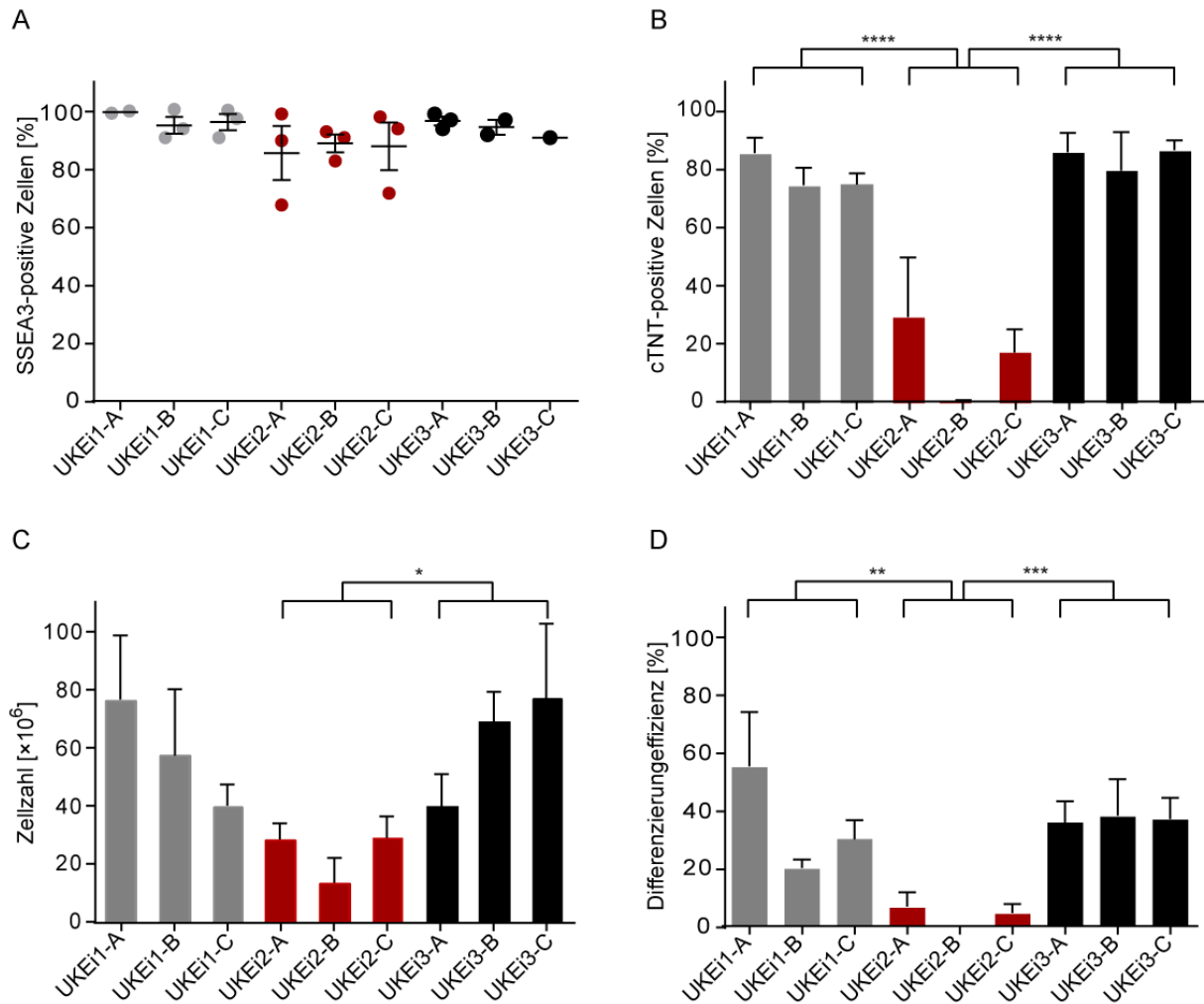


Abbildung 4.6: Kardiales Differenzierungspotenzial der 3 *Batches* pro Klon. (A) Quantitative Pluripotenzbestimmung von SSEA3-positiven Zellen (%) durch Durchflusszytometrie vor der Einleitung der kardialen Differenzierung. Keine signifikanten Unterschiede auf *Batch*-, Klon- und Donorebene. (B) Durchflusszytometrie-Ergebnisse zur kardial gerichteten Differenzierung. Als kardialer Marker diente cTNT. (C) Zellertrag der kardialen Differenzierung in Millionen ( $\times 10^6$ ). (D) Kardial-gerichtete Differenzierungseffizienz (cTNT-positive Zellen/hiPSCs, %). *One-way ANOVA* with *Bonferroni's Post-Test*, \* $p < 0,05$ . Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM. Signifikanzberechnungen auf Klonebene beziehen sich auf Berechnungen innerhalb eines Spenders, Signifikanzberechnungen auf *Batch*-Ebene beziehen sich auf Berechnungen innerhalb eines Klons. (B-D) Keine signifikanten Unterschiede auf *Batch*- und Klonebene aber auf Donorebene. SSEA3, *Stage-specific Embryonic Antigen 3*; cTNT, kardiales Troponin.



### 4.1.4 EHT-Entwicklungsphase

Zur funktionellen Analyse wurden hiPSC-CMs zunächst zu EHTs verarbeitet. Sofern möglich, wurden hierfür frisch dissoziierte CMs verwendet, um 14-24 EHTs pro *Batch* herzustellen. Die EHT-Entwicklungsphase wurde zweimal pro Woche durch video-optische Kontraktionsaufnahmen dokumentiert. Sobald sich in den EHTs eine Kraftplateauphase eingestellt hatte (etwa 2-3 Wochen nach Herstellung), wurde mit den funktionellen Analysen begonnen (Abbildung 4.7).

Ausschlusskriterium war eine in der Plateauphase erreichte Kraft von unter 0,1 mN. Dem geringen CM-Reinheitsgrad der UKEi2 Differenzierungen entsprechend, entwickelten UKEi2-EHTs keine messbaren Kräfte (Daten nicht gezeigt) und mussten so von den funktionellen Analysen ausgeschlossen werden. Somit wurden die weiteren funktionellen EHT-Analysen mit den 2 Spendern UKEi1 und UKEi3, deren insgesamt 6 Klone und 18 *Batches* durchgeführt. Trotz des hohen CM-Reinheitsgrads der UKEi1- und UKEi3-Differenzierungen, die über dem Grenzwert von 60%-positiven CM-Zellpopulationen lagen, erreichten manche *Batches* nicht den benötigten Kraftgrenzwert von 0,1 mN. Sofern es die *Batch*-spezifische Differenzierungsausbeute zuließ, wurden CMs zur erneuten EHT-Herstellung und Kultivierung aufgetaut (n=4/18). Falls die Differenzierungsausbeute dies nicht zuließ und zu wenige *Batch*-spezifische CMs eingefroren aufbewahrt werden konnten, wurden die entsprechenden Differenzierungen wiederholt (n=4/18). UKEi3-B-*Batches* entwickelten insgesamt sehr geringe Kräfte, weswegen UKEi3-B #1 mit einer Kraft von unter 0,1 mN mit in die Analyse eingeschlossen wurde.

## Ergebnisse

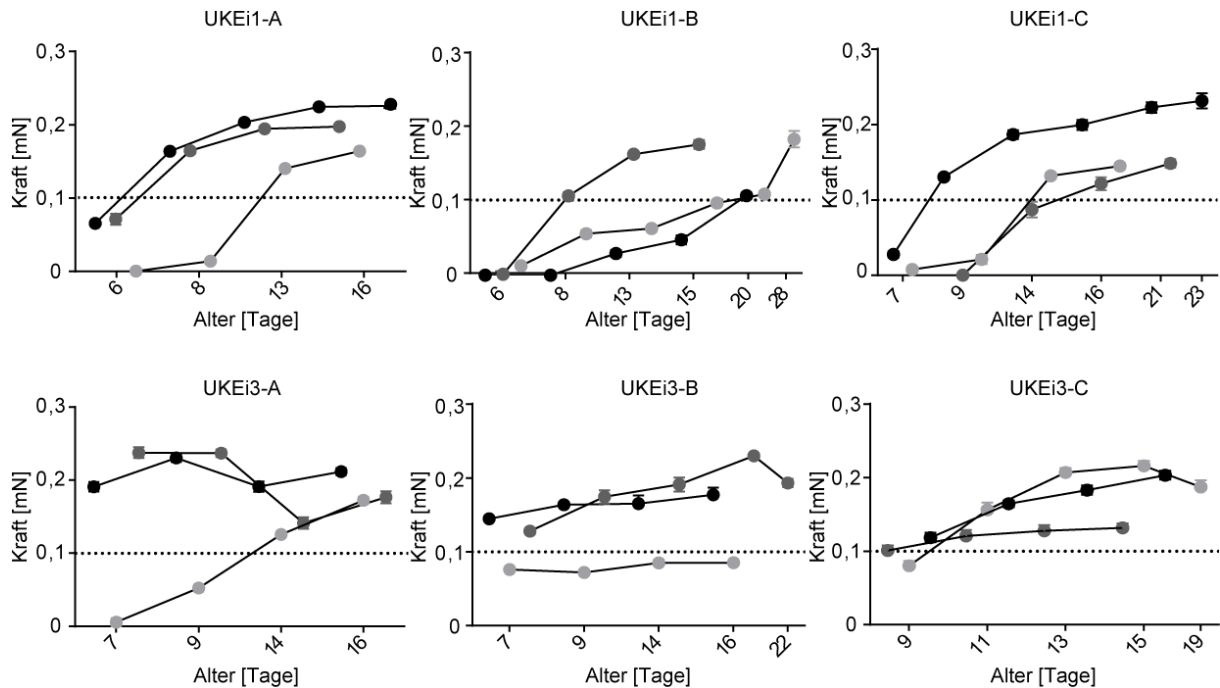


Abbildung 4.7: Entwicklung der EHTs über die Zeit. Bis auf UKEi3-B #1 erreichte jedes *Batch* die minimale Kraft von 0,1 mN. *Batches* eines jeden Klonen gezeigt in hellgrau: #1, mittelgrau: #2, schwarz: #3. Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM von 14-24 EHTs.

### 4.1.5 Funktionelle Analysen der EHTs nach Standardvorgehensweise

Für die funktionellen Analysen der 18 *Batches* wurde eine Standardvorgehensweise etabliert und durchgeführt, um eine effiziente Arbeitsweise zu gewährleisten und die Ergebnisse bestmöglich miteinander vergleichen zu können. Im Normalfall wurden die Experimente pro *Batch* innerhalb von 5 Tagen umgesetzt und immer in der gleichen Reihenfolge durchgeführt ( $\hat{=}$  Reihenfolge der hier aufgeführten Ergebnisse). Sofern möglich, wurden die EHTs außerdem alternierend verwendet. Dies bedeutet, dass von den 14-24 hergestellten EHTs jeweils  $\sim 8$  EHTs pro Experiment verwendet wurden und so nicht an jedem Experimenttag auf die gleichen EHTs zurückgegriffen werden musste. Mit diesen Schritten konnte eine zusätzliche Variabilität zwischen den *Batches* durch z.B. unterschiedliche vorherige Experimente mit möglichen anhaltenden Effekten vermieden werden. Zur weiteren Verbesserung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse fand die elektrische Stimulation für alle EHTs bei 1,5 Hz statt. Resultierende gemittelte Kontraktionsaufnahmen sind in Abbildung 4.8 gezeigt. Ausschließlich stimulierte und der Stimulation mit 1,5 Hz folgende EHTs wurden in die spätere Analyse aufgenommen.

## Ergebnisse

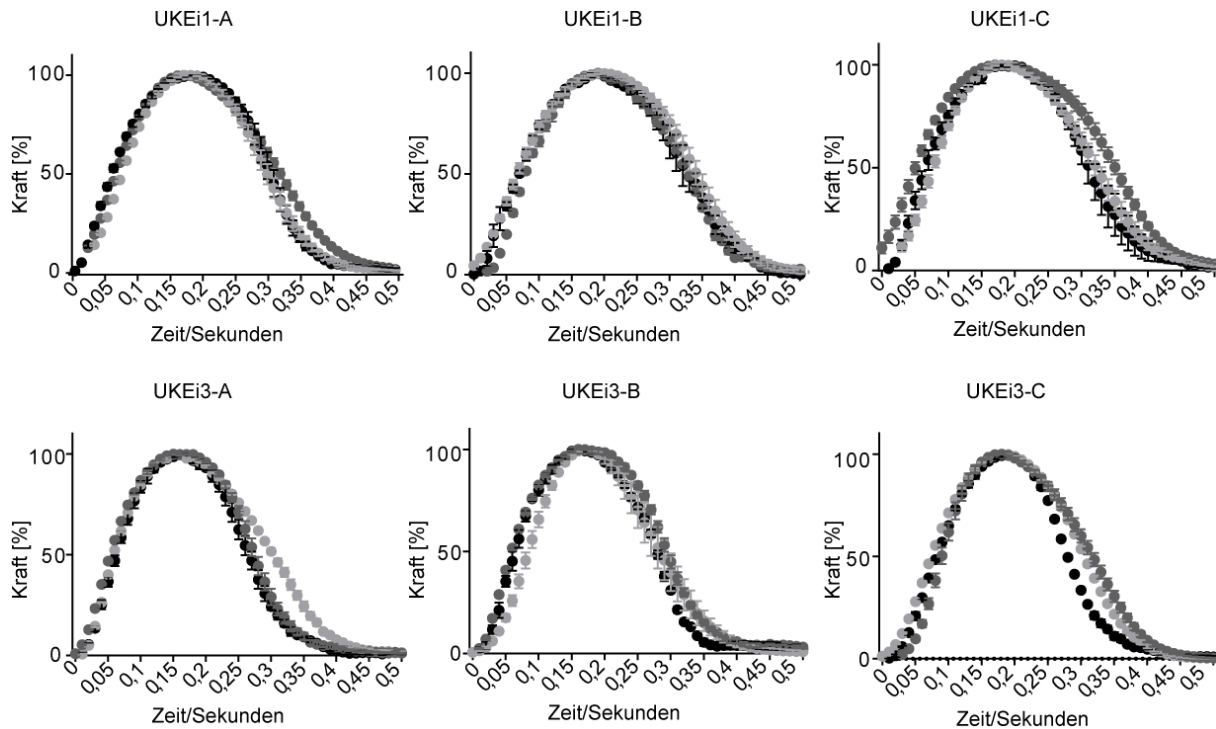


Abbildung 4.8: Normalisierte Kontraktionspeaks. Video-optisch aufgenommene Kontraktion, die am ersten Tag der funktionellen Analysen in 1,8 mM Calcium-haltiger Tyrodelösung und bei 1,5 Hz elektrischer Stimulierung aufgenommen wurde. Die gemessene Kraft wurde auf den geringsten und höchsten Wert normalisiert. *Batches* eines jeden Klon gezeigt in hellgrau: #1, mittelgrau: #2, schwarz: #3. Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 EHTs pro *Batch*.

Die resultierenden Daten wurden auf *Batch*-, Klon- und schließlich Spenderebene zusammengefasst, um sowohl die jeweilige Ebenen-abhängige als auch die technische Variabilität besser voneinander abgrenzen zu können. Die im weiteren Verlauf aufgeführten Darstellungen der Experimente folgen der Legende aus Abbildung 2.1. Zur Übersichtlichkeit werden die funktionellen Daten von UKEi3-B (#1, #2, #3) repräsentativ für die *Batches* gezeigt, die restlichen Daten der *Batches* werden, zusammen mit Details zu Klonen und Spendern tabellarisch aufgeführt. UKEi3-B #1-3 wurden als Beispiel gewählt, da hier eine vergleichsweise hohe Variabilität zwischen den *Batches* zu sehen war. Außerdem werden im Folgenden die Ergebnisse für die Abgrenzung der Ebenen durch das mehrstufige hierarchische Statistikmodell (Mehrebenenanalyse) gezeigt. Mithilfe dieses Modells konnte die biologische Varianz (Spender) von der technischen Varianz (Klone, *Batches*) separiert werden. Die Restvarianz der untersten Ebene konnte nicht mehr aufgeschlüsselt werden und beinhaltet die Varianz zwischen den einzelnen EHTs und zwischen den wiederholten Messungen innerhalb eines Experiments aber auch

## Ergebnisse

nicht kausal zuordbare, also unerklärliche bzw. zufällige Effekte (EHT/Wiederholung/Unerklärliches). Pro Experiment werden die Ebenen-abhängige Variabilität der Messwerte und die daraus resultierende Ebenen-anteilige Varianz (Intra-Klassen-Korrelationskoeffizient, ICC) in Abhängigkeit der Gesamtvarianz (%) dargestellt.

## Ergebnisse

### 4.1.5.1 Calciumkonzentrations-Wirkungskurve

Mithilfe einer Calciumkonzentrations-Wirkungskurve konnten die Calciumsensitivität, ausgedrückt in  $EC_{50}$ , berechnet und die Variabilität innerhalb der Ebenen dargestellt und untereinander verglichen werden (Abbildung 4.9, Tabelle 4.1). Auf *Batch*-Ebene zeigte UKEi1-B #2 eine signifikant geringere Calcium- $EC_{50}$  als die anderen beiden UKEi1-B-*Batches* (UKEi1-B #2 vs. UKEi1-B #1: \*\*\* $p < 0,001$ ; UKEi1-B #2 vs. UKEi1-B #3: \*\* $p < 0,01$ ; Abbildung 4.9A, Tabelle 4.1). Für UKEi3-B und UKEi3-C wiesen einzelne *Batches* signifikant höhere  $EC_{50}$ -Werte und somit eine geringere Calciumsensitivität auf (UKEi3-B #1 vs. UKEi3-B #2: \* $p < 0,05$ ; UKEi3-B #1 vs. UKEi3-B #3: \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; UKEi3-C #1 vs. UKEi3-C #2 \* $p < 0,05$ ). Auch auf Klonebene konnten signifikante Unterschiede zwischen sowohl den UKEi1-Klonen als auch UKEi3-Klonen kalkuliert werden (UKEi1-B vs. UKEi1-A/C: \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; UKEi3-C vs. UKEi3-A: \*\* $p < 0,01$ ; UKEi3-C vs. UKEi3-B: \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; Abbildung 4.9B, Tabelle 4.1). Im Vergleich der beiden Spender zeigte UKEi1 eine signifikant geringere Calcium- $EC_{50}$  als UKEi3 (UKEi1 vs. UKEi3: \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; Abbildung 4.9C, Tabelle 4.1). Allerdings waren die Unterschiede quantitativ sehr gering bei sehr niedriger Streuung.

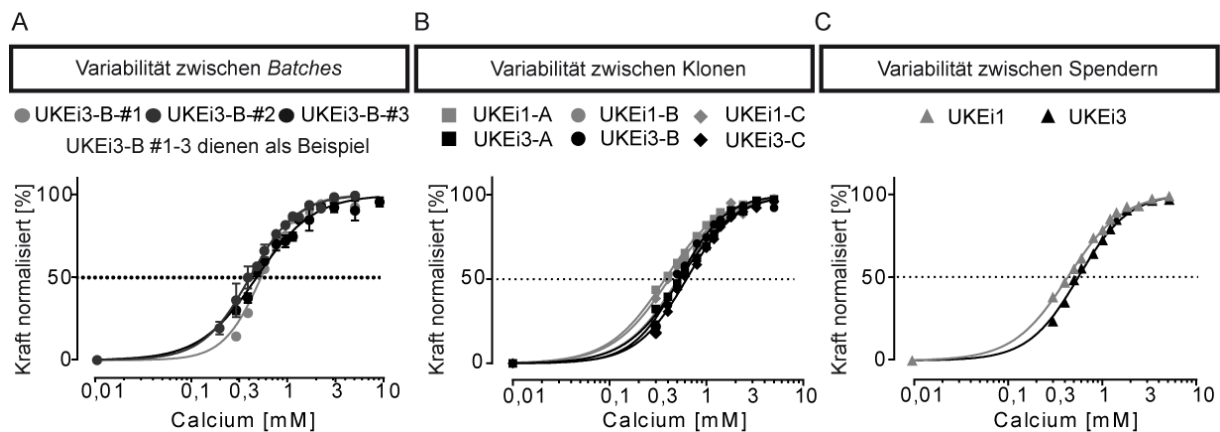


Abbildung 4.9: Calciumkonzentrations-Wirkungskurve. Calciumkonzentrations-Wirkungskurven und ihre Variabilität auf (A) *Batch*-Ebene, (B) Klonebene und (C) Spenderebene. UKEi3-B #1-3 wurden als repräsentatives Beispiel der *Batches* gewählt. Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM. (One-way ANOVA mit Bonferroni's Post-Test für *Batch*- und Klonebene, Student *t*-Test für Spenderebene, \* $p < 0,05$ ).

## Ergebnisse

Tabelle 4.1: Calciumkonzentrations-Wirkungskurve.

			Calciumkonzentrations-Wirkungskurve				
Spender	Klon	Batch	Anzahl (A/M)	Mittelwert $\pm$ SD	Variabilität		
UKEi1	A	#1	8/8	0,39 $\pm$ 0,04			
UKEi1	A	#2	11/11	0,40 $\pm$ 0,04	ns		
UKEi1	A	#3	8/8	0,37 $\pm$ 0,06		ns	ns
UKEi1	B	#1	8/8	0,56 $\pm$ 0,08			
UKEi1	B	#2	12/12	0,46 $\pm$ 0,04	***		
UKEi1	B	#3	7/7	0,55 $\pm$ 0,03		ns	**
UKEi1	C	#1	8/8	0,41 $\pm$ 0,05			
UKEi1	C	#2	8/8	0,41 $\pm$ 0,07	ns		
UKEi1	C	#3	8/8	0,43 $\pm$ 0,09		ns	ns
UKEi3	A	#1	8/8	0,55 $\pm$ 0,07			
UKEi3	A	#2	4/5	0,48 $\pm$ 0,11	ns		
UKEi3	A	#3	8/8	0,53 $\pm$ 0,08		ns	ns
UKEi3	B	#1	11/11	0,55 $\pm$ 0,05			
UKEi3	B	#2	2/2	0,42 $\pm$ 0,07	*		
UKEi3	B	#3	8/8	0,39 $\pm$ 0,06		****	ns
UKEi3	C	#1	8/8	0,76 $\pm$ 0,16			
UKEi3	C	#2	5/5	0,57 $\pm$ 0,07	*		
UKEi3	C	#3	8/8	0,61 $\pm$ 0,09		ns	ns
UKEi1	A	#1-3	27/27	0,39 $\pm$ 0,05			
UKEi1	B	#1-3	27/27	0,51 $\pm$ 0,07	****		
UKEi1	C	#1-3	24/24	0,42 $\pm$ 0,07		ns	****
UKEi3	A	#1-3	20/21	0,53 $\pm$ 0,08			
UKEi3	B	#1-3	21/21	0,48 $\pm$ 0,1	ns		
UKEi3	C	#1-3	21/21	0,66 $\pm$ 0,14		**	****
UKEi1	A-C	#1-3	82/82	0,44 $\pm$ 0,08			
UKEi3	A-C	#1-3	62/63	0,55 $\pm$ 0,13	****		

Werte aller *Batches*, Klone und Spender. Anzahl an analysierten (A) und gemessenen (M) EHTs, deren berechneter Calcium EC<sub>50</sub>-Wert (mM; Mittelwert  $\pm$  SD) und Variabilität, dargestellt in Signifikanzberechnungen (*One-way ANOVA* mit *Bonferroni's Post-Test* für *Batch*- und Klonebene, *Student t-Test* für Spenderebene, \*p<0,05).

## Ergebnisse

Die Vielzahl an berechneten Signifikanzen auf allen Ebenen spiegelte sich auch in der Ebenenseparierung der Variabilität wider, die sich durch keine klar erkennbare Variabilitäts-dominante Ebene auszeichnete (Abbildung 4.10A). Die Ebenen-abhängige Varianz erlaubte eine klarere Differenzierung: Von 100% Gesamtvarianz konnten 31% der letzten Ebene zugeschrieben werden, die die Variabilität zwischen EHTs, die Wiederholungs-bedingte und die unerklärliche zusammenfasst. 17% der Gesamtvariabilität konnte auf die *Batch*-Ebene zurückgeführt werden, 36% auf die Klonebene, und 16% auf die Variabilität zwischen den Spendern (Abbildung 4.10B).

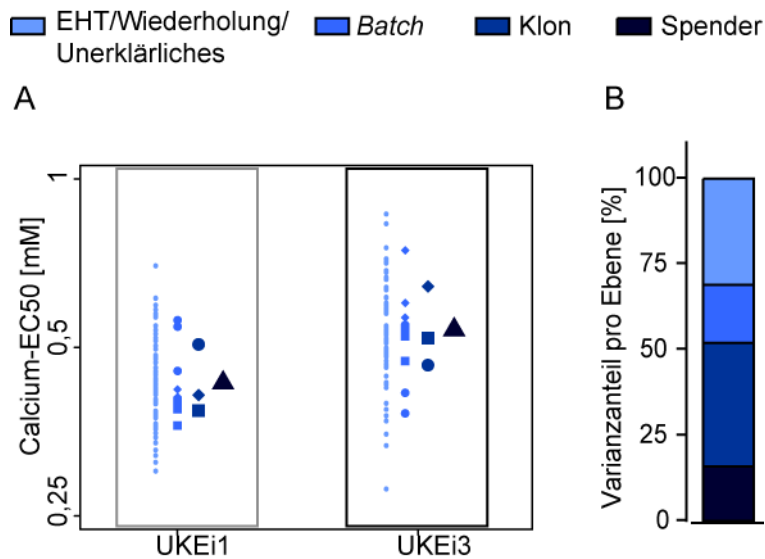


Abbildung 4.10: Ergebnisse der angewandten Mehrebenenanalyse mit den Ebenen EHT/Wiederholung/Unerklärliches (hellblau), *Batch* (blau), Klon (marineblau) und Spender (dunkelblau). (A) Darstellung der Ebenen-abhängigen Variabilität der Messrohwerte. (B) Darstellung der Ebenen-abhängigen Varianzanteile (ICC, %).

## Ergebnisse

### 4.1.5.2. Kraft-Frequenzbeziehung

Für die Analyse der Kraft-Frequenzbeziehung wurden nur die EHTs in die Auswertung einbezogen, die der elektrischen Stimulation mit der entsprechenden Frequenz gefolgt sind. Bis auf UKEi1-A #3 zeigten alle *Batches* einen anfänglich positiven inotropen Effekt (zwischen 0,7 und ~1.7 Hz), der nach einem kurzen Plateau in einen negativ-inotropen Effekt (über ~2 Hz) bei höher werdender Frequenz umschlug (Abbildung 4.11). Dieses Experiment resultierte in einen großen Anteil an gemessenen Signifikanzen auf *Batch*-, Klon- und Spenderebene, mit nur wenigen nicht-signifikanten Ausnahmen (Tabelle 4.2).

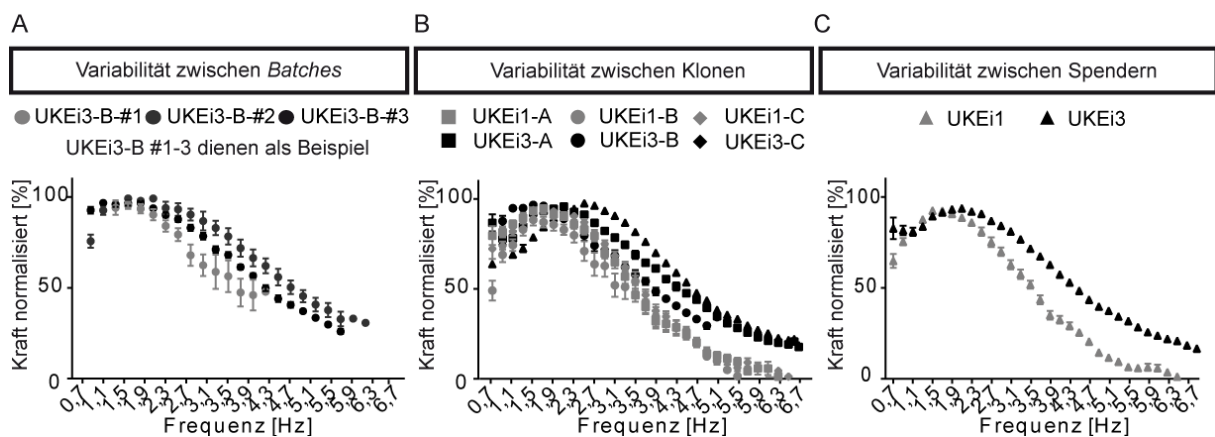


Abbildung 4.11: Kraft-Frequenzbeziehung. Kraft-Frequenzbeziehungskurven und ihre Variabilität auf (A) *Batch*-Ebene, (B) Klonebene und (C) Spenderebene. UKEi3-B #1-3 wurden als repräsentatives Beispiel der *Batches* gewählt. Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM. (*One-way ANOVA* mit *Bonferroni's Post-Test* für *Batch*- und Klonebene, *Student t-Test* für Spenderebene, \* $p < 0,05$ ).



## Ergebnisse

Tabelle 4.2: Kraft-Frequenzbeziehung

			Kraft-Frequenzbeziehung				
Spender	Klon	Batch	Anzahl (A/M)	Mittelwert±SD	Variabilität		
UKEi1	A	#1	8/8	n.a.			
UKEi1	A	#2	8/8	n.a.	****		
UKEi1	A	#3	8/8	n.a.		**	ns
UKEi1	B	#1	8/8	n.a.			
UKEi1	B	#2	8/8	n.a.	**		
UKEi1	B	#3	8/8	n.a.		**	**
UKEi1	C	#1	8/8	n.a.			
UKEi1	C	#2	8/8	n.a.	ns		
UKEi1	C	#3	8/8	n.a.		*	****
UKEi3	A	#1	8/8	n.a.			
UKEi3	A	#2	8/8	n.a.	*		
UKEi3	A	#3	8/8	n.a.		***	ns
UKEi3	B	#1	8/8	n.a.			
UKEi3	B	#2	8/8	n.a.	**		
UKEi3	B	#3	3/3	n.a.		****	**
UKEi3	C	#1	8/8	n.a.			
UKEi3	C	#2	7/7	n.a.	*		
UKEi3	C	#3	8/8	n.a.		**	***
UKEi1	A	#1-3	24/24	n.a.			
UKEi1	B	#1-3	24/24	n.a.	***		
UKEi1	C	#1-3	24/24	n.a.		ns	****
UKEi3	A	#1-3	24/24	n.a.			
UKEi3	B	#1-3	19/19	n.a.	**		
UKEi3	C	#1-3	23/23	n.a.		***	ns
UKEi1	A-C	#1-3	72/72	n.a.			
UKEi3	A-C	#1-3	66/66	n.a.	****		

Werte aller *Batches*, Klone und Spender mit der Anzahl an analysierten (A) und gemessenen (M) EHTs, und deren Variabilität, dargestellt in Signifikanzberechnungen (*One-way ANOVA* mit *Bonferroni's Post-Test* für *Batch*- und Kloneebene, *Student t-Test* für Spenderebene, \* $p < 0,05$ ).

Die Separierung der Variabilität auf die Ebenen erfolgte pro gemessene Frequenz und wurde als anteilige Varianz berechnet. Das Modell zeigte, dass die Varianzverteilung der Ebenen stark Frequenz-abhängig war (Abbildung 4.12A). Bei geringen Frequenzen (<3,5) dominierte die Varianz der Ebenen *Batches* und EHTs/Wiederholung/Unerklärliches. Der Anteil der Varianz zwischen den Klonen war generell sehr klein und in geringem Maße bei den niedrigen Frequenzen zu sehen. Bei höher werdender Frequenz (>3,5) überwog allerdings die Varianz, die zwischen den Spendern gemessen wurde (Abbildung 4.12A). Über die Frequenzen gemittelte

## Ergebnisse

Ebenen-abhängige Varianzanteile resultierten in einem Varianzanteil von 37% auf Spenderebene, 3% auf Klonebene, 28% auf *Batch*-Ebene und 32% auf der Ebene EHTs/Wiederholung/Unerklärliches.

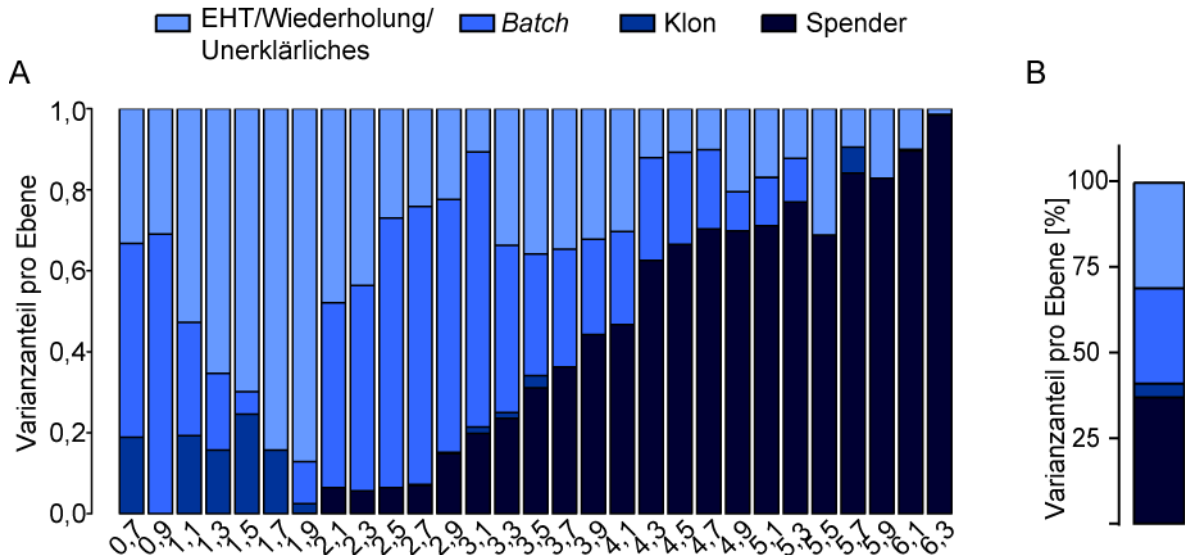


Abbildung 4.12: Ergebnisse der angewandten Mehrebenenanalyse mit den Ebenen EHT/Wiederholung/Unerklärliches (hellblau), *Batch* (blau), Klon (marineblau) und Spender (dunkelblau). (A) Darstellung der Ebenen-abhängigen Varianzanteile pro Frequenz. (B) Darstellung der Ebenen-abhängigen Varianzanteile (ICC, %).

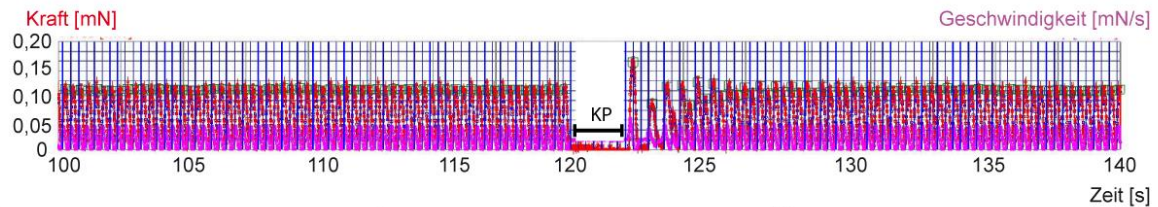
### 4.1.5.3 Post-Pausenbeziehung

Zur Untersuchung des intrazellulären Calciumzyklus und der Calciumspeicherkapazität wurde die Post-Pausenbeziehung, d.h. die Potenzierung der Kraft nach Pausieren der elektrischen Stimulation, gemessen. Alle EHTs zeigten einen Anstieg in der Kraft um ~50% zwischen zuletzt stimulierter und erster spontaner Kontraktion (Anhang, Abbildung Z1). Die Kontraktionspause zwischen diesen beiden Kontraktionen hingegen zeigte eine höhere Variabilität mit signifikanten Unterschieden auf der *Batch*-Ebene. Grundsätzlich verhielten sich UKEi1-*Batches* homogener als UKEi3-*Batches*, die in 2-3 *Batch*-Vergleichen pro Klon einen Ausreißer mit sehr hoher Kontraktionspause zeigten (UKEi3-B #2 vs. UKEi3-B #1/#3:  $p < 0,001$ ; UKEi3-C #3 vs. UKEi3-C #2:  $*p < 0,05$ ; Abbildung 4.13A, Tabelle 4.3). Dennoch wurden auch für die *Batches* UKEi1-A #3 und UKEi1-B #2 signifikante Unterschiede zu den zugehörigen *Batches* berechnet (UKEi1-A #3 vs. UKEi1-A #1:  $**p < 0,01$ ; UKEi1-A #3 vs. UKEi1-A #2:  $*p < 0,05$ ; Tabelle 4.3). Hierbei stach UKEi1-A #3 mit der höchsten Kontraktionspause aller UKEi1-*Batches* hervor.

## Ergebnisse

Auf Klonebene konnten keine signifikanten Unterschiede kalkuliert werden, auf Spenderebene hingegen zeigte UKEi1 eine signifikant geringere Kontraktionspause als UKEi3 (UKEi1 vs. UKEi3:  $*p<0,05$ ).

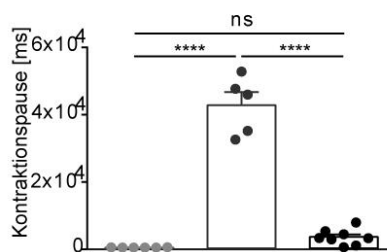
A



B

Variabilität zwischen *Batches*

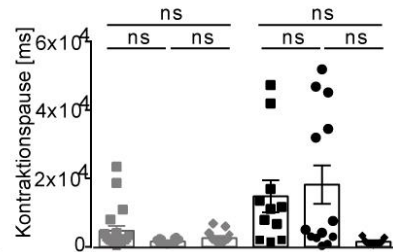
● UKEi3-B-#1 ● UKEi3-B-#2 ● UKEi3-B-#3



C

Variabilität zwischen Klonen

■ UKEi1-A ● UKEi1-B ◆ UKEi1-C  
■ UKEi3-A ● UKEi3-B ◆ UKEi3-C



D

Variabilität zwischen Spendern

▲ UKEi1 ▲ UKEi3

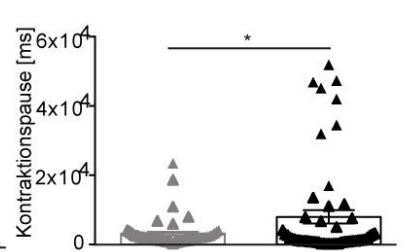


Abbildung 4.13: Post-Pausenbeziehung. Kontraktionspausen der Post-Pausenbeziehungsanalyse (A dient als Beispielmessung) und ihre Variabilität auf (B) *Batch*-Ebene, (C) Klonebene und (D) Spenderebene. UKEi3-B #1-3 wurden als repräsentatives Beispiel der *Batches* gewählt. Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM. (One-way ANOVA mit *Bonferroni's Post-Test* für *Batch*- und Klonebene, *Student t-Test* für Spenderebene,  $*p<0,05$ ). KP, Kontraktionspause.

## Ergebnisse

Tabelle 4.3: Kontraktionspausen der Post-Pausenbeziehung (PRP).

			PRP (Kontraktionspause)				
Spender	Klon	Batch	Anzahl (A/M)	Mittelwert $\pm$ SD	Variabilität		
UKEi1	A	#1	4/4	1728 $\pm$ 303			
UKEi1	A	#2	9/9	1885 $\pm$ 1365	ns		
UKEi1	A	#3	7/7	10207 $\pm$ 8060		**	*
UKEi1	B	#1	3/3	920 $\pm$ 321			
UKEi1	B	#2	7/7	2340 $\pm$ 344	***		
UKEi1	B	#3	6/6	1057 $\pm$ 249		ns	****
UKEi1	C	#1	8/8	1664 $\pm$ 1040			
UKEi1	C	#2	3/3	2853 $\pm$ 1205	ns		
UKEi1	C	#3	4/4	4238 $\pm$ 2513		ns	ns
UKEi3	A	#1	3/3	3803 $\pm$ 3514			
UKEi3	A	#2	4/4	27033 $\pm$ 21274	ns		
UKEi3	A	#3	4/4	10740 $\pm$ 2890		ns	ns
UKEi3	B	#1	6/6	237 $\pm$ 45			
UKEi3	B	#2	5/5	42036 $\pm$ 8494	****		
UKEi3	B	#3	8/8	3311 $\pm$ 2317		ns	****
UKEi3	C	#1	2/2	960 $\pm$ 0			
UKEi3	C	#2	4/4	900 $\pm$ 202	ns		
UKEi3	C	#3	4/4	2285 $\pm$ 857		ns	*
UKEi1	A	#1-3	20/20	4727 $\pm$ 6154			
UKEi1	B	#1-3	16/16	1593 $\pm$ 740	ns		
UKEi1	C	#1-3	15/15	2588 $\pm$ 1839		ns	ns
UKEi3	A	#1-3	11/11	14773 $\pm$ 15604			
UKEi3	B	#1-3	13/13	18205 $\pm$ 20290	ns		
UKEi3	C	#1-3	9/9	1522 $\pm$ 903		ns	ns
UKEi1	A-C	#1-3	51/51	3115 $\pm$ 4168			
UKEi3	A-C	#1-3	54/54	7944 $\pm$ 14222	*		

Alle Werte der *Batches*, Klone und Spender mit der Anzahl an analysierten (A) und gemessenen (M) EHTs, deren berechnete Dauer (ms; Mittelwert  $\pm$  SD) und Variabilität, dargestellt in Signifikanzberechnungen (*One-way ANOVA* mit *Bonferroni's Post-Test* für *Batch*- und Kloneebene, *Student t-Test* für Spenderebene, \* $p < 0,05$ ).

## Ergebnisse

Dass UKEi1 insgesamt eine geringere Variabilität als UKEi3 aufwies, konnte mit der Auftrennung der Ebenen verifiziert werden (Abbildung 4.14A). Die Berechnung der Varianz verdeutlichte allerdings, dass zwar wie erwartet der größte Anteil der Varianz (78%) der Ebene der *Batches* zugeschrieben werden konnte und keine Varianz auf der Klonebene beruhte (0%), aber auch, dass trotz berechneter Signifikanz keine Varianz auf die Spenderebene zurückzuführen war (0%, Abbildung 4.14B).

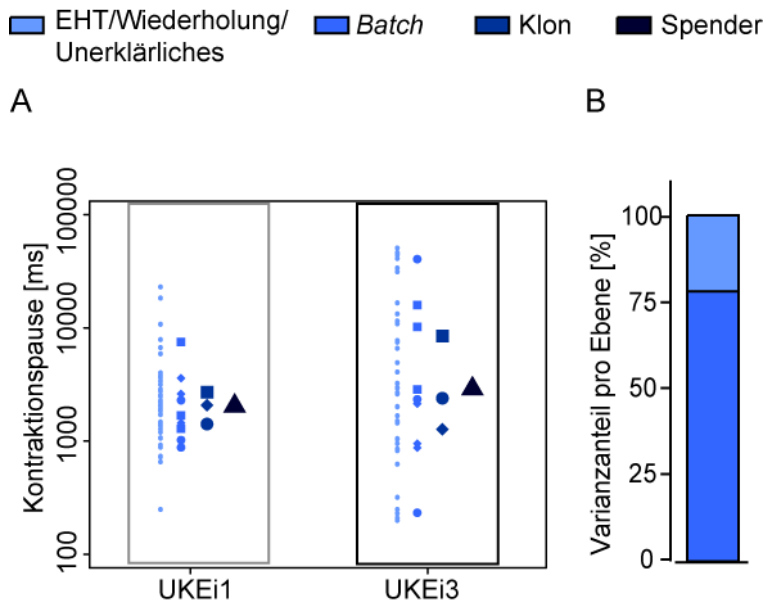


Abbildung 4.14: Ergebnisse der Mehrebenenanalyse mit den Ebenen EHT/Wiederholung/Unerklärliches (hellblau), *Batch* (blau), Klon (marineblau) und Spender (dunkelblau). (A) Darstellung der Ebenen-abhängigen Variabilität der Messrohwerter. (B) Darstellung der Ebenen-abhängigen Varianzanteile (ICC, %).

## Ergebnisse

### 4.1.5.4 Kontraktionsregularität

Die Entwicklung von Arrhythmien wurde über einen Zeitraum von 10 Stunden in sowohl 1,8 mM als auch 3 mM Calcium gemessen (Abbildung 4.15). Für dieses Experiment fehlt die Messung eines *Batches* von UKEi1-C, da zu dem Aufnahmezeitpunkt die Software keine Langzeitmessungen verarbeiten konnte. Es konnten auf allen Ebenen und sowohl für UKEi3 als auch UKEi1 und den beiden Konditionen (1,8 mM; 3 mM) signifikante Unterschiede gemessen werden (Tabelle 4.4).

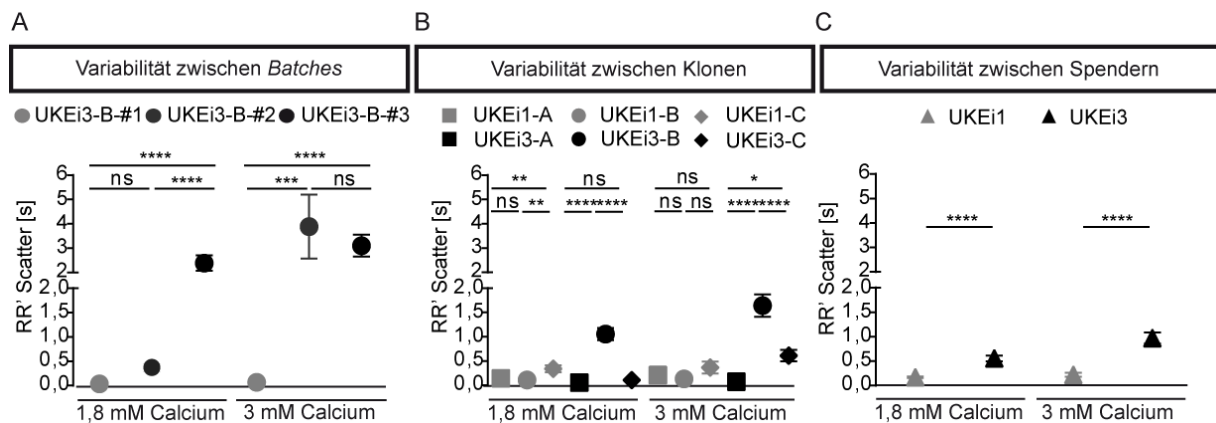


Abbildung 4.15: Kontraktionsregularität. Kontraktionsregularitäten in 1,8 mM und 3 mM Calcium und ihre Variabilität auf (A) *Batch*-Ebene, (B) Klonebene und (C) Spenderebene. UKEi3-B #1-3 wurden als repräsentatives Beispiel der *Batches* gewählt. Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM. (One-way ANOVA mit *Bonferroni's Post-Test* für *Batch*- und Klonebene, *Student t-Test* für Spenderebene, \* $p < 0,05$ ). *RR' Scatter* (s) beschreibt den Dezilabstand von medianer Schlag-zu-Schlag Abweichung.

## Ergebnisse

Tabelle 4.4: Kontraktionsregularitäten (*RR' Scatter*, s) in 1,8 mM und 3 mM Calcium.

			Langzeitmessung in 1,8 /3 mM Calcium									
			1,8 mM Calcium					3 mM Calcium				
Spender	Klon	Batch	Anzahl (A/M)	Mittelwert±SD	Variabilität			Anzahl (A/M)	Mittelwert±SD	Variabilität		
UKEi1	A	#1	4/4	0,11±0,08	ns			4/4	0,20±0,24	ns		
UKEi1	A	#2	4/4	0,08±0,03				4/4	0,19±0,15			
UKEi1	A	#3	4/4	0,23±0,12		**	***	4/4	0,23±0,41		ns	ns
UKEi1	B	#1	4/4	0,08±0,05	ns			4/4	0,16±0,1	ns		
UKEi1	B	#2	3/3	0,15±0,08				4/4	0,1±0,04			
UKEi1	B	#3	2/2	0,1±0,09		ns	ns	3/3	0,13±0,09		ns	ns
UKEi1	C	#1	3/3	0,5±0,4	**			4/4	0,55±0,71	ns		
UKEi1	C	#2	2/2	0,09±0,05				3/3	0,12±0,03			
UKEi1	C	#3	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		n.a.	n.a.
UKEi3	A	#1	3/4	0,11±0,16	ns			3/3	0,08±0,09	ns		
UKEi3	A	#2	4/4	0,03±0,02				3/4	0,1±0,13			
UKEi3	A	#3	4/4	0,04±0,03		ns	ns	2/2	0,04±-0,04		ns	ns
UKEi3	B	#1	8/8	0,03±0,01	ns			8/8	0,07±0,02	***		
UKEi3	B	#2	4/4	0,37±0,27				2/2	3,9±2,6			
UKEi3	B	#3	8/8	2,39±1,04		****	****	8/8	3,1±1,5		****	ns
UKEi3	C	#1	4/4	0,07±0,04	ns			4/4	0,1±0,09	ns		
UKEi3	C	#2	4/4	0,03±0,01				4/4	0,04±0,01			
UKEi3	C	#3	4/4	0,2±0,09		****	****	4/4	1,58±1,01		****	****
UKEi1	A	#1-3	12/12	0,14±0,045	ns			12/12	0,2±0,17	ns		
UKEi1	B	#1-3	9/9	0,11±0,03				12/12	0,13±0,05			
UKEi1	C	#1-3	5/5	0,34±0,24		**	**	7/7	0,37±0,4		ns	ns
UKEi3	A	#1-3	11/12	0,06±0,05	****			8/9	0,07±0,07	****		
UKEi3	B	#1-3	20/20	1,05±0,42				18/18	1,64±0,76			
UKEi3	C	#1-3	12/12	0,11±0,3		ns	****	12/12	0,61±0,39		*	****
UKEi1	A-C	#1-3	36/36	0,17±0,29	****			31/31	0,22±0,14	****		
UKEi3	A-C	#1-3	43/43	0,56±1,21				38/39	0,97±0,38			

Werte aller *Batches*, Klone und Spender mit der Anzahl an analysierten (A) und gemessenen (M) EHTs, deren berechneten Mittelwerte  $\pm$  SD (s) und Variabilität, dargestellt in Signifikanzberechnungen (*One-way ANOVA* mit *Bonferroni's Post-Test* für *Batch*- und Kloneebene, *Student t-Test* für Spenderebene, \* $p < 0,05$ ). *RR' Scatter* (s) beschreibt den Dezilabstand von medianer Schlag-zu-Schlag Abweichung.

## Ergebnisse

Die Separierung der Variabilität auf die 3 Ebenen bekräftigte die Annahme, dass UKEi3 eine höhere Streuung der Messwerte zeigte und insgesamt eine stärkere Entwicklung von Arrhythmien aufwies (Abbildung 4.16A). Außerdem ermöglichte es die *Batch*-Ebene als die Ebene mit der höchsten Varianz für beide Konditionen (1,8 mM: 42%; 3 mM Calcium: 36%, Abbildung 4.16B) auszumachen. Es folgte die Klonebene mit 12% bzw. 16% Varianz. Ungleich der Signifikanzberechnung wurde keine Varianz auf der Spenderebene gefunden (0%).

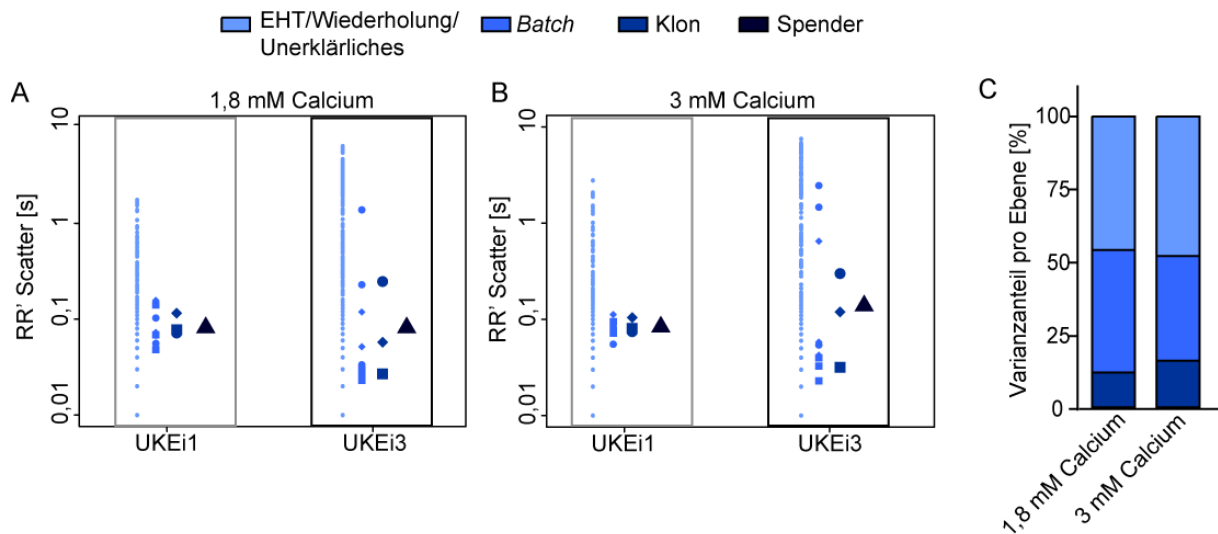


Abbildung 4.16: Mehrebenenanalyse der Kontraktionsregularität in 1,8 mM und 3 mM Calcium. Ergebnisse der angewandten Mehrebenenanalyse mit den Ebenen EHT/Wiederholung/Unerklärliches (hellblau), *Batch* (blau), Klon (marineblau) und Spender (dunkelblau). Darstellung der Ebenen-abhängigen Variabilität der Messrohwerte in (A) 1,8 mM und (B) 3 mM Calcium. (C) Darstellung der Ebenen-abhängigen Varianzanteile (ICC, %) in 1,8 mM und 3 mM Calcium. *RR' Scatter* (s) beschreibt den Dezilabstand von medianer Schlag-zu-Schlag Abweichung.



## Ergebnisse

### 4.1.5.5 Wirkungen von Isoprenalin und Carbachol

Um die Reaktion der EHTs auf  $\beta$ -adrenerge Stimuli zu untersuchen, wurde ein Bolus von 100 nM Isoprenalin verwendet. Anschließend wurde dem Medium der cholinerge Agonist Carbachol (10  $\mu$ M) hinzugegeben, um seine Wechselwirkung mit Isoprenalin auf die EHTs zu analysieren. UKEi1 und UKEi3 zeigten beide einen Isoprenalin-induzierten Anstieg der Kraft um ~50% und eine fast vollständige Aufhebung des Isoprenalin-Effekts durch Carbachol. Für die Berechnung der relativen Effektgröße wurde die unter der pharmakologischen Intervention gemessene Kraft mit den vorherigen gemessenen Kräften verrechnet (siehe 3.5.3). Signifikante Unterschiede konnten ausschließlich auf der *Batch*-Ebene und auch nur bei der Wechselwirkung mit Carbachol gezeigt werden (Abbildung 4.17, Tabelle 4.5). UKEi1-A #2 und UKEi1-B #1 wiesen einen signifikant größeren relativen Effekt von Carbachol auf als die anderen beiden zugehörigen *Batches* (UKEi1-A #2 vs. UKEi1-A #1/#3: \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; UKEi1-B #1 vs. UKEi1-B #2/#3: \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Die Unterschiede in UKEi3-*Batches* waren geringer aber dennoch signifikant (UKEi3-A #1 vs. UKEi3-A #3: \* $p < 0,05$ ; UKEi3-B #2 vs. UKEi3-B #3: \* $p < 0,05$ ).

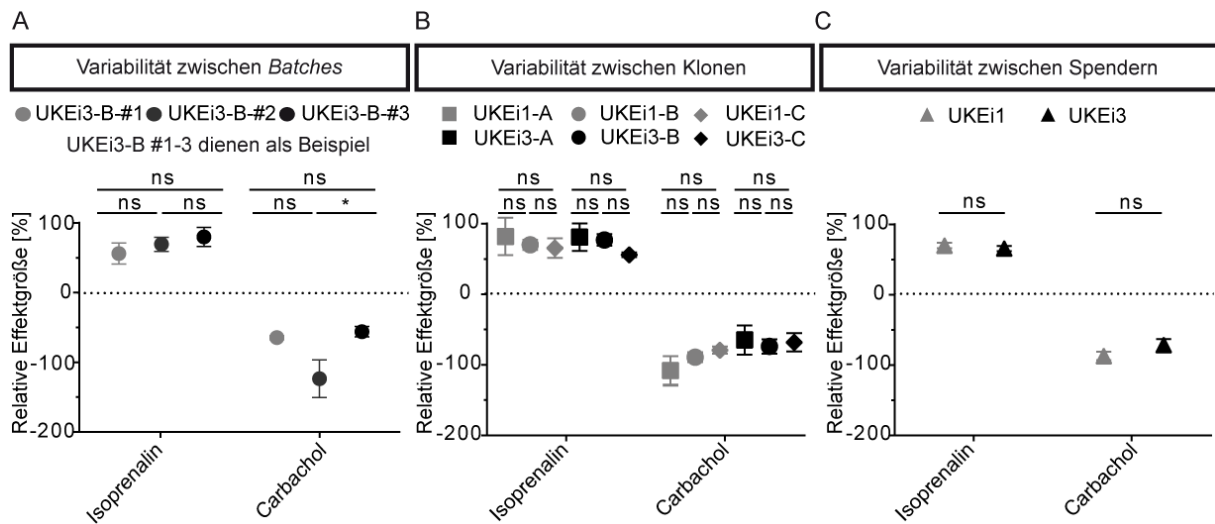


Abbildung 4.17: Wirkung von Isoprenalin und Carbachol. Isoprenalin- und Carbachol-abhängige relative Effektgrößen und ihre Variabilität auf (A) *Batch*-Ebene, (B) Klonebene und (C) Spenderebene. UKEi3-B #1-3 wurden als repräsentatives Beispiel der *Batches* gewählt. Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM. (*One-way ANOVA* mit *Bonferroni's Post-Test* für *Batch*- und Klonebene, *Student t-Test* für Spenderebene, \* $p < 0,05$ ).

## Ergebnisse

Tabelle 4.5: Relative Effektgrößen von Isoprenalin und Carbachol.

			Wirkung von Isoprenalin und Carbachol									
			Isoprenalin					Carbachol				
Spender	Klon	Batch	Anzahl (A/M)	Mittelwert±SD	Variabilität			Anzahl (A/M)	Mittelwert±SD	Variabilität		
UKEi1	A	#1	5/7	72,9±22,7	ns			7/7	-49,6±31,2	****		
UKEi1	A	#2	8/8	44,6±15,1				8/8	-165,8±46,9			
UKEi1	A	#3	7/8	61,3±14,4		ns	ns	7/8	-61,4±15,3		ns	****
UKEi1	B	#1	6/7	74,5±10,4	ns			7/7	-69,2±10,9	****		
UKEi1	B	#2	7/7	50,3±15,5				7/7	-115,9±18,8			
UKEi1	B	#3	2/2	82,2±6,1		ns	ns	2/2	-38,4±14,2		ns	****
UKEi1	C	#1	5/6	76,2±24,7	ns			5/6	-80,7±18	ns		
UKEi1	C	#2	8/8	90,8±36,4				8/8	-82,2±30			
UKEi1	C	#3	4/5	88,3±17,3		ns	ns	4/5	-69,8±14,3		ns	ns
UKEi3	A	#1	3/3	54,6±26,8	ns			3/3	-42,7±36,8	ns		
UKEi3	A	#2	8/8	90,8±36,4				8/8	-82,2±29,6			
UKEi3	A	#3	4/4	88,3±17,3		ns	ns	4/4	-69,8±14,4		*	ns
UKEi3	B	#1	8/8	59,6±15,2	ns			8/8	-61,6±2,9	ns		
UKEi3	B	#2	7/7	73±10				7/7	-120,9±27,3			
UKEi3	B	#3	8/8	83,6±13,7		ns	ns	8/8	-53,1±7,5		ns	*
UKEi3	C	#1	8/8	53,2±5,1	ns			4/4	-55±15,3	ns		
UKEi3	C	#2	6/7	68,52±16,3				6/7	-66,7±27,5			
UKEi3	C	#3	8/8	45,7±15,7		ns	ns	8/8	-78,7±39,6		ns	ns
UKEi1	A	#1-3	20/23	80,5±129	ns			22/23	-108,5±98,15	ns		
UKEi1	B	#1-3	15/16	68,7±29,9				16/16	-89,5±28,5			
UKEi1	C	#1-3	17/19	64,1±62,7		ns	ns	17/19	-79,7±22,5		ns	ns
UKEi3	A	#1-3	15/15	79,6±89,6	ns			15/15	-65,4±94,1	ns		
UKEi3	B	#1-3	23/23	75,6±40,1				23/23	-74,41±50,1			
UKEi3	C	#1-3	22/22	54,7±15,5		ns	ns	21/22	-68,7±62		ns	ns
UKEi1	A-C	#1-3	52/55	69,9±27,6	ns			55/56	-84,5±34	ns		
UKEi3	A-C	#1-3	60/60	63,5±28,8				59/60	-55,8±29			

Werte aller *Batches*, Klone und Spender mit der Anzahl an analysierten (A) und gemessenen (M) EHTs, deren berechneten Mittelwerte  $\pm$  SD (s) und Variabilität, dargestellt in Signifikanzberechnungen (*One-way ANOVA* mit *Bonferroni's Post-Test* für *Batch*- und Klonebene, Student t-Test für Spenderebene, \* $p < 0,05$ ).

## Ergebnisse

Diese vergleichsweise homogenen Resultate spiegeln sich in den Abbildungen der Variabilität (4.18A) und Varianz (4.18B) wider, die verdeutlichen, dass die Varianz nur zu 8% bzw. 2,5% auf die *Batch*-, 13% bzw. 0% auf die Klon- und 0% bzw. 8% auf die Spenderebene zurückzuführen sind. Die höchste Varianz konnte in der letzten Ebene EHT/Wiederholung/Unerklärliches gefunden werden (Isoprenalin: 79%; Carbachol: 90%). Der Anteil der letzten Ebene war in diesem Experiment mit Abstand der größte.

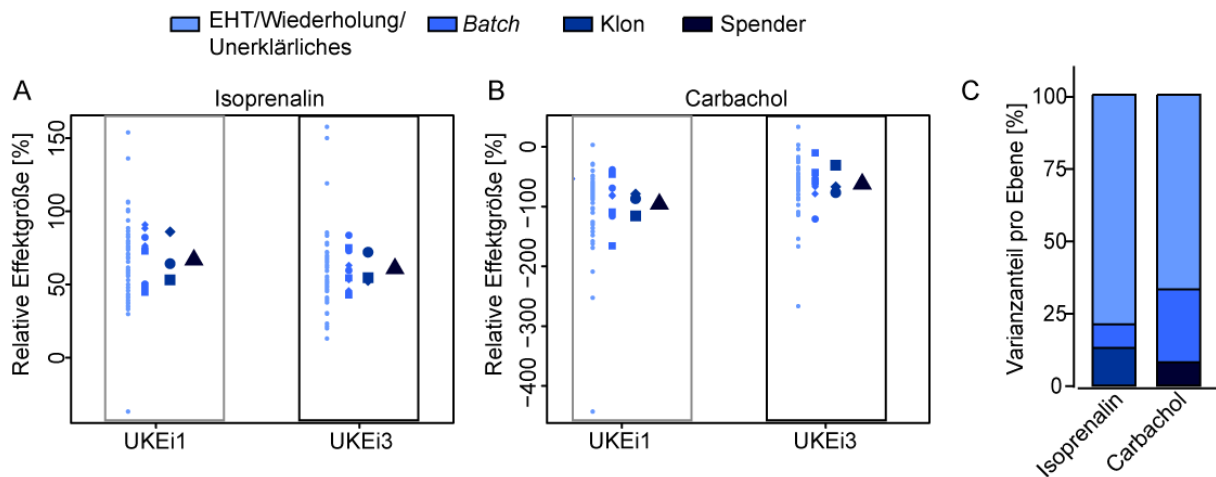


Abbildung 4.18: Mehrebenenanalyse der Wirkung von Isoprenalin und Carbachol. Ergebnisse der angewandten Mehrebenenanalyse mit den Ebenen EHT/Wiederholung/Unerklärliches (hellblau), *Batch* (blau), Klon (marineblau) und Spender (dunkelblau). Darstellung der Ebenen-abhängigen Variabilität der Messrohwerte in (A) 1,8 mM und (B) 3 mM Calcium. (C) Darstellung der Ebenen-abhängigen Varianzanteile (ICC, %) unter Isoprenalin und Carbachol.

## Ergebnisse

### 4.1.5.6 Technische Variabilität der Experimente

Die technische Variabilität der Experimente konnte miteinander verglichen werden, indem der Variationskoeffizient (SD/Mittelwert) als normierter Parameter berechnet wurde (Abbildung 4.19). Die Experimente Calciumkonzentrations-Wirkungskurve, Kraft-Frequenzbeziehung und die Bestimmung der Isoprenalinwirkung zeigten einen geringen Variationskoeffizienten von 0,3, 0,3 bzw. 0,5. Der Variationskoeffizient der Bestimmung der Carbacholwirkung zeigte mit 0,74 einen höheren Wert. Die höchsten Variationskoeffizienten konnten allerdings für die Experimente zur Bestimmung der Kontraktionspause (Post-Pausenbeziehung, PRP) und der Kontraktionsregularität in sowohl 1,8 mM als auch 3 mM Calcium kalkuliert werden (1,8; 2,5 bzw. 2,3).

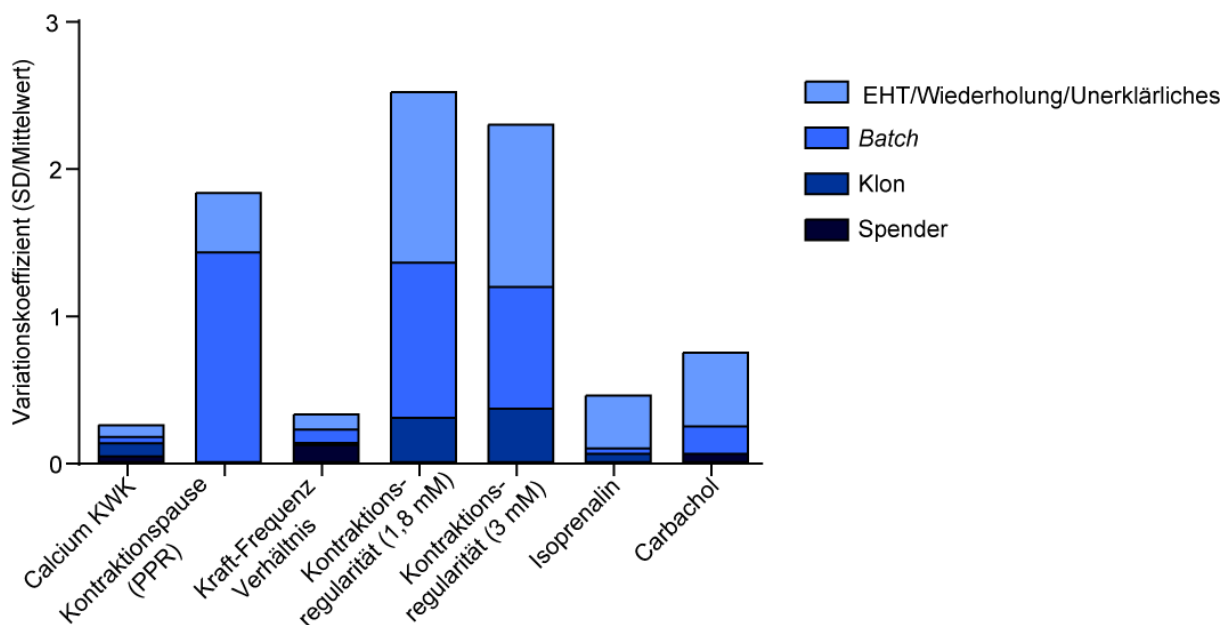


Abbildung 4.19: Variationskoeffizienten der Experimente. Zum Vergleich der Experimente wurden der Variationskoeffizient (SD/Mittelwert) und seine Ebenen-abhängigen Anteile berechnet. Hellblau: EHT/Wiederholung/Unerklärliches, *Batch*: blau, Klon: marineblau, Spender: dunkelblau. PRP, Post-Pausenbeziehung.

### 4.1.6 Kardiale Genexpressionsanalyse

Ein möglicher Zusammenhang zwischen funktionellen Ergebnissen und der Genexpression wurde untersucht, indem 57 kardiale Gene mithilfe der NanoString Technologie auf ihre Expression analysiert wurden. Die kardialen Gene wurden aufgrund ihrer Beteiligung an (i) der Hypertrophie, (ii) der Calciumhomöostase, (iii) Apoptose, (iv) dem fetalen Genprogramm, (v) Fibrose und (vi) der Arrhythmieentstehung gewählt. Für die Analyse wurden ~30 Tage alte EHTs von sowohl UKEi1, UKEi3, als auch UKEi2 verwendet. Eine *Heatmap*-Darstellung und PCA zeigten auf, dass sich *Batches* aller Spender unabhängig von den zugehörigen Klonen verteilten (Abbildung 4.20A, 4.20D). UKEi2-*Batches* (d.h. EHTs, die nicht schlugen und von einer karyotypisch abnormalen Zelllinie stammten) häuften sich Spender-spezifisch zu einem Cluster an, wohingegen sich UKEi1- und UKEi3-*Batches* Spender-unabhängig anordneten und vermischten. Auf Klonebene zeigten sich Spender-abhängige Cluster für UKEi1 und UKEi3, auch wenn der Verlauf der Taxonomiebranche der *Heatmap*-inbegriffenen Taxonomieanalyse noch stets keine klare Separierung von UKEi1 und UKEi3 aufzeigte (Abbildung 4.20B). Diese Beobachtung spiegelte sich in der PCA wider, in der sich UKEi1- und UKEi3-Klone, wie auch schon auf *Batch*-Ebene, geclustert darstellten (Abbildung 4.20E). Erst auf Spenderebene zeigten UKEi1 und UKEi3 eine klare Separierung in der PCA voneinander (Abbildung 4.20F). Ihre insgesamt große Ähnlichkeit zueinander wurde aber weiterhin durch die geringe Distanzhöhe der Taxonomiebranche zwischen UKEi1 und UKEi3 verdeutlicht, gerade im Vergleich zu UKEi2 (Abbildung 4.20C).

## Ergebnisse

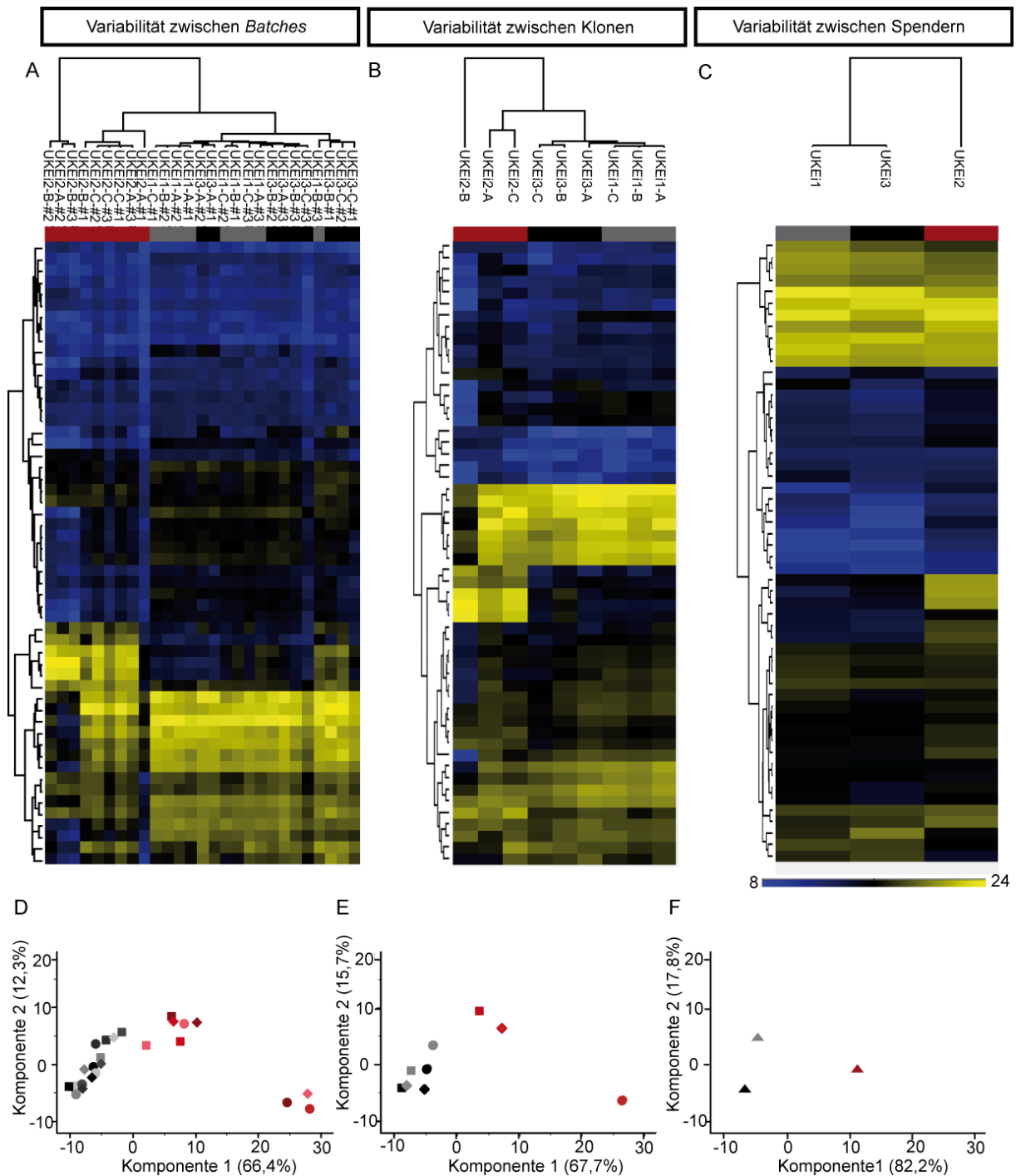


Abbildung 4.20: Kardiale Genexpression. NanoString-Analyse der Genexpression dargestellt als (A-C) *Heatmap*, bei der eine gelbe Markierung eine hohe und eine blaue eine geringe Expression impliziert, und (D-F) *Principal Component-Analyse* (PCA). Ebenen-abhängige Variabilität der Genexpression zwischen (A, D) *Batches*, (B, E) *Klonen* und (C, F) *Spendern*.

Ein direkter Genexpressionsvergleich mithilfe einer *Volcano Plot*-Analyse verifizierte die Ähnlichkeit zwischen UKEi1 und UKEi3. Kein Gen wurde signifikant abweichend zwischen UKEi1 und UKEi3 exprimiert, allein CASQ2 befand sich in der Nähe des

## Ergebnisse

Signifikanzgrenzwertes und war geringer in UKEi1 exprimiert (Abbildung 4.21). Im Gegensatz hierzu zeigte UKEi2 eine klare Separierung von UKEi1 und UKEi3 in der *Heatmap*- und PC-Analyse, die auf eine sehr geringe Expression von Genen der intrazellulären Calciumhomöostase und Herzzellen-spezifischen Genen zurückzuführen ist und sich im Einklang mit dem geringen CM-Reinheitsgrad der kardialen Differenzierung (siehe 4.1.3) befindet (Tabelle Z1-3).

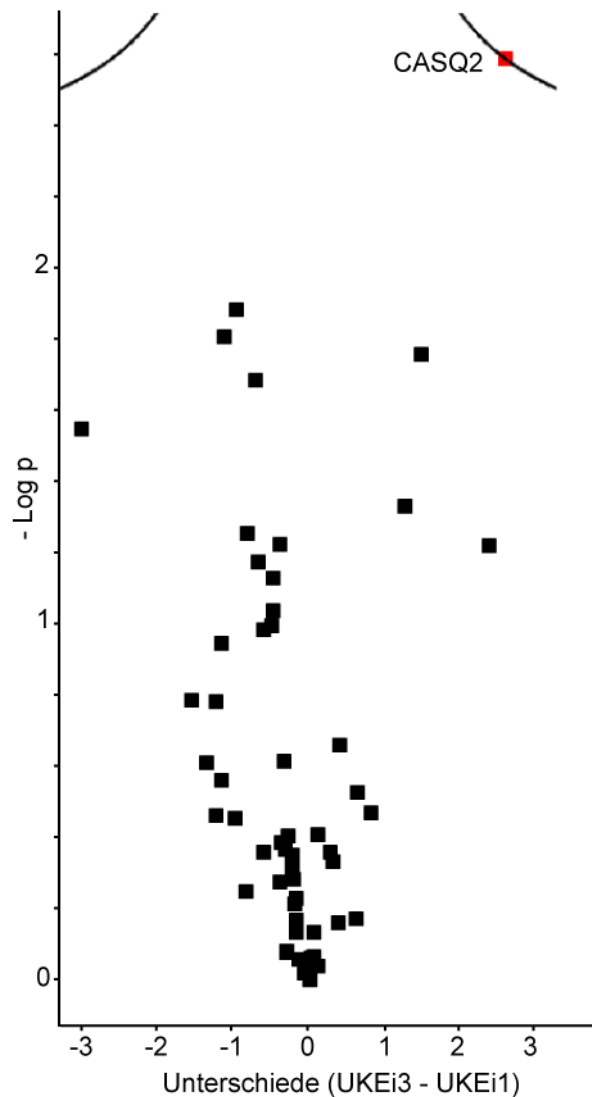


Abbildung 4.21: *Volcano Plot*-Analyse. Calsequestrin (CASQ2) befindet sich als einziges Gen an der Grenze zur Signifikanz zwischen UKEi1 und UKEi3. X-Achsen: 0 impliziert eine gleichwertige Expression eines Gens zwischen UKEi1 und UKEi3. Auf der rechten Seite aufgetragene Gene (0-3) sind geringer in UKEi1 exprimiert. Gene, die weiter links angeordnet sind (-3-0), sind geringer in UKEi3 exprimiert.

## Ergebnisse

### 4.2 Untersuchungen zur Anwendung von hiPSC-CMs als biologischer Schrittmacher

#### 4.2.1 Herstellung und Entwicklung des kardialen Organoid-Modells

Zur Herstellung des kardialen Organoid-Modells wurde ein einzelner hiPSC-CM EB in ein Ratten-EHT eingebracht (EHT+EB). Hierfür wurde das spontan schlagende EB in die vorgefertigte EHT-Gussform aus Agarose, mittig und in die Nähe einer der beiden Silikonhalterungen platziert, zu dem der noch flüssige EHT-*Mastermix* mit Rattenherzzellen hinzupipettiert wurde. Die weitere Prozedur unterschied sich nicht von der Herstellung normaler Ratten-EHTs, die als Kontrollgruppe dienen (Abbildung 4.22).

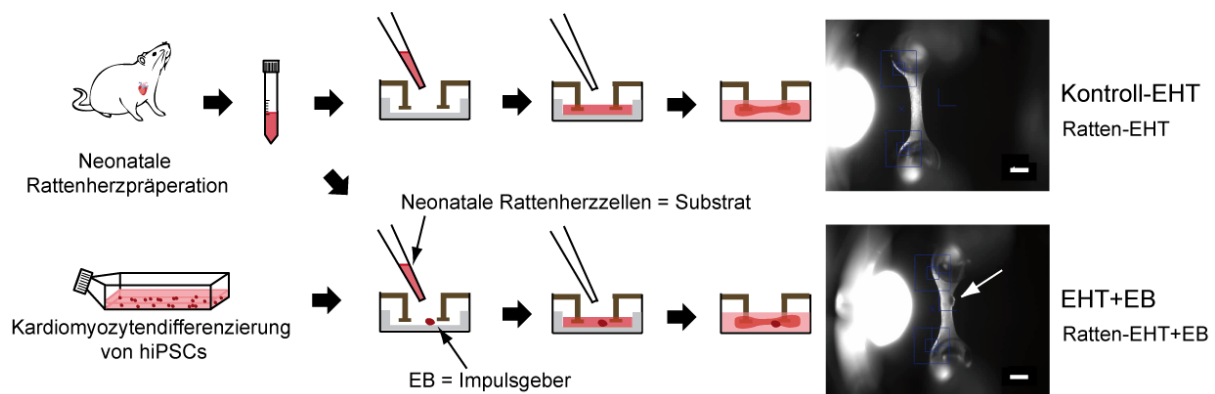


Abbildung 4.22: Herstellung des kardialen Organoid-Modells. Die schematische Darstellung zeigt, wie neonatale Rattenherzen präpariert und zu einem *Mastermix* inklusive Fibrinogen verarbeitet wurden. Dieser *Mastermix* wird in die EHT-Gussform gegeben, um Kontroll-EHTs herzustellen. Für die Herstellung der EHTs+EB wurde zunächst ein EB aus hiPSC-CMs (Impulsgeber) in die EHT-Gussform vorgelegt, bevor der Rattenherzzellen-enthaltende *Mastermix* (Substrat) hinzugefügt wurde. Screenshots zeigen Beispiele beider Gruppen. Der weiße Pfeil deutet auf das EB des EHT+EB. Maßstab 1 mm.

Während der ersten Tage der Kultivierung schlugen die EBs spontan und unabhängig vom umliegenden Rattengewebe. Histologisch konnte in dieser Zeit beobachtet werden, dass sich die Zellstrukturen im Rattengewebe zum EB radial ausrichteten (Abbildung 4.23).



## Ergebnisse

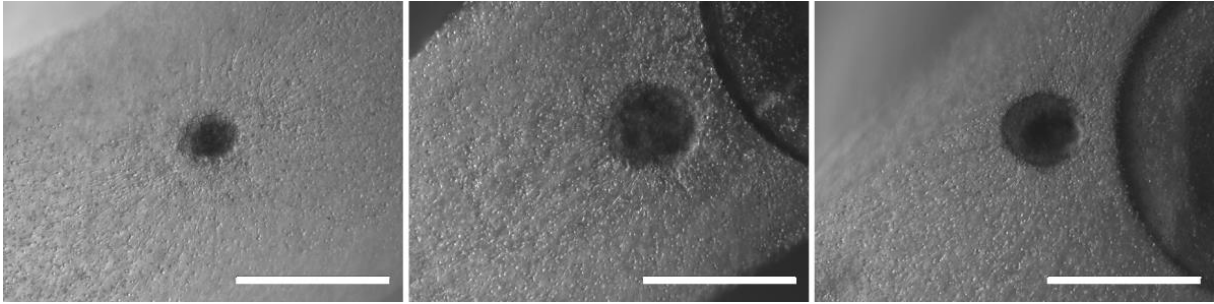


Abbildung 4.23: Entwicklung des kardialen Organoid-Modells. Repräsentative Aufnahmen der radialen Anordnung der Rattenzellen zum EB ab Tag 3 der Kultivierung. Maßstab 1 mm.

Nach etwa 3-5 Tagen fingen die Rattenzellen zunächst einzeln und unkoordiniert an zu schlagen. Dieses Schlagmuster entwickelte sich innerhalb der folgenden 1-2 Tage zu einem synchronen Schlagen einzelner Zellgruppierungen, das sich nach etwa 7-9 Kultivierungstagen zu einem einheitlichen und koordinierten Schlagmuster entfaltete. In dieser Zeit konnte oft beobachtet werden, dass integriertes EB und umliegendes Rattengewebe asynchron schlugen. Nach 2-3 Wochen Kultivierung der EHTs+EB begannen EB und umliegendes EHT synchron und regulär zu schlagen, wie für hiPSC-CM-EHTs bekannt (Lemoine et al. 2017). Die Frequenz von EHTs+EB lag bei  $50,0 \pm 1,3$  BPM ( $n=29$ ). Kontroll-EHTs hingegen schlugen in Ratten-EHT-typischen arrhythmischen *Bursts* (Hirt et al. 2014).

### 4.2.2 Kontraktionsmuster

Um zu untersuchen, ob das reguläre und rhythmische Kontraktionsmuster der EHTs+EB über die Zeit stabil bleibt, wurde die spontane Kontraktionsfrequenz über einen Zeitraum von 10 Stunden in EHT-Medium gemessen. Das Kontraktionsmuster jeder Messung wurde anhand einer Arrhythmien-Skala (0, 1) bewertet, wobei 0 ein reguläres und rhythmisches Kontraktionsmuster impliziert und 1 ein irreguläres und arrhythmisches (Abbildung 4.24). Mit dieser Analyse konnte sowohl gezeigt werden, dass EHTs+EB signifikant regulärer als Kontroll-EHTs schlugen, als auch, dass dieses Kontraktionsmuster über die Zeit stabil blieb ( $***p<0,001$ ).

## Ergebnisse

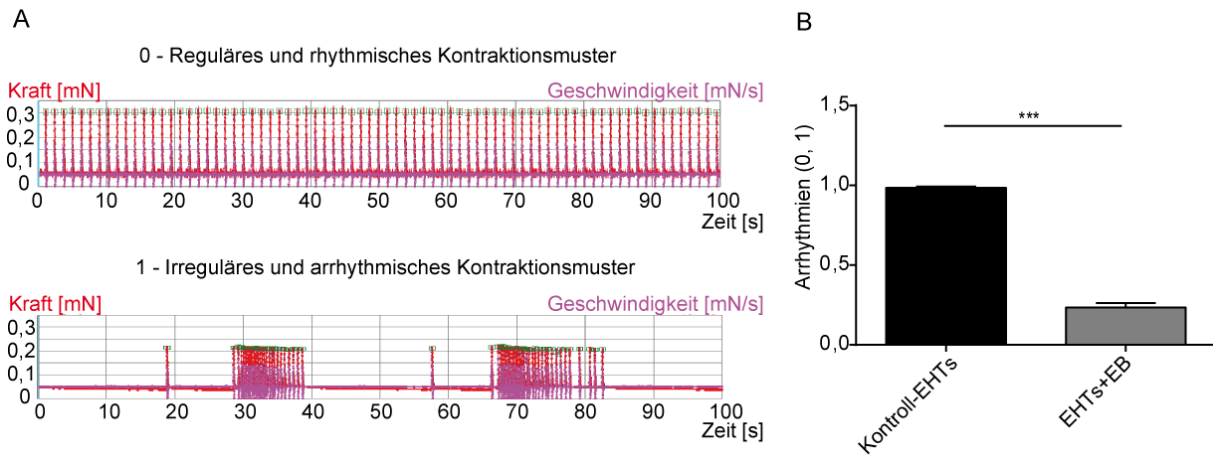
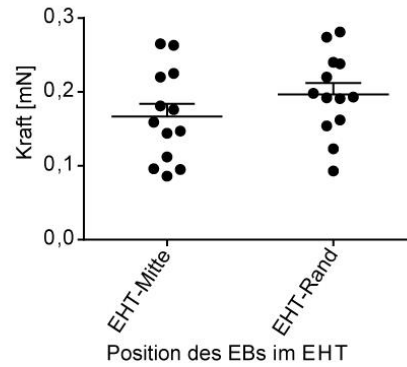


Abbildung 4.24: Kontraktionsmuster. (A) Analyse der Kontraktionsmuster. (A) Beispielaufnahmen zur Illustration der Arrhythmieskala. 0 entspricht einem regulären und rhythmischen Kontraktionsmuster, 1 einem irregulären und arrhythmischen Kontraktionsmuster. (B) Kontraktionsregularität von Kontroll-EHTs und EHTs+EB. Mann-Whitney Test,  $p < 0,05$ . 10 Messpunkte (10-stündige Aufnahmen) von  $n=18/24$  Kontroll-EHTs/EHTs+EB. Daten dreier EHT-Herstellungsrunden zusammengefasst.

Im Folgenden wurde der Einfluss der (i) Lage des EBs innerhalb des Ratten-EHTs und (ii) der EB-Größe auf die Funktion analysiert. Die Lage des EBs hatte keine Auswirkung auf die Kraftentwicklung und die Übernahme eines regulären Kontraktionsmusters, sofern das EB innerhalb der beiden Silikonhalterungen platziert war (Abbildung 4.25A). Um den Einfluss der Größe des EBs zu untersuchen, wurden EBs durch Zellsiebe mit 2 Filtergrößen (300  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ ) in die Größen  $<300 \mu\text{m}$ , 300-500  $\mu\text{m}$  und  $>500 \mu\text{m}$  aufgeteilt und zur Herstellung der EHT+EBs verwendet (Abbildung 4.25B).

## Ergebnisse

A



B

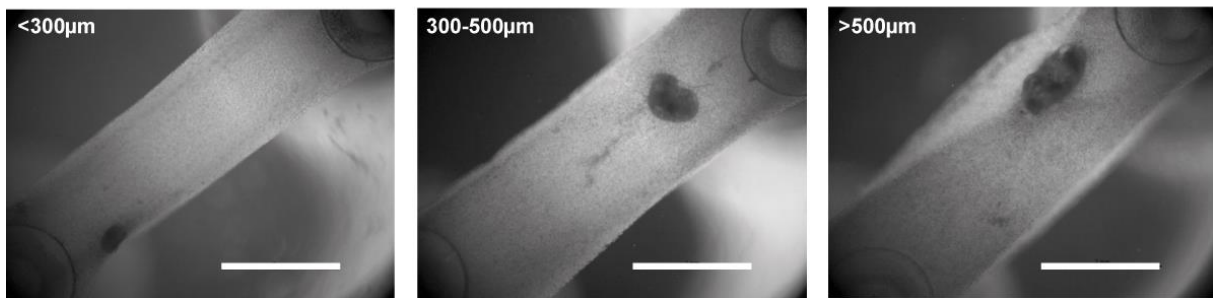


Abbildung 4.25: Robustheit des kardialen Organoid-Modells. Untersuchungen zum Einfluss (A) der Lage des EBs innerhalb des EHTs und (B) der EB-Größe. (A) Effekt der EB-Position innerhalb des EHT+EB. Keine signifikanten Unterschiede in der Kraft [mN] zwischen EHTs+EB, in denen das EB entweder mittig oder am EHT-Rand, in der Nähe der Silikonhalterungen, positioniert war (*One-way ANOVA with Bonferroni's Post-Test*,  $*p < 0,05$ ). Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n=26$  pro Gruppe. Daten von 2 EHT-Herstellungsrunden zusammengefasst. (B) Beispielaufnahmen von EHTs+EB mit  $<300 \mu\text{m}$ ,  $300-500 \mu\text{m}$  und  $>500 \mu\text{m}$  großen EBs. Maßstab 1 mm.

Anhand einer kontinuierlichen Beobachtung der EHTs+EB-Entwicklung über die Zeit wurde deutlich, dass sich EHTs+EB mit  $300-500 \mu\text{m}$  großen EBs am schnellsten in Bezug auf Kraft und die Übernahme des regulären Kontraktionsmusters entwickelten. Nach  $\sim 3$  Wochen Kulturzeit zeigten jedoch  $\sim 80\%$  aller EHTs+EB der 3 Gruppen ein reguläres und rhythmisches Kontraktionsmuster (Tabelle 4.6).

## Ergebnisse

Tabelle 4.6: EB-Größen-abhängige Erfolgsrate regulär schlagender EHTs+EB.

	Erfolgsrate [%]		
Kulturzeit (Tage)	<300 µm (n=15)	300-500 µm (n=15)	>500 µm (n=8)
19	21	67	25
21	47	73	50
23	80	80	75

### 4.2.3 Human-spezifische Genexpressionsanalyse

Die stabile Übernahme des Kontraktionsmusters des EBs im Rattengewebe führte zu der Fragestellung, ob das EB des kardialen Organoid-Modells nicht nur funktionell einem Schrittmacher ähnelt, sondern mit der Transkription von HCN4 und Cx45 auch eine Schrittmacherzellen-ähnliche molekulare Signatur aufweist. Zur Beantwortung diente eine qPCR-Analyse mit Primern, die human- und somit EB-spezifisch designt wurden (Anhang, Abbildung Z2). Gesundes, humanes Gewebe aus dem linken Ventrikel (NF LV) wurde zur Standardisierung der Expression verwendet. Als weitere Kontrollen dienten sowohl EBs, bevor sie in die EHTs integriert wurden (EBs d0), als auch EBs, die parallel zu EHTs+EB einzeln in 6-wells kultiviert wurden (EBs>d14). Die Expression von *Myosin Light Channel v2* (MLC2V) diente als interne Kontrolle, da sie standardmäßig im Institut für hiPSC-differenzierte CMs ermittelt wird. Die Ergebnisse der qPCR zeigten, dass EHT-integrierte EBs eine ~10-fach höhere MLC2V-Expression aufwiesen als EB-Kontrollen, aber immer noch eine ~10-fach geringere Expression als NF LV. Für alle Gruppen wurde im Vergleich zu NF LV eine signifikant geringere MLC2V-Expression gemessen (\*\*\*\*p<0,0001, Abbildung 4.26). Die Schrittmachermarker Cx45 und HCN4 hingegen waren signifikant stärker in EHT-integrierten EBs als in NF LV exprimiert (\*\*p<0,01 bzw. \*\*\*p<0,001, Abbildung 4.26). Außerdem zeigte einerseits die EB-Kontrolle EBs>d14 eine signifikant stärkere Cx45-Expression im Vergleich zu NF LV (\*\*\*p<0,001) und andererseits EBs d0 eine signifikant stärkere HCN4-Expression im Vergleich zu NF LV (\*p<0,05).

## Ergebnisse

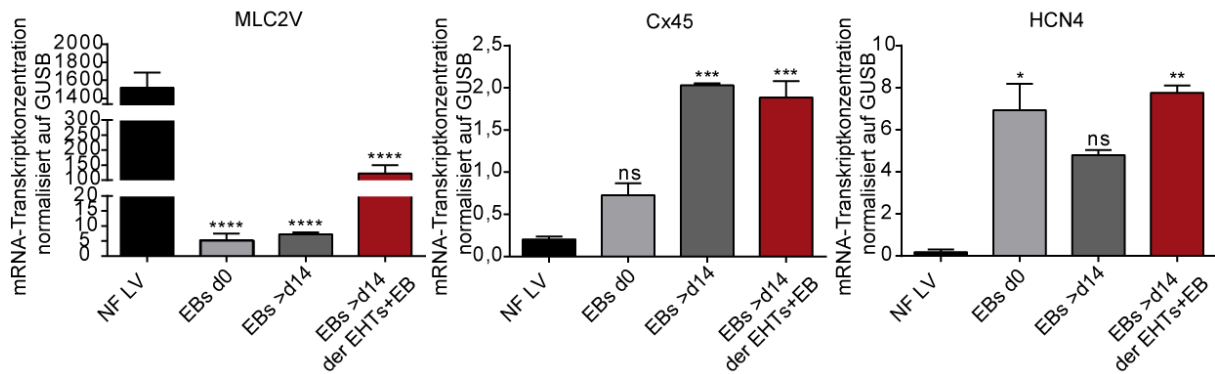


Abbildung 4.26: Human-spezifische Genexpressionsanalyse. QPCR-Ergebnisse für den ventrikulären Marker (*Myosin Light Chain 2v*, MLC2V) und die Marker für Schrittmacherzellen (*Connexin 45*, Cx45; *Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide Gated Potassium Channel 4*, HCN4) über die Kulturzeit (Tag 0, d0; >d14). Daten wurden auf die Expression des Haushaltgens  $\beta$ -Glucuronidase (GUSB) normalisiert. *One-way ANOVA* mit *Bonferroni's Post-test*,  $*p < 0,05$ . In den Graphen dargestellte Signifikanzen beziehen sich auf Vergleiche zu gesundem, humanem Gewebe aus dem linken Ventrikel (NF LV). Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM. Daten von 3 EHT-Herstellungen zusammengefasst für die Gruppen EBs d0 und EBs >d14 der EHTs+EB. Daten einer Probe von NF LV und EBs >d14. 3 technische Replikate gemittelt pro Gruppe.

Die HCN4-Expression im EB konnte mit einer Immunfluoreszenzfärbung verifiziert werden (rot, Abbildung 4.27). Zur Identifizierung des EBs im EHT+EB-Schnitt diente die Färbung des human-spezifischen Markers *lupus ku autoantigen protein p80* (Ku80, grün).

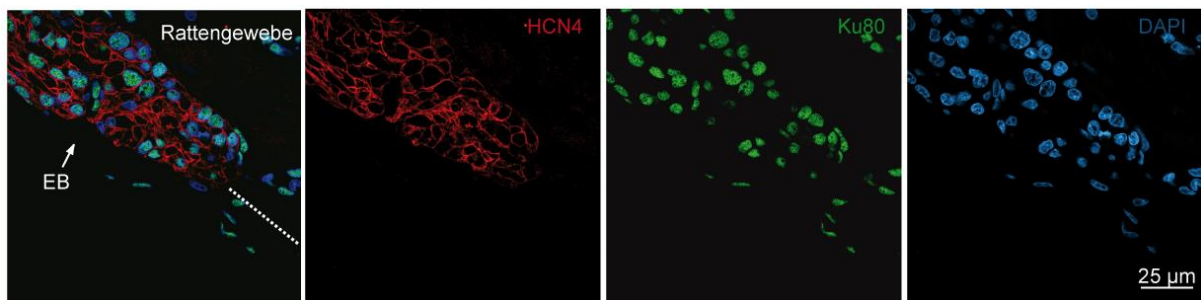


Abbildung 4.27: Immunfluoreszenz. Repräsentative Färbung von HCN4 (rot) im Bereich des EBs von EHTs+EB. Identifikation des EBs im EHT+EB erfolgte durch die Färbung des human-spezifischen Markers Ku80 (grün). DAPI (blau) wurde zur Identifikation der Zellnuklei verwendet.

### 4.2.4 HCN-Inhibierung durch Ivabradin

Die Expression des Schrittmachermarkers HCN4 im EB veranlasste die Untersuchung, inwieweit im Schrittmacher des Herzens stattfindende Mechanismen in dem entwickelten Modell eine Rolle spielen. Hierfür wurde die Wirkung des HCN-Inhibitors Ivabradin auf die EHTs+EB und Kontroll-EHTs getestet. Ivabradin ist ein Herzfrequenz senkendes Medikament, das mit hoher Spezifität den HCN-Schrittmacherkanal-generierten  $I_f$ -Strom inhibiert (Koncz et al. 2011). In der Gegenwart von 1  $\mu$ M Ivabradin zeigten EHTs+EB eine Reduktion der Frequenz um 89% (\*\*p<0,001), wohingegen Kontroll-EHTs ihre Frequenz nur um 14% verringerten (nicht-signifikant, Abbildung 4.28A). Hierbei verringerten EHTs+EB ihre Frequenz, ohne das für Ratten-EHTs typische Kontraktionsverhalten der *Bursts* zu entwickeln (Arrhythmien-Schweregrad: EHT+EB,  $0,2 \pm 0,0$ , n=9; Kontroll-EHT,  $1,0 \pm 0,0$ , n=8). Unterschiedliche Größen des EBs führten zu einer vergleichbaren Reduktion der Frequenz in EHTs+EB (Abbildung 4.28B). Dies wurde anhand eines Experiments gezeigt, das parallel zur Optimierung der Messlösung diente. So konnte in der 1,8 mM Calcium-haltigen Tyrodelösung ein stetiger Abfall der Frequenz für alle Gruppen über die Zeit beobachtet werden. Dieser durch die Tyrode bedingte Abfall der Frequenz konnte mit der Nutzung von *Dulbecco's modified Eagle Medium* umgangen werden.

## Ergebnisse

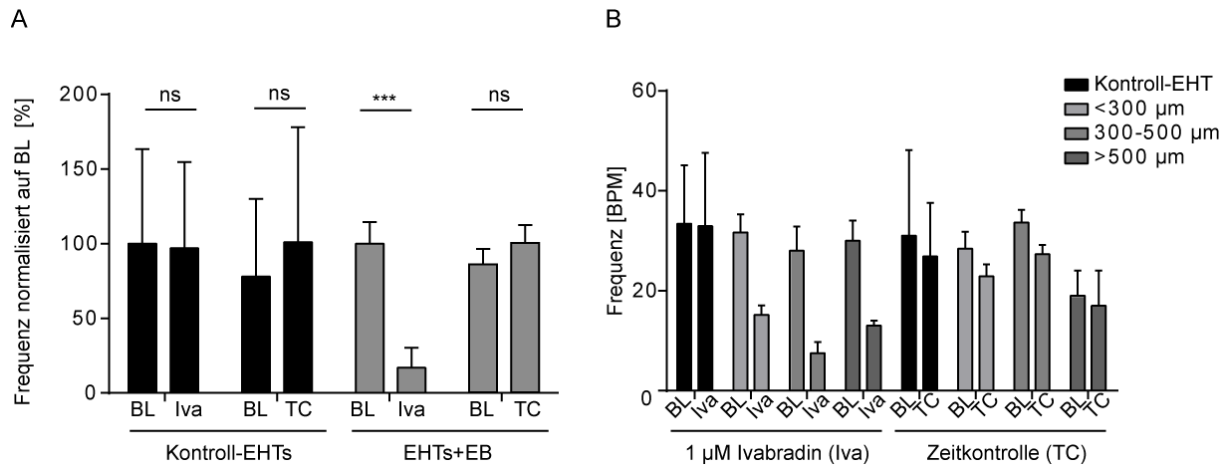


Abbildung 4.28: Wirkung von Ivabradin. (A) Frequenz (Schläge pro Minute, BPM) normalisiert auf die Referenzfrequenz (BL, ohne Ivabradin; %) von Kontroll-EHTs (n=8) und EHTs+EB (n=9) in Gegenwart von 1 µM Ivabradin. Daten von 3 EHT-Herstellungen zusammengefasst. (B) Einfluss der EB-Größe auf die Ivabradinwirkung und Testung einer neuen Messlösung (*Dulbecco's modified Eagle Medium*). Keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen (*Two-way ANOVA* mit *Bonferroni's Post-Test*). N=2-10 EHTs pro Gruppe, Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 4.2.5 Calciumtransienten

Um einerseits eine potenzielle Kopplung des EBs mit dem umliegenden EHT aufzuzeigen, als auch den/die Bereich/e der Kontraktionsinitiierung zu identifizieren, wurden Calciumtransienten im kardialen Organoid-Modell gemessen. Calciumtransienten konnten durch die Zugabe des fluoreszierenden Calciumindikators Fluo-4 (30 µM) zur Messlösung visualisiert werden. Abbildung 4.29A-B zeigt eine repräsentative *Heatmap* der Transientenmessung über die Zeit (Zeitpunkt T0/BL - T3). Das Calciumsignal ist dabei zuerst überwiegend im EB zu sehen (T0/BL) und anschließend im umliegenden Rattengewebe (T3). Quantifizierung der Signalintensitäten in den beiden Bereichen (EB, Rattengewebe) ergab, dass das Calciumsignal zum Anfang der Kontraktion im EB signifikant stärker als im umliegenden Rattengewebe war (T1; \*\*\*p<0,001; Abbildung 4.29C).

## Ergebnisse

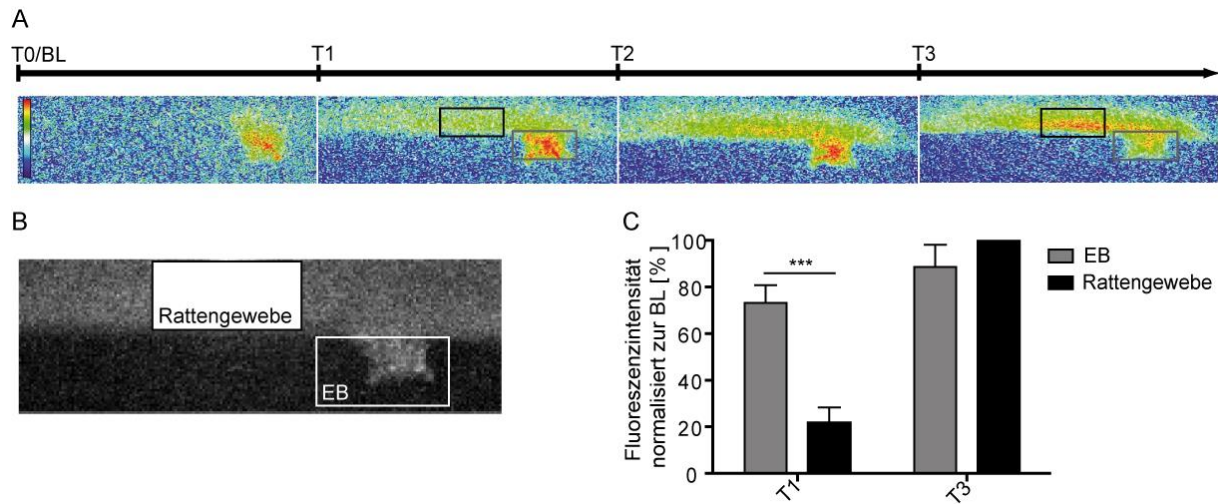


Abbildung 4.29: Calciumtransienten. (A) Repräsentative *Heatmap* zeigt Calciumtransienten über die Zeit (Referenzwert T0/BL – zuletzt analysierter Zeitpunkt T3). Signalintensitätsskala auf der linken Seite von T0/BL, Intensität von Calciumsignalen nimmt von blau bis rot zu. (B) Durchlichtbild des in A analysierten EHT+EB. Weiß gefülltes Rechteck stellt den Bereich des Rattengewebes dar, weiß gerahmtes Rechteck den des EBs. (C) Quantitative Analyse der bereichs- und zeitabhängigen Intensität von Calciumsignalen. Die Calciumsignale wurden in den Bereichen EB (grau) und Rattengewebe (schwarz) zu den Zeitpunkten T1 und T3 gemessen, die beispielhaft in A dargestellt werden ( $n=9$  EHTs+EB,  $n=9$  Kontroll-EHTs). *Two-way ANOVA* mit *Bonferroni's Post-test*,  $*p<0,05$ . Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM. Daten von 3 EHT-Herstellungen zusammengefasst.

Eine graphische Darstellung der Calciumtransienten im EB und umliegendem Rattengewebe vs. Zeit zeigten, dass das Calciumsignal  $\sim 20$  ms versetzt im Rattengewebe anstieg (Abbildung 4.30).



## Ergebnisse

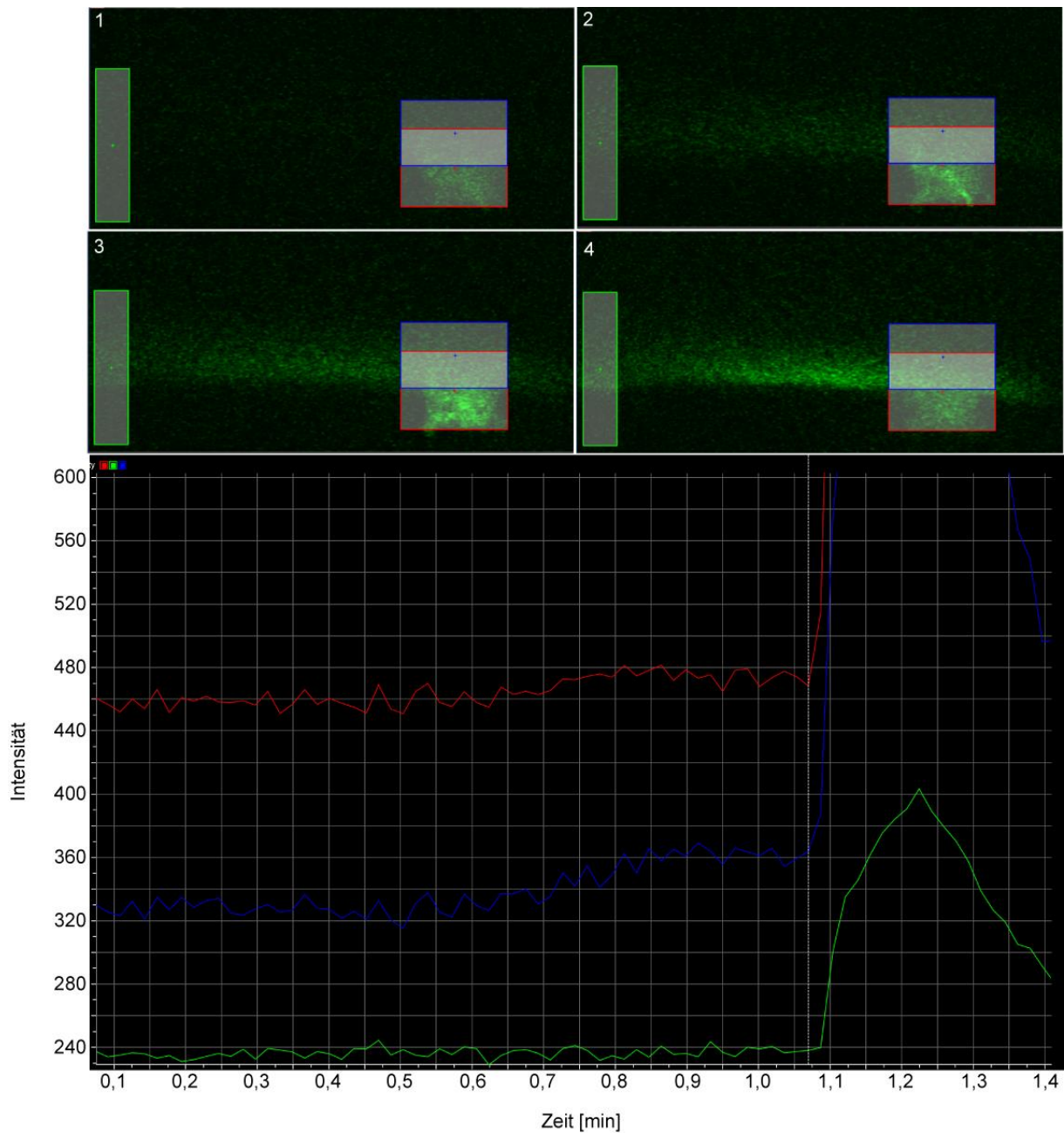


Abbildung 4.30: Calciumtransienten vs. Zeit. X-Achse zeigt 100 ms Schritte. Y-Achse zeigt gemessene Intensitäten von Calciumsignalen. Weiße vertikale Linie bildet den Zeitpunkt ab, zu dem sich die Signalintensität im EB erhöht. Jede farblich gekennzeichnete Transiente (grün, blau, rot) reflektiert die Calciumsignalintensitäten in den farblich gleich gekennzeichneten Messrechtecken in 1-4 (zeitlicher Verlauf von 1 bis 4). Calciumtransienten über die Zeit in EB (rot gerahmter Messbereich), EB-angrenzenden Bereich (blau gerahmter Messbereich) und Rattengewebe (grün gerahmter Messbereich).

### 4.2.6 Messungen von Aktionspotenzialen

Zur Untersuchung einer elektrischen Kopplung zwischen EB und umliegenden Rattengewebe der EHTs+EB wurden Aktionspotenziale gemessen. Aktionspotenziale im EB und umliegenden Rattengewebe zeigten Unterschiede in der Aktionspotenzialform, wie man sie von EHTs der unterschiedlichen Spezies kennt (Abbildung 4.31A-B) mit signifikanten Unterschieden in der Aktionspotenzialdauer (APD) bei 20%, 50% und 90% Repolarisierung ( $APD_{50}$ ,  $APD_{90}$ ,  $**p<0,01$ ,  $***p<0,001$ ), in der maximalen Aufstrichgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ,  $*p<0,05$ ) und in der diastolischen Depolarisierung (DD,  $***p<0,001$ , Abbildung 4.31C). Aktionspotenziale, die in dem Bereich zwischen EB und umliegenden Rattengewebe gemessen wurden, zeigten eine intermediäre APD. Maximales diastolisches Potenzial (MDP), *Take-Off-Potenzial* (TOP) und AP-Amplitude (APA) gehörten zu AP-Parametern, die sich zwischen den 3 Bereichen des kardialen Organoid-Modells nicht signifikant unterschieden.

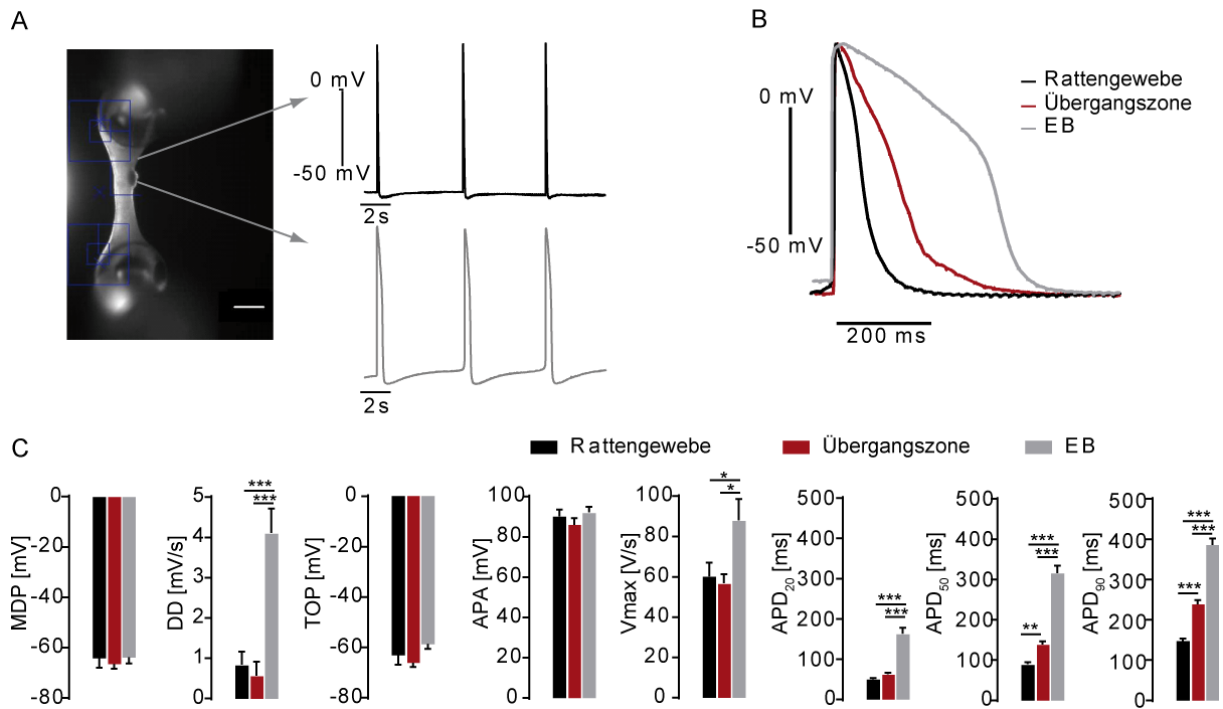


Abbildung 4.31: Aktionspotenzialmessungen. (A) Repräsentative Aufnahme eines EHT+EB mit entsprechenden Aktionspotenzialen (APs) aufgenommen in dem Bereich des EBs (grau) und des Rattengewebes (schwarz). Maßstab 1 mm. (B) Bildüberlagerung von APs gemessen im Rattengewebe (schwarz), in der Übergangszone zwischen Rattengewebe und EB (rot) und im EB (grau). (C) Quantitative Analyse der AP Parameter in den Bereichen Rattengewebe (schwarz, n=11), Übergangszone (rot, n=9) und EB (grau, n=8). *Two-way ANOVA* mit *Bonferroni's Post-test*, \* $p < 0,05$ . Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM. MDP, Maximales diastolisches Potenzial; DD, Diastolische Depolarisierung; TOP, *Take-Off*-Potenzial; APA, AP-Amplitude;  $V_{\max}$  (dV/dt), maximale Aufstrichgeschwindigkeit; APD<sub>20/50/90</sub>, AP Dauer bei 20%, 50% und 90% der Repolarisierung.

## 4.2.7 Migration

In Anbetracht der Messung einer intermediären APD im Bereich zwischen EB und umliegenden Rattengewebe wurde eine genauere histologische Charakterisierung dieses Bereichs vorgenommen. Hierfür wurden fluoreszenzmarkierte hiPSC verwendet (Venus-GFP). Nach der Differenzierung dieser Zelllinie zu CM-EBs und deren Verarbeitung zu EHTs+EB konnte das Verhalten der fluoreszierenden EB-Zellen im kardialen Organoid-Modell über die Zeit beobachtet werden. Schon nach ~3 Tagen Kultivierung der EHTs+EB begannen EB-Zellen (grün) zu migrieren und in das umliegende Rattengewebe einzuwandern (Abbildung 4.32A). Diese EB-Zellmigration führte zu der Bildung eines Bereichs, in dem sowohl Rattenzellen als auch EB-Zellen zu finden waren (Abbildung 4.32B) und der im weiteren Verlauf dieser Doktorarbeit als Übergangszone definiert wird.

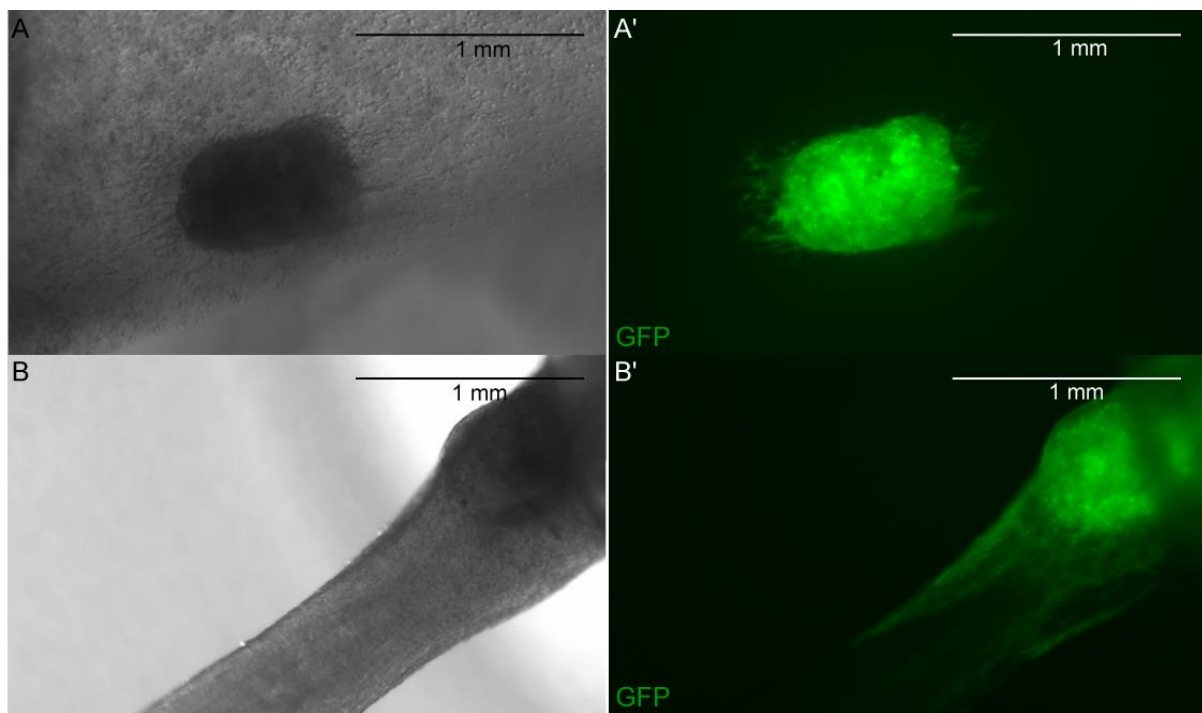


Abbildung 4.32: EB-Zellmigration während der Kultivierungszeit. EB-Zellen (grün) sind fluoreszenzmarkiert. (A) Durchlichtaufnahme eines repräsentativen EHT+EB an Tag 3 und (A') die zugehörige Fluoreszenzaufnahme. (B) Durchlichtaufnahme eines repräsentativen EHT+EB an Tag 23 und (B') die zugehörige Fluoreszenzaufnahme.

Das Ausmaß der Migration unterschied sich zwischen verschiedenen EHTs+EB und war zum Teil von der Größe des EBs abhängig. Einige EB-Zellen (violett) migrierten unwesentlich (Abbildung 4.33A), andere um das komplette EHT herum (Abbildung

## Ergebnisse

4.33B). Die Verarbeitung großer EBs führte oftmals zu der Bildung eines Bereichs mit kleinen, geschrumpften Zellen (Abbildung 4.33B, Asterisk).

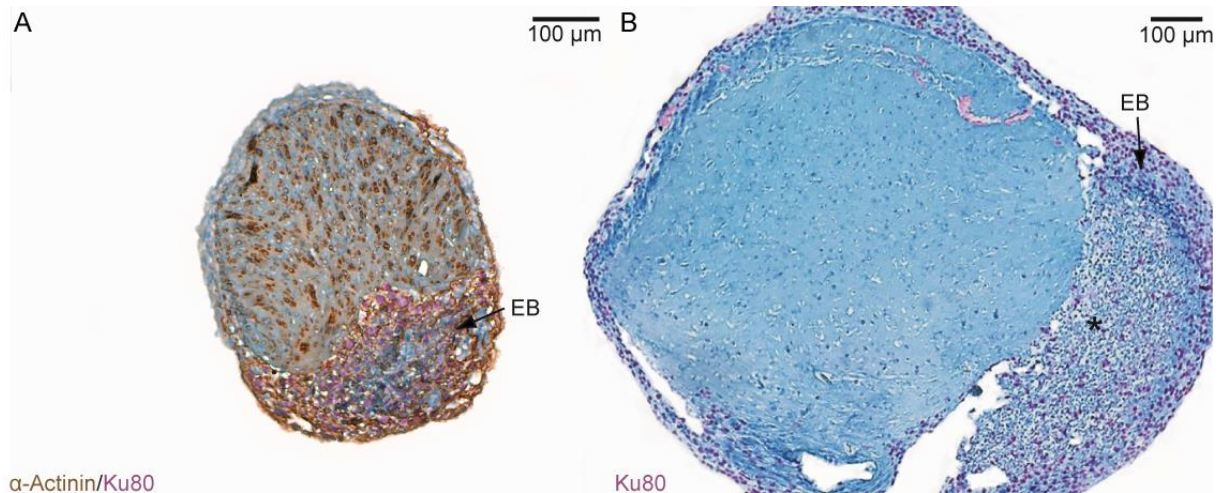


Abbildung 4.33: Immunhistologie der EB-Zellmigration. Der schwarze Pfeil deutet auf den Bereich des EBs. Hämatoxylin I wird zur Zellnukleusanfärbung verwendet (blau). (A) Doppelfärbung des kardialen Markers  $\alpha$ -Actinin (braun) und des human-spezifischen Markers Ku80 (violett). (B) Färbung des human-spezifischen Markers Ku80 (violett). Asterisk markiert den mittleren Bereich des EBs, in dem kleine, geschrumpfte Zellen zu sehen sind.

Die starke Migration der EB-Zellen warf die Frage auf, welcher Zelltyp hierfür verantwortlich ist. Durch die durchflusszytometrische Analyse von cTNT konnte ein hoher CM-Reinheitsgrad garantiert werden (79-93%, n=3), jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der kleine, nicht zu Herzzellen differenzierte Anteil der Differenzierung für die Zellmigration verantwortlich war. Um diese Frage zu beantworten, wurden Doppelfärbungen von Ku80 (pink/grün) und dem CM-spezifischen Marker  $\alpha$ -Actinin (braun/rot) angefertigt, die zeigen konnten, dass der Großteil der migrierenden Zellen  $\alpha$ -Actinin-positiv war (Abbildung 4.33A, 4.34).



## Ergebnisse

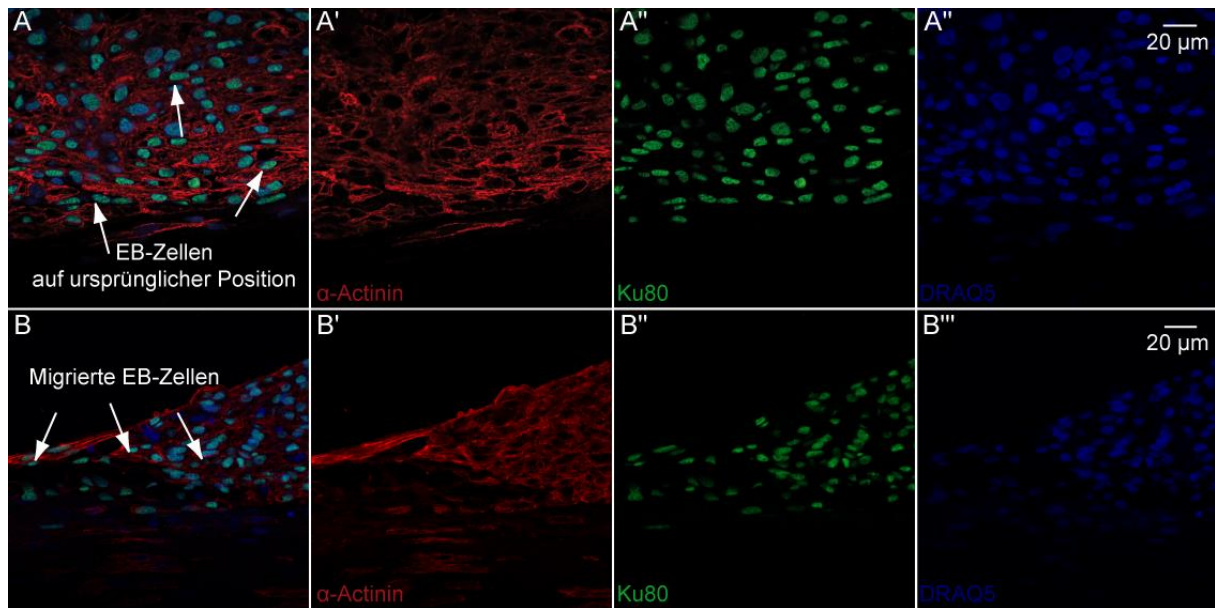


Abbildung 4.34: Immunfluoreszenz von EB-Zellen. Repräsentative Färbungen des kardialen Markers  $\alpha$ -Actinin (rot) und des human-spezifischen Markers Ku80 (grün) zur Identifikation des EBs im EHT+EB. DRAQ5 (blau) wurde zur Identifikation der Zellnuklei verwendet. (A) EB-Zellen in ursprünglicher Position des EBs im EHT+EB. (B) EB-Zellen in einem dem EB-angrenzenden Bereich.

### 4.2.8 Charakterisierung der Übergangszone

Für alle EHTs+EB, die der Frequenz des EBs folgten, konnte eine Übergangszone gezeigt werden, in der sowohl Ratten- (Ku80-negativ) als auch EB-Zellen (Ku80-positiv) zu finden waren (Abbildung 4.35A). Des Weiteren war in diesem Bereich, aber auch innerhalb des EBs, das Calcium-abhängige Zelladhäsionsprotein N-Cadherin (N-cad) (Kim et al. 2011b), das in der Zellmigration eine Rolle spielt (Shih und Yamada 2012), zu sehen (Abbildung 4.34B). Auch Cx45 konnte in der Übergangszone nachgewiesen werden. Die Stärke der Cx45-Färbung war hier intermediär im Vergleich zum EB, in dem Cx45 stark nachgewiesen werden konnte und zum umliegenden Rattengewebe, in dem so gut wie kein Cx45 zu sehen war (Abbildung 4.35C). Dieser Cx45-Gradient, der sich von EB über Übergangszone und Rattengewebe erstreckte, war gegensätzlich zur Cx43-Färbung (Abbildung 4.35.D-F). Cx43 konnte in geringen Massen im EB, intermediär im Übergangsbereich und signifikant stark im Rattengewebe nachgewiesen werden ( $***p < 0.001$  Rattengewebe vs. EB,  $**p < 0.01$  Rattengewebe vs. Übergangsbereich Abbildung 4.35E-I).

## Ergebnisse

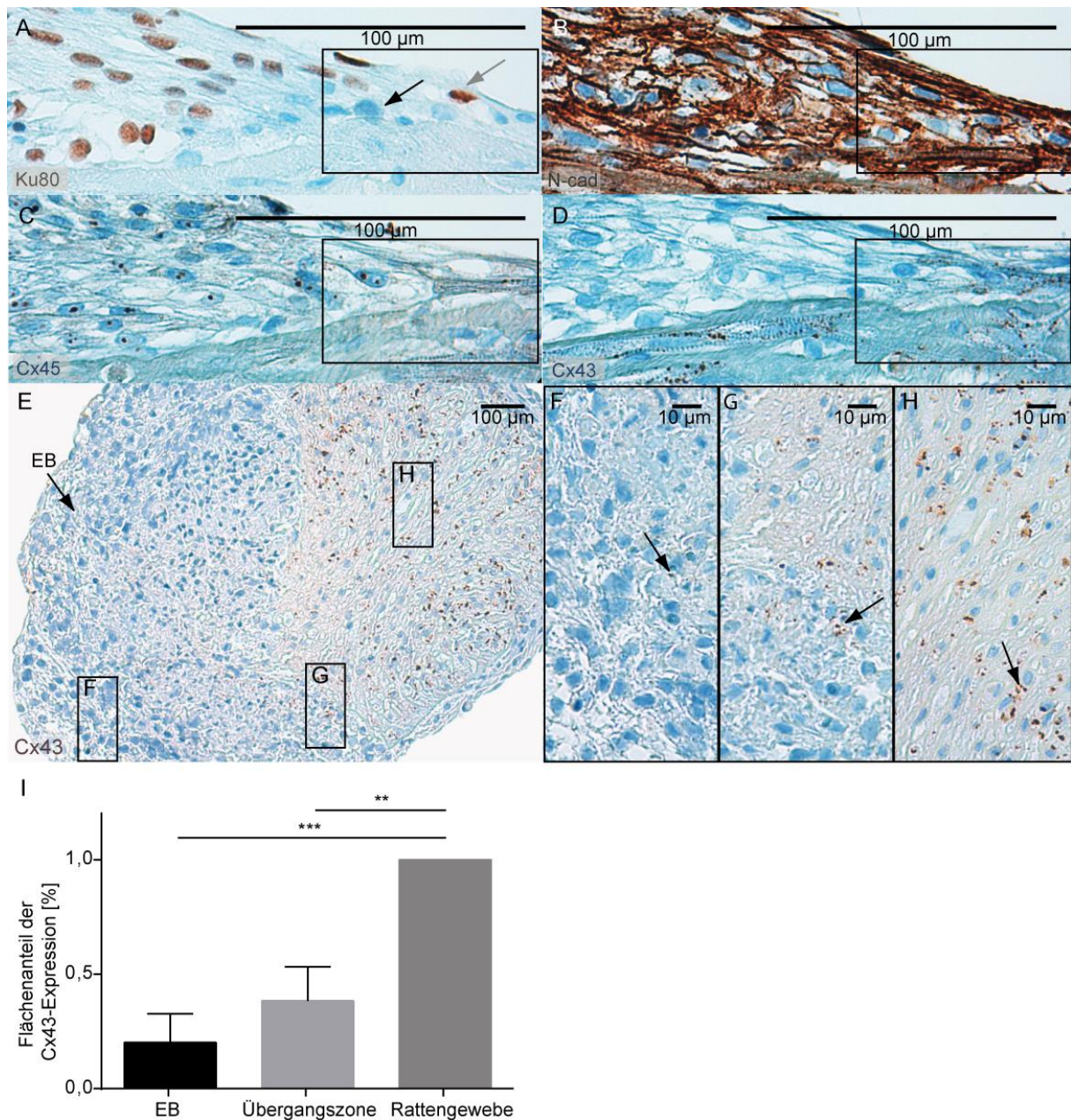


Abbildung 4.35: Übergangszone. (A-C) Konsekutive, repräsentative Schnitte der Übergangszone (schwarz gerahmtes Rechteck) mit sowohl Ratten- als auch EB-Zellen, gefärbt für (A) Ku80 (violett, grauer Pfeil zeigt EB-Zelle, schwarzer Pfeil Rattenzelle), (B) N-cad (braun), (C) Cx45 (braun) und (D) Cx43 (braun). Hämatoxylin I wird zur Gegenfärbung des Zellnukleus verwendet (blau). (E) Repräsentative Färbung von Cx43, sowie die Detailansicht (schwarz gerahmtes Rechteck) von (F) EB, (G) Übergangszone und (H) Rattengewebe. Pfeile in F-H weisen auf positive Cx43-Färbungen hin. (I) Quantitative Analyse der Cx43-positiv gefärbten Flächen [%] in den Bereichen EB, Übergangszone und Rattengewebe (n=5). *One-way ANOVA* mit *Bonferroni's Post-Test*, \* $p < 0,05$ . Daten von 3 EHT-Herstellungsrunden zusammengefasst. Fehlerbalken zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM.





### 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei hiPSC-CM-basierte Projekte bearbeitet, die im Folgenden diskutiert werden.

#### 5.1 Untersuchungen zur Reliabilität von hiPSC-CMs im 3D-Format

Das erste Projekt beschäftigte sich mit der Reliabilität von 3D-kultivierten hiPSC-CMs als Modellsystem und erfolgte in drei gesunden Spendern des ERC-Projekts (UKEi1-UKEi3), aus denen jeweils drei Klone pro Spender und drei kardiale Differenzierungs-*Batches* pro Klon hergestellt und im EHT-Format auf ihre Funktion und Genexpression untersucht wurden. Neben der Untersuchung des Modellsystems wurden auch die Tests zur Analyse der funktionellen Parameter auf ihre technische Variabilität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine geringe hiPSC-Qualität alle Prozesse der Modellierung von Krankheitsphänotypen negativ beeinflusste, zu denen hiPSC-Kultur, hiPSC-Differenzierung und die funktionelle und genexpressorische Charakterisierung gehören. Sofern hiPSC-Qualitätsstandards, die Pluripotenz und einen normalen Karyotyp einschließen, erfüllt waren, konnte insgesamt eine geringe Variabilität in den genannten Parametern zwischen Spendern und zwischen Klonen und eine vergleichsweise hohe Variabilität zwischen *Batches* beobachtet werden. Die Reliabilität der verwendeten Tests war sehr heterogen.

##### 5.1.1 Qualitätsüberprüfung von hiPSC-MCBs

Die hiPSCs wurden nach deren Generierung zunächst zu einer MCB verarbeitet, bevor sie für weitere Analysen verwendet wurden. Hierdurch konnte für alle Anwendungen die gleiche Qualität der hiPSCs gewährleistet werden, da für alle durchzuführenden Expansionen/Charakterisierungen auf die gleiche Kultivierungspassage der hiPSCs zurückgegriffen wurde und diese nur zeitlich begrenzt kultiviert/expandiert wurden. Dies ist in der hiPSC-Forschung ein wichtiger Punkt, da ein Instituts-interner Langzeitkultivierungsversuch und mehrere Studien zeigen konnten, dass die hiPSC-Kultivierung zu (epi-)genetischen Veränderungen bis hin zu karyotypischen Abnormalitäten der Zellen führen kann (International Stem Cell Initiative et al. 2011). Dessen Konsequenzen sind schwer einzuschätzen,

können aber Grundlage von Variabilität und nicht reproduzierbarer Ergebnisse sein (Weissbein et al. 2014; Andrews et al. 2017).

Qualitätsüberprüfungen der hiPSC-MCBs bezogen sich unter anderem auf (i) die genomische Integrität, (ii) die Pluripotenz und (iii) das Differenzierungspotenzial.

Bei der Untersuchung zur genomischen Integrität erwiesen sich alle drei UKEi2-Klone als karyotypisch abnormal. Bemerkenswert hierbei ist, dass die drei Klone unterschiedliche chromosomale Abnormalitäten aufzeigten, was zunächst unerwartet und schwer zu erklären ist. Am wahrscheinlichsten ist, dass die genomische Integrität der Zellen während der Reprogrammierung, einem stressreichen Prozess für die Zellen, gestört wurde (Martins-Taylor und Xu 2012; Weissbein et al. 2014) und sich jeweils in den hiPSC-Klonen anders ausgewirkt hat. Um den Zeitpunkt der Entstehung aber besser eingrenzen zu können, müssten die Hautfibroblasten des Spenders karyotypisch untersucht werden. So könnte man herausfinden, ob bereits in diesen ein erhöhter Anteil an karyotypisch veränderten Zellen vorliegt. Diese Hypothese erscheint allerdings als eher unwahrscheinlich, weil man sonst in den drei UKEi2 Klonen dieselbe karyotypische Abnormalität erwartet hätte.

Als weiteres schlechtes Merkmal der genomischen Integrität stellte sich das Vorhandensein von Virusrestpartikeln in einem UKEi2-Klon (UKEi2-C) heraus, die laut des Herstellers des Reprogrammierungsprotokolls ab Zellpassage 10 zellulär nicht mehr nachweisbar sein sollten (Abbildung 5.1). Einen Einfluss dieser Virusrestpartikel konnte allerdings nicht bestätigt werden, da sich alle drei Klone von UKEi2 in deren Charakterisierung sehr ähnelten.

## Diskussion

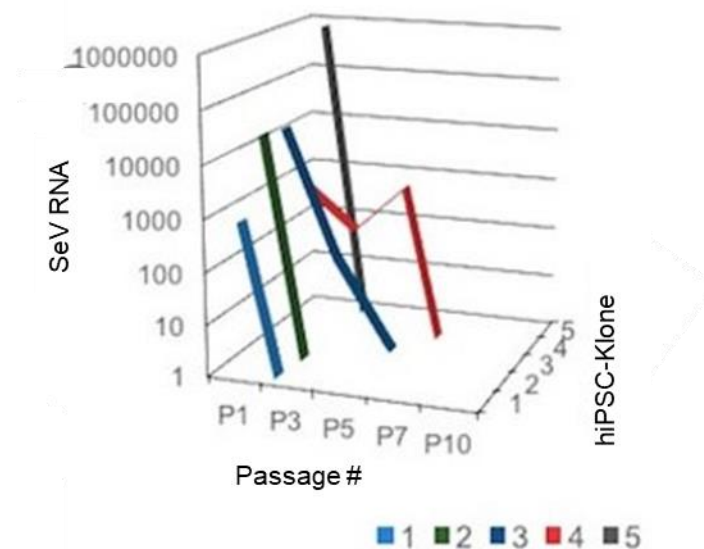


Abbildung 5.1: Herstellernachweis von Virusrestpartikeln über die Kultivierungszeit. Ab Passage 10 war keine Sendaivirus-RNA (SeV RNA) mehr nachweisbar. Website von ThermoFisher, Stand 18.01.2019, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A16517>.

UKEi2 wurde trotz der schlechten genomischen Integrität in die weiteren Analysen mit eingeschlossen. Als Negativkontrolle erlaubte sie einen besseren Einblick in die Konsequenzen der genomischen Instabilität auf die folgenden Prozesse zur Modellierung von Krankheitsphänotypen. So konnte größtenteils in Bezug auf die Pluripotenz kein Unterschied zwischen den genomisch stabilen UKEi1- und UKEi3-Klonen und den genomisch instabilen UKEi2-Klonen gefunden werden. Die Expression der Pluripotenzmarker SSEA-3 (Durchflusszytometrie) und Oct3/4, Sox2, Nanog und Lin28 (Hochdurchsatz-Immunhistologiedetektion) war in allen Klonen gleich und hoch. Diese hohe Pluripotenz konnte für UKEi1 und UKEi3 mit dem PluriTest verifiziert werden. Für die UKEi2-Klone hingegen zeigte der PluriTest eine nur begrenzte Pluripotenz auf. Diese voneinander abweichenden Ergebnisse demonstrieren die höhere Sensitivität einer das ganze Genom umfassenden Expressionsanalyse im Gegensatz zur Untersuchung einzelner Marker (Müller et al. 2008, 2011). Eine hohe Heterogenität zeigte die mit der Pluripotenzmarker-Hochdurchsatz-Immunhistologiedetektion einhergehende Untersuchung der Zellkernmorphologie bei allen Klonen, deren Interpretation daher nicht eindeutig ist. Grundsätzlich weisen hiPSCs einen großen und runden Zellkern auf (Takahashi et al. 2007).

In der spontanen, ungerichteten Differenzierung exprimierten die UKEi2-Klone mindestens einen Marker der drei Keimblätter. Trotzdem wurden sehr geringe CM-Reinheitsgrade (cTNT) mit der kardial-gerichteten Differenzierung generiert, die sich in nicht schlagende und damit nicht analysierbare EHT-kultivierte UKEi2-*Batches* niederschlug. Dies zeigt, dass auch die Testsensitivität der ungerichteten Differenzierung unzureichend war, um das kardiale Differenzierungspotential vorherzusagen. UKEi1 und UKEi3 hingegen ließen sich mit einem hohen kardialen Reinheitsgrad differenzieren, was einerseits die Robustheit des kardialen Differenzierungsprotokolls unterstreicht. Andererseits bestätigen die Ergebnisse den Einfluss der hiPSC-Qualität auf die Differenzierungskapazität (Mayshar et al. 2010).

Die zum Teil heterogenen Ergebnisse der hiPSC-Qualität von UKEi2 demonstrieren die unterschiedlichen Sensitivitäten der Methoden. Um daher eine adäquate Auswahl von hiPSC-Zelllinien für hiPSC-basierte Studien machen zu können, ist es notwendig, mehrere Qualitätsanalysen durchzuführen. Besonders die Karyotypisierung ist hierbei eine wichtige und aussagekräftige Analyse, die bei der Modellierung von Krankheitsphänotypen mit hiPSCs bisher noch nicht immer Standard ist. Aufgrund der Zunahme karyotypischer Abnormalitäten über längere Passagen ist hier vor allem auf eine Analyse kurz vor der kardialen Differenzierung und funktionellen Untersuchung zu achten. Dazu hat sich das System der MCB bewährt.

### 5.1.2 Reliabilität von hiPSC-CMs im 3D-Format

Die Relevanz eines Modellsystems ist abhängig von seiner Validität und seiner Reliabilität, die die Reproduzierbarkeit unter standardisierten Bedingungen mit einschließt. Je komplexer ein Modellsystem ist, desto wahrscheinlicher ist eine höhere Relevanz. Komplexität bürgt jedoch auch die Gefahr einer erhöhten technischen Variabilität, in diesem Fall auf EHT-, *Batch*- oder Klonebene. Um diese möglichst minimal zu halten, wurde daher eine für diese Arbeit etablierte Standardvorgehensweise verfolgt, die sich von der hiPSC-Kultur bis hin zu der funktionellen EHT-Analyse erstreckte. Diese schloss die Qualitätskontrolle der hiPSC-MCBs, den kardialen Differenzierungsreinheitsgrad, die Qualitätskontrolle der EHTs und die standardisierte Durchführung der funktionellen Analyse ein.

Die verbleibende technische Variabilität wurde mit der heterogenen Testzusammensetzung in ~144 EHTs gemessen und durch eine Mehrebenenanalyse einerseits von der biologischen Variabilität (Spenderebene) getrennt und andererseits den einzelnen technischen Ebenen (*Batch*-, Klonebene) zugeordnet. Die unterste Ebene konnte allerdings mit dem Statistikmodell nicht von der unerklärlichen und wiederholungsbedingten Variabilität unterschieden werden, erwies sich aber als diejenige mit der höchsten anteiligen Variabilität. Inwieweit die EHTs zu diesem hohen Anteil beitragen, ist somit nicht ganz eindeutig. Überwiegend konnten in dieser Arbeit aber geringe Standardfehler und -abweichungen vom Mittelwert in der Kraftentwicklung und in vielen funktionellen Analysen der EHTs beobachtet werden. Auch Mannhardt et al. (2017) berechnete einen niedrigen Varianzkoeffizienten zwischen EHTs, der im Vergleich zu humanem atrialen Trabeculae als Modellsystem geringer ausfiel. Dennoch ist zu erwähnen, dass die Herstellung von EHTs auch technische Schwankungen mit sich bringt. So mussten insgesamt vier EHT-Herstellungen und vier Differenzierungen von *Batches* wiederholt werden, obwohl der Herzzellenreinheitsgrad, sonst ausreichend, über 60% lag. Diese schlechte Quote ist überwiegend der Tatsache geschuldet, dass in dem Zeitabschnitt, in dem viele *Batches* für diese Arbeit zu EHTs verarbeitet wurden, der Endotoxinwert des für die EHT-Herstellung verwendeten Matrigels über dem Grenzwert lag. Durch die Komplexität der Prozesse und der vielen Komponenten wurde diese potenzielle Toxizitätsquelle erst spät ausfindig gemacht.

Zwischen *Batch*- und Klonebene dominierte in sowohl funktioneller als auch genexpressorischer Charakterisierung die Variabilität auf der *Batch*-Ebene. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der gefundenen hohen Variabilität in den grundlegenden Kontraktionsparametern von hiPSC-CM-*Batches* (Huo et al. 2016; Mannhardt et al. 2017). Es ist wahrscheinlich, dass sie aus Unterschieden in der hiPSC-Expansion/kardialen Differenzierung resultiert. Besonders der sich pro *Batch* unterscheidende Anteil an Nicht-Herzzellen sollte hierbei nicht außer Acht gelassen werden (2-30%). So könnten verschiedene Differenzierungsanteile von u.a. Endothelzellen oder Fibroblasten zu einem unterschiedlichen Verhalten der Differenzierungs-*Batches* im EHT-Format führen. Tessa Werner, ehemalige Doktorandin des IEPT, konnte in ihrer Doktorarbeit zum Beispiel zeigen, dass ein definierter kardialer Fibroblastenanteil (5%) im EHT zu einer höheren Kontraktilität

führt (0,53 mN vs. 0,43 mN der Kontroll-EHTs; Werner 2018). Die Ergebnisse waren zwar Zelllinien-abhängig, werden aber generell durch andere Studien unterstützt (Tulloch et al. 2011; Tiburcy et al. 2017). Um eine definierte und somit vergleichbarere Zelltypenzusammensetzung im EHT zu schaffen, ist es auch möglich, eine Herzzellen-spezifische Aufreinigung des Differenzierungs-*Batches* durchzuführen (Denning et al. 2016; Casini et al. 2017), die jedoch in einem erheblichen Verlust der Zellausbeute resultiert. Beide Ansätze sind zudem sehr zeitintensiv.

Erwähnenswert ist außerdem, dass durch die Einführung der MCBs die Kraftentwicklung von UKEi3-B gesteigert werden konnte. So entwickelten die hergestellten EHTs der *Batch*-Differenzierungen vor der MCB-Einführung Kräfte unter 0,1 mN (z.B. UKEi3-B #1) und nach deren Etablierung über 0,1 mN (UKEi3-B #2-3). Für UKEi3-B konnte die Passagennummer nicht direkt mit der Kraft-beeinflussenden Differenzierungsreinheit korreliert werden. Dennoch könnten die geringen Kräfte vor der Etablierung der MCBs durch Schwankungen in der hiPSC-Qualität mit unterschiedlicher hiPSC-Kultivierungsdauer und insgesamt höherer Passagennummer ( $52 \pm 20$ ,  $n=6$  vs.  $24 \pm 3$ ,  $n=2$  von UKEi3-B #2-3) zustande gekommen sein, die sich wiederum in hohe Schwankungen im CM-Reinheitsgrad der Differenzierungen niederschlugen ( $46 \pm 39,5\%$ ,  $n=6$  vs.  $92,5 \pm 1$ ,  $n=2$ ). Diese geringen Kräfte wirkten sich auf die Calciumhomöostase aus. UKEi3-B #1 zeigte im Vergleich zu den beiden anderen MCB-basierten UKEi3-B-*Batches* eine geringere Calciumsensitivität in der Calciumkonzentrations-Wirkungskurve und eine möglicherweise damit verbundene geringere Entwicklung von Kontraktionsirregularitäten in sowohl 1,8 mM als auch 3 mM Calcium auf.

Es konnten keine systematisch durchgeführten Studien gefunden werden, die einen Vergleich der Reliabilität von hiPSC-CMs im 3D-Format mit anderen gängigen Modellsystemen der kardiovaskulären Forschung zulassen. Um dennoch einen Eindruck der Reliabilität unterschiedlicher Modelle zu gewinnen, wurde der Variationskoeffizient des für die kardiovaskuläre Forschung relevanten Parameters Kraft von unterschiedlichen Modellen kalkuliert (Tabelle 5.1). Die Berechnungen verdeutlichen, dass 3D-kultivierte hiPSC-CMs einen der geringsten Variabilitätswerte in der gemessenen Kraft (*Baseline*) besitzen. Zumindest in Bezug auf die Kraft

## Diskussion

können daher 3D-kultivierte hiPSC-CMs als ein vergleichsweise reliables kardiovaskuläres Modellsystem gesehen werden.

Tabelle 5.1: Variationskoeffizienten (CV) der gemessenen Kraft unterschiedlicher kardiovaskulärer Modellsysteme.

	HiPSC-CMs EHT-Format	Ventrikuläre Myozyten (Meerschweinchen)	Ventrikuläre Myozyten (Human)	Ventrikuläre Papillarmuskeln (Kaninchen)	Ventrikuläre Papillarmuskeln (Ratte)	Ventrikuläre Trabeculae (Ratte)	Ventrikuläre Trabeculae (Kaninchen)	Atriale Trabeculae (Human)	Atriale Trabeculae (Human)
Kraft	0,15±0,04 mN	0,71±0,54 µN	3±1 kN/m <sup>2</sup>	6,4±2,8 mN/mm <sup>2</sup>	40±9 mN/mm <sup>2</sup>	59±22 mN/mm <sup>2</sup>	5,4±3,7 mN/mm <sup>2</sup>	n.a.	6.2±3.5 mN
N	131	33	20	3	12	63	5	856	52
Stimulation	1,5 Hz	0,5 Hz	n.a.	0,5 Hz	3,3 Hz	0,2 Hz	0,5 Hz	1 Hz	1 Hz
Publikation	diese Arbeit	Shepherd and Fisher (1990)	Van Der Velden et al. (1998)	Bluhm et al. (1995)	Schouten & ter Keurs (1986)	Schouten (1986)	Bluhm et al. (1995)	Pecha et al. (2018)	Mannhardt et al. (2017)
CV	<b>0,29</b>	<b>0,76</b>	<b>0,32</b>	<b>0,44</b>	<b>0,23</b>	<b>0,38</b>	<b>0,69</b>	<b>0,82</b>	<b>0,56</b>

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Reliabilität dieses Modellsystems gesteigert werden kann, wenn mehrere *Batches* analysiert werden. Dies ist von Bedeutung, um eine erfolgreiche Modellierung von Krankheitsphänotypen mit hiPSC-CMs im 3D-Format zu ermöglichen.

### 5.1.3 Reliabilität der funktionellen Tests

Die Ergebnisse der Variationskoeffizienten der einzelnen Tests veranschaulichen, dass sich die Tests stark in ihrem relativen Streuungsmaß ( $\triangleq$  Variationskoeffizient) und folglich ihrer technischen Variabilität unterscheiden. So konnte für die Analysen der Calciumsensitivität (Calciumkonzentrations-Wirkungskurve), der Reaktion auf Isoprenalin und der Kraft-Frequenzbeziehung ein geringer Variationskoeffizient gezeigt werden. Die Reaktion auf Carbachol und besonders die Kontraktionsregularität und die Kontraktionspause der Post-Pausenbeziehung zeigten jedoch hohe Variationskoeffizienten.

Der Variationskoeffizient kann hierbei als Maß zur Bestimmung der absoluten Reliabilität gesehen werden und definiert, wie variabel die gemessenen Werte innerhalb einer Gruppe sind. Ebenfalls kann die relative Reliabilität mit dem ICC kalkuliert werden (Shechtman 2013). Dieser definiert, wie variabel die Elemente einer Gruppe zueinander sind (z.B. die Varianz zwischen Klonen auf Klonebene; Shechtman 2013). Der ICC wurde in dieser Arbeit berechnet, um die relativen Varianzanteile der unterschiedlichen Ebenen zu bestimmen und somit herausfinden zu können, auf welcher Ebene technische Replikate erforderlich sind. In Bezug auf die Reliabilität eines Tests oder Modellsystems wäre der ICC im Idealfall auf den technischen Ebenen (EHT/Wiederholung/Unerklärliches, *Batch*-, Klonebene) sehr gering. Dies impliziert eine wünschenswert hohe relative Varianz auf Spenderebene. In dieser Arbeit wurde jedoch eine Kontrollgruppe mit gesunden Spendern untersucht. Um einen reliablen Test z.B. für die Modellierung von Krankheitsphänotypen zu erhalten, sollte dementsprechend die absolute Varianz (Variationskoeffizient), also die Varianz innerhalb einer (Kontroll)-gruppe, gering sein. In jedem der untersuchten Tests konnte in der vorliegenden Untersuchung der jeweils größte Anteil des ICCs den technischen Ebenen zugeschrieben werden, was für eine geringe Reliabilität der Tests spricht. Bei den genannten Tests mit den geringsten Variationskoeffizienten (Calciumsensitivität, Isoprenalinantwort, Kraft-Frequenzbeziehung) war jedoch der Spenderanteil im Vergleich zu den anderen Tests am höchsten, was sie insgesamt zu reliableren Tests macht. Diese Resultate sollten bei der Interpretation der Ergebnisse unbedingt berücksichtigt werden.

Wie für diese Arbeit angestrebt, sollten Tests so zusammengestellt werden, dass sie unterschiedliche Aspekte der, in diesem Fall, Herzphysiologie abdecken. Die große Bandbreite an heterogenen Tests sind die Basis, um eine hohe Validität der funktionellen Charakterisierung erreichen zu können. Im Gegenzug aber steigt die Reliabilität an, wenn man die zu testenden Aspekte inhaltlich homogener gestaltet. Gemeint ist hiermit, dass die Wahrscheinlichkeit höher ist das biologische Merkmal abzubilden, je höher die Anzahl an unterschiedlichen Analysen ist, die z.B. Calciumsensitivität untersuchen. Dieser Gegensatz wird als Reliabilität-Validitätsdilemma beschrieben. Eine Testzusammenstellung also gleichzeitig reliabler und valider zu machen, hat etwas von einem Dilemma an sich, da die Optimierung der Testzusammensetzung hinsichtlich eines Kriteriums darin resultiert,



dass sie hinsichtlich des anderen Kriteriums schlechter wird (Rost 2014). Dies trifft nur zu, sofern man von der gleichen Größe der Testzusammenstellung ausgeht. Würde man jedoch zusätzliche Untertests zu den zu testenden Aspekten konzipieren, könnte man das Dilemma umgehen. Dies würde jedoch in einem erheblich höheren Arbeitsumfang resultieren und die Gestaltung der z.B. Modellierung von Krankheitsphänotypen zusätzlich erschweren. Einzelne Tests trotz deren wichtiger Aspekte zur Validität aber schwachen Reliabilität aus der Testzusammensetzung herauszunehmen, könnte jedoch auch kritisch sein, da damit die Validität beeinträchtigt würde (Rost 2014), da einzelne Aspekte der z.B. Herzphysiologie nicht mit einbezogen wären. Somit könnte es in bestimmten Fällen sinnvoll sein, auch Tests mit geringer Reliabilität in die Analyse einzuschließen und diese im Kontext der funktionellen Charakterisierung bewusst zu interpretieren. Voraussetzung hierfür ist natürlich, dass die zwar wenig reliablen Tests valide die Physiologie abbilden können (siehe Ausblick 5.1.5).

### 5.1.4 Die Definition eines gesunden Phänotyps im 3D-Format

3D-kultivierte hiPSC-CMs zeigen als Modellsystem ein großes relevantes und prädiktives Anwendungspotenzial zur Modellierung von Krankheitsphänotypen, da sie die von Vincent et al. (2015) aufgestellten „3 Regeln“ erfüllen: (1) Mit der Verwendung von hiPSC-CMs wird ein für die kardiovaskuläre Forschung relevanter Zelltyp verwendet. In diesem Zusammenhang konnten in dieser Arbeit eine positive inotrope Wirkung von Isoprenalin und eine positive Kraft-Frequenzbeziehung zwischen 0,7 und 1,9 Hz gezeigt werden, die auch in reifen Herzzellen gesehen wird. (2) Krankheitsrelevante Stimuli, wie die  $\beta$ -adrenerge Sensitivität, können untersucht werden. (3) Funktionelle Parameter, wie die Kontraktilität, können wie bei der klinischen Phänotypisierung aufgenommen werden (video-optisch für EHTs). Eine kontraktile Beeinträchtigung ist der weitverbreitetste klinische kardiale Krankheitsphänotyp (Debold et al. 2007). In diesem Zusammenhang konnten Studien eine geringere Kontraktionskraft in hiPSC-CMs von DCM-Patienten aufzeigen, während die Ergebnisse für HCM-Patienten uneindeutiger sind (Eschenhagen und Carrier 2018).

Mit der Mehrebenenanalyse der funktionellen Charakterisierung war es möglich, die technische von der biologischen Variabilität (Spenderebene) zu trennen. Diese

Analyse erlaubte einen Eindruck in die biologischen Unterschiede von zwei gesunden Spendern, deren Varianz sehr gering war. Dieses Ergebnis steht scheinbar im Kontrast zu den berechneten signifikanten Unterschieden für die funktionelle Analyse. So zeigte UKEi1 eine signifikant höhere Calciumsensitivität als UKEi3, eine signifikant geringere Kontraktionspause in der Kontraktionspausenbeziehung, einen signifikant schnelleren Einbruch in der Kontraktionskraft in der Kraft-Frequenzbeziehung und eine signifikant geringere Anfälligkeit für die Entwicklung von Arrhythmien bei hoher Calciumkonzentration. Die Diskrepanz in der statistischen Auswertung der Ergebnisse demonstriert, dass signifikante Unterschiede nicht unbedingt relevanten Unterschieden entsprechen müssen.

Die genexpressorische Analyse zeigte zwar eine unterschiedliche molekulare Signatur von UKEi2 zu UKEi1 und UKEi3 auf, was höchstwahrscheinlich dem geringen CM-Reinheitsgrad und möglicherweise der karyotypischen Abnormalität zuzuschreiben ist. Allerdings zeigen die bisherigen Ergebnisse des ERC-Projekts (Validität), dass eine karyotypische Abnormalität nicht unbedingt mit einem schlechten CM-Reinheitsgrad einhergehen muss. UKEi1 und UKEi3 wiesen aber eine sehr ähnliche molekulare Signatur auf, was in einem gemeinsamen Cluster und keiner klaren Separierung der *Batches* in der *Heatmap* und der PCA resultierte. Die Klone wiederum ordneten sich Spender-abhängig an, was einerseits die geringere Variabilität auf Klonebene im Vergleich zu der *Batch*-Ebene unterstreicht und andererseits genexpressorische Unterschiede zwischen den beiden Spendern impliziert. Mit einer *Volcano Plot*-Analyse konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Expression einzelner Gene gefunden werden. Nur CASQ2 befand sich in der Nähe des Signifikanzgrenzwerts und war in UKEi1 geringer exprimiert als in UKEi3.

CASQ2 ist ein calciumbindendes Protein des SRs, das für dessen Calciumspeicherkapazität eine tragende Rolle spielt und als Pufferprotein die freie luminale Calciumkonzentration im SR beeinflusst (Abbildung 5.2; Terentyev et al. 2003, 2006, 2008). Über die freie luminale Calciumkonzentration kontrollieren Calciumsensoren des SR durch einen positiv-regulierten Mechanismus die Zytosol-gerichtete Freisetzung von Calcium durch RyR. Die Bindung von Calcium an CASQ2 führt dazu, dass sich die Zytosol-gerichtete Freisetzung von Calcium erhöht, da eine

Calcium-abhängige Schließung des RyR-Kanals herausgezögert wird. Im Umkehrschluss führt eine geringe Expression von CASQ2 und eine damit einhergehende geringere Calciumpufferkapazität zu einem schnelleren Ablauf der Zytosol-gerichteten Calciumausschüttung, auch da die freie Calciumkonzentration im SR, bei der Calcium über den RyR aus dem SR freigesetzt wird, früher erreicht wird. Nach Ablauf der Calciumausschüttung stellt SERCA den Calciumspeicher des SRs durch den SR-gerichteten Transport von Calcium wieder her. Dieser Prozess ist abgeschlossen, sobald luminales Calcium durch den luminalen Calciumsensor gebunden wird. Eine geringe CASQ2-Expression beschleunigt auch diesen Prozess, wodurch insgesamt die funktionelle Aktivität des Mechanismus zur Zytosol-gerichteten Calciumausschüttung erhöht ist. Dies kann in einer verfrühten erneuten RyR-Aktivierung resultieren (Terentyev et al. 2003, 2006, 2008).

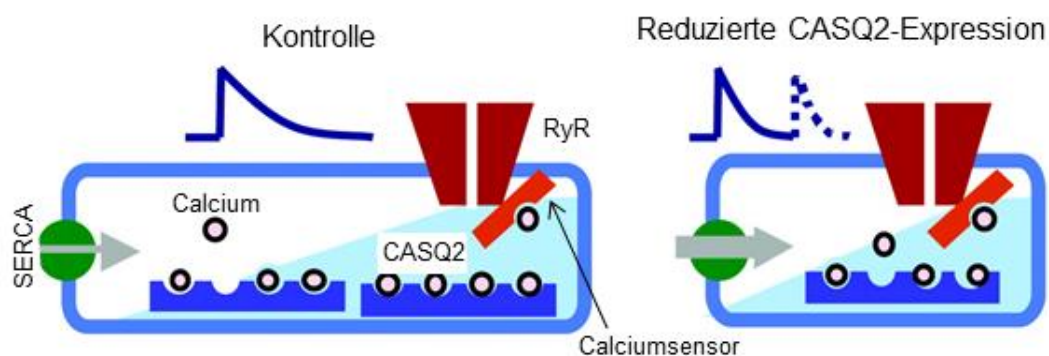


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der Effekte einer reduzierten CASQ2-Expression auf die Calciumhomöostase des SRs. Eine geringe Expression von CASQ2 führt zu einem schnelleren Ablauf der Zytosol-gerichteten Calciumausschüttung und zu einer schnelleren Wiederherstellung des Calciumspeichers des SR. Die luminalen Calciumkonzentration des SR wird in hellblau gezeigt (verändert nach Terentyev et al. 2003).

Betrachtet man ausschließlich die Tests zur funktionellen Charakterisierung mit einem geringen Variationskoeffizienten und einer auf der Mehrebenenanalyse basierten Varianz auf der Spenderebene, wies UKEi1 im Vergleich zu UKEi3 eine (i) höhere Calciumsensitivität und (ii) einen schnelleren Einbruch in der Kontraktionskraft in der Kraft-Frequenzbeziehung auf. Mit einer durch die geringere CASQ2-Expression bedingten potenziell geringeren Calciumspeicherkapazität von UKEi1 könnte man die Ergebnisse folgendermaßen erklären: (i) die freie Calciumkonzentration im SR, die zur RyR-basierten Calciumfreisetzung aus dem SR

führt, wird früher erreicht. Zusätzlich könnte dies eine erhöhte Calcium-induzierte Calciumfreisetzung durch RyR zur Folge haben. Beide Prozesse würden in einer schneller erreichten maximalen Kontraktionskraft resultieren ( $\triangleq$  geringerer Calcium-EC<sub>50</sub>). (ii) Der schnellere Einbruch in der Kraft-Frequenzbeziehung wiederum könnte daraus resultieren, dass sich das SR bei hohen Frequenzen entleert und weniger Calcium pro Schlag durch die geringere Calciumspeicherkapazität freigesetzt wird.

Bezieht man auch die durch die ANOVA als signifikant berechneten Unterschiede zwischen UKEi1 und UKEi3 mit ein, so könnte die schnellere Maschinerie zur Calciumausschüttung auch die geringere Kontraktionspause der Post-Pausenbeziehung erklären, jedoch steht die signifikant geringere Entwicklung von Arrhythmien im Gegensatz zu den vorgeschlagenen Theorien und zu der publizierten Verknüpfung von CASQ2-Mutationen mit einer durch Catecholamine induzierten erhöhten Entwicklung ventrikulärer Tachykardien (Terentyev et al. 2006, 2008). Da es sich bei UKEi1 aber um einen gesunden Spender handelt, könnte die geringere CASQ2-Expression einfach eine Normvariante sein und über dem zum Krankheitsphänotyp führenden Grenzwert liegen. Marta Lemme, Doktorandin im IEPT, konnte jedoch in diesem Zusammenhang herausfinden, dass UKEi1 unter Stressbedingungen (konstante elektrische Stimulation) Tachykardien entwickelt, die leichter zu induzieren und stabiler waren als bei UKEi3 (Lemme et al. MS eingereicht).

Die Forschung zur Modellierung von Krankheitsphänotypen beruht auf der Annahme, dass sich Proben von Patienten systematisch von denen der gesunden Spender unterscheiden. Für die hiPSC-CM EHTs von gesunden Spendern müssten es also für die funktionellen Parameter als „normal“ definierte Mittelwerte  $\pm$  SD geben. Diese Arbeit konnte einen Einblick in deren mögliche Definition geben.

### 5.1.5 Ausblick

Die Probenanzahl zur Definition der als normal definierten Mittelwerte  $\pm$  SD für die funktionellen Parameter von 3D-kultivierten hiPSC-CMs war in dieser Arbeit mit n=2 gesunden Spendern sehr gering. Das ERC-Projekt hingegen, mit seinen 40 gesunden Studienteilnehmern, wird eine bessere Einschätzung des gesunden EHT-Phänotyps ermöglichen. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Reliabilität

von hiPSC-CMs im EHT Modell relativ hoch im Vergleich zu anderen *in vitro* Systemen zur kardialen Kontraktionsmessung ist (siehe Tabelle 5.1) und gesteigert werden kann, wenn mehrere *Batches* analysiert werden, da diese im Vergleich zu der Klon- und Spenderebene die mit dem höchsten Varianzanteil war. Es bleibt abzuwarten, wie das ERC-Projekt die Frage der Validität der 3D-kultivierten hiPSC-CMs als Modellsystem und der damit zusammenhängenden Testzusammensetzung beantwortet.

Bei hoher Validität des Modellsystems könnte man erwarten, dass EHTs von kranken Herzpatienten einen signifikant unterschiedlichen Mittelwert  $\pm$  SD als gesunde Spender aufweisen. Im Vergleich zu EHTs von gesunden Spendern könnten EHTs von HCM-Patienten eine erhöhte und die von DCM-Patienten eine niedrigere Calciumsensitivität aufzeigen (Willott et al. 2010; Chung et al. 2016). Eine geringere Post-Pausenbeziehung (Pieske et al. 1996; Eschenhagen et al. 2015) und eine negative Kraft-Frequenzbeziehung werden sowohl für EHTs von HCM- als auch DCM-Patienten erwartet (Pieske et al. 1992). Außerdem sollte man möglicherweise eine erhöhte Wirkung  $\beta$ -adrenerger Stimuli in EHTs von HCM-Patienten sehen und eine geringere in EHTs von DCM-Patienten (Koga et al. 1985), sofern man die Physiologie der Krankheiten mit den 3D-kultivierten hiPSC-CMs abbilden kann. Dabei ist natürlich zu beachten, dass die in der Herzinsuffizienzliteratur beschriebenen Besonderheiten in der Regel in terminal insuffizienten Herzen erfasst worden sind und möglicherweise keine primären Veränderungen darstellen, sondern sekundäre Anpassungen z.B. an chronisch erhöhte Katecholaminkonzentrationen im Plasma von Patienten mit Herzinsuffizienz sein könnten.

### 5.2 Untersuchungen zur Anwendung von hiPSC-CMs als biologischer Schrittmacher

HiPSC-CMs bieten viele Anwendungsmöglichkeiten und werden mittlerweile auch auf ihr Potenzial als biologischer Schrittmacher getestet, um eine Alternative/Unterstützung zu elektrischen Schrittmachern anbieten zu können (Rosen et al. 2011). Erste Studien zeigten ein Schrittmacherpotenzial von EB-kultivierten hiPSC-CMs (Chauveau et al. 2014), das in dem zweiten Projekt dieser Arbeit im Kontext arrhythmisch schlagender Ratten-EHTs untersucht wurde. Hierfür wurde ein kardiales Organoid-Modell entwickelt, in dem arrhythmische Ratten-EHTs als Substrat genutzt wurden, um regulär schlagende EBs als Impulsgeber zu testen

(EHT+EB). EHTs+EB zeigten ein stabiles, hiPSC-CM-typisches reguläres Kontraktionsmuster. Die Schrittmacherfunktion des EBs konnte weiterhin mit der Messung von Calciumtransienten verifiziert werden, aus denen hervorging, dass die Kontraktion im EB initiiert wurde und Substrat und Impulsgeber hinreichend miteinander gekoppelt waren. Diese Kopplung wurde weiterhin mit Aktionspotenzialmessungen und Histologie gezeigt. Letztere visualisierte außerdem eine über die Kultivierung entstandene Übergangszone zwischen Impulsgeber und Substrat.

### 5.2.1 Einfluss des unreifen hiPSC-CM-Phänotyps

Mit der genexpressorischen Charakterisierung der EHT+EB-kultivierten hiPSC-CMs konnte gezeigt werden, dass sie mit der Expression von Cx45 und HCN4 eine Schrittmacher-ähnliche molekulare Signatur aufweisen. Eine zu EHTs+EB vergleichbare Cx45- und HCN4-Expression konnte aber auch teilweise in EBs, die parallel zu EHTs+EB im EB-Format weiterkultiviert wurden, vorgefunden werden, und in solchen, die grade erst die kardiale Differenzierung durchlaufen haben. Passend zu der Transkription von Schrittmachermarkern zeigten die AP-Messungen in den EBs eine signifikant höhere spontane Depolarisierung (DD) als die aus Ventrikeln isolierten Rattenherzzellen. Außerdem konnte in EHT+EB-kultivierten hiPSC-CMs eine über die Kulturzeit ansteigende Expression des ventrikulären Markers MLC2V nachgewiesen werden (O'Brien et al. 1993; Kubalak et al. 1994), die höchstwahrscheinlich auf über die Kultivierungszeit reifende ventrikulär-ähnliche hiPSC-CMs zurückzuführen ist (Bedada et al. 2016). Dieser in allen Kulturformaten und Zeitpunkten vorgefundene Phänotyp unterschiedlicher Herzzelltypen ergibt sich wahrscheinlich durch die bisherigen etablierten kardialen Differenzierungsprotokolle, die eine Mischung aus atrialen, ventrikulären und Sinusknotenzellen hervorbringen (Karakikes et al. 2015). Alternativ zu einer heterogenen Zellpopulation könnte der gemischte Phänotyp aber auch mit einer homogenen, aber unreifen Zellpopulation mit intermediärem Herzzellphänotyp zu erklären sein. Besonders HCN4 zeigt eine sehr dynamische Expression während der Entwicklung des Herzens in der Embryogenese (Liang et al. 2013). Mit beiden Erklärungsversuchen würde das spontane und reguläre Kontraktionsmuster aber auf  $I_f$ -abhängigen Mechanismen beruhen.

### 5.2.2 Schrittmacher-Mechanismen

Dass die Schrittmacherfunktion der EB-kultivierten hiPSC-CMs auf  $I_f$ -abhängigen Mechanismen (Kationeneinstrom  $I_f$  von HCN-Kanälen) beruht, konnte mit dem HCN-Inhibitor Ivabradin nachgewiesen werden (Koncz et al. 2011), durch den sich die Frequenz der EHTs+EB, aber nicht die der Kontroll-EHTs verringerte. Dieses Ergebnis impliziert einerseits einen ähnlichen Schrittmachermechanismus des EBs zu dem des primären Schrittmachers. Andererseits zeigt es den hohen Einfluss des EBs auf das Rattengewebe, da auch bei der Inhibierung der Schrittmacherfunktion des EBs durch Ivabradin und einer daraus resultierenden geringen Frequenz die EHTs+EB weiterhin regulär schlugen und nicht das rattentypische Kontraktionsmuster entwickelten. Unter dieser Interventions-bedingten geringen spontanen Schlagfrequenz, aber auch unter der normalen Kulturbedingung wies das EB eine viel geringere spontane Grundfrequenz (~50 BPM) als das Substrat (=Ratten-EHT, bis zu 240 BPM) auf (Eder et al. 2014). Trotzdem war es in der Lage, als Impulsgeber im kardialen Organoid-Modell zu fungieren, was bemerkenswert ist. In diesem Zusammenhang wurden Daten veröffentlicht, die zeigen, dass eine permanente (elektrische) Stimulierung sowohl in Ratten- als auch humanen EHTs zu einer Reduzierung bis hin zur Einstellung des spontan generierten Schlagmusters führt (Nunes et al. 2013; Hirt et al. 2014). Diese permanente Stimulierung wurde in dem entwickelten kardialen Organoid-Modell von Beginn der Kultivierungszeit an durch das EB hervorgerufen, während das Rattengewebe durch seine anfängliche EHT-Unreife noch keine spontane Kontraktion aufwies. Somit zeigte das EB als Stimulus zunächst eine höhere Frequenz auf, was eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen sein könnte.

Im Einklang mit der Literatur konnte in unserem kardialen Organoid-Modell außerdem ein Einfluss der Größe des Impulsgebers (=EB) auf die Erfolgsrate der Schrittmacheraktivität beobachtet werden (Joyner und van Capelle 1986). EHTs+EB mit 300-500  $\mu\text{m}$ -großen EBs zeigten als erste eine Schrittmacheraktivität auf, die sich in einer 80%igen Erfolgsrate manifestierte. Mit fortlaufender Kultivierung entwickelten die anderen EB-Größen (<300  $\mu\text{m}$ , >500  $\mu\text{m}$ ) jedoch eine vergleichbare Erfolgsrate. Die EB-Größe zeigte keinen erkennbaren Einfluss auf die  $I_f$ -basierte Schrittmacheraktivität.

Die Verarbeitung von großen EBs führte jedoch oftmals zu einem zentralen Bereich im EB mit sehr kleinen nekrotisch wirkenden Zellen. Diese Degeneration könnte durch eine zu geringe Nährstoff- und/oder Sauerstoffversorgung hervorgerufen worden sein. Dieses Phänomen schien aber keinen Einfluss auf die Schrittmacherfunktion zu haben und trug vielleicht sogar zu einer Schrittmacherförderlichen, geringen elektrischen Kopplung im EB-Zentrum bei, die aus dem primären Schrittmacher bekannt ist (Boyett et al. 2000). Dennoch könnten sie auch eine potenzielle Limitierung für mögliche *in vivo*-Anwendungen darstellen, für die man die EBs abermals vergrößern müsste.

### 5.2.3 Kopplungsprozesse

Der Größe des Schrittmachers wurde in numerischen Modellierungen eine Wechselbeziehung mit einer Übergangszone zwischen Sinusknoten und Atrium und deren elektrischen Kopplung zugeschrieben (Abbildung 5.3). Durch eine Übergangszone mit intermediärer Kopplung zwischen Sinusknoten und Atrium konnte einerseits das Aktionspotenzial erfolgreich ins Atriums weitergeleitet und andererseits die Schrittmachergröße reduziert werden (Abbildung 5.3; Joyner und van Capelle 1986; Joyner et al. 2007). Da die in den EHTs+EB beobachtete Übergangszone zwischen EB und Rattengewebe in allen analysierten und dem EB erfolgreich folgenden EHTs+EB vorgefunden werden konnte, ist davon auszugehen, dass sie auch in dem hier entwickelten kardialen Organoid-Modell eine tragende Rolle spielt. Die hohe Expression von N-cad, das auch in der Zellmigration fungiert, und die mit fluoreszenzmarkierten EBs durchgeführten Migrationsanalysen lassen vermuten, dass die Übergangszone im kardialen Organoid-Modell durch die Zellmigration von Zellen aus den EBs gebildet wird. Dieses Verhalten der EB-Zellen mildert die kürzlich diskutierte Limitierung der kugelförmigen Struktur des EBs ab, die dazu führen könnte, dass nur ein Teil der Oberfläche mit dem umliegenden zu stimulierenden Gewebe in Verbindung kommt (Chauveau et al. 2014). Diese ungünstige Verbindung zwischen EB und Substrat könnte wiederum zur Folge haben, dass die Schrittmacherautomatik des EBs durch das hyperpolarisierte Substrat gestört und das Aktionspotenzial nicht weitergeleitet werden würde (Chauveau et al. 2014). Mit dem Bestehen der Übergangszone würden diese



## Diskussion

beschriebenen elektrischen Beeinträchtigungen, wie im Fall des primären Schrittmachers (Boyett et al. 2000), minimiert werden.

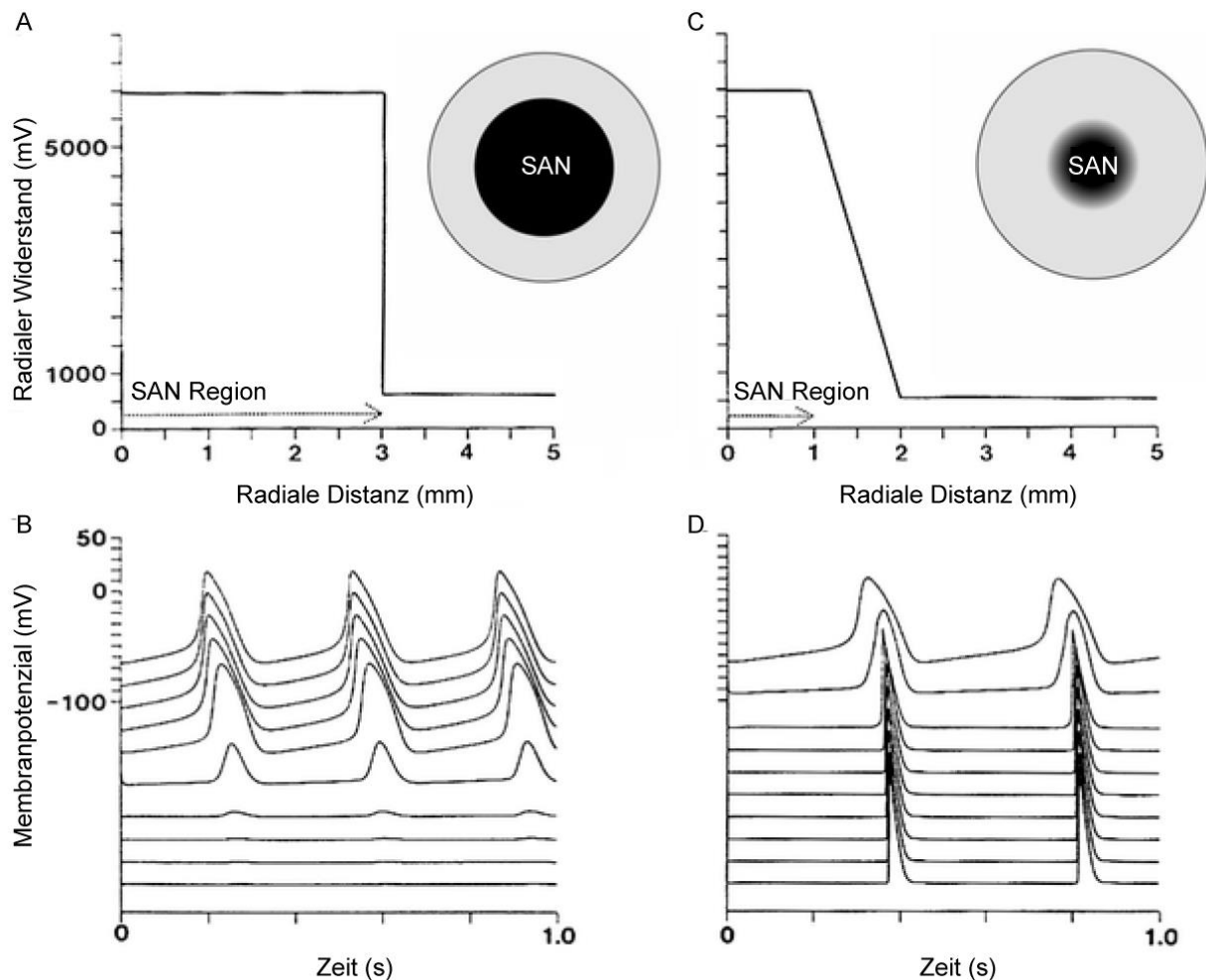


Abbildung 5.3: Erfolgreiche Weiterleitung des Aktionspotenzials. Die Größe des Sinusknotens (SAN) steht mit der elektrischen Kopplung und der Übergangszone in Wechselbeziehung. Durch die geringe elektrische Kopplung im Sinusknoten weist diese Region einen hohen elektrischen Widerstand auf, der im Atrium durch die vermehrte elektrische Kopplung geringer ist. Durch eine Übergangszone mit einem intermediärem Widerstand ( $\triangleq$  intermediäre elektrische Kopplung) kann der Sinusknoten sowohl in seiner Größe reduziert werden, als auch das Aktionspotenzial erfolgreich ins Atrium weiterleiten. (A) und (C) zeigen jeweils die angewandten Modelle, ohne (A) oder mit bestehender (C) Übergangszone und (B) und (D) die daraus resultierenden Simulationen (Joyner et al. 2007).

Als weitere Parallele zum primären Schrittmacher konnte in dem kardialen Organoid-Modell ein Gradient in der Cx43-Expression zwischen EB und Rattengewebe ausgemacht werden. Das EB wies hierbei eine sehr geringe Expression dieses schnell leitenden Cx, die Übergangszone eine intermediäre und das Rattengewebe eine sehr hohe Cx43-Expression auf. Die höhere Cx43-Expression im Rattengewebe

könnte dem im Vergleich zu den hiPSC-CMs reiferen Phänotyp zugrunde liegen. Die geringe Cx43-Expression im EB wiederum könnte dem noch unreiferen Phänotyp dieser Zellen geschuldet sein, da in der anfänglichen Herzentwicklung eine geringere Leitgeschwindigkeit vorgefunden werden kann als im später entstehenden Arbeitsmyokard (Christoffels et al. 2010). Passend hierzu konnte im EB statt des schnell leitenden Cx43 das langsam leitende Cx45 nachgewiesen werden, dessen Expressionsmuster auch einen Gradienten zum Rattengewebe aufzeigte. Solch einen Gradient in der Cx45-Expression von Sinusknoten bis zur Peripherie wurde bisher für das Kaninchen beschrieben (Coppen et al. 1999). Mit der Expression von Cx45 im EB wurden zum einen die Genexpressionsanalysen verifiziert. Zum anderen unterstreicht das in den EHTs+EB vorgefundene Cx43/Cx45-Expressionsmuster die Ähnlichkeit zu dem Kopplungsmuster des primären Schrittmachers. Inwiefern die intermediäre Kopplung in der Übergangszone auf EB-Zellen oder Rattenzellen zurückgeht, ist unklar und kann wie für die Sinusknotenstruktur diskutiert werden (Zhang et al. 2001). Unwahrscheinlich scheint jedoch der Fall zu sein, dass die EB-Zellen ihre elektrophysiologischen Eigenschaften zum Rattengewebe hin verändern (Gradient-Modell). Wahrscheinlicher ist, dass der Gradient auf das Mosaik-Modell zurückzuführen und durch die Bereichs-abhängige Verteilung von sowohl geringgekoppelten EB-Zellen als auch vermehrt gekoppelten Rattenzellen zustande gekommen ist.

Anders als im Sinusknoten konnte kein Gradient in der Aufstrichgeschwindigkeit zwischen EB und Rattengewebe gezeigt werden. Für das Organoid-Modell wurde für alle Bereiche ein ventrikulär-ähnlicher Wert gemessen. Diese Ergebnisse unterstreichen die Limitierung des in 5.2.1 diskutierten unreifen und gemischten Zellphänotyps der hiPSC-CM-Differenzierungen, die sowohl Eigenschaften von ventrikulären Zellen als auch von Sinusknotenzellen aufweisen. Im Gegensatz hierzu wurde aber ein Gradient in der Aktionspotenzialdauer zwischen EB, Übergangszone und Rattengewebe gefunden, der auch im Sinusknoten vorzufinden ist (Zentrum/EB > Peripherie/Rattengewebe). Diese ist Spezies-abhängig größer in ventrikulären humanen als in ventrikulären Ratten-CMs (Watanabe et al. 1983; O'Hara und Rudy 2012) und begünstigt höchstwahrscheinlich das Schrittmacherpotenzial des EBs.

Der Kopplungsgradient in der Cx43-Expression ist die Grundlage einer erfolgreichen *Source-Sink*-Beziehung, bei der der Impulsgeber/EB (= *Source*) die elektrische Spannung generiert und diese an das Substrat/Rattengewebe (= *Sink*) weiterleitet (Fast und Kléber 1995; Watanabe et al. 1995; Rohr et al. 1997; Wang und Rudy 2000). Neben Leitungsbarrieren und einem Gradienten in Membraneigenschaften soll der elektrische Kopplungsgradient die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass eine kleine Gruppe an Zellen (Sinusknoten/EB) eine größere Gruppe an Zellen (Atrium/Rattengewebe) erfolgreich elektrisch stimulieren kann und ein elektrisches Synzytium mit ausgewogener *Source-Sink*-Beziehung ermöglicht.

### 5.2.4 Ausblick

Durch das zum primären Schrittmacher ähnliche Kopplungsmuster bietet das entwickelte kardiale Organoid-Modell die Möglichkeit, Kopplungsprozesse, die für eine erfolgreiche Weiterleitung des Schrittmacherpotenzials nötig sind, *in vitro* zu studieren. *In vivo* sind solche Visualisierungen oft schwierig, weswegen bisher einfache *in vitro* 2D-CM-Kulturen oder *ex vivo* Herzschnitte benutzt werden, um eine potenzielle Kopplung zwischen dem entwickelten biologischen Schrittmacher und dem Substrat aufzeigen zu können. *Ex vivo* Herzschnitte zeigen zwar die komplexe Struktur des Herzen, haben jedoch den Nachteil, dass sie meist nur wenige Tage (~7 Tage) kultiviert werden können, was Entwicklungs- und Langzeitstudien erschwert. Daher kann das entwickelte kardiale Organoid-Modell als eine *in vitro* Alternative dienen, da es als 3D-Modell eine vergleichsweise hohe physiologische Komplexität erreicht, lange Kultivierungszeiten ermöglicht (~70-100 Tage) und eine leichte Visualisierung der strukturellen und elektrophysiologischen Kopplungsprozesse zulässt.

Um eine höhere Relevanz des entwickelten kardialen Organoid-Modells zu erreichen, könnte man folgende Optimierungen des Modells vornehmen: (i) Die Position des EBs im EHT sollte standardisiert werden und z.B. durch eine Thrombin-Fibrinogenmischung an die Innenseite eines Silikonstäbchens „geklebt“ werden. (ii) Statt der EB-kultivierten hiPSC-CMs mit gemischtem Phänotyp sollte man hiPSCs zu Sinusknotenzellen differenzieren und diese Differenzierungen zusätzlich Sinusknotenzell-spezifisch aufreinigen. Differenzierungsprotokolle hierfür wurden kürzlich veröffentlicht (Protze et al. 2016). (iii) Diese Sinusknoten-EBs könnte man in

die kürzlich in unserem Institut etablierten atrialen Ratten-EHTs (Krause et al. 2018) oder atrialen humanen EHTs (Lemme et al. 2018) einbringen, was die *in vivo* Situation widerspiegeln würde. (iv) Letztere hätten den Vorteil, dass nicht zwei unterschiedliche Spezies verwendet würden, deren Einfluss unbekannt ist und somit, wenn möglich umgangen werden sollte. (v) Außerdem könnte man versuchen, die EHT-Gussform so anzupassen, dass man drei Kompartimente schafft, das erste für hiPSC-Sinusknotenzellen, das zweite für aus hiPSC-hergestellte atriale Zellen und das dritte für aus hiPSC-hergestellte ventrikuläre Zellen, die aus dem für diese Arbeit verwendeten Differenzierungsprotokoll aufgereinigt werden könnten. Diese Schritte würden eine erhöhte Komplexität und damit eine bessere Vergleichbarkeit zur menschlichen Herzphysiologie schaffen.

### 6 Zusammenfassung

Aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte Kardiomyozyten (hiPSC-CMs) bieten u.a. die Möglichkeit zur Patienten-spezifischen Modellierung von Krankheitsphänotypen. Inwiefern hiPSC-CMs die Gütekriterien eines Modellsystems erfüllen, ist bisher jedoch praktisch nicht systematisch untersucht worden. Das erste Projekt dieser Arbeit diente daher zur Untersuchung der Reliabilität von 3D-kultivierten hiPSC-CMs. Hierzu wurden von drei gesunden Spendern (UKEi1-UKEi3) jeweils drei Klone pro Spender und drei kardiale Differenzierungs-*Batches* pro Klon hergestellt und im EHT-Format (3D *Engineered Heart Tissue*, EHT) funktionell und auf Transkriptionsebene untersucht. Im Anschluss wurden die Tests zur funktionellen Charakterisierung auf ihre Reliabilität untersucht. Eine geringe hiPSC-Qualität beeinflusste alle Prozesse der Modellierung von Krankheitsphänotypen negativ, zu denen hiPSC-Kultur, hiPSC-Differenzierung und die funktionelle und genexpressorische Charakterisierung gehörten. Sofern hiPSC-Qualitätsstandards erfüllt waren, konnte eine geringe Variabilität in den genannten Prozessen zwischen Spendern und zwischen Klonen, aber eine vergleichsweise hohe Variabilität zwischen *Batches* beobachtet werden. Zur Optimierung der Reliabilität sollten daher mehrere *Batches* pro Spender ( $n \geq 3$ ) analysiert werden. Die Variationskoeffizienten der verwendeten Tests waren sehr heterogen und hauptsächlich den technisch-bedingten Ebenen zuzuschreiben. Innerhalb der Testzusammensetzung zeigten die Experimente zur Calciumsensitivität und Kraft-Frequenzbeziehung die höchste Reliabilität.

Das zweite Projekt beschäftigte sich mit der Anwendung der qualitätskontrollierten hiPSC-CMs als biologischer Schrittmacher. Es wurde ein kardiales Organoid-Modell entwickelt, für das sich das arrhythmische Ratten-EHT als Substrat zu Nutzen gemacht wurde, um regulär schlagende Embryoidkörperchen (EBs) als Impulsgeber zu testen (EHT+EB). Das EB zeigte eine stabile Schrittmacherfunktion im Ratten-EHT, welches ein hiPSC-CM-typisches reguläres Kontraktionsmuster aufwies. Außerdem konnte ein mit dem primären Schrittmacher des Herzens vergleichbares Kopplungsmuster visualisiert werden, weswegen das kardiale Organoid-Modell eine Möglichkeit bietet, Kopplungsprozesse für eine erfolgreiche Schrittmacherfunktion *in vitro* zu studieren.

### 7 Summary

Due to the lack of systematic studies questioning quality criteria associated with human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) modeling human disease phenotypes, the first project of this thesis aimed at analyzing reliability of 3D-cultured hiPSC-CMs. For this, three healthy donors were chosen (UKEi1-UKEi3) of which three clones/donor and three cardiac differentiation batches/clone were generated and analyzed in 3D engineered heart tissue (EHT). Analysis included gene expression profiles and functional cardiac parameters associated with cardiomyopathies. Tests for functional characterization were also analyzed for reliability. A high impact of low hiPSC quality could be observed for all processes involved in hiPSC disease modeling, including hiPSC culture, hiPSC differentiation, functional characterization and the transcriptome. If hiPSCs fulfilled quality standards like exhibiting a normal karyotype and high pluripotency, little variability was seen for disease modeling processes between healthy donors and clones. However, batches depicted a high level of variability wherefore it is suggested to analyze at least three batches per donor. The separation of biological from technical variability allowed for UKEi1 to link functional calcium handling characteristics with a lower expression in calsequestrine (CASQ2), a calcium binding protein from the sarcoplasmic reticulum. The variation coefficients of the used tests for functional characterization were highly heterogenic and mainly associated with levels of technical variability (EHT/repetition/unexplained, clone, batch). Within the test pool, experiments analyzing calcium sensitivity and force frequency relationship showed highest reliability.

Next to the possibility of using hiPSC-CMs for disease modeling studies another application may be their use for regeneration purposes. Accordingly, the second project analyzed the potential of regular beating hiPSC-CMs to act as a biological pacemaker. For this, embryonic body (EB) cultured hiPSC-CMs were used as a trigger to pace arrhythmic beating rat EHTs as substrate. This cardiac organoid model showed that the EB indeed was capable of pacing rat EHTs in a regular and stable way. Furthermore, a coupling pattern comparable to the primary pacemaker of the heart could be observed which makes EHTs+EB a good *in vitro* model to study coupling processes necessary for successful action potential propagation.

## 8 Literaturverzeichnis

- Aasen T, Raya A, Barrero MJ, et al (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol.* doi: 10.1038/nbt.1503
- Abou-Saleh H, Zouein FA, El-Yazbi A, et al (2018) The march of pluripotent stem cells in cardiovascular regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther* 9:201. doi: 10.1186/s13287-018-0947-5
- Andrews PW, Ben-David U, Benvenisty N, et al (2017) Assessing the Safety of Human Pluripotent Stem Cells and Their Derivatives for Clinical Applications. In: *Stem Cell Reports*
- Bedada FB, Wheelwright M, Metzger JM (2016) Maturation status of sarcomere structure and function in human iPSC-derived cardiac myocytes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863:1829–1838
- Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA (1990) Connexin family of gap junction proteins. *J. Membr. Biol.*
- Bluhm WF, McCulloch AD, Lew WYW (1995) Active force in rabbit ventricular myocytes. *J Biomech.* doi: 10.1016/0021-9290(94)00018-Y
- Bogdanov KY, Vinogradova TM, Lakatta EG (2001) Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na(+)-Ca(2+) exchanger: molecular partners in pacemaker regulation. *Circ Res* 88:1254–8
- Boineau J, Schuessler R, Roeske W, et al (1983) Quantative relation between sites of atrial impulse origin and cycle length. *Am J Physiol*
- Boyett MR, Honjo H, Kodama I (2000) The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res* 47:658–87
- Boyett MR, Honjo H, Yamamoto M, et al (1999) Downward gradient in action potential duration along conduction path in and around the sinoatrial node. *Am J Physiol*

- Bradshaw PJ, Stobie P, Knuiman MW, et al (2014) Trends in the incidence and prevalence of cardiac pacemaker insertions in an ageing population. *Open Hear.* doi: 10.1177/0038038514560262
- 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
- Brown HF, Difrancesco D, Noble SJ (1979) How does adrenaline accelerate the heart? [13]. *Nature*
- Burridge PW, Anderson D, Priddle H, et al (2007) Improved Human Embryonic Stem Cell Embryoid Body Homogeneity and Cardiomyocyte Differentiation from a Novel V-96 Plate Aggregation System Highlights Interline Variability. *Stem Cells.* doi: 10.1634/stemcells.2006-0598
- Burrows CK, Banovich NE, Pavlovic BJ, et al (2016) Genetic Variation, Not Cell Type of Origin, Underlies the Majority of Identifiable Regulatory Differences in iPSCs. *PLoS Genet* 12:e1005793. doi: 10.1371/journal.pgen.1005793
- Carcamo-Orive I, Hoffman GE, Cundiff P, et al (2017) Analysis of Transcriptional Variability in a Large Human iPSC Library Reveals Genetic and Non-genetic Determinants of Heterogeneity. *Cell Stem Cell* 20:518–532.e9. doi: 10.1016/j.stem.2016.11.005
- Casini S, Verkerk AO, Remme CA (2017) Human iPSC-Derived Cardiomyocytes for Investigation of Disease Mechanisms and Therapeutic Strategies in Inherited Arrhythmia Syndromes: Strengths and Limitations. *Cardiovasc drugs Ther* 31:325–344. doi: 10.1007/s10557-017-6735-0
- Chauveau S, Brink PR, Cohen IS (2014) Stem cell-based biological pacemakers from proof of principle to therapy: A review. *Cytotherapy* 16:873–880
- Chen P-S, Joung B, Shinohara T, et al (2010) The Initiation of the Heart Beat. *Circ J.* doi: 10.1253/circj.CJ-09-0712
- Christoffels VM, Smits GJ, Kispert A, Moorman AFM (2010) Development of the pacemaker tissues of the heart. *Circ. Res.* 106:240–254



- Chung J-H, Biesiadecki BJ, Ziolo MT, et al (2016) Myofilament Calcium Sensitivity: Role in Regulation of In vivo Cardiac Contraction and Relaxation. *Front Physiol* 7:562. doi: 10.3389/fphys.2016.00562
- Cingolani E, Goldhaber JI, Marbán E (2017) Next-generation pacemakers: from small devices to biological pacemakers. *Nat Rev Cardiol*. doi: 10.1038/nrcardio.2017.165
- Cingolani E, Goldhaber JI, Marbán E (2018) Next-generation pacemakers: From small devices to biological pacemakers. *Nat. Rev. Cardiol*.
- Cloherty SL, Dokos S, Lovell NH (2005) Qualitative Support for the Gradient Model of Cardiac Pacemaker Heterogeneity. In: 2005 IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference. IEEE, pp 133–136
- Coppen SR, Kodama I, Boyett MR, et al (1999) Connexin45, a Major Connexin of the Rabbit Sinoatrial Node, Is Co-expressed with Connexin43 in a Restricted Zone at the Nodal-Crista Terminalis Border. *J Histochem Cytochem* 47:907–918. doi: 10.1177/002215549904700708
- Debold EP, Schmitt JP, Patlak JB, et al (2007) Hypertrophic and dilated cardiomyopathy mutations differentially affect the molecular force generation of mouse  $\alpha$ -cardiac myosin in the laser trap assay. *Am J Physiol Circ Physiol* 293:H284–H291. doi: 10.1152/ajpheart.00128.2007
- Denning C, Borgdorff V, Crutchley J, et al (2016) Cardiomyocytes from human pluripotent stem cells: From laboratory curiosity to industrial biomedical platform. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1863:1728–1748. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.10.014
- Dobrzynski H, Boyett MR, Anderson RH (2007) New insights into pacemaker activity: Promoting understanding of sick sinus syndrome. *Circulation*
- Dobrzynski H, Li J, Tellez J, et al (2005) Computer Three-Dimensional Reconstruction of the Sinoatrial Node. *Circulation* 111:846–854. doi: 10.1161/01.CIR.0000152100.04087.DB
- Eder A, Hansen A, Uebeler J, et al (2014) Effects of proarrhythmic drugs on

- relaxation time and beating pattern in rat engineered heart tissue. *Basic Res Cardiol* 109:436. doi: 10.1007/s00395-014-0436-7
- Eisner DA, Cerbai E (2009) Beating to time: calcium clocks, voltage clocks, and cardiac pacemaker activity. *AJP Hear Circ Physiol*. doi: 10.1152/ajpheart.00056.2009
- Eschenhagen T, Carrier L (2018) Cardiomyopathy phenotypes in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes—a systematic review. *Pflügers Arch - Eur J Physiol*. doi: 10.1007/s00424-018-2214-0
- 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*. doi: 10.1096/fasebj.11.8.9240969
- Eschenhagen T, Mummery C, Knollmann BC (2015) Modelling sarcomeric cardiomyopathies in the dish: from human heart samples to iPSC cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 105:424–38. doi: 10.1093/cvr/cvv017
- Fast VG, Kléber AG (1995) Block of impulse propagation at an abrupt tissue expansion: evaluation of the critical strand diameter in 2- and 3-dimensional computer models. *Cardiovasc Res* 30:449–59
- Fedorov V V., Glukhov A V., Chang R (2012) Conduction barriers and pathways of the sinoatrial pacemaker complex: their role in normal rhythm and atrial arrhythmias. *AJP Hear Circ Physiol*. doi: 10.1152/ajpheart.00892.2011
- Fedorov V V., Glukhov A V., Chang R, et al (2010) Optical mapping of the isolated coronary-perfused human sinus node. *J Am Coll Cardiol*. doi: 10.1016/j.jacc.2010.03.098
- Fedorov V V, Schuessler RB, Hemphill M, et al (2009) Structural and functional evidence for discrete exit pathways that connect the canine sinoatrial node and atria. *Circ Res* 104:915–23. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.193193
- Fink C, Kralisch D, Remmers U, et al (2000) Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. *FASEB J*. doi: 10.1096/fasebj.14.5.669

- Gorski PA, Ceholski DK, Hajjar RJ (2015) Altered myocardial calcium cycling and energetics in heart failure - A rational approach for disease treatment. *Cell Metab.*
- Gratz D, Onal B, Dalic A, Hund TJ (2018) Synchronization of Pacemaking in the Sinoatrial Node: A Mathematical Modeling Study. *Front Phys* 6:63. doi: 10.3389/fphy.2018.00063
- Haase A, Olmer R, Schwanke K, et al (2009) Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Cord Blood. *Cell Stem Cell*. doi: 10.1016/j.stem.2009.08.021
- Hansen A, Eder A, Bonstrup 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
- Henry Gray (2013) Gray's Anatomy. Arcturus Publishing Ltd
- Hirt MN, Boeddinghaus J, Mitchell A, et al (2014) Functional improvement and maturation of rat and human engineered heart tissue by chronic electrical stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 74:151–161. doi: 10.1016/J.YJMCC.2014.05.009
- Hu YF, Dawkins JF, Cho HC, et al (2014) Biological pacemaker created by minimally invasive somatic reprogramming in pigs with complete heart block. *Sci Transl Med* 6:. doi: 10.1126/scitranslmed.3008681
- Huo J, Kamalakar A, Yang X, et al (2016) Evaluation of Batch Variations in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiomyocytes from 2 Major Suppliers. *Toxicol Sci* 156:kfw235. doi: 10.1093/toxsci/kfw235
- Inada S, Zhang H, Tellez JO, et al (2014) Importance of gradients in membrane properties and electrical coupling in sinoatrial node pacing. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0094565
- International Stem Cell Initiative TISC, Amps K, Andrews PW, et al (2011) Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat Biotechnol* 29:1132–44. doi: 10.1038/nbt.2051
- Joyner RW, van Capelle FJ (1986) Propagation through electrically coupled cells.

- How a small SA node drives a large atrium. *Biophys J* 50:1157–1164. doi: 10.1016/S0006-3495(86)83559-7
- Joyner RW, Wilders R, Wagner MB (2007) Propagation of pacemaker activity. *Med. Biol. Eng. Comput.*
- Jungen C, Scherschel K, Eickholt C, et al (2017) Disruption of cardiac cholinergic neurons enhances susceptibility to ventricular arrhythmias. *Nat Commun* 8:14155. doi: 10.1038/ncomms14155
- Kaebisch C, Schipper D, Babczyk P, Tobiasch E (2015) The role of purinergic receptors in stem cell differentiation. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*
- Karakikes I, Ameen M, Termglinchan V, Wu JC (2015) Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: insights into molecular, cellular, and functional phenotypes. *Circ Res* 117:80–8. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.305365
- Katz AM (2011) *The Physiology of the Heart*. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins Health, ©2011.
- Kehat I, Khimovich L, Caspi O, et al (2004) Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22:1282–1289. doi: 10.1038/nbt1014
- Kilpinen H, Goncalves A, Leha A, et al (2017) Common genetic variation drives molecular heterogeneity in human iPSCs. *Nature* 546:370–375. doi: 10.1038/nature22403
- Kim K, Zhao R, Doi A, et al (2011a) Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29:1117–9. doi: 10.1038/nbt.2052
- Kim SA, Tai C-Y, Mok L-P, et al (2011b) Calcium-dependent dynamics of cadherin interactions at cell-cell junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:9857–62. doi: 10.1073/pnas.1019003108
- Kléber AG, Rudy Y (2004) Basic Mechanisms of Cardiac Impulse Propagation and Associated Arrhythmias. *Physiol Rev* 84:431–488. doi: 10.1152/physrev.00025.2003

- Koga Y, Itaya M, Toshima H (1985) Increased cardiovascular response to epinephrine in hypertrophic cardiomyopathy. *Jpn Heart J* 26:727–40
- Koncz I, Szél T, Jaeger K, et al (2011) Selective pharmacological inhibition of the pacemaker channel isoforms (HCN1-4) as new possible therapeutical targets. *Curr Med Chem* 18:3662–74. doi: 10.2174/092986711796642427
- Krause J, Löser A, Lemoine MD, et al (2018) Rat atrial engineered heart tissue: a new in vitro model to study atrial biology. *Basic Res Cardiol* 113:41. doi: 10.1007/s00395-018-0701-2
- Kubalak SW, Miller-Hance WC, O'Brien TX, et al (1994) Chamber specification of atrial myosin light chain-2 expression precedes septation during murine cardiogenesis. *J Biol Chem* 269:16961–16970
- Laflamme MA, Chen KY, Naumova A V., et al (2007) Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol*. doi: 10.1038/nbt1327
- Lee G, Papapetrou EP, Kim H, et al (2009) Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461:402–406. doi: 10.1038/nature08320
- Lemme M Chronic intermittent tachypacing by an optogenetic approach induces arrhythmia vulnerability in human engineered heart tissue
- Lemme M, Ulmer BM, Lemoine MD, et al (2018) Atrial-like Engineered Heart Tissue: An In Vitro Model of the Human Atrium. *Stem Cell Reports*. doi: 10.1016/J.STEMCR.2018.10.008
- Lemoine MD, Krause T, Koivumäki JT, et al (2018) Human iPSC-derived engineered heart tissue as a sensitive test system for QT prolongation and arrhythmic triggers. *Circ Arrhythmia Electrophysiol* in press:
- Lemoine MD, Mannhardt I, Breckwoldt K, et al (2017) Human iPSC-derived cardiomyocytes cultured in 3D engineered heart tissue show physiological upstroke velocity and sodium current density. *Sci Rep* 7:5464. doi: 10.1038/s41598-017-05600-w

- Liang X, Wang G, Lin L, et al (2013) HCN4 dynamically marks the first heart field and conduction system precursors. *Circ Res* 113:399–407. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301588
- Lister R, Pelizzola M, Kida YS, et al (2011) Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471:68–73. doi: 10.1038/nature09798
- Lovell NH, Cloherty SL, Celler BG, Dokos S (2004) A gradient model of cardiac pacemaker myocytes. In: *Progress in Biophysics and Molecular Biology*
- Mackaay A, Op't Hof T, Bleeker W, et al (1980) Interaction of adrenaline and acetylcholine on cardiac pacemaker function. Functional inhomogeneity of the rabbit sinus node. *J Pharmacol Exp Ther*
- 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
- Martinez-Fernandez A, Nelson TJ, Reyes S, et al (2014) Ips cell-derived cardiogenicity is hindered by sustained integration of reprogramming transgenes. *Circ Cardiovasc Genet*. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000298
- Martins-Taylor K, Xu R-H (2012) Concise Review: Genomic Stability of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* 30:22–27. doi: 10.1002/stem.705
- Matsa E, BurrIDGE PW, Yu K-H, et al (2016) Transcriptome Profiling of Patient-Specific Human iPSC-Cardiomyocytes Predicts Individual Drug Safety and Efficacy Responses In Vitro. *Cell Stem Cell* 19:311–25. doi: 10.1016/j.stem.2016.07.006
- Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, et al (2010) Identification and Classification of Chromosomal Aberrations in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 7:521–531. doi: 10.1016/j.stem.2010.07.017
- Mond HG, Wickham GG, Sloman JG (2012) The Australian history of cardiac pacing: memories from a bygone era. *Heart Lung Circ*. doi: 10.1016/j.hlc.2011.09.004
- Mosqueira D, Mannhardt I, Bhagwan JR, et al (2018) CRISPR/Cas9 editing in human

- pluripotent stem cell-cardiomyocytes highlights arrhythmias, hypocontractility, and energy depletion as potential therapeutic targets for hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. doi: 10.1093/eurheartj/ehy249
- Müller F-J, Brändl B, Loring JF (2008) Assessment of human pluripotent stem cells with PluriTest. Harvard Stem Cell Institute
- Müller F-J, Schuldt BM, Williams R, et al (2011) A bioinformatic assay for pluripotency in human cells. *Nat Methods* 8:315–317. doi: 10.1038/nmeth.1580
- Mummery C, Ward D, Van Den Brink CE, et al (2002) Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *J. Anat.*
- Nag AC (1980) Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios*
- Nazor KL, Altun G, Lynch C, et al (2012) Recurrent variations in DNA methylation in human pluripotent stem cells and their differentiated derivatives. *Cell Stem Cell* 10:620–34. doi: 10.1016/j.stem.2012.02.013
- Nikolaïdou T, Aslanidi O V., Zhang H, Efimov IR (2012) Structure-function relationship in the sinus and atrioventricular nodes. In: *Pediatric Cardiology*
- Nunes SS, Miklas JW, Liu J, et al (2013) Biowire: a platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods* 10:781–7. doi: 10.1038/nmeth.2524
- O'Brien TX, Lee KJ, Chien KR (1993) Positional specification of ventricular myosin light chain 2 expression in the primitive murine heart tube. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5157–5161. doi: 10.1073/pnas.90.11.5157
- O'Hara T, Rudy Y (2012) Quantitative comparison of cardiac ventricular myocyte electrophysiology and response to drugs in human and nonhuman species. *Am J Physiol Circ Physiol* 302:H1023–H1030. doi: 10.1152/ajpheart.00785.2011
- Pecha S, Koivumäki J, Geelhoed B, et al (2018) Normalization of force to muscle cross-sectional area: A helpful attempt to reduce data scattering in contractility studies? *Acta Physiol* 224:e13202. doi: 10.1111/apha.13202

- Pieske B, Hasenfuss G, Holubarsch C, et al (1992) Alterations of the force-frequency relationship in the failing human heart depend on the underlying cardiac disease. In: Cellular and Molecular Alterations in the Failing Human Heart. Steinkopff, Heidelberg, pp 213–221
- Pieske B, Sütterlin M, Schmidt-Schweda S, et al (1996) Diminished post-rest potentiation of contractile force in human dilated cardiomyopathy. Functional evidence for alterations in intracellular Ca<sup>2+</sup> handling. J Clin Invest 98:764–76. doi: 10.1172/JCI118849
- Plotnikov AN, Shlapakova I, Szabolcs MJ, et al (2007) Xenografted Adult Human Mesenchymal Stem Cells Provide a Platform for Sustained Biological Pacemaker Function in Canine Heart. Circulation 116:706–713. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.703231
- Potapova I, Plotnikov A, Lu Z, et al (2004) Human Mesenchymal Stem Cells as a Gene Delivery System to Create Cardiac Pacemakers. Circ Res 94:952–959. doi: 10.1161/01.RES.0000123827.60210.72
- Prondzynski M, Krämer E, Laufer SD, et al (2017) Evaluation of MYBPC3 trans-Splicing and Gene Replacement as Therapeutic Options in Human iPSC-Derived Cardiomyocytes. Mol Ther Nucleic Acids 7:475–486. doi: 10.1016/j.omtn.2017.05.008
- Protze SI, Liu J, Nussinovitch U, et al (2016) Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker. Nat Biotechnol 35:56–68. doi: 10.1038/nbt.3745
- Rohr S, Kucera JP, Fast VG, Kléber AG (1997) Paradoxical improvement of impulse conduction in cardiac tissue by partial cellular uncoupling. Science 275:841–4. doi: 10.1126/SCIENCE.275.5301.841
- Rosen MR, Robinson RB, Brink PR, Cohen IS (2011) The road to biological pacing. Nat. Rev. Cardiol. 8:656–666
- Rost J (2014) Reliabilitäts-Validitätsdilemma, Dorsch – L. M. A. Wirtz
- Rouhani F, Kumasaka N, de Brito MC, et al (2014) Genetic background drives



- transcriptional variation in human induced pluripotent stem cells. *PLoS Genet* 10:e1004432. doi: 10.1371/journal.pgen.1004432
- Sánchez-Quintana D, Cabrera JA, Farré J, et al (2005) Sinus node revisited in the era of electroanatomical mapping and catheter ablation. *Heart*. doi: 10.1136/hrt.2003.031542
- 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*. doi: 10.1371/journal.pone.0026397
- Schouten VJA (1986) The negative correlation between action potential duration and force of contraction during restitution in rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. doi: 10.1016/S0022-2828(86)80291-7
- Schouten VJA, ter Keurs HEDJ (1986) The force-frequency relationship in rat myocardium. *Pflügers Arch*. doi: 10.1007/bf00580714
- Sgodda M, Cantz T (2013) Small but significant: inter- and inpatient variations in iPS cell-based disease modeling. *Mol Ther* 21:5–7. doi: 10.1038/mt.2012.273
- Shechtman O (2013) The Coefficient of Variation as an Index of Measurement Reliability. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 39–49
- Shepherd N, Fisher VJ (1990) Combined force and voltage measurement in rapidly superfused guinea pig heart cells. *Am J Physiol Physiol* 258:C739–C748. doi: 10.1152/ajpcell.1990.258.4.C739
- Shepherd N, Vornanen M, Isenberg G (1990) Force measurements from voltage-clamped guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol Circ Physiol*. doi: 10.1152/ajpheart.1990.258.2.h452
- Shih W, Yamada S (2012) N-cadherin as a key regulator of collective cell migration in a 3D environment. *Cell Adh Migr* 6:513–7. doi: 10.4161/cam.21766
- Stöhr A, Friedrich FW, Flenner F, et al (2013) Contractile abnormalities and altered drug response in engineered heart tissue from Mybpc3-targeted knock-in mice. *J Mol Cell Cardiol* 63:189–198. doi: 10.1016/J.YJMCC.2013.07.011

- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al (2007) Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 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*. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Tapia N, Schöler HR (2016) Molecular Obstacles to Clinical Translation of iPSCs. *Cell Stem Cell* 19:298–309. doi: 10.1016/j.stem.2016.06.017
- ten Velde I, de Jonge B, Verheijck EE, et al (1995) Spatial distribution of connexin43, the major cardiac gap junction protein, visualizes the cellular network for impulse propagation from sinoatrial node to atrium. *Circ Res*. doi: 10.1161/01.RES.76.5.802
- Terentyev D, Kubalova Z, Valle G, et al (2008) Modulation of SR Ca Release by Luminal Ca and Calsequestrin in Cardiac Myocytes: Effects of CASQ2 Mutations Linked to Sudden Cardiac Death. *Biophys J* 95:2037–2048. doi: 10.1529/biophysj.107.128249
- Terentyev D, Nori A, Santoro M, et al (2006) Abnormal Interactions of Calsequestrin With the Ryanodine Receptor Calcium Release Channel Complex Linked to Exercise-Induced Sudden Cardiac Death. *Circ Res* 98:1151–1158. doi: 10.1161/01.RES.0000220647.93982.08
- Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Gyorke I, et al (2003) Calsequestrin determines the functional size and stability of cardiac intracellular calcium stores: Mechanism for hereditary arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci*. doi: 10.1073/pnas.1932318100
- Thaemert NL, Beckerly R (2011) Cardiac physiology. In: Vacanti CA, Sikka P, Urman R, Segal BS (eds) *Essential Clinical Anesthesia*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 427–437
- Theobald A (2000) *Das World Wide Web als Befragungsinstrument*. Gabler, Wiesbaden

- 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
- Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, et al (2016) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13:731–740. doi: 10.1038/nmeth.3901
- Ulmer BM, Stoehr A, Schulze ML, et al (2018) Contractile Work Contributes to Maturation of Energy Metabolism in hiPSC-Derived Cardiomyocytes. *Stem cell reports* 10:834–847. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.01.039
- Unudurthi SD, Wolf RM, Hund TJ (2014) Role of sinoatrial node architecture in maintaining a balanced source-sink relationship and synchronous cardiac pacemaking. *Front Physiol* 5:446. doi: 10.3389/fphys.2014.00446
- Urbach A, Bar-Nur O, Daley GQ, Benvenisty N (2010) Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6:407–11. doi: 10.1016/j.stem.2010.04.005
- Van Der Velden J, Klein LJ, Van Der Bijl M, et al (1998) Force production in mechanically isolated cardiac myocytes from human ventricular muscle tissue. *Cardiovasc Res*. doi: 10.1016/S0008-6363(98)00019-4
- Vincent F, Loria P, Pregel M, et al (2015) Developing predictive assays: The phenotypic screening “rule of 3.” *Sci Transl Med* 7:293ps15-293ps15. doi: 10.1126/scitranslmed.aab1201
- Wang Y, Rudy Y (2000) Action potential propagation in inhomogeneous cardiac tissue: safety factor considerations and ionic mechanism. *Am J Physiol Circ Physiol* 278:H1019–H1029. doi: 10.1152/ajpheart.2000.278.4.H1019
- Watanabe EI, Honjo H, Anno T, et al (1995) Modulation of pacemaker activity of

- sinoatrial node cells by electrical load imposed by an atrial cell model. *Am J Physiol Circ Physiol* 269:H1735–H1742. doi: 10.1152/ajpheart.1995.269.5.H1735
- Watanabe T, Delbridge LM, Bustamante JO, McDonald TF (1983) Heterogeneity of the action potential in isolated rat ventricular myocytes and tissue. *Circ Res* 52:280–90
- Weber K, Mock U, Petrowitz B, et al (2010) Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis. *Gene Ther* 17:511–520. doi: 10.1038/gt.2009.149
- 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*. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf8781
- Weissbein U, Benvenisty N, Ben-David U (2014) Genome maintenance in pluripotent stem cells. *J. Cell Biol.*
- Werner T (2018) Humanes künstliches Herzgewebe aus mehreren Zelltypen zur Untersuchung kardialer Hypertrophie. Universität Hamburg
- Willott RH, Gomes A V., Chang AN, et al (2010) Mutations in Troponin that cause HCM, DCM AND RCM: What can we learn about thin filament function? *J Mol Cell Cardiol* 48:882–892. doi: 10.1016/J.YJMCC.2009.10.031
- Young MA, Larson DE, Sun C-W, et al (2012) Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 10:570–82. doi: 10.1016/j.stem.2012.03.002
- Zhang H, Holden A V, Boyett MR (2001) Gradient model versus mosaic model of the sinoatrial node. *Circulation* 103:584–8
- Zhang J, Klos M, Wilson GF, et al (2012) Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: The matrix sandwich method. *Circ Res*. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.273144
- Zhou T, Benda C, Dunzinger S, et al (2012) Generation of human induced pluripotent

## Literaturverzeichnis

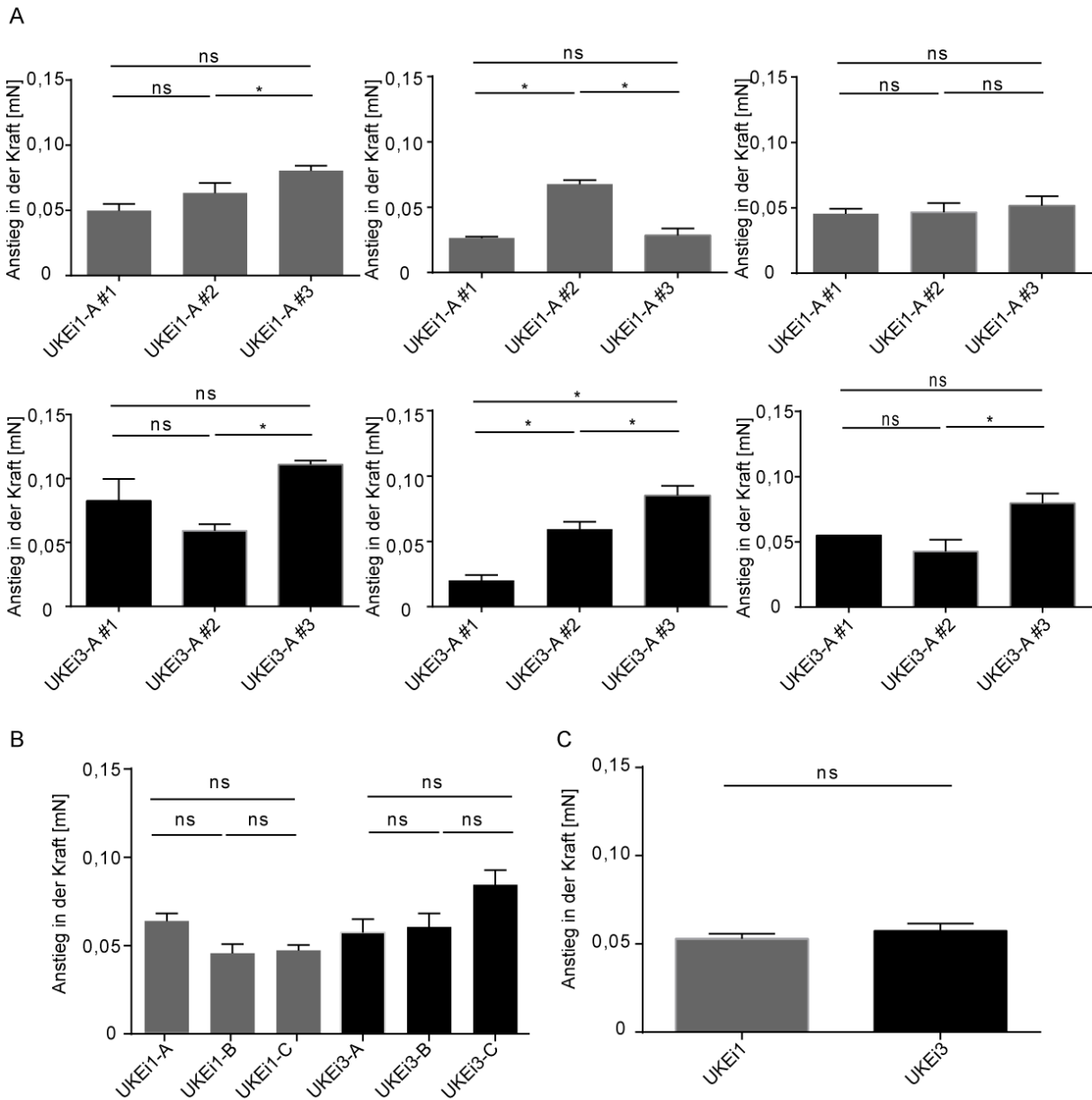
stem cells from urine samples. Nat Protoc. doi: 10.1038/nprot.2012.115

Zimmermann WH, Didié M, Wasmeier GH, et al (2002) Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. Circulation. doi: 10.1161/01.cir.0000032876.55215.10

## 9 Anhang

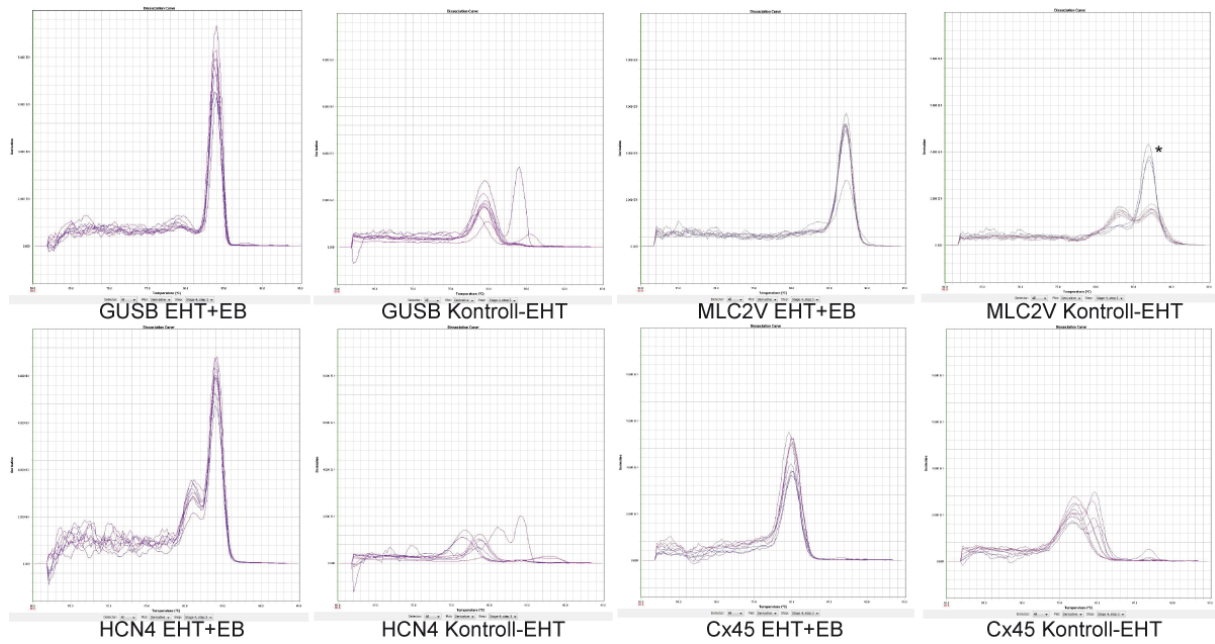
### 9.1 Zusätzliche Abbildungen

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



Zusätzliche Abbildung Z1: Post-Pausenbeziehung. Anstieg in der Kraft nach Kontraktionspause auf den Ebenen der (A) *Batches*, (B) Klone und (C) Spender. *One-way ANOVA* mit *Bonferroni's Post-Test*,  $p < 0,05$ . Fehlerbalken zeigen Mittelwert  $\pm$  SEM.

## Anhang - Zusätzliche Abbildungen



Zusätzliche Abbildung Z2: Verifizierung der human-spezifischen Genexpressionsanalyse. Dissoziationskurven der qPCR für GUSB-, MLC2V-, HCN4- und Cx45-Primer in sowohl EHTs+EB und Kontroll-EHTs. Drei technische Replikate pro Gruppe. Asterisk zeigt einen Ausreißer in der Dissoziationskurve von drei technischen Replikaten einer Probe, die wahrscheinlich auf einen Pipettierfehler hinweisen.

### 9.2 Zusätzliche Tabellen

Gezeigt sind die Ergebnisse der mit NanoString analysierten Genexpression (mRNA-Transkriptkonzentrationen), die auf die Haushaltsgene ABCF1, CLTC, GAPDH, PGK1 und TUBB normalisiert wurde.

# Anhang - Zusätzliche Tabellen

Tabelle Z1: Expressionsergebnisse für UKEi1-Batches.

Gen	UKEi1								
	A#1	A#2	A#3	B#1	B#2	B#3	C#1	C#2	C#3
ACTA1	992,15	1415,23	1998,54	429,54	632,59	2662,81	616,24	342,88	2982,94
ACTA2	898,8	731,05	1281,55	1572,81	630,85	3463,07	1504,13	1736,44	1566,19
ACTC1	383,61	369,5	262,14	373,66	309,15	612,76	352,04	355,92	637,79
ACTN2	17735,25	19253,23	17337,51	17329,34	19405,38	17041,24	19248,84	16864,5	21172,83
ATP1A1	6541,66	6140,49	5488,81	6541,49	7655,06	9291,48	7190,22	4785,53	6496,99
ATP1A2	440,59	325,38	495,62	383,72	450,38	348,12	478,33	372,23	459,25
ATP2A2	10361,35	7988,04	7092,84	8668,22	9420,49	7584,01	10451,25	7373,72	8953,47
BAX	576,36	481,94	548,02	782,69	693,62	1235,38	542,64	589,63	866,74
BCL2	76,92	77,14	111,39	68,57	67,65	39,07	66,92	81,99	62,27
CACNA1C	1209,13	945,56	821,02	1129,13	1216,71	807,61	1191,9	963,56	958,11
CACNA1G	941,23	706,83	434,03	600,53	968,24	471,37	895,16	573,32	721,81
CASP3	427,25	374,69	506,65	398,25	602,95	1220,88	844,8	282	1056,83
CASQ2	55,1	69,36	50,72	64,09	76,37	33,63	82,42	26,55	37,06
CDH5	70,86	70,22	71,86	95,39	77,24	74,41	51,43	68,95	61,22
COL1A1	165,42	117,79	1245,7	951,44	183,61	2526,86	149,82	258,09	266,01
COL3A1	85,41	84,06	1120,69	1406,29	158,32	3781,18	95,59	387,44	280,71
CTGF	116,93	154,99	187,68	384,84	208,89	2581,24	207,93	210,26	1273,18
FHL1	1764,33	1110,76	2247,65	2052,24	2244,58	3076,08	1626,55	1507,07	4378,69
FHL2	11611,14	15111,82	11144,75	13724,08	21249,27	26759,49	23410,17	8520,53	17768
FN1	281,79	233,7	1549,96	1316,88	290,84	5665,37	245,12	496,15	274,41
HCN4	399,37	276,95	277,77	356,9	352,74	295,55	313,3	335,27	386,79
KCNA4	439,38	294,24	189,52	340,13	450,38	258,39	474,46	277,65	483,41
KCNA5	76,92	60,71	36,01	73,04	74,63	68,98	70,02	53,73	51,76
KCND3	57,53	43,41	40,61	80,86	32,78	68,98	21,99	35,25	52,81
KCNE1	42,98	16,59	34,17	19,39	30,17	19,13	17,34	17,86	24,46
KCNE2	7,83	21,78	26,82	9,33	35,4	25,47	18,11	6,99	26,56
KCNH2	851,53	748,35	747,49	731,28	843,57	733,29	751,83	667,89	938,15
KCNIP2	179,96	205,15	22,22	49,57	381,51	28,19	386,91	40,68	91,67
KCNJ11	86,62	58,98	65,43	60,74	77,24	39,98	63,05	58,08	31,81
KCNJ12	13,89	26,97	37,85	27,22	24,94	21,85	19,66	30,9	21,31
KCNJ2	472,11	203,42	368,77	507,77	226,33	291,02	208,71	533,1	565,32
KCNJ3	45,41	27,84	69,1	138,97	36,27	107,04	16,56	129,82	28,66
KCNJ5	623,63	514,81	501,14	622,88	664,85	668,95	661,18	535,28	565,32
KCNMA1	4,19	20,05	12,11	11,57	11,86	14,6	1,84	17,86	16,06
KCNN3	27,22	11,4	11,19	27,22	21,45	6,44	8,81	22,2	4,5
KCNQ1	537,56	583,14	590,3	627,35	627,36	542,07	590,67	540,71	494,96
MEOX1	4,19	1	3,84	7,1	1	1	1	15,68	1,05
MYH6	58749,3	39717,25	20273,49	33270,26	22694,74	23664,48	48358,75	34074,2	19821,19
MYH7	84499,14	115150,1	101595,7	101104,1	112787,2	72708,85	79649,65	98518,2	82885,07
NFKB1	85,41	72,82	68,18	70,8	108,63	104,32	94,04	89,6	129,48
NPPA	25317,64	23278,74	44600,57	51161,34	29347,56	96409,49	30372,31	36576,52	51718,61
NPPB	1005,48	1413,5	5795,82	2757,42	1147,83	17101,06	1633,52	2898,46	13132,31
PLN	28676,69	28994,38	33467,93	24850,54	51377,45	73705,79	75640,96	15444,85	58264,66
POSTN	152,08	52,92	134,37	213,85	58,94	629,07	145,18	154,82	205,1
PPP1R1A	8155,12	5330,89	3937,17	4592,46	7597,52	3302,65	6265,14	4178,97	6324,76
RCAN1	350,88	398,04	503,89	441,83	485,25	1780,07	476,78	361,36	1026,37
RYR2	11566,29	11183,19	8375,15	8087,08	8917,45	5641,81	8058,74	11184,82	7365,53
S100A4	1879,49	2515,45	1750,35	1064,31	2457,3	4209,86	2818,16	1069,01	3194,04
SCN10A	5,4	1,89	15,79	1,51	8,37	6,44	1	6,99	5,55
SCN5a	1577,64	1173,04	1382,66	1324,71	1991,75	1347,77	1513,43	1099,44	1372,95
SLC8A1	33157,03	28618,99	23199,36	37082,27	32337,88	26049,86	29854,76	32978,49	27101,35
SLC9A1	154,51	122,12	174,81	157,97	108,63	113,39	106,44	138,52	78,02
SRF	1150,95	1169,58	1041,63	988,32	1262,91	1487,34	1322,06	925,52	1778,33
VWF	11,46	1,89	1,08	1,12	4,88	1	1,07	1,09	2,4



# Anhang - Zusätzliche Tabellen

Tabelle Z2: Expressionsergebnisse für UKEi2-Batches.

Gen	UKEi2								
	A#1	A#2	A#3	B#1	B#2	B#3	C#1	C#2	C#3
ACTA1	127,17	51,1	1112,49	681,74	190,07	38,55	2264	770,35	2277,42
ACTA2	3153,96	6554,69	22893,95	17168,14	11495,68	17458,21	14982,55	15426,28	14869,9
ACTC1	341,33	1,12	131,62	119,73	1	1,49	225,13	165,3	180,53
ACTN2	11463,34	94,69	3125,49	4149,23	356,19	71,25	6257,98	5490,42	5690,44
ATP1A1	4810,12	7435,4	3484,38	3413,42	4011,75	4413,16	5541,22	3872,11	4505,36
ATP1A2	212,84	1,12	107,33	55,5	2,24	1,49	118,05	120,83	96,88
ATP2A2	3054,02	579,75	2514,31	3659,95	775,26	998,79	3366,77	3448,58	3161,34
BAX	1155,14	1426,93	982,96	1246,59	2465,72	1904,04	969,52	1069,22	863,69
BCL2	241,39	44,4	84,4	39,44	59,84	48,95	44,64	46,48	94,09
CACNA1C	626,88	49,99	463,52	188,68	54	66,79	865,03	811,9	852,54
CACNA1G	469,83	43,28	76,3	35,66	41,47	17,74	134,45	98,97	121,97
CASP3	698,26	758,58	526,94	510,77	614,98	598,94	561,05	542,91	453,79
CASQ2	41,51	1,12	20,99	59,27	1	1,49	212,18	141,97	191,68
CDH5	198,56	38,81	49,32	21,49	28,95	68,28	33,42	39,19	68,99
COL1A1	8008,24	90040,66	40735,75	3925,37	84879,05	113313,2	28331,5	37077,4	25803,27
COL3A1	9721,51	437173,9	74985,16	8072,94	185527,6	301644,4	37655,39	34528,2	34887,93
CTGF	1569,18	1048,05	3219,94	3428,53	5272,29	9099,92	3264,87	5823,56	3309,13
FHL1	2140,27	4215,46	1977,32	3247,17	2125,95	3892,9	1731,18	2374,81	1644,45
FHL2	18373,55	542,87	5149,29	2896,74	1552,45	1319,86	12241,6	11006,54	9914,88
FN1	9236,09	32491,92	55203,21	20648,85	53687,82	39778,68	40408,43	49709,71	35632,43
HCN4	455,55	159,52	271,94	183,96	62,34	83,14	299,4	249,86	289,28
KCNA4	184,28	1,12	23,68	1	1	1,49	44,64	34,82	46,68
KCNA5	127,17	10,87	304,32	234,96	3,91	22,2	267,44	209,77	314,37
KCND3	127,17	212,05	62,81	17,71	84,88	114,36	84,37	66,89	66,2
KCNE1	27,23	49,99	30,43	19,6	45,65	51,93	41,19	28,26	63,42
KCNE2	98,62	5,28	11,54	1	1	1,49	8,37	2,01	24,38
KCNH2	898,15	77,93	316,46	276,52	57,34	62,33	379,71	343,9	384,08
KCNIP2	55,79	10,87	20,99	7,32	25,61	10,3	10,1	9,3	21,59
KCNJ11	41,51	1,12	2,1	12,99	5,58	2,87	16,15	4,93	13,22
KCNJ12	112,89	25,4	14,24	12,05	7,25	5,85	14,42	30,44	16,01
KCNJ2	398,44	23,16	62,81	115,95	64,85	22,2	90,41	98,24	105,24
KCNJ3	27,23	1,12	69,56	60,22	1	1,49	112	58,87	119,18
KCNJ5	569,77	9,75	315,11	267,08	71,53	22,2	409,07	324,22	278,12
KCNMA1	41,51	118,16	10,19	2,6	83,21	60,84	6,65	12,22	41,11
KCNN3	41,51	3,05	8,84	1	1	4,36	26,51	17,32	32,74
KCNQ1	255,67	94,69	247,65	170,73	98,24	69,76	440,16	360,67	381,29
MEOX1	27,23	77,93	50,67	6,38	29,79	40,03	25,65	15,86	27,17
MYH6	45557,52	195,28	18347,15	19947,04	297,76	261,51	28458,45	23918,77	24040,99
MYH7	10592,43	81,28	6943,73	6281,11	1802,05	106,92	20304,69	17473,22	18249,46
NFKB1	112,89	123,75	134,32	58,33	119,95	80,17	86,1	93,13	108,03
NPPA	11606,12	167,34	65052,36	130204,9	463,05	1612,69	101070,2	76174,21	100647,1
NPPB	398,44	124,87	5170,88	10497,64	526,49	200,57	8389,25	3334,13	8096,84
PLN	33050,61	1248,1	23374,27	29233,99	2092,56	705,96	25804,72	23945,75	29587,15
POSTN	1226,52	15794,28	11896,63	684,57	11830,43	11662,55	6282,16	6308,33	7020,51
PPP1R1A	940,98	27,63	483,76	498,49	265,2	19,22	789,9	600,5	590,43
RCAN1	712,54	735,1	1148,92	916,94	1095,82	1498,24	1522,2	1279,17	1307,05
RYR2	2582,87	122,63	1209,63	623,18	95,74	71,25	1928,94	1354,98	1973,48
S100A4	355,61	1865,05	1940,9	3201,83	3570,98	2306,86	2162,96	2298,27	2001,36
SCN10A	14,28	1,12	8,84	5,43	1	1,49	12,69	7,84	24,38
SCN5a	955,25	1,12	275,98	262,35	3,91	1,49	415,11	357,75	423,12
SLC8A1	13590,66	536,16	6986,9	6427,52	1108,34	322,46	9985,98	6445,37	8495,58
SLC9A1	398,44	571,93	365,03	317,14	647,54	760,96	303,71	350,46	250,24
SRF	683,99	529,46	702,33	586,34	534	566,24	701,82	658,08	529,08
VWF	14,28	1,12	3,45	3,54	19,77	8,82	1	3,47	2,79

# Anhang - Zusätzliche Tabellen

Tabelle Z3: Expressionsergebnisse für UKEi3-Batches.

Gen	UKEi3								
	A#1	A#2	A#3	B#1	B#2	B#3	C#1	C#2	C#3
ACTA1	6841,79	7874,16	2391,26	13145,16	1602,15	3555,23	2137,5	5049,32	2119,5
ACTA2	3296,55	4076,58	1980,61	5274,79	1048,72	250,89	1335,29	2525,46	844,02
ACTC1	628,06	213,09	237,87	383,08	322,61	293,55	263,37	289,63	276,36
ACTN2	22505,59	15748,55	16703,81	12484,91	17667,97	16991,72	20156,12	19466,93	18902,85
ATP1A1	20946,27	8832,71	6103,78	15809,23	5507,23	4812,78	6570,41	7098,48	7262,97
ATP1A2	525,08	155,41	591,76	302,64	521,19	428,33	193,35	97,89	296,08
ATP2A2	10648,88	4346,66	9245,39	6432,01	8643,89	6941,99	10533,92	9396,82	9647,71
BAX	1075,26	1123,11	464,89	747,85	710,27	725,02	731,04	658,75	705,98
BCL2	77,88	38,22	124,35	34,24	61,87	83,15	42,07	122,38	76,34
CACNA1C	728,09	503,31	865,52	758,2	1068,58	839,43	885,78	1117,4	923,61
CACNA1G	363,27	106,89	371,41	325,74	484,07	360,46	380,94	457,72	484,13
CASP3	3184,75	1734,68	768,7	1093,5	655,88	550,49	728,45	841,2	981,36
CASQ2	1351,81	2717,04	351,38	942,98	626,52	365,3	421,57	441,67	260,87
CDH5	42,58	71,18	74,28	10,35	83,46	48,25	55,91	56,5	60,85
COL1A1	689,84	4036,3	277,93	1224,91	774,16	221,81	84,43	129,99	245,37
COL3A1	1663,68	3040,21	371,41	1499,68	598,9	197,57	74,06	53,12	356,65
CTGF	401,51	1365,73	181,11	978,82	235,41	224,71	279,8	1076,86	200,3
FHL1	5135,37	4417,16	2561,53	1483,76	2782,39	1893,37	2704,58	2584,59	3375,96
FHL2	60597,09	54457,68	10801,18	25831,57	11016,47	6782,98	20208,85	19159,47	18359,84
FN1	3390,7	9151,31	545,02	4503,84	1192,9	202,41	107,77	182,36	262,98
HCN4	207,33	115,13	244,54	425,29	246,64	229,56	260,78	207,7	227,77
KCNA4	345,61	252,46	60,92	242,11	192,24	204,35	332,53	241,48	215,79
KCNA5	107,3	65,69	47,57	44,6	14,39	26,92	63,69	28,63	35,49
KCND3	2,94	33,65	30,87	68,49	61,01	33,71	57,63	42,14	25,63
KCNE1	2,94	1	10,84	11,15	25,61	23,04	21,33	26,09	20
KCNE2	325,02	60,2	37,55	33,45	20,43	25,95	35,16	82,69	58,03
KCNH2	263,23	337,6	878,88	313	998,64	938,33	807,98	774,47	686,26
KCNIP2	2,94	6,18	60,92	8,76	43,74	55,04	323,89	657,06	165,08
KCNJ11	2,94	8,01	67,6	20,7	42,88	44,37	37,75	37,07	49,58
KCNJ12	27,86	26,32	3,34	36,63	24,75	16,25	7,5	30,32	24,93
KCNJ2	607,46	181,96	585,08	129,02	267,36	185,93	58,5	143,5	235,51
KCNJ3	21,98	56,53	57,58	209,46	75,69	69,58	42,94	38,76	15,07
KCNJ5	563,33	630,56	575,06	551,93	597,17	420,57	477,76	706,05	710,21
KCNMA1	7,27	8,01	10,84	3,18	8,34	15,28	3,17	12,58	8,73
KCNN3	24,92	3,43	4,17	8,76	4,89	4,62	1	11,73	1
KCNQ1	1860,8	823,74	511,63	826,7	439,17	398,27	462,2	581,88	607,38
MEOX1	2,94	1	3,34	1	1	1	1	9,2	1
MYH6	45409,91	19782,34	29604,13	83062,59	11864,31	12636,35	34525,03	40571,75	24787,23
MYH7	91898,2	51195,67	76240,95	33306,91	97817,48	79133,3	72463,2	74586,45	100893,3
NFKB1	80,82	35,48	84,29	56,54	65,33	54,07	100,86	81,84	83,39
NPPA	105852,6	151164,1	44881,54	171224	50741,56	38275,05	28568,1	20623,28	29936,33
NPPB	17498,12	12390,42	8737,93	9189,26	3158,83	5495,37	1300,72	6798,62	5214,17
PLN	97052,78	87678,25	62282,29	43693,21	57517,38	49078,15	82470,09	85100,01	78051,64
POSTN	292,65	1691,65	124,35	122,65	218,15	45,34	22,19	100,42	60,85
PPP1R1A	4123,28	1916,87	4033,85	1590,48	3480	2131,89	3244,87	7976,09	7012,24
RCAN1	2002,02	1139,59	621,81	1576,14	406,36	409,9	485,54	610,6	606,68
RYR2	13408,58	4390,61	10804,51	2952,38	6744,45	6293,34	5476,01	8577,49	9025,82
S100A4	7589,09	5974,46	2294,44	3407,94	2858,37	2881,37	2375,23	2500,96	2999,87
SCN10A	2,94	17,17	10,84	1,59	17,84	13,34	6,63	15,11	15,77
SCN5a	2060,86	974,8	1963,92	1036,16	1762,74	1524,93	1670,7	1115,71	1549,73
SLC8A1	61532,68	31048,73	20613,3	20955,79	19366,24	16092,92	23630,35	19637,55	25311,93
SLC9A1	33,75	74,84	134,37	128,22	176,7	177,2	73,19	124,07	86,2
SRF	1166,46	889,66	1072,52	834,66	999,51	857,85	1269,6	1912,23	1262,37
VWF	2,94	1	7,5	1	1,44	1	6,63	4,98	9,43

9.3 Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	
ANOVA	<i>One-way Analysis of Variance</i>
APA	Aktionspotenzial-Amplitude
APD	Aktionspotenzialdauer
aRNA	Amplifizierte RNA
ATP	Adenosintriphosphat
<b>B</b>	
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BMP4	<i>Bone Morphogenetic Protein 4</i>
BPM	<i>Beats per Minute</i> , Schläge pro Minute
BSA	Bovines Serumalbumin
BTS	4-Methyl-N- (phenylmethyl)benzenesulfonamid
<b>C</b>	
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CASQ2	Calsequestrin 2
cDNA	Komplementäre DNA
CEN	Zentrum
CM	<i>Cardiomyocyte</i> , Kardiomyozyte
Ct	<i>Cycle Threshold</i> (qPCR)
cTNT	<i>Cardiac Troponin T</i>
CV	Variationskoeffizient
Cx	Connexin
<b>D</b>	
d	<i>Day</i> , Tag
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonuclein Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat

## Anhang- Abkürzungsverzeichnis

<b>E</b>	
EB	<i>Embryoid Body</i> , Embryoidkörperchen
EC <sub>50</sub>	<i>Half Maximal Effective Concentration</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>Enhanced GFP</i>
EHT	<i>Engineered Heart Tissue</i> , künstliches Herzgewebe
EF1 $\alpha$	Elongation Factor 1-alpha
ERC	<i>European Research Commission</i>
<b>F</b>	
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FFR	<i>Force-Frequency Relationship</i> , Kraft- Frequenzbeziehung
FTDA	bFGF, TGF $\beta$ 1, Dorsomorphin- und Activin A-basiertes Zellkulturmedium
<b>G</b>	
gDNA	Genomische DNA
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GUSB	$\beta$ -Glucuronidase
<b>H</b>	
h	<i>Hour</i> , Stunde
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonsäure
hiPSC	Humane induzierte pluripotente Stammzellen
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HCN4	<i>Potassium/Sodium Hyperpolarization- Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channel 4</i>
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
Hz	Hertz (Einheit)
<b>I</b>	

# Anhang- Abkürzungsverzeichnis

IEPT	Institut für Experimentale Pharmakologie und Toxikologie
I <sub>x</sub>	Ionenstrom des Kanals X
IMDM	<i>Iscoe's Modified Dulbecco's Medium</i>
<b>K</b>	
Ktr	Kontrolle
Ku80	<i>Lupus Ku Autoantigen Protein p80</i>
<b>M</b>	
MCB	Master-Zellbank
min	Minute
mM	Millimolar
MLC2V	<i>Myosin Regulatory Light Chain 2</i> , ventrikuläre, kardiale Muskelisoform
mN	Millinewton, Kraft: 1kg*m*/s <sup>2</sup> (Einheit)
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonuclein Acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
mV	Millivolt (Einheit)
<b>N</b>	
n	Anzahl der untersuchten Proben, biologische Replikate
N-cad	N-Cadherin
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
NKM	Nicht-Kardiomyozyten Medium
ns	Nicht signifikant
<b>O</b>	
Oct3/4	Oktamer-bindener Transkriptionsfaktor 3/4
<b>P</b>	
p	p-Wert, Signifikanzniveau
PMBCA	Calcium-ATPase der Sarkolemma (Plasmamembran)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> ,

## Anhang- Abkürzungsverzeichnis

PCA	Phosphatgepufferte Salzloesung <i>Principal Component Analysis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
Per	Peripherie
PLB	Phospholamban
PPR	<i>Post-Rest Potentiation</i> , Post- Pausenbeziehung
PTFE	Polytetrafluoroethylen
PVA	Polyvenylalkohol
<b>Q</b>	
qPCR	<i>Quantitative real time polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit-PCR
<b>R</b>	
RNA	Ribonukleinsaeure
ROI	<i>Region of Interest</i> , Region von Interesse
rpm	<i>Revolutions per Minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Relaxationszeit
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
RyR	Ryanodinrezeptor
<b>S</b>	
s	Sekunde
SAN	Sinusknoten
SD	<i>Standard Deviation</i> , Standardabweichung
SERCA	<i>Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase</i>
SEM	<i>Standard Error of Mean</i> , Standardfehler
SeV	Sendaivirus
Sox2	<i>Sex Determining Region Y-box 2</i>

## Anhang- Abkürzungsverzeichnis

SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SSEA3	<i>Stage-Specific Embryonic Antigen 3</i>
<b>T</b>	
T	Zeitpunkt
T <sub>2</sub>	Relaxationszeit
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBX18	T-box Transkriptionsfaktor
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TTP	<i>Time to Peak</i>
TUBB3	<i>Tubulin Beta Chain 3</i>
<b>U</b>	
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
<b>V</b>	
V <sub>max</sub>	Maximale Aufstrichgeschwindigkeit

## 9.4 Geräte, Materialien und Substanzen

### 9.4.1 Geräte

Abi Prism 7000HT (Applied Biosystems)

Amplifiziergerät BA-1s npf (Npi Electronic)

Analysenwaage Genius (Sartorius AG)

BD LSRFortessa Zellanalysegerät (BD Biosciences)

Combispin FVL-2400N mit Vortex (PeqLab)

Dampfsterilisator Varioklav (Medi-Tech)

Digitalwaage Ohaus Precision Advanced (Ohaus)

DMZ-Universal Puller (Zeitz Instrumente)

Entwässerungsautomat HM325 (Microm)

Fluoreszenzmikroskop EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fischer)

Inkubatoren für die Zellkultur (Thermo Fischer)

iScan Apparatur (Illumina)

Konfokales Laser Scan Mikroskop LSM 800 (Zeiss)

Konfokales Laser Scan Mikroskop A1 (Nikon)

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)

NanoDrop ND-1000 Photometer (Thermo Fischer Scientific)

nCounter SPRINT Profiler (NanoString)

Paraffineinbetter EG 1120 (Leica)

pH-Meter, digital (Mettler Toledo)

Pipetten 10/100/1000 µl (Eppendorf, Peqlab)

Pipettierhilfe Accu-jet pro (Brand)



Qubit 3 Fluorometer (Invitrogen)

S88X Dual Output Square Pulsstimulator (Grass)

Sicherheitswerkbank HERAsafe (Heraeus)

Sicherheitswerkbank Safe2020 (Thermo Scientific)

Stereomikroskop (Olympus SZ61)

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)

#### 9.4.2 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)

Neubauer-Zählkammer (Karl-Hecht KG)

Objektträger mit Vertiefung (Thermo Scientific/Menzel Gläser)

Objektträger Superfrost/Plus (Hecht-Assistent)

Pipettenspitzen (Sarstedt)

## Anhang - Sicherheitsinformationen

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)

Magnetrührflasche (INTEGRA Biosciences AG, 182 051 und 182 101)

Sterilfilter Filtropur S 0,2 µm (Sarstedt)

Tissue Lyser Stahlkügelchen (Qiagen)

Zellkulturflaschen 75 und 175 cm<sup>2</sup> (Sarstedt)

Zellkulturflaschen mit ultra-niedriger Zelladhäsion 75 cm<sup>2</sup> (T75, Corning, 3814)  
Zellkulturschalen, 6-Wells, 12-Wells, 24-Wells, 96-Wells (Nunc)

Zellkulturschalen, 6-Wells (Greiner)

Zellschaber (Sarstedt)

Zellsieb, 100 µm (Falcon, 352360)

Zellsieb, 300 und 500 µm (Pluriselect)

### 9.4.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 9.1: Puffer und Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung
Agarose	2% (w/v) Agarose 300 mL 1xPBS Sterilized by autoclaving before storage at 60 °C.
Aprotinin	33 mg/mL Aprotinin Aqua ad injectabilia
BTS-Lösung	30 mM BTS in DMSO

## Anhang - Sicherheitsinformationen

Dissoziierungspuffer (Differenzierung)	HBSS (-) Calcium/Magnesium 200 U/mL Collagenase II 1 mM HEPES 10 µM Y-27632 30 µM BTS
EDTA	0,5 mM EDTA PBS
FACS-Puffer	PBS 5% (v/v) FCS 0.05% (v/v) Natriumazid 0.5% (w/v) Saponin (für intrazelluläre Färbungen)
Fibrinogenlösung	200 mg/mL Fibrinogen 100 µg/mL Aprotinin 0.9%-NaCl-Lösung
HEPES-Lösung	1 M HEPES PBS Kaliumhydroxid zur pH-Adjustierung (pH 7,4)
TBS (10x)	1 M Tris-HCl 1.5 M NaCl Aqua dest.pH 7.5 (eingestellt mit 37% HCl)
Thrombinlösung	60% PBS + 40% Aqua ad injectabilia 100 U/mL Thrombin
Tyrodelösung	120 mM NaCl 5,4 mM KCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 0,6 mM CaCl <sub>2</sub> 0,4 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

## Anhang - Sicherheitsinformationen

	22,6 mM NaHCO <sub>3</sub> 5 mM Glucose 0,05 mM Na <sub>2</sub> EDTA and 25 mM HEPES Aqua ad injectabilia
--	---

### 9.4.4 Zellkulturmedien und Seren

DMEM (Biochrom, F0415)

DMEM/F12 (Gibco, 21331-046)

DMEM ohne Phenolrot (Gibco, 11880028)

Fetales Kälberserum (Biochrom, S0615)

Pferdeserum (Life technologies, 26050088)

RPMI 1640 (Gibco, 21875)

### 9.4.5 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)

Carbachol (Merck, 212385)

DMSO (Sigma-Aldrich, D4540)

Dorsomorphin (Tocris, 3093)

EDTA (Roth, 8043.2)

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

## Anhang - Sicherheitsinformationen

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)  
Isoprenalin (Sigma-Aldrich, I6504)  
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)

#### 9.4.6 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)

Fibrinogen (Sigma-Aldrich, F8630)

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

Hydrocortison (Sigma-Aldrich, H4001)

Insulin (Sigma-Aldrich, I9278)

Kollagenase-II (Worthington, LS004176)

TGF $\beta$ 1 (Peprotech, 100-21)

Thrombin (Sigma-Aldrich, T7513)

Transferrin (Sigma-Aldrich, S5261)

Trypsin-EDTA 0,5% (Gibco, 15400054)

#### 9.4.7 Primer

Alle verwendeten Primer für die qPCR wurden mit dem NCBI Primer-BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://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*). Falls 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. Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG/Eurofins erworben.

Tabelle 9.2: Primer für die qPCR.

Gensymbol	Beschreibung	RefSeq Nr.	Primer
AFP	AFP	NM_001134.2	Fwd:AGAACCTGTCACAAGCTGTG Rev:GACAGCAAGCTGAGGATGTC
GJC1	Connexin 45	NM_005497.4	Fwd:GGGTAACCGAAGTTCTGGACA Rev:AGGAAGCTCCAACTCATGGTG
GUSB	GUSB	NM_000181.3	Fwd:ACGATTGCAGGGTTTCACCA Rev:CACTCTCGTCGGTGACTGTT
HCN4	HCN4	NM_005477.3	Fwd:CATGTAAGTAGGAGTGGCAGAG Rev:TGATCCACCACTCCACATCCACCTCA
MYL2	MLC2V	NM_000432.3	Fwd:ACATCACCCACGGAGAAGAGA Rev:ATTGGAACATGGCCTCTGGATGGA
PAX6	PAX6	NM_000280.4	Fwd:TGGGCAGGTATTACGAGACTG Rev:ACTCCCGCTTATACTGGGCTA
SeV	Sendaivirus-rückgrat	NC_001552.1	Fwd:GGATCACTAGGTGATATCGAGC Rev:ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC
SOX17	SOX17	NM_022454.4	Fwd:CGCACGGAATTTGAACAGTA Rev:GGATCAGGGACCTGTCACAC
TBXT	Brachyury	NM_003181.3	Fwd:TGCTTCCCTGAGACCCAGTT Rev:ATCACTTCTTTCCTTTGCATCAAG

TNNT1	cTNT	NM_003283 .6	Fwd:TTTGGTTTGGACTCCTCCAT Rev:CTGGAGAGAGGACGAAGACG
TUBB3	TUBB3	NM_006086 .4	Fwd:GGCCAAGGGTCACTACACG Rev:GCAGTCGCAGTTTTTCACACTC

#### 9.4.8 NanoString Expression Codeset

Tabelle 9.3: Verwendetes NanoString Expressions-Codeset

Haushaltsgene	Basis Tag Set		Erweiterung-Tag Set Arrhythmien	
ABCF1	ACTA1	FN1	ATP1A1	KCNJ11
CLTC	ACTA2	MEOX1	ATP1A2	KCNJ12
GAPDH	ACTC1	MYH6	CACNA1C	KCNJ2
PGK1	ACTN2	MYH7	CACNA1G	KCNJ3
TUBB	ATP2A2	NFKB1	HCN4	KCNJ5
	BAX	NPPA	KCNA4	KCNMA1
	BCL2	NPPB	KCNA5	KCNN3
	CASP3	PLB	KCND3	KCNQ1
	CASQ2	POSTN	KCNE1	SCN10A
	CDH5	PPP1R1A	KCNE2	SCN5a
	COL1A1	RCAN1	KCNH2	SLC8A1
	COL3A1	RYR2	KCNIP2	SLC9A1
	CTGF	S100A4		
	FHL1	SRF		
	FHL2	VW		



## 9.5 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 Behälter. Alle Zellsuspensionen und kontaminierte Materialien wurden vor der Entsorgung oder Wiederverwendung autoklaviert und mit GVOs in Berührung gekommene Oberflächen mit Flächendesinfektionsmittel desinfiziert.

Tabelle 9.4: Sicherheitsinformationen zu allen verwendeten Substanzen. Die Bedeutung der H- und P-Sätze sind unter 9.5.1 und 9.5.2 zu finden.

Substanzen	CAS Nummer	H-Sätze	P-Sätze
2-Propanol	67-63-0	H: 225, 319, 336	P: 210, 261, 305+351+338
Carbachol	51-83-2	H: 300	P 308+310
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: 351-331-311-301314-317	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+352321- 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-	P: 210-233-280-302+352

# Anhang - Sicherheitsinformationen

		301370	
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)-(-)-Phenylephrin-hydrochlorid	61-76-7	H: 302-315-319-335	P: 261-305+351+338
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+331303+361+353-305+351+338-405-501
Streptomycin	57-92-1	H: 302	
Thrombin	9002-04-4	H: 315, 319, 334, 33	P: 261, 305+351+338, 342+311
Trichlormethan	67-66-3	H: 302-331-315-319351-361d-336-372	P: 261-281-305+351+338-311
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: 304-226-400-410315-317	P210-280-273-301+310-303+361+353-332+313

## Anhang - Sicherheitsinformationen

Y-27632	331752-47-7	H302, 312, 332	P: 280
---------	-------------	----------------	--------

#### 9.5.1 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.

H272 Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.

H280 Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.

H281 Enthält tiefgekühltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder – Verletzungen verursachen.

## Anhang - Sicherheitsinformationen

H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H300 Lebensgefahr bei Verschlucken.

H301 Giftig bei Verschlucken.

H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.

H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.

H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.  
(Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen

H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt)  
(Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H360 F Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.

H360 D Kann das Kind im Mutterleib schädigen.

H360 FD Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.

H360 Fd Kann die Fruchtbarkeit.

H360 Df Kann das Kind im Mutterleib sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H361 f Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.

H361 d Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.

H361 fd Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.

H362 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.

H370 Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H371 Kann die Organe schädigen (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist,

dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

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

H373 Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition  
(Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

### 9.5.2 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,

## Anhang - Sicherheitsinformationen

auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen. P263 Kontakt während der Schwangerschaft / und der Stillzeit vermeiden.

P264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen. P270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.

P271 Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.

P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.

P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

P280 Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

P281 Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.

P282 Schutzhandschuhe / Gesichtsschild / Augenschutz mit Kälteisolierung tragen.

P283 Schwer entflammbare / flammhemmende Kleidung tragen.

P284 Atemschutz tragen.

P285 Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.

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

P235 + P410 Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen.

P301 Bei Verschlucken:

P302 Bei Berührung mit der Haut:

P303 Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar)

P304 Bei Einatmen:

P305 Bei Kontakt mit den Augen::

P306 Bei kontaminierter Kleidung:

P307 Bei Exposition:

P308 Bei Exposition oder falls betroffen: P309 Bei Exposition oder Unwohlsein: P310 Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P311 Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P312 Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P313 Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P314 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.



## Anhang - Sicherheitsinformationen

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.

## Anhang - Sicherheitsinformationen

P373 Keine Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe / Gemische / Erzeugnisse erreicht.

P374 Brandbekämpfung mit üblichen Vorsichtsmaßnahmen aus angemessener Entfernung.

P375 Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.

P376 Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.

P377 Brand von ausströmendem Gas: Nicht löschen, bis Undichtigkeit gefahrlos beseitigt werden kann.

P378 ... zum Löschen verwenden.

P380 Umgebung räumen.

P381 Alle Zündquellen entfernen, wenn gefahrlos möglich.

P390 Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.

P391 Verschüttete Mengen aufnehmen.

P301 + P310 Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P301 + P312 Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P301 + P330 + P331 Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.

P302 + P334 Bei Kontakt mit der Haut In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.

P302 + P350 Bei Kontakt mit der Haut: Behutsam

mit viel Wasser und Seife waschen.

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

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

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

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

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

## Anhang - Sicherheitsinformationen

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.

P501 Inhalt / Behälter ... zuführen.

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.

## 9.5 Tagungen, wissenschaftlicher Austausch und Publikationen

### 9.5.1 Tagungen

Stem Cells in Drug Discovery, Cambridge, UK, 06.2016, Posterpräsentation, „Assessment of intra-patient clonal variability in human iPSC-derived engineered heart tissue (EHT)”

Retreat des Deutschen Zentrums für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK), Tremsbüttel, 01.2017, Posterpräsentation, „Assessment of intra-patient clonal variability in human iPS cells at an undifferentiated and differentiated level”

International Society for Heart Research, Hamburg 07.2017, Posterpräsentation, „Biological pacing of neonatal rat engineered heart tissue by human iPSC-derived cardiomyocyte organoids“

American Heart Association, Anaheim, USA, 11.2017, Posterpräsentation  
“Proof of principle: Biological pacing of neonatal rat 3D engineered heart tissue by human iPSC-derived cardiomyocyte EBs.”

Stem Cell Community Day, Düsseldorf, 04.2018, Posterpräsentation, „Development of a Cardiac Organoid Culture System with hiPSC-derived Cardiomyocytes”

3D Cell Culture, Freiburg, 06.2018, Posterpräsentation, „Development of a Cardiac Organoid Culture System with hiPSC-derived Cardiomyocytes”

### 9.5.2 Wissenschaftlicher Austausch

Arbeitsgruppe von Dr. Nicole Dubois, Mount Sinai Hospital, New York, USA, 09.2016, Erlernung von Protokollen zur Stammzellkultur und zur kardialen Differenzierung.

### 9.5.3 Publikationen

Schulze ML, Shibamiya A, Pless O, Schulze T, Klampe B, Hansen A, Eschenhagen T, Ulmer BM. Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes: Dissecting Technical and Biological Variability. Manuskript in Bearbeitung.

Schulze ML, Lemoine MD, Fischer A, David R, Hansen A, Eschenhagen T, Ulmer BM. Dissecting Biological Pacemaker Activity in a Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiac Organoid Model. Manuskript in Revision.

Lemoine MD, Krause T, Koivumäki JT, Prondzynski M, Schulze ML, Girdauskas E, Willems S, Hansen A, Eschenhagen T, Christ T. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Engineered Heart Tissue as a Sensitive Test System for QT Prolongation and Arrhythmic Triggers. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2018; 11(7):e006035

Ulmer BM, Stoeck A, Schulze ML, Patel S, Gucek M, Mannhardt I, Funcke S, Murphy E, Eschenhagen T, Hansen A.; Contractile Work Contributes to Maturation of Energy Metabolism in hiPSC-Derived Cardiomyocytes. Stem Cell Reports. 2018 Mar 13;10(3):834-847

Glasner C, de Goffau MC, van Timmeren MM, Schulze ML, Jansen B, Tavakol M, van Wamel WJB, Stegeman CA, Kallenberg CGM, Arends JP, Rossen JW, Heeringa P, van Dijk JM. Genetic loci of Staphylococcus aureus associated with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (ANCA)-associated vasculitides. Sci Rep. 2017; 7(1):12211

Breckwoldt K, Letuffe-Brenière D, Mannhardt I, Schulze T, Ulmer B, Werner T, Benzin A, Klampe B, Reinsch MC, Laufer S, Shibamiya A, Prondzynski M, Mearini G, Schade D, Fuchs S, Neuber C, Krämer E, Saleem U, Schulze ML, Rodriguez ML, Eschenhagen T, Hansen A. Differentiation of cardiomyocytes and generation of human engineered heart tissue. Nat Protoc. 2017 Jun;12(6):1177-1197

Hamburg, den

### 10 Danksagung

Nun ist sie geschrieben, die Doktorarbeit, und das bedeutet, dass sich ein wunderbares und aufregendes Kapitel dem Ende zuneigt! Die letzten knappen vier Jahre waren eine Karrussellfahrt mit aufregenden, herausfordernden, stressigen, aber hauptsächlich glücklichen Momenten, die mich in der Summe geprägt und mich in meiner persönlichen Entwicklung vorangetrieben haben.

Es ist nun auch an der Zeit sich bei den vielen Menschen zu bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben:

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Thomas Eschenhagen dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat an so einem spannenden Thema arbeiten zu dürfen. Sie sind ein großes Vorbild mit enormem Wissensschatz für mich und ich konnte viel von Ihnen lernen! Besonders möchte ich mich bei Ihnen für die ausgeglichene Betreuung bedanken, mit der Sie mir sowohl Freiraum gegeben haben eigene Ideen zu entwickeln und umzusetzen, als sich auch die Zeit genommen haben, um neue Ansätze zu finden, falls ich nicht weiter kam oder um Umsetzungsstrategien zu diskutieren. Sie haben es geschafft aus einem Institut mit so vielen Mitarbeitern und kleinen Untergruppen eine große „Familie“ zu machen, die sich wohlwollend unterstützen, was meiner Meinung nach keine Selbstverständlichkeit ist. Ich habe sehr gerne in dieser tollen Arbeitsatmosphäre gearbeitet und werde diese Zeit immer in guter Erinnerung behalten. Ein gutes wenigstens hat das Ende meiner Zeit am IEPT: Sie müssen ihr Notizbuch nicht mehr vor mir in Sicherheit bringen!

Auch 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. Außerdem danke ich Peter Heisig und Thorsten Schinke für ihre Unterstützung durch die Mitgliedschaft in der Prüfungskommission.

Bei Arne Hansen möchte ich mich dafür bedanken, dass seine Tür für mich immer offen stand und ich mit Problemen jeglicher Art zu ihm kommen konnte!

Besonderer Dank gebührt auch Bärbel Ulmer für ihre wunderbare Betreuung - ich hätte mir keine bessere wünschen können! Wir sind zusammen durch die Höhen und

## Danksagung

Tiefen der letzten vier Jahre gegangen, die uns zusammengeschweißt haben. Wachend über deine Schäfchen warst Du immer für mich da und hast mich unterstützt, wo Du nur konntest! Dafür danke ich Dir sehr! Ich habe unsere Zusammenarbeit aber auch die gemeinsamen Kongressfahrten oder die Spätzle-/Keksback-/Spieleabende bei den „Bärbel's“ sehr genossen (hier auch ein Dank an Steffen für die perfekte Gastfreundschaft!). Es hat mir durchgehend Spaß gemacht mit Dir zusammen zu arbeiten und ich möchte Dir auch für alles danken, was Du mir beigebracht hast!

Bedanken möchte ich mich auch bei dem Rest der „IEPT-Familie“, die mich entweder im Labor unterstützt hat oder/und mich nach Rückschlägen motiviert hat weiterzumachen! Ihr standet mir immer mit Rat und/oder Tat zur Seite und habt mich so mit meinen Projekten maßgeblich vorangetrieben! Besonders hervorzuheben sind Birgit Klampe, Thomas Schulze und Aya Domke-Shibamiya für ihre technische Hilfe und Marta Lemme, Antonia Zech aber auch Justus Stenzig, die mich nicht nur als Kollegen, sondern als Freunde unterstützt haben, wo sie konnten!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Migchiel und meiner Familie bedanken, deren Unterstützung ich mir bedingungslos sicher sein konnte. Migchiel, wat ben ik blij je te hebben! Je bent voor mij naar Hamburg vertrokken en ondersteuned mij op alle mogelijke manieren – ik kan me geen betere partner voorstellen! Liebe Mama und lieber Papa: J. W. Goethe sagte: „Zwei Dinge sollen Kinder von ihren Eltern bekommen, Wurzeln und Flügel“- ich finde, ihr habt beides bei uns Kindern geschafft. Ihr würdet alles versuchen, um uns zu helfen und zu unterstützen und mit dieser Sicherheit im Hinterkopf konnten wir jeweils unsere eigenen Wege finden - und ich u.a. meine Doktorarbeit meistern. Ich bin Euch für alles sehr dankbar!



## 12 Eidesstattliche Erklärung

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

„Kardiomyozyten aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen

–

Untersuchungen zur Reliabilität im 3D-Format und Anwendung als biologischer  
Schrittmacher“

am Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Eschenhagen, der Anleitung von Frau Dr. Bärbel Ulmer 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