

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

## **Einfluss verschiedener Kulturbedingungen auf die Maturierung Stammzell-abgeleiteter humaner Herzmuskelgewebe**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Larissa Hörmann  
aus Hamburg

Hamburg, 2020

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 28.05.2020**

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

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Jörg Heeren**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>8</b>
2.1	Epidemiologie und Ätiologie .....	8
2.2	Pathophysiologie der Herzinsuffizienz und Therapieoptionen .....	9
2.3	Bestrebungen der Forschung .....	9
2.3.1	Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) .....	10
2.3.2	Tissue Engineering und Engineered Heart Tissues (EHTs).....	11
2.3.3	Potential und momentane Grenzen von hiPSC.....	12
2.3.4	Verbesserung der Reife durch Maturierungsmedien.....	15
<b>3</b>	<b>Arbeitshypothese und Fragestellung .....</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
4.1	Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC).....	18
4.2	Herstellung der künstlichen Herzgewebe .....	18
4.3	Normale EHT Kultivierung .....	21
4.4	Kultivierung in verschiedenen Medien .....	22
4.5	Längen- und Breitenverhältnisse im Verlauf der Kultur .....	22
4.6	Funktionelle Analysen der EHTs .....	23
4.6.1	Kraft-Frequenz-Beziehung .....	23
4.6.2	Wirkung von Isoprenalin und Carbachol .....	23
4.7	Metabolismus der EHTs .....	24
4.8	DNA-Isolation und DNA-Analyse mittels qPCR .....	24
4.9	Protein-Isolation und Protein-Analyse mittels Western Blot.....	26
4.10	Histologie.....	29
4.10.1	Immunhistochemie.....	30
4.10.2	Immunfluoreszenz.....	30
4.10.3	Elektronenmikroskopie.....	31
4.11	Statistik.....	32
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
5.1	Herstellung und Kultivierung der künstlichen Herzgewebe in verschiedenen Medien .....	34
5.1.1	Erster Versuchsdurchlauf mit ERC001-EHTs .....	34
5.1.2	Zweiter Versuchsdurchlauf mit ERC018-EHTs .....	37

5.1.3	Dritter Versuchsdurchlauf mit ERC001-EHTs .....	39
5.1.4	Zusammenfassung der drei Versuchsdurchläufe.....	40
5.2	Längen- und Breitenverhältnisse im Verlauf der Kulturzeit .....	41
5.3	Funktionelle Analysen der EHTs .....	42
5.3.1	Kraft-Frequenz-Beziehung .....	42
5.3.2	Wirkung von Isoprenalin und Carbachol .....	46
5.4	Metabolismus der EHTs .....	48
5.5	Histologie.....	51
5.5.1	Immunhistochemie.....	51
5.5.2	Elektronenmikroskopie.....	56
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>58</b>
6.1	Herstellung und normale Kultivierung der künstlichen Herzgewebe: Vergleichbarkeit der Versuchsdurchläufe.....	58
6.2	Kultivierung in verschiedenen Medien: Effekt auf Kraft und spontane Schlagfrequenz .....	60
6.3	Längen- und Breitenverhältnisse im Verlauf der Kulturzeit .....	63
6.4	Funktioneller Reifestatus .....	64
6.5	Metabolischer Reifestatus .....	65
6.6	Struktureller Reifestatus .....	67
6.7	Ausblick.....	69
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Summary .....</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>74</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>78</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>79</b>
<b>12</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>80</b>

# 1 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Alpha
$\alpha$ -MHC	$\alpha$ -myosin heavy chain; $\alpha$ -Isoform der Myosin-Schwerkette
ACE-Hemmer	Angiotension-Converting-Enzym-Hemmer
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$	Beta
$\beta$ -MHC	$\beta$ -myosin heavy chain; $\beta$ -Isoform der Myosin-Schwerkette
Batch	Differenzierungscharge
BPM	Beats per minute; Schläge pro Minute
$\text{Ca}^{2+}$	Calciumion
c-Myc	Cellular Myelocytomatosis
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
CTMV	Consulting Team Machine Vision [Software]
cTNT	Cardiac Troponin T; kardiales Troponin T
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonuclein acid; Desoxyribonukleinsäure
EHT	Engineered Heart Tissue, künstliches Herzgewebe
ERC	European Research Commission
FCS	Fetal calf serum; fetales Kälberserum
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
FTDA	bFGF, TGF $\beta$ 1, Dorsomorphin- und Activin A-basiertes Zellkulturmedium
g	Schwerebeschleunigung, Fallbeschleunigung
GMP	Good manufacturing practice; Gute Herstellungspraxis
h	Stunde(n)
hiPSC	humane induzierte pluripotente Stammzellen
Hz	Hertz (Einheit)
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
iPSC	Induzierte pluripotente Stammzellen
KHK	Koronare Herzkrankheit
Klf4	Kruppel-like factor 4
mA	Milliampere (Einheit)
ml	Milliliter (Einheit)
MLC2a	Myosin regulatory light chain 2 atrial isoform; Atriale Isoform der Myosin-Leichtkette

MLC2v	Myosin regulatory light chain 2 ventricular isoform; Ventrikuläre Isoform der Myosin-Leichtkette
mM	Millimolar (Einheit)
MM	Maturierungsmedium (Mercola Labor, Stanford, Vereinigte Staaten)
mN	Millinewton (Einheit)
mRNA	Messenger ribonuclein acid; Boten-Ribonukleinsäure
n	Stichprobenanzahl
Na <sup>+</sup>	Natriumion
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NKM	Serumhaltiges Resuspensionsmedium (Nicht- Kardiomyozyten Medium)
nM	Nanomolar (Einheit)
Oct3/4	Octamer-binding transcription factor 3/4
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p	p-Wert; Signifikanzniveau
PBS	Phosphate Buffered Saline; Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PTFE	Polytetrafluoethylen
qPCR	Quantitative real time polymerase chain reaction; quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonuclein acid; Ribonukleinsäure
RAAS-System	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
s	Sekunde(n)
Sox2	Sex determining region Y-box 2
T1/TTP	time-to-peak; Kontraktionszeit
T2/RT	Relaxationszeit
T3	Triiodthyronin
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFβ-1	Transforming Growth Factor β 1
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
V	Volt (Einheit)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt	Wingless/Integrated
YAP1	Yes-associated protein 1

$\mu\text{l}$	Mikroliter (Einheit)
$\mu\text{M}$	Mikromolar (Einheit)
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

## 2 Einleitung

### 2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in Deutschland und stellen auch europa- und weltweit ein gesundheitliches und gesundheitspolitisches Problem dar. Unter kardiovaskulären Erkrankungen leiden laut Deutscher Gesellschaft für Kardiologie (DGK) etwa 28 Millionen Menschen weltweit und 6,5 Millionen Menschen sind in Europa betroffen (Zahlen von 2013). Die Anzahl der Erkrankten steigt jährlich um etwa 600 000 Fälle. Die Kosten, die für die Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen anfallen, machen einen großen Anteil des gesamten Budgets des Gesundheitssystems aus (Rickenbacher 2001, Ponikowski et al. 2014, Brown et al. 2017). Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind vor allem in den Industrieländern eine der Hauptursachen, neben malignen Geschehen, für Morbidität und Mortalität der Bevölkerung. Die Prognose bei Herzinsuffizienz und die 5-Jahres-Überlebensrate sind sehr schlecht. Die Überlebensraten dieser Patienten sind schlechter als der Patienten, die an Darm-, Brust- oder Prostatakrebs leiden (Ponikowski et al. 2014). Die meisten Patienten sterben innerhalb von fünf Jahren nach Diagnosestellung trotz medikamentöser Therapie. In den letzten dreißig Jahren konnte die Mortalitätsrate bedingt durch kardiovaskuläre Erkrankungen durch den Einsatz von Medikamenten, wie zum Beispiel ACE-Hemmer oder  $\beta$ -Blocker, verbessert werden. Gleichzeitig steigt jedoch die Anzahl der Patienten, die an einer Herzinsuffizienz leiden (McMurray et al. 2012). Die zurzeit angewandte Therapie bei chronischer Herzinsuffizienz adressiert generelle Mechanismen wie die neurohumorale Aktivierung, die erst in fortgeschrittenen Stadien der Krankheit einsetzen und deren medikamentöse Bremsung lediglich das weitere Fortschreiten der Krankheit verlangsamt (McMurray et al. 2012, Brown et al. 2017).

Die Ursachen von kardiovaskulären Erkrankungen sind vielfältig. Sowohl genetische oder entzündliche als auch zivilisatorische und umweltbedingte Risikofaktoren begünstigen die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen. Zivilisatorische und umweltbedingte Risikofaktoren dominieren. Manche Erkrankungen, wie zum Beispiel die koronare Herzerkrankung (KHK), arterielle Hypertonie oder Herzerkrankungen bedingt durch Diabetes mellitus, könnten durch eine Änderung des Lebensstils verhindert oder in ihrem Verlauf verlangsamt werden. Dieser Ansatz zur Eigeninitiative und Primärprävention würde die Risikofaktoren zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz senken und auch das Gesundheitssystem entlasten (Ponikowski et al. 2014, Metra et al. 2017). Die Indolenz und Verantwortungslosigkeit des Menschen, lieber eine Tablette einzunehmen, bietet

dadurch allerdings ein weitaus größeres Interessengebiet, neben genetisch bedingten Herzerkrankungen, die Forschung zu neuen Therapieansätzen vorantreiben und finanzieren zu können.

## **2.2 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz und Therapieoptionen**

Eine Herzinsuffizienz bedeutet, dass die Pumpleistung des Herzens nicht ausreicht um die peripheren Organe des Körpers mit ausreichend Substrat und Sauerstoff aus dem Blut versorgen zu können. Die Herzinsuffizienz ist genau genommen keine eigene Krankheit, sondern stellt vielmehr das Endstadium der zugrunde liegenden Herzerkrankung dar. Bei genügend großem Blutvolumen und normalen Füllungsbedingungen kann von dem erkrankten Herzmuskel nicht genügend Leistung aufgebracht werden, das Blut mit ausreichend Druck im Organismus zu verteilen. Durch diese Beeinträchtigung der ventrikulären Funktion kommt es zu einer Reduzierung des Herzminutenvolumens und des Blutdruckes, was unter anderem zu einer Minderperfusion verschiedener Organe und Gewebe oder zu einem Rückstau des Blutvolumens führt (Steffel 2014). Eine beginnende Herzinsuffizienz wird durch Mechanismen wie eine Aktivierung des Sympathikus oder des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) oder eine Hypertrophie des Herzens vom Organismus kompensiert. Diese Kompensation führt initial zu einer Verbesserung der Krankheitssymptome, über die Zeit jedoch zur Progression der Herzinsuffizienz und endet meist in einer chronischen Herzinsuffizienz oder mit dem plötzlichen Herztod (Rickenbacher 2001). Die Herzinsuffizienz ist derzeit unheilbar. In weit fortgeschrittenen Stadien der Krankheit besteht bedingt noch die Möglichkeit der Implantation eines Schrittmachers, eines Spenderherzens oder eines Kunstherzens (Steffel 2014). Die momentanen Therapieansätze haben ihre Grenzen erreicht, weshalb nach neuen Modellen und Therapiestrategien gesucht wird (Bruyneel et al. 2018). Die Anstrengungen und Aufwendungen in der Forschung zu neuen Therapieansätzen sind groß, denn „die chronische Herzinsuffizienz ist häufig, invalidisierend, teuer und tödlich“ (Rickenbacher 2001, McMurray et al. 2012). Individualisierte kausale Therapieansätze fehlen bislang.

## **2.3 Bestrebungen der Forschung**

Die Krankheitsmodellierung und Forschung zu Medikamenten im Tiermodell stellten sich teilweise als schwierig heraus, da die Physiologie der Menschen und Nagetiere genetisch und molekularbiologisch stark divergiert. Offensichtliche Unterschiede sind die Schlagfrequenz - das menschliche Herz schlägt ungefähr 50 bis 80 Mal pro Minute in

Ruhe im Vergleich zu Nagerherzen mit 250 bis 500 Schlägen pro Minute - oder die unterschiedliche Größe der Herzen. Diese und weitere Unterschiede der Physiologie und Morphologie existieren, weshalb ein Tiermodell nur schwer auf den menschlichen Organismus übertragbar bleibt (Mummery 2018).

### **2.3.1 Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC)**

Eine der größten Errungenschaften für die biomedizinische Forschung ist die Entdeckung, aus differenzierten somatischen Zellen pluripotente Stammzellen reprogrammieren zu können. Im Jahr 2006 veröffentlichten Yamanaka und Kollegen ihre Ergebnisse ausdifferenzierte Fibroblastenzellen der Maus in einen Zustand zurückversetzt zu haben, der dem embryonalen und pluripotenten Stammzellen ähnelt, sogenannte iPSC (Takahashi und Yamanaka 2006). Danach glückte das Reprogrammieren von humanen Zellen (Takahashi et al. 2007). Mittels retroviraler Transduktion der Zellen aus einer gewählten Kombination von vier Transkriptionsfaktoren, Oct3/4 (Octamer-binding transcription factor 3/4), Sox2 (Sex determining region Y-box 2), Klf4 (Kruppel-like factor 4) und c-Myc (cellular Myelocytomatosis), gelang dem Forschungsteam um Yamanaka das Reprogrammieren ausdifferenzierter humaner Zellen zu sogenannten hiPSC. Dabei sind Oct3/4 und Sox2 wichtige Transkriptionsfaktoren in embryonalen Stammzellen zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz, indem diese die frühe embryonale Differenzierung regulieren und verhindern. Klf4 und c-Myc fungieren als Onkogene oder Tumorsuppressoren für den Langzeiterhalt der Pluripotenz und fördern die Proliferation von Zellen. cMyc unterstützt das Reprogrammieren durch das Unterdrücken von Fibroblasten-spezifischen Genen (Takahashi und Yamanaka 2006, Takahashi et al. 2007, Liao et al. 2018). hiPSC sind eine große Hoffnung in der Forschung zu medizinischen und pharmakologischen Zwecken, da damit die ethisch umstrittene embryonale Stammzellforschung umgangen werden kann und Patienten-spezifische Zellen erzeugt werden können.

Über die letzten Jahre wurde das Protokoll immer weiter optimiert. Mittlerweile wird die virale Transduktion mit Retroviren, zum Beispiel dem Sendaivirus, durchgeführt, da diese nicht dauerhaft in das Genom integrieren. Über einen Virus-spezifischen Mechanismus gelangen die Transkriptionsfaktoren in die Zelle. Dort werden die Transkriptionsfaktoren zu Proteinen umgeschrieben. Die Transkription erfolgt jedoch aufgrund der zeitlich begrenzten Integration nur für einen gewissen Zeitraum, in welchem die Transkripte zwecks Reprogrammierung erwünscht sind. Anfänglich wurden hauptsächlich Lentiviren zur Reprogrammierung verwendet, welche die Transkriptionsfaktoren dauerhaft in die

Zellen integrieren. Es besteht dabei die Gefahr einer willkürlichen Integration der Faktoren in das Genom und deren fortdauernde Genexpression, welche sich auf das spätere Differenzierungspotenzial auswirken könnte (Martinez-Fernandez et al. 2014). Diese Gefahr soll mit der Wahl des nicht dauerhaft integrierenden Sendaviruses zur Reprogrammierung umgangen werden.

Durch eine Nachahmung der Embryogenese können aus pluripotenten Stammzellen alle Zellen der drei Keimblätter differenziert werden. Zur Differenzierung kardialer Zellen existieren mittlerweile verschiedene Protokolle. Im Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie in Hamburg wurde von Breckwoldt et al. (2017) ein effektives, zuverlässiges und kostengünstiges Differenzierungsprotokoll entwickelt. Die Differenzierung von Kardiomyozyten erfolgt über eine Bildung von Embryoidkörperchen (EBs) und die Induktion des mesodermalen Wnt/- $\beta$ -Catenin-Signalweges durch eine Kombination von drei Wachstumsfaktoren und folgend einer Abschaltung dieses Signalweges. Die Differenzierung zu Kardiomyozyten erfolgt in einem Zeitraum von vierzehn Tagen. Für die mesodermale Induktion werden zur Aktivierung des Wnt/- $\beta$ -Catenin-Signalweges die Wachstumsfaktoren BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4), Activin A und bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) zu den EBs gegeben. Im Verlauf werden die entstehenden mesodermalen kardialen Vorläuferzellen durch Inhibition des Wnt/- $\beta$ -Catenin-Signalweges, durch die niedermolekulare Verbindung XAV-939, zu kardialen Zellen differenziert. Durch die Zugabe von Insulin wird die mesodermale Entwicklung inhibiert und die kardiale Differenzierung verstärkt. Nach acht bis zehn Tagen erhält man spontan schlagende Zellen, weshalb ab diesem Zeitpunkt die Zugabe der Inhibitoren beendet wird. Die Kardiomyozyten können, nach erfolgten Qualitätskontrollen, dissoziiert und zu Engineered Heart Tissues (EHTs) weiterverarbeitet werden.

### **2.3.2 Tissue Engineering und Engineered Heart Tissues (EHTs)**

Moderne Technologien wie das Tissue Engineering ermöglichen die Herstellung von humanen Herzmuskelgeweben aus Patienten-spezifischen Stammzellen, die über das Reprogrammieren von Hautbiopsien gewonnen werden können. Herzmuskelgewebe aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen werden im Englischen auch als Engineered Heart Tissues (EHTs) bezeichnet. Seit der Herstellung des ersten künstlichen Herzgewebes in einem dreidimensionalen Format im Jahr 1997 (Eschenhagen et al. 1997) erfolgte eine rege Forschung und Weiterentwicklung der Methodik, wie zum Beispiel der Austausch der Kollagen-basierten Matrix durch eine Fibrin-Hydrogel-basierte Matrix. Die ursprünglich an Glasröhrchen befestigten bikonkaven, flächigen

Gewebestrukturen durchliefen mehrere Optimierungsschritte (Zimmermann et al. 2002) und werden derzeit als Gewebestreifen an flexiblen Silikongestellrahmen befestigt (Hansen et al. 2010). Kultiviert werden die Gewebe in einem 24-Well-Format, wodurch eine automatisierte Messung per video-optischer Analyse möglich gemacht werden konnte (Hansen et al. 2010). Die Kultivierung der Kardiomyozyten in einem 3D-Format ermöglicht, wie auch im lebenden Organismus, neben einer räumlichen Orientierung der Zellen die Möglichkeit der Kokultur mit anderen Zelltypen. Als wichtigster Vorteil der dreidimensionalen Herzgewebe gegenüber der zweidimensionalen Zellkultur wurde ein erhöhter Reifegrad der Kardiomyozyten zu einem eher adulten Phänotyp ausgemacht (Fink et al. 2000, Lemoine et al. 2017, Ulmer et al. 2018, Yoshida et al. 2018).

### **2.3.3 Potential und momentane Grenzen von hiPSC**

Durch die Verwendung von hiPSC eröffnen sich für die Pharmakologie und Toxikologie, für Krankheitsmodellierungen zum besseren Verständnis von pathologischen Mechanismen und der regenerativen Medizin neue Möglichkeiten. Die pharmakologische und toxikologische Forschung kann durch die Entwicklung und Überprüfung neuer therapeutischer Wirkstoffe im humanen Herzmodell unterstützt und vorangetrieben werden, wodurch zusätzlich eine verbesserte Arzneimittelsicherheit erzielt und gewährleistet werden kann (Mannhardt et al. 2016, Bruyneel et al. 2018). Des Weiteren können mit hiPSC-Kardiomyozyten neue Erkenntnisse und ein besseres Verständnis von Krankheitsmechanismen durch die Untersuchung von Herzerkrankungen im humanen Herzmodell erlangt werden. Durch die Verwendung von hiPSC-Kardiomyozyten besteht die Möglichkeit Patientenspezifische Zelllinien für Krankheitsmodellierungen zu generieren oder in gesunde Zelllinien pathologische Mutationen einzufügen, wobei diese Zelllinien gleichzeitig als Kontrollen verwendet werden können (Eschenhagen und Carrier 2019). Mit Herzmuskelgeweben, generiert aus hiPSC, wird die Forschung an sonst schwer zugänglichen humanen Geweben möglich, die weiterhin zur Entwicklung personalisierter Therapieansätze führen könnten (Mummery 2018, Eschenhagen und Carrier 2019). Die Generierung von hiPSC ist unbegrenzt möglich und wird in jüngster Zeit zunehmend kommerzialisiert, um Kulturprotokolle zu vereinfachen und die Reproduzierbarkeit zu verbessern (Horikoshi et al. 2019, Machiraju und Greenway 2019). Humane oder sogar patienteneigene Gewebe als Ersatz für zu Grunde gegangene Primärzellen zu verwenden, könnten eine Integration der Gewebe in den Organismus erleichtern, Abstoßungsreaktionen verhindern und die Prognose der Herzinsuffizienz verbessern. Bisher wurden Implantationen von Herzmuskelzellpflastern in Meerschweinchen getestet. Nach den Implantationen erfolgte eine Neovaskularisierung

durch den Wirt und eine Anpassung der hiPSC-Kardiomyozyten im Herzmuskelzellpflaster hin zu einem reiferen Phänotyp (Weinberger et al. 2016). Implantationen von Herzmuskelzellpflastern in Schweinen waren dagegen bisher noch nicht ohne Abstoßungsreaktionen erfolgreich durchführbar (Weinberger et al. 2016, Machiraju und Greenway 2019).

Derzeitige Einschränkungen in der Aussagekraft von EHTs stellen unter anderem die Unreife der hiPSC-Kardiomyozyten und die noch nicht vollständig standardisierten Bedingungen der Herstellung der EHTs, die Abläufe der Experimente und die Kontrollen dar (Zimmermann et al. 2002, Schaaf et al. 2011). Das Hamburger Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie entwickelte in den letzten Jahren Möglichkeiten EHTs unter standardisierten Bedingungen reproduzierbar herzustellen und video-optisch zu erfassen (Hansen et al. 2010). Verschiedene Qualitätsparameter können mit der Messapparatur des Hamburger Instituts zur funktionellen Charakterisierung an den EHTs ermittelt werden (Mannhardt et al. 2016).

Die Unreife der Kardiomyozyten belässt jedoch eine Ungewissheit, ob die Modelle und die daraus abgeleiteten Versuchsergebnisse auf ein alterndes und krankes Herz übertragbar sind. Ein Ziel der momentanen Forschung ist daher die Reifeförderung von hiPSC-Kardiomyozyten auf funktioneller, struktureller und metabolischer Ebene, hin zu einem in vitro Phänotyp, der dem nativen Herzmuskelgewebe gleichkommt. Möglichkeiten die Reife der hiPSC-Kardiomyozyten zu verbessern, um mit möglichst adulten und morphologisch-charakteristisch strukturierten Zellen zu forschen, sind daher von großem Interesse. Unter den momentanen Kulturbedingungen entstehen Kardiomyozyten, die eher einem fetalen Phänotyp mit rundlicher, anstatt für adulte Kardiomyozyten typischer stabförmiger Morphologie, gleichkommen. Die Ultrastruktur der Zellen reflektiert dies. Die Zellorganellen und funktionellen Einheiten der Kardiomyozyten liegen nur in schwach ausgeprägter Form und Anzahl vor oder fehlen gänzlich. Fetale Kardiomyozyten besitzen demzufolge auch eine geringere Dichte an Mitochondrien und können ihren Energieverbrauch hauptsächlich über die anaerobe Glykolyse decken (Lopaschuk und Jaswal 2010, Ulmer und Eschenhagen 2019). Das erwachsene Myokard kann, je nach Angebot, als Energiesubstrate Glukose, freie Fettsäuren oder Laktat zur ATP-Gewinnung heranziehen. Je nach verwendetem oder vorliegendem Sauerstoffangebot werden die genannten Substrate in Ruhe meist zu je einem Drittel herangezogen. Man bezeichnet reife Kardiomyozyten auch als omnivor.

Die bestehende morphologische Unreife resultiert weiterhin in einer geringeren Kraftentwicklung bei Kontraktionen im Vergleich zu nativem Myokard. Die Neigung zu spontanen Kontraktionen von EHTs ist ein weiteres Zeichen von Unreife, wohingegen sich natives linksventrikuläres Myokard im Ruhezustand befindet. Allerdings weisen hiPSC-Kardiomyozyten, kultiviert im EHT-Format, humanähnliche Aktionspotentiale in Dauer und Form und eine humanähnliche Dichte an Ionenkanälen auf (Lemoine et al. 2017).

Durch die dreidimensionale Kultivierung der Kardiomyozyten als EHTs konnte, wie oben beschrieben, bereits eine deutliche Verbesserung des Reifegrades erzielt werden. Durch die Kultur zwischen den Silikonpfosten konnte eine räumliche Orientierung und Ausrichtung der Kardiomyozyten unter vermehrter Ausbildung von Gap junctions und Zellorganellen und eine Verbesserung der Kontraktionskraft erreicht, sowie eine Kokultur mit Fibroblasten und anderen Zelltypen ermöglicht werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Kardiomyozyten in EHTs verschiedene Substrate verstoffwechseln können und die unterschiedlichen Möglichkeiten der Energiegewinnung vermehrt nutzen, um ihren Energiebedarf nicht ausschließlich über die anaerobe Glykolyse zu decken (Ulmer et al. 2018, Ulmer und Eschenhagen 2019). Weitere molekulare Analysen der EHTs zeigten eine verstärkte Konzentration spezifischer Markerproteine der Kardiomyozytenreifung. Unter anderem werden  $\alpha$ -actinin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Myosin-Schwerkette ( $\alpha$ -/ $\beta$ -MHC),  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums,  $\text{Na}^{+}$ -/ $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher oder Titin verstärkt in dreidimensional kultivierten Kardiomyozyten translatiert und gleichen physiologischen Proteinkonzentrationen (Hirt et al. 2014b, Yang et al. 2014a, Ulmer et al. 2018). EHTs kommen derzeit dem nativen Herzgewebe am nächsten.

Trotz metabolischer, morphologischer und vor allem funktioneller Verbesserung der Reife konnte bisher jedoch noch kein vollständig erwachsener Phänotyp von Kardiomyozyten in Kultur erhalten werden (Hansen et al. 2010, Ulmer et al. 2018). Momentane Ansätze den Reifegrad von Kardiomyozyten weiter zu verbessern, basieren auf Kulturprotokollen, die mittels elektrischer und mechanischer Stimulation von hiPSC-Kardiomyozyten eine Verbesserung der funktionellen und strukturellen Reife erzielen (Hirt et al. 2014a, Veerman et al. 2015, Ronaldson-Bouchard et al. 2018). Andere Labore erzielten durch Langzeitkultur oder durch Kultur in modifizierten Medienzusammensetzungen reifere Phänotypen von hiPSC-Kardiomyozyten (Lundy et al. 2013, Brandao et al. 2017, Horikoshi et al. 2019).

### **2.3.4 Verbesserung der Reife durch Maturierungsmedien**

Die Modifikation von Kulturmedien bietet vielfältige Möglichkeiten, die Reife von hiPSC-Kardiomyozyten zu verbessern. Durch das Hinzufügen oder Weglassen von bestimmten Wachstumsfaktoren oder Hormonen, wie zum Beispiel Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1), Insulin, Adrenalin oder Trijodthyronin (T3), sollen postnatale oder adulte Bedingungen für die Kardiomyozyten nachgeahmt werden (Maillet et al. 2013, Yang et al. 2014a, Yang et al. 2014b). Mittlerweile sind bereits sehr reife Kardiomyozyten in Kultur Wirklichkeit geworden (Ulmer et al. 2018, Ulmer und Eschenhagen 2019). Eine Kombination mehrerer Ansätze zur Reifeförderung in einem Kulturprotokoll könnte zu einer optimierten und zufriedenstellenden Reifesteigerung führen (Brandao et al. 2017, Maxwell und Xu 2018, Machiraju und Greenway 2019). Gleichzeitig stellt sich die Frage wie nah man nativen Kardiomyozyten in vitro überhaupt kommen kann und welche Faktoren die Reife und Entwicklung der Kardiomyozyten wirklich fördern. Darüber hinaus basieren die meisten vorhandenen Kulturprotokolle auf serumhaltigen Herstellungsschritten oder Kulturmedien, die meist bovines oder equines Serum beinhalten.

Eine serumfreie Kultur zu entwickeln ist eine Voraussetzung für den Zertifikaterhalt der guten Herstellungspraxis (Good manufacturing practice, GMP). GMP beinhaltet Richtlinien zur Qualitätssicherung bei der Herstellung von Produkten für den Menschen. Unter anderem fallen auch die Produktionsschritte von Arzneimitteln und Medizinprodukten unter diese Gesetze, mit dem Ziel eine unbedenkliche, sichere und beständige Qualität garantieren und Nebenwirkungen oder Abstoßungsreaktionen ausschließen zu können (Gouveia et al. 2015, McGrath et al. 2019). Herstellungsprozesse und Kulturprotokolle ohne tierische Bestandteile werden damit zur Notwendigkeit um den Richtlinien gerecht zu werden und die Modell- und Therapieideen in anwendbare Produkte für den Menschen umsetzen zu können und damit das ganze Potential der hiPSC zu nutzen.

Erste Versuche serumfreie Kulturbedingungen zu schaffen, wurden bereits von Mills et al. (2017) oder Tiburcy et al. (2017) probiert umzusetzen. Mills und Kollegen versuchten über Wechsel der Substratzufuhr eine mehr und mehr postnatale Umgebung zu schaffen, um den Stoffwechsel der fetalen Kardiomyozyten durch ein stetig veränderndes Nährstoffangebot anzupassen (Mills et al. 2017). Deren serumfreies Maturierungsmedium enthielt wenig Glukose, viel Palmitat und kein Insulin. Insulin ist in den meisten Kulturmedien als essentieller Bestandteil für Überleben und Funktion der hiPSC-Kardiomyozyten enthalten (Ulmer und Eschenhagen 2019). In dem Maturierungsmedium war Insulin bewusst nicht enthalten, da Insulin die Glykolyse auslöst und proliferative

Effekte auf Zellen ausübt. Mills et al. (2017) erzielten mit ihrem Maturierungsmedium hiPSC-Kardiomyozyten mit einer funktionell und metabolisch verbesserten Reife im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe. Des Weiteren gelang die Beherrschung der Zellzyklusaktivität zu einer geringeren proliferativen Aktivität über eine Repression von  $\beta$ -Catenin und YAP1 (Yes-associated protein 1). In dem Maturierungsmedium konnte jedoch keine weitere morphologische Maturierung im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielt werden. Tiburcy und Kollegen orientierten sich an bereits vorhandenen Kulturprotokollen und ersetzten die serumhaltigen Herstellungs- und Kultivierungsschritte durch eine Kombination aus TGF $\beta$ -1 (Transforming Growth Factor  $\beta$  1), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1), FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und B27 (Tiburcy et al. 2017). Vor allem TGF $\beta$ -1 wurde als ein wichtiger Zusatz in den ersten Kulturtagen für eine gute Kraftentwicklung ausgemacht. Unter serumfreien Bedingungen in Kombination mit Wachstumsfaktoren zeigten hiPSC-Kardiomyozyten eine morphologische, molekulare und funktionelle Reifesteigerung.

Ein weiteres, bisher noch nicht publiziertes, serumfreies Maturierungsmedium wurde im Labor von Mark Mercola (Stanford, Vereinigte Staaten) entwickelt. Vor Ort führte das Maturierungsmedium in bisherigen 2D-Kulturen zu beeindruckenden strukturellen Ergebnissen von hiPSC-Kardiomyozyten. Im Hamburger Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie wurde mit diesem Projekt das serumfreie Maturierungsmedium aus Stanford im EHT-Modell untersucht und mit dem hausinternen serumhaltigen Standard experimentell verglichen.

### **3 Arbeitshypothese und Fragestellung**

Es erfolgte ein experimenteller Versuch mit Stammzell-abgeleiteten Kardiomyozyten (hiPSC-Kardiomyozyten) zweier gesunder Kontrollzelllinien des Hamburger Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie. Durch eine dreidimensionale Kultivierung der Kardiomyozyten als Engineered Heart Tissues (EHTs) konnte bereits eine deutliche Verbesserung des Reifegrades erzielt werden. Der bisherige institutsinterne Standard basiert auf einem serumhaltigen Kulturprotokoll. Um das volle Potential der hiPSC-Kardiomyozyten nutzen zu können, ist es notwendig Kardiomyozyten mit einem adulten Phänotyp unter serumfreien Bedingungen, zum Erfüllen der GMP-Richtlinien, generieren zu können. Das Mercola Labor in Stanford entwickelte ein noch nicht publiziertes Maturierungsmedium, welches in bisherigen 2D-Kulturen zu beeindruckenden strukturellen Ergebnissen von hiPSC-Kardiomyozyten führte.

Im Hamburger Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie sollte mit diesem Projekt experimentell untersucht werden, ob durch das serumfreie Maturierungsmedium aus Stanford in Kombination mit einer Kultur im EHT-Format ein synergistischer Maturierungseffekt verglichen mit dem hausinternen serumhaltigen Standard erzielt werden kann.

#### **Folgende Fragen sollen während des Projektes beantwortet werden:**

- Ist es möglich, die hiPSC-Kardiomyozyten durch Kombination von EHT-Kultur und Kultur im Maturierungsmedium dem menschlichen Herzen in Funktion und Morphologie noch näher zu bringen, um mit möglichst wirklichkeitsnahen Modellen forschen zu können?
- Wie wirken sich die unterschiedlichen Kulturbedingungen auf das Kontraktionsverhalten, sowie auf metabolische, strukturelle und elektrophysiologische Eigenschaften der Kardiomyozyten aus?

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC)

Die Zellen für den Versuch stammten aus Hautbiopsien von zwei gesunden weiblichen Kontrollen des *ERC IndivHeart* Projektes, welche unter den verblindeten Bedingungen des Projektzeitraumes die Bezeichnung ERC001 und ERC018 erhielten. Die Entnahme der Hautbiopsien erfolgte im Herzzentrum des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Leitung Prof. Stefan Blankenberg). Aus der jeweiligen Hautbiopsie wurden durch die Mitarbeiter des Instituts der Experimentellen Pharmakologie und Toxikologie die Fibroblasten isoliert und folgend kultiviert. Mithilfe der Sendaivirus-Reprogrammierungstechnologie (CytoTune-iPS Sendai Reprogramming Kit, #A1377801, Life Technologies) wurden die Fibroblasten nach Herstellerangaben zu hiPSC reprogrammiert. Nach dem Reprogrammieren der kutanen Fibroblasten zu hiPSC wurde die Differenzierung zu Kardiomyozyten veranlasst. Die Differenzierung zu Kardiomyozyten erfolgte nach dem kürzlich publizierten institutsinternen standardisierten Vorgehen und wurde hauptsächlich durch Birgit Klampe durchgeführt (Breckwoldt et al. 2017). Die Zelllinien wurden folgend als ERC001sv1162 und ERC018sv1634 benannt. Sie sind bei *hPSCreg* unter UKWi001-A/ERC001sv1162 und UKEi003-C/ERC018sv1634 registriert.

### 4.2 Herstellung der künstlichen Herzgewebe

Die Herstellung der künstlichen Herzgewebe erfolgte nach dem bereits erwähnten und kürzlich publizierten institutsinternen standardisierten Vorgehen. Die EHTs wurden mit Hilfe von Frau Dr. Ulmer, Birgit Klampe und Thomas Schulze gegossen. Für die Herstellung wurden sowohl frisch dissoziierte als auch aufgetaute Kardiomyozyten verwendet.

Als Erstes wurden EHT-Gussformen in die 24-Well-Platten vorgelegt. Zur Herstellung dieser wurden 1,5 ml flüssige Agarose (2% in PBS, aufbewahrt bei 60 °C; Invitrogen, 15510-027) in jedes Well gegeben. Danach wurden Platzhalter aus Polytetrafluorethylen (PTFE) in die flüssige Agarose gesteckt, um die Gusstaschen herzustellen. Nachdem die Agarose ausgehärtet war, konnten die PTFE-Formen wieder aus der Agarose entnommen werden. Die Silikongestellrahmen wurden über die entstandenen Gusstaschen gehängt, sodass je zwei Silikonpfosten in einer Gusstasche hingen (Abbildung 4.1). Für diesen Versuch wurden sowohl Silikonpfosten mit einem geringen als auch mit einem mittleren Steifegrad gewählt. Für die ersten beiden Versuchsdurchläufe wurden

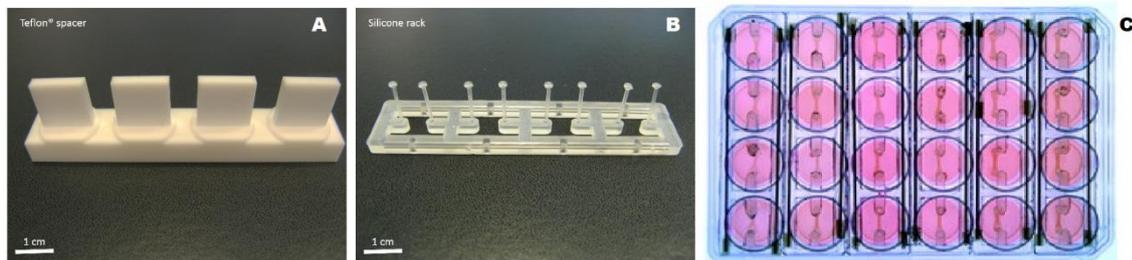
Silikongestellrahmen mit einem mittleren Steifegrad gewählt. Für den dritten Versuchsdurchlauf wurden Silikongestellrahmen mit dem geringsten Steifegrad verwendet. Die Silikongestellrahmen mit mittlerem Steifegrad konnten mit einem Faktor von 2,7 bezogen auf die Kontraktionskraft zu den Silikongestellrahmen mit dem geringsten Steifegrad vergleichbar berechnet werden.

**Tabelle 4.1:** Zusammensetzung der Substanzmengen, die für den EHT-Mastermix zur Herstellung eines EHTs benötigt werden, inklusive 10% Pipettierfehler.

<b>Substanz</b>		<b>Humanes EHT</b>
<b>Kardiomyozyten</b> (Zellanzahl)		880 000 – 1 000 000
<b>NKM</b>		86,9 µl
<b>DMEM</b> (Biochrom F0415)		
<b>FCS</b> (Biochrom, S0615)	<b>10%</b>	
<b>Glutamin</b> (Gibco, 25030-081)	<b>1%</b>	
<b>2×DMEM</b>		6,2 µl
<b>10% Matrigel</b> (Corning, 354234)		11 µl
<b>0,1% Y-27632</b> (Biaffin, PKI-Y27632-010)		0,11 µl
<b>Fibrinogen</b> (Sigma-Aldrich, F8630)		2,8 µl
<b>Thrombin</b> (Sigma-Aldrich, T7513)		3,3 µl

Der EHT-Mastermix wurde ohne Zugabe von Thrombin in einem Zentrifugenröhrchen zusammengefügt und vermischt. Die genaue Zusammensetzung kann der Tabelle 4.1 entnommen werden. Bei dem ersten Versuchsdurchlauf der ERC001-EHTs wurde Matrigel zugegeben. Die beiden anderen Versuchsdurchläufe erfolgten ohne einen Zusatz von Matrigel. Der Volumenanteil von Matrigel wurde durch serumhaltiges Resuspensionsmedium (NKM) ersetzt. Kurz vor dem Gießen eines jeden EHT wurden zu 100 µl Mastermix 3 µl Thrombin in die Pipettenspitze aufgenommen und zum Mischen zweimal ab- und aufpipettiert. Diese Kombination musste vor der Koagulation in die jeweilige EHT-Gusstasche zwischen die zwei Silikonpfosten pipettiert werden. Zur vollständigen Polymerisierung wurden die EHTs für eine Stunde bei 37 °C, 7% CO<sub>2</sub>, 40% O<sub>2</sub> inkubiert. Danach erfolgte ein Überschichten mit dem folgenden Kulturmedium der

EHTs, um nach einer weiteren halben Stunde Inkubationszeit die Silikongestellrahmen mit den gegossenen EHTs aus der Gussform entnehmen zu können.



**Abbildung 4.1:** Herstellung der EHTs im 24-Well-Format (adaptiert von EHT Technologies GmbH (<http://www.eht-technologies.com/products.html>), Hansen et al. 2010). (A) Platzhalter zur Herstellung der Gusstaschen. (B) Silikongestellrahmen mit Silikonpfosten als EHT-Halterung. (C) 24-Well-Platte mit Silikongestellrahmen und gegossenen EHTs.

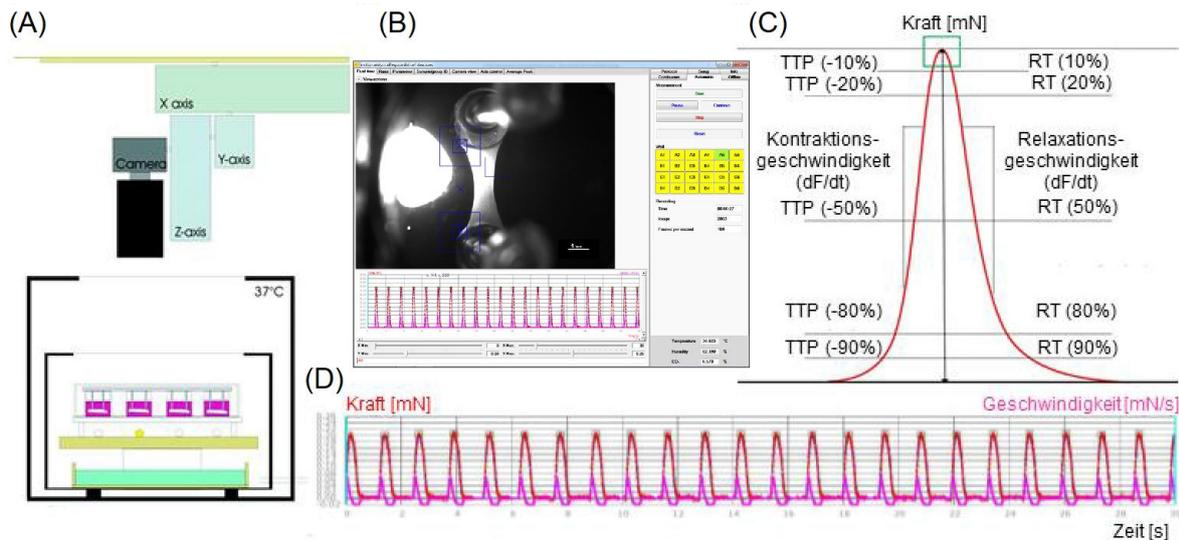
Die EHTs wurden dann in eine mit Kulturmedium vorbereitete 24-Well-Platte überführt. Bis auf die Versuchsgruppe der ERC018-EHTs (n=7), die ausschließlich mit dem Maturierungsmedium kultiviert wurde, wurden die EHTs in das Standard-EHT-Medium (Complete) überführt. Das Standard-EHT-Medium bedeutet eine Kultivierung in DMEM mit 10% Pferdeserum, 1% Penicillin/Streptomycin und einem Zusatz von Insulin und Aprotinin. Die genauen Zusammensetzungen der verschiedenen Kulturmedien können der Tabelle 4.2 entnommen werden.

**Tabelle 4.2:** Zusammensetzung der Kulturmedien der Gruppen A - E. Pro Well wurden insgesamt 1,5 ml pipettiert.

Substanz	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	Gruppe E
<b>DMEM</b> (Biochrom F0415)	1,35 ml/ well	1,35 ml/ well			
<b>MM Medium</b>			1,5 ml/ well	1,35 ml/ well	1,35 ml/ well
<b>Pferdeserum (10%) inaktiviert</b> (Gibco 26050)	0,15 ml/ well			0,15 ml	
<b>Humanserum (10%) aktiv</b> (Biowest)		0,15 ml/ well			0,15 ml
<b>Aprotinin</b> (Sigma Aldrich A1153)	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
<b>Insulin</b> (Sigma Aldrich 19278)	1,5 µl	1,5 µl			
<b>Penicillin/ Streptomycin (P/S)</b> (Gibco 15140)	1%				

### 4.3 Normale EHT Kultivierung

Die EHTs wurden bei 37 °C, 7% CO<sub>2</sub>, 40% O<sub>2</sub> in einem Zellinkubator (Thermo Fisher Scientific) kultiviert. Die ERC001-EHTs des ersten Versuchsdurchlaufes wurden nach dem Gießen über neun Tage, die ERC018-EHTs des zweiten Versuchsdurchlaufes über vierzehn Tage und die ERC001-EHTs des dritten Versuchsdurchlaufes über zwölf Tage mit dem Standard-EHT-Medium kultiviert. Das Medium wurde dreimal pro Woche gewechselt. Neben dem Wechsel des Standardmediums erfolgte während der Formationsphase der EHTs eine regelmäßige Messung der Ausgangslage und Kontraktionskraftentwicklung der EHTs (Abbildung 4.2). Die Messungen in der Messapparatur erfolgten frühestens eineinhalb Stunden nach dem Mediumwechsel, um den EHTs Zeit für die Substrataufnahme zu gewähren. Die Messungen erfolgten mittels video-optischer Analyse und der dazugehörigen CTMV-Software (Consulting Team Machine Vision, Pforzheim). In dem Zellinkubator der Messapparatur erfolgten die Messungen unter konstanten Bedingungen von 37 °C, 7% CO<sub>2</sub>, 40% O<sub>2</sub>. Durch eine Glasscheibe auf der Oberseite des integrierten Inkubators wurden die Auslenkungen der Silikonpfosten bei Kontraktion der EHTs mit einer Kamera aufgenommen. Das jeweilige gemessene EHT wurde während der Messung per LED Licht beleuchtet. Zur Vermeidung einer Wärmeentwicklung des Kulturmediums durch Licht erfolgte die Beleuchtung des jeweiligen Wells nur während der video-optischen Erfassung (Hansen et al. 2010). Vor der Messung wurde der CTMV-Software über Einstellung und Ausrichtung der X-, Y- und Z-Achse die Koordinaten der EHTs mitgeteilt, sodass die Kamera während der Messung die EHTs erneut anfahren und aufnehmen konnte. Mit der Messapparatur konnten kontraktile Parameter, wie zum Beispiel die Kontraktionskraft, die Frequenz, die Kontraktionszeit und ihre Geschwindigkeit oder die Relaxationszeit und ihre Geschwindigkeit, erfasst werden. Weitere Informationen über die Messapparatur können der Abbildung 4.2 sowie der Internetseite der EHT Technologies GmbH entnommen werden.



**Abbildung 4.2:** Video-optische Analyse der EHTs (adaptiert von EHT Technologies GmbH (<http://www.eht-technologies.com/products.html>), Hansen et al. 2010). (A) Skizze vom Aufbau der Messapparatur mit 24-Well-Platte im integrierten Inkubator. (B) Computerbildschirmansicht der CTMV-Software bei Messung eines EHTs in der Messapparatur. (C) Berechnete Kontraktionsparameter durch die CTMV-Software. (D) Vergrößerte Abbildung einer Kontraktionsaufnahme eines EHTs über die Zeit von 30 Sekunden.

#### 4.4 Kultivierung in verschiedenen Medien

Die Kultivierung der EHTs im institutsinternen Standard-EHT-Medium mit 10% Pferdeserum sollte in dem Versuch mit einer abgewandelten Zusammensetzung, Standard-EHT-Medium mit 10% Humanserum statt Pferdeserum, und dem Maturierungsmedium (MM) mit unterschiedlichen Zugaben, verglichen werden. Das Maturierungsmedium aus Stanford wurde freundlicherweise von dem Mercola Labor in Stanford (Vereinigte Staaten) zur Verfügung gestellt und durch Ph.D. Dries Feyen nach Hamburg verschickt. Dem Maturierungsmedium, mit zu diesem Zeitpunkt unbekanntem Inhaltsstoffen, wurde Penicillin/Streptomycin in einer Konzentration von 1:100 und Aprotinin in einer Konzentration von 1:1000 zugefügt. Die weiter abgewandelten Zusammensetzungen vom Maturierungsmedium erhielten einen Zusatz von 10% Pferde- bzw. 10% Humanserum (Tabelle 4.2). Pro Kulturmediumansatz wurden, nach dem Randomisieren der EHTs, mindestens drei EHTs zugeteilt und kultiviert.

#### 4.5 Längen- und Breitenverhältnisse im Verlauf der Kultur

Zur Analyse der EHT-Gestalt im Verlauf der Kulturzeit wurden mittels ImageJ die Längen und Breiten der EHTs ermittelt. Für diese Analyse sind Bilder der einzelnen EHTs zu unterschiedlichen Kulturzeitpunkten gewählt worden, die jeweils automatisch bei

Messungen der Ausgangslage von der CTMV-Software in die Messprotokolle eingefügt wurden. Während den Messungen der Ausgangslage entstand sowohl ein Bild des jeweiligen EHTs am Anfang, sowie am Ende jeder Messung. Für die Analyse wurden Bilder im relaxierten Zustand der EHTs gewählt. Des Weiteren erfolgte eine Messung der in das Bild eingefügten Maßstableiste, um mit Microsoft Excel die ermittelten ImageJ-Werte der Längen und Breiten maßstabsgetreu in Millimeter zu berechnen. Mittels GraphPad Prism 5 wurden die Längen- und Breitenverhältnisse der EHTs zum jeweiligen Ausgangswert normalisiert und folgend in den beiden Konditionen im Verlauf der Kulturzeit dargestellt.

## **4.6 Funktionelle Analysen der EHTs**

Mindestens drei Wochen Maturierung und normale Kultivierung warten sowohl das Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie als auch das Mercola Labor bevor funktionelle Tests mit den Kardiomyozyten durchgeführt werden. Nach drei Wochen erreichen die Kardiomyozyten gewöhnlich eine Plateauphase ihrer Kraftentwicklung und sind damit ausreichend stark für funktionelle Tests.

### **4.6.1 Kraft-Frequenz-Beziehung**

Zur Analyse der Kraft-Frequenz-Beziehung wurde zuerst die Ausgangslage in 1,8 mM Calcium-haltiger Tyrodelösung (2 ml/Well) spontan und unter elektrischer Stimulation von 1,5 Hz gemessen. Folgend wurden die EHTs in 0,6 mM Calcium-haltiger Tyrodelösung (2 ml/Well) bei ansteigender Frequenz gemessen. Die Frequenz wurde in jeder Messung erhöht bis die EHTs der elektrischen Stimulation nicht mehr folgten. Begonnen wurden die Messungen bei 0,75 Hz. Die Frequenz wurde bis 2,5 Hz je Messung um 0,25 Hz erhöht. Im Intervall von 2,5 Hz bis 4 Hz je um 0,5 Hz und ab 4 Hz je Messung um 1 Hz.

### **4.6.2 Wirkung von Isoprenalin und Carbachol**

Zuerst wurde die Ausgangslage in sowohl 1,8 mM als auch 0,6 mM Calcium-haltiger Tyrodelösung (2 ml/Well) spontan und unter elektrischer Stimulation von 1,5 Hz gemessen. Um folgend die Wirkung von Isoprenalin auf die EHTs, also eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation, zu messen, wurde den EHTs in der 0,6 mM Calcium-haltigen Tyrodelösung 100 nM Isoprenalin (20  $\mu$ l/Well; Sigma-Aldrich, I6504; Stammlösung: 10  $\mu$ M gelöst in Tyrodelösung) zugegeben. Die EHTs wurden daraufhin einmal spontan und dreimal unter

elektrischer Stimulation von 1,5 Hz gemessen. Im Anschluss wurde die Wechselwirkung mit dem vegetativen Gegenspieler, also einer parasympathomimetischen Stimulation, getestet und 10  $\mu$ M Carbachol (20  $\mu$ l/Well; Merck, 212385; Stammlösung: 1 mM gelöst in Tyrodelösung) hinzugegeben. Die EHTs wurden daraufhin erneut einmal spontan und dreimal unter elektrischer Stimulation bei 1,5 Hz gemessen.

#### **4.7 Metabolismus der EHTs**

Zur Analyse des Stoffwechselerhaltens der EHTs wurden an unterschiedlichen Kulturzeitpunkten Proben der Kulturmedien nach vier Stunden, nach vierundzwanzig Stunden und vor dem nächsten Mediumwechsel entnommen. Es wurden Proben von 0,4 ml pro Well mit Einmalspritzen mittels Injektionskanülen entnommen und bis zur Auswertung bei 4 °C gelagert. Bei dem vorangegangenen Mediumwechsel wurden aufgrund der Entnahme 2 ml Kulturmedium in die jeweiligen Wells gegeben. Die Analyse der Glukose- und Laktatkonzentrationen erfolgte mit einem Blutgasanalysegerät (RADIOMETER ABL90 SERIE, Radiometer GmbH) im Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf nach Absprache mit Herrn Thomas Andreas.

#### **4.8 DNA-Isolation und DNA-Analyse mittels qPCR**

Mithilfe des TRIzol Protokolls wurde RNA, Protein und DNA aus schockgefrorenen EHTs gewonnen. Zur Homogenisierung und Zellyse wurde jedem 2 ml Reagenzgefäß mit je einem schockgefrorenen EHT 300  $\mu$ l TRIzol (Life Technologies, 15596026) zugegeben. Das Zellpellet wurde durch ein stetiges Auf- und Abpipettieren mit Mikropipetten absteigender Volumenfassung zerkleinert. Als letzter Schritt der Homogenisierung wurde mit einer 1 ml Einmalspritze der Inhalt des Reagenzgefäßes mehrfach über die Kanüle aufgenommen und wieder abgegeben. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde jedem Reagenzgefäß 0,66  $\mu$ l Chloroform zugegeben. Nach leichtem Schwenken erfolgte eine weitere Inkubation von 2 - 3 Minuten bei Raumtemperatur, dem sich eine fünfzehnminütige Zentrifugierung von 12 000 x g bei 4 °C anschloss. Die oberste wässrige RNA-Phase wurde in ein neues Reagenzgefäß pipettiert und bei -80 °C eingefroren. Während des Pipettierens wurde das Reagenzgefäß schräg gehalten und ausschließlich die durchsichtige RNA-Phase entnommen.

Die verbliebene RNA-Phase wurde folgend aus dem Ausgangsgefäß pipettiert und verworfen, um danach 0,90 µl 100% Ethanol (Ethanol absolut; J.T. Baker, JT9229-3C), zur Trennung von DNA und Protein, zuzugeben. Nach leichtem Schwenken erfolgte eine erneute Inkubation von 2 - 3 Minuten bei Raumtemperatur, dem sich eine fünfminütige Zentrifugierung von 2 000 x g bei 4 °C anschloss. Die obere Proteinphase wurde in ein neues Reagenzgefäß pipettiert und bei -80 °C eingefroren.

Nachfolgend wurde die DNA dreimal gewaschen. Dazu erfolgte dreimal eine dreißigminütige Inkubation bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem leichtem Schwenken in 600 µl 0,1 M Natriumcitrat gelöst in 10% Ethanol. Nach jedem Inkubieren wurden die Reagenzgefäße bei 2 000 x g für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nach dem dritten Waschdurchlauf wurde der flüssige Anteil abgenommen und die DNA für zehn bis fünfzehn Minuten luftgetrocknet. Folgend wurde zu der DNA 500 µl Nuklease-freies Wasser zur Rehydratation gegeben. Über Nacht erfolgte auf dem Rüttler eine Inkubation bei 37 °C. Mit dem Nanodrop Spectrophotometer (NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific) wurde die Ausbeute der DNA in ng/µl ermittelt und eine passende Verdünnung für den PCR-Mastermix berechnet. Die Zusammensetzung des Volumens pro Reaktionstasche ist der Tabelle 4.3 zu entnehmen.

**Tabelle 4.3:** Zusammensetzung des Volumens pro Reaktionstasche (µl).

Substanz	Volumen [µl]
EvaGreen Mastermix	2,0
Primer vorwärts/ reverse	0,5
DNA	2,0
Nuklease-freies Wasser	5,5

Die Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes (EvaGreen; Solis Biodyne), der an doppelsträngige DNA bindet, sollte die Messung quantifizierter DNA möglich machen. Die PCR wurde mit dem ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Sowohl die mitochondrialen Gene NADH-Dehydrogenase 1 (ND1) und NADH-Dehydrogenase 2 (ND2), als auch g-actin aus dem Zellkern sollten mittels der verschiedenen Primeransätze (Tabelle 4.4) analysiert werden. Für jeden Primeransatz wurden drei Reaktionstaschen mit der oben genannten Zusammensetzung befüllt. Zum Ausschluss technischer Ungenauigkeiten, wie zum Beispiel Pipettierfehler, wurde jeweils eine Probe Wasser in dreifacher Ausfertigung analysiert.

**Tabelle 4.4:** Primer für die qPCR.

Primersequenzen (doi: 10.1038/srep22788) abgeleitet aus (Burkart et al. 2016).

Primer	Sequenz
mt-ND1 vorwärts	5'- ATGGCCAACCTCCTACTCCTCATT-3'
mt-ND1 reverse	5'-TTATGGCGTCAGCGAAGGGTTGTA-3'
mt-ND2 vorwärts	5'-CCATCTTTGCAGGCACACTCATCA-3'
mt-ND2 reverse	5'-ATTATGGATGCGGTTGCTTGCGTG-3'
ACTB (actin, beta) ACTB vorwärts	5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'
ACTB reverse	5'- CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'

#### 4.9 Protein-Isolation und Protein-Analyse mittels Western Blot

Zur Isolation der Proteine wurden zu den Reagenzgefäßen mit der Proteinphase 600 µl Isopropanol zugegeben. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Reagenzgefäße bei 12 000 x g für zehn Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet dreimal gewaschen. Zum Waschen wurden die Pellets in 600 µl 0,3 M Guanidin Hydrochlorid-95%-Ethanol zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um dann bei 7500 x g für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert zu werden. Der jeweils entstandene Überstand wurde verworfen. Nach dem Waschen wurden die Proteinpellets in 600 µl 100% Ethanol zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 7500 x g für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Protein für fünf bis zehn Minuten luftgetrocknet. Die Proteinpellets wurden in 100 µl 1% SDS resuspendiert und folgend zur Lösung der Pellets für zwanzig Minuten bei 50 °C im Hitzeblock inkubiert. Die Reagenzgefäße wurden bis zur Durchführung des Western Blots bei -80 °C gelagert.

Zur Vorbereitung der Ladungen für den Western Blot wurden die Reagenzgefäße bei 10 000 x g für zehn Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Folgend wurden die Ansätze für die Taschen des Western Blots pipettiert. Pro Tasche sollten die Proteinproben mit 6x Lämmli Puffer in einer Zusammensetzung von 5:1 geladen werden. Jede Probe wurde auf zwei verschiedenen Gelen je einmal geladen, um  $\alpha$ -MHC und  $\beta$ -MHC miteinander vergleichen zu können. Als Positivkontrolle wurde eine institutsinterne Probe Non-failing-Heart und als Negativkontrolle eine Proteinprobe aus einem Ratten-EHT vorbereitet.

Die Durchführung des Western Blots erfolgte mit Unterstützung von Frau Dr. Schlossarek und Frau Dr. Ulmer mit den Produkten von Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH,

Feldkirchen). Am ersten Tag erfolgte die Herstellung der Polyacrylamidgele. Das gesamte Zubehör zum Gießen der Gele wurde mit 70%-igem Ethanol gereinigt und dann zusammengebaut. Es wurden Glasplatten zum Herstellen von 1 mm dicken Gelen, mit passenden Kämmen zum Herstellen von fünfzehn Taschen, verwendet. Die Substanzen für das Trenngel und das Sammelgel wurden bis auf TEMED (Tetramethylethyldiamin; Bio-Rad #1610801) zusammengegeben (Tabelle 4.5). TEMED wurde jeweils erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele hinzugefügt. Für das Trenngel wurde eine Acryl-Konzentration von 10% gewählt. Mit einer Pipette wurde erst das Trenngel gegossen, welches dann mit Isopropanol, für die Polymerisationszeit von fünfzehn Minuten, überschichtet wurde. Der Überstand an Isopropanol wurde vor dem Gießen des Sammelgels abgegossen. Nach dem Gießen des Sammelgels wurden unverzüglich die Kämmen zum Herstellen der Taschen eingesteckt. Das Sammelgel benötigte eine Polymerisationszeit von dreißig Minuten. Zur Lagerung bei 4 °C über Nacht wurden die Glasplatten mit den Gelen in feuchtes Handtuchpapier und Frischhaltefolie eingepackt.

Am Folgetag wurde die Elektrophoresekammer mit den Gelen aufgebaut und mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Vor dem Beladen der Taschen wurden die Proben für fünf Minuten bei 95 °C zum Denaturieren der Proteine in den Hitzeblock gestellt. Die Kämmen wurden gezogen, um die Taschen entweder mit 5 µl Marker (MW Protein Standard, Sigma-Aldrich, I-5506) oder mit den Proteinproben zu befüllen. Die Elektrophorese lief zuerst zehn Minuten bei 80 Volt und dann weitere 80 Minuten bei 150 Volt, bis die gefärbten Banden des Markers das Gel entlanggelaufen waren.

**Tabelle 4.5:** Substanzen zur Herstellung der Polyacrylamidgele. Die Mengenangaben reichen für die Herstellung von zwei Gelen.

Substanzen	Trenngel (10%)	Sammelgel
Wasser [ml]	4,8	3,015
40% Acrylamid/Bis Solution 29:1 [ml] (Bio-Rad #1610146)	2,5	0,64
0,5 M Tris pH 8,8 [ml]	2,5	
0,5 M Tris pH 6,8 [ml]		1,25
10% SDS [ml]	0,1	0,05
10% APS [ml]	0,1	0,05
TEMED [ml] (Bio-Rad #1610801)	0,004	0,005

Es erfolgte der Transfer der Gele auf Nitrocellulose Membranen. Dafür wurde jeweils der „Sandwich-Chamber“ geöffnet und mit der Unterseite in eine Wanne mit Transferpuffer gestellt. Der Transferpuffer setzte sich aus 200 ml 5x Blot Puffer I (5x Blot Puffer I: 29 g Tris Base, 145 g Glycin und 2 Liter Milli Q), 200 ml Methanol und 1 Liter Milli Q zusammen. Ein Schwamm und drei Filterpapiere in der Größe 7 x 10 cm wurden in dem Transferpuffer geschwenkt und auf den „Sandwich-Chamber“ gelegt. Danach wurde das Gel von der Glasplatte gelöst und auf das Filterpapier geschwemmt. Eine Nitrocellulose Membran in der Größe 6 x 9 cm wurde auf das Gel gelegt, dann erneut befeuchtetes Filterpapier und ein Schwamm. Folgend wurde der Stapel durch Ausübung von moderatem Druck mit einem Glasröhrchen berollt, um Luftblasen zu verdrängen. Der „Sandwich-Chamber“ wurde geschlossen und in die Elektrophoresekammer gestellt, die von einem Behälter mit Eis umgeben war. Der Transfer erfolgte für 90 Minuten bei 300 mA. Danach wurden die Membranen jeweils aus der Kammer entnommen, mit Ponceau-S (0,5 g Ponceau, 25 ml Essigsäure und 500 ml Milli Q) gefärbt und im Chemidoc (Bio-Rad) fotografiert. Zum Auswaschen der Ponceau-Färbung wurden die Membranen dreimal fünf Minuten in 1x TBS-Tween 0,1% (100 ml 10x TBS, 900 ml Milli Q und 1 ml Tween 20) gewaschen. Für eine Stunde erfolgte das Blocken in 5%-iger Milchpulver-Lösung (2,5 g Milchpulver und 50 ml TBS-Tween 0,1%) auf dem Rüttler und folgend ein dreimaliges Waschen für je fünf Minuten in 1x TBS-Tween 0,1%. Über Nacht wurde je eine der Membranen bei 4 °C auf dem Rüttler mit einem der primären Antikörper von  $\alpha$ -MHC oder  $\beta$ -MHC (Tabelle 4.6), gelöst in 5 ml 1x TBS-Tween 0,1%, inkubiert. Am Folgetag wurden die Membranen dreimal fünf Minuten in 1x TBS-Tween 0,1% gewaschen. Die sekundären Antikörper von  $\alpha$ -MHC und  $\beta$ -MHC (Tabelle 4.6) wurden jeweils in 5 ml der 5%-igen Milchpulver-Lösung angesetzt. Die Inkubation der sekundären Antikörper erfolgte über eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rüttler. Erneut wurden die Membranen dreimal fünf Minuten in 1x TBS-Tween 0,1% gewaschen. Auf die zu detektierenden Banden wurden 100  $\mu$ l Clarity™ Western ECL Substrat (Bio-Rad #1705061) gegeben und im Chemidoc (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen) detektiert.

Zur Plausibilitätskontrolle und Quantifizierung der Proben auf den zwei Gelen wurde jeweils zusätzlich kardiales Troponin T (cTNT) gefärbt. Zur Vorbereitung der cTNT Färbung erfolgte erneut ein dreimaliges Waschen in 1x TBS-Tween 0,1% und das Abschneiden der Banden von  $\alpha$ -MHC und  $\beta$ -MHC, um beim nächsten Detektieren nur ein Bild der cTNT-Banden zu erhalten. Über Nacht wurden die Membranen bei 4 °C auf dem Rüttler mit dem primären Antikörper von cTNT (Tabelle 4.6), gelöst in 5 ml 1x TBS-Tween 0,1%, inkubiert. Am Folgetag wurden die Membranen dreimal fünf Minuten in 1x TBS-Tween 0,1% gewaschen. Der sekundäre Antikörper von cTNT (Tabelle 4.6) wurde jeweils

in 5 ml der 5%-igen Milchpulver-Lösung angesetzt. Die Inkubation des sekundären Antikörpers erfolgte über eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rüttler. Erneut wurden die Membranen dreimal fünf Minuten in 1x TBS-Tween 0,1% gewaschen. Auf die zu detektierenden Banden wurden 100 µl Clarity™ Western ECL Substrat gegeben und im Chemidoc detektiert.

Mittels ImageLab™ Software von Bio-Rad wurden die Dateien analysiert und zur bildlichen Darstellung als jpeg-Dateien exportiert. Zur Analyse der Banden wurden sowohl α-MHC als auch β-MHC zu cTNT von jeder Proteinprobe einzeln zueinander ins Verhältnis gesetzt. Folgend wurden sowohl für α-MHC/cTNT als auch β-MHC/cTNT, je Versuchsdurchlauf die EHTs der Standard-EHT-Kultur gleich Eins gesetzt und deren Durchschnitt gebildet, um die EHTs der Maturierungsmediumkultur dazu ins Verhältnis zu setzen.

**Tabelle 4.6:** Verwendete primäre und sekundäre Antikörper mit angewendeten Konzentrationen.

Antikörper	Molekülgröße	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
α-MHC	224 kDa	Hase polyklonal	Theresia Kraft, Hannover	1: 1000
β-MHC	220 kDa	Maus monoklonal	Sigma M-8421	1: 4000
cTNT	35 kDa	Maus monoklonal	Thermo Fischer Scientific MA5-12960	1:10000
Anti-rabbit IgG			Sigma A0545	1:5000
Anti-mouse IgG			Sigma A9044	1:5000

#### 4.10 Histologie

Die histologischen Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Mauspathologie und dem Zentrum für molekulare Neurobiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die immunhistochemischen Färbungen wurden von Kristin Hartmann aus der Mauspathologie durchgeführt. Die Immunfluoreszenz erfolgte gemeinsam mit Charlotta Behrens im Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie und die Elektronenmikroskopie wurde von Frau Dr. Schweizer im Zentrum für molekulare Neurobiologie durchgeführt.

#### **4.10.1 Immunhistochemie**

Zur Fixierung der Zellen wurden die EHTs an ihrem Silikongestell in ein mit Formaldehyd (4% Roti<sup>®</sup>-Histofix, Carl Roth, P087.3) befülltes Well einer 24-Well-Platte, nach zehnmütigem Waschen in PBS (Gibco, 14190-094), überführt und bei 4 °C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag erfolgte eine Überführung der EHTs in TBS acid (Sigma-Aldrich, A-3908) zur weiteren Lagerung bei 4 °C. Vor der Übergabe an die Mauspathologie wurden die fixierten EHTs mit einer Pinzette von ihrem Silikongestell entnommen. Die EHTs für die Längsschnitte wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit PBS gegeben. Die EHTs für die Querschnitte wurden in Agarose (4% in PBS, gelagert bei 60 °C) eingebettet. Dafür wurden 1,5 ml flüssige Agarose in Wells einer 24-Well-Platte gegeben und folgend je ein EHT eingelegt, sodass diese vollständig von der Agarose gefasst wurden. Die ausgehärtete Agarose wurde dem Well entnommen und die Überschüsse mit einem Skalpell abgeschnitten. Die EHT-Agarose-Blöcke wurden ebenfalls in einem 2 ml Reaktionsgefäß an die Mauspathologie gegeben. Das Einbetten in Paraffin, die 4 µm dicken Längs- und Querschnitte und die immunhistochemischen Färbungen wurden folgend von Kristin Hartmann aus der Mauspathologie durchgeführt. Die Schnitte wurden mit spezifischen Antikörpern behandelt. In den Längsschnitten wurden die Antigene MLC2a, MLC2v, Connexin-43 und Actin gefärbt. In den Querschnitten wurden die Antigene MLC2a, MLC2v und Dystrophin gefärbt. Die Anfertigung von mikroskopischen Aufnahmen erfolgte von mir mit einem Leica DMD 108 Mikroskop.

#### **4.10.2 Immunfluoreszenz**

Die Immunfluoreszenz erfolgte für die EHTs des zweiten und des dritten Versuchsdurchlaufes. Es erfolgte keine Relaxierung der EHTs vor der Fixierung. Zur Fixierung der Zellen wurden die EHTs an ihrem Silikongestell in ein mit Formaldehyd befülltes Well einer 24-Well-Platte, nach zehnmütigem Waschen in PBS, überführt und bei 4 °C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag erfolgte eine Überführung der EHTs in TBS acid zur weiteren Lagerung bei 4 °C. Die Immunfluoreszenzfärbungen und die Aufnahmen am konfokalen Laser Scan Mikroskop erfolgten mit der Unterstützung von Charlotta Behrens. Je zwei EHTs pro Kondition wurden für die Immunfluoreszenzfärbungen gewählt. Jeweils ein EHT pro Kondition wurde je mit  $\alpha$ -actinin (Thermo Fischer Scientific, PA5-16891 und A11008) und Hoechst (Invitrogen, H3569) oder je mit Phalloidin (ATTO-TEC GmbH, AD 633-81) und Hoechst gefärbt.

Die Gewebe durchliefen einen mehrtägigen Prozess zur Vorbereitung und Ausführung der Immunfluoreszenzfärbungen. Am ersten Tag wurden die EHTs zweimal in 1 ml PBS gewaschen. Es erfolgte dann eine Inkubation auf dem Rüttler in je 500 µl Puffer bei 4 °C über Nacht. Der Puffer setzte sich aus PBS mit 3% Milchpulver (Carl Roth, T145.2) und 1:1000 Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T8787) zusammen. Am zweiten Tag wurden die EHTs fünfmal je eine Stunde in 1 ml PBS gewaschen. Es erfolgte dann eine Inkubation des primären Antikörpers auf dem Rüttler bei 4 °C über Nacht. Für die  $\alpha$ -actinin-Färbung wurden 1,25 µl  $\alpha$ -actinin (Thermo Fischer Scientific, PA5-16891) in 1 ml des Puffers gelöst und zu gleichen Teilen auf die beiden EHTs verteilt. Für die Phalloidin-Färbung wurden 16 µl Phalloidin in 1 ml des Puffers gelöst und ebenfalls zu gleichen Teilen auf die beiden EHTs verteilt. Die Phalloidin-Färbung enthielt bereits den sekundären Antikörper, weshalb fortan die Reaktionsgefäße vor Licht geschützt wurden. Am dritten Tag wurden die EHTs erneut fünfmal je eine Stunde in 1 ml PBS gewaschen. Es erfolgte dann eine Inkubation des sekundären Antikörpers der  $\alpha$ -actinin-Färbung auf dem Rüttler bei 4 °C über Nacht. Dafür wurden 1,25 µl des sekundären Antikörpers (Thermo Fischer Scientific, A11008) in 1 ml PBS gelöst. Die Phalloidin-gefärbten EHTs wurden über Nacht in 1 ml PBS auf dem Rüttler inkubiert. Am vierten Tag wurden die EHTs dreimal dreißig Minuten in 1 ml PBS gewaschen. Dann wurden zu dem Milliliter PBS 30 µl Hoechst zugegeben und dreißig Minuten inkubiert. Folgend wurden die EHTs noch dreimal je dreißig Minuten in 1 ml PBS gewaschen.

Um die EHTs unter dem Konfokalmikroskop betrachten zu können, wurden diese auf Objektträger mit Vertiefungen (Menzel GmbH) gegeben, welche zuvor mit Fluoromount-G (Southern Biotech 0100-01) bestrichen wurden. Nachdem die Deckgläser gelegt waren, wurden die Objektträger vor Lichtzufuhr geschützt. Die Immunfluoreszenzbilder wurden mit dem Konfokalmikroskop (Carl Zeiss AG; Zeiss LSM 800) angefertigt.

#### **4.10.3 Elektronenmikroskopie**

Für die Elektronenmikroskopie wurde aus dem zweiten Versuchsdurchlauf je ein ERC018-EHT pro Kondition an das Zentrum für molekulare Neurobiologie gegeben. Es erfolgte keine Relaxierung der EHTs vor der Fixierung. Zur Fixierung wurden die EHTs an ihrem Silikongestell in einer Mischung aus 4% Paraformaldehyd und 1% Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (Science Services, Deutschland), nach zehnmütigem Waschen in PBS, überführt und bei 4 °C über Nacht fixiert. Am nächsten Tag erfolgte die Übergabe an das Zentrum für molekulare Neurobiologie. Dafür wurden die fixierten EHTs mit einer Pinzette

von ihrem Silikongestell entnommen und in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml der Fixierlösung gegeben.

Im Zentrum für molekulare Neurobiologie wurden die Proben von Frau Dr. Schweizer dreimal in 0,1 M Dimethylarsinsäurepuffer (pH 7,2 - 7,4) gespült und unter Verwendung von 1% Osmiumtetroxid in Dimethylarsinsäurepuffer gefärbt. Nach der Färbung wurden die Proben unter Verwendung aufsteigender Ethanolkonzentrationen entwässert, gefolgt von zwei Spülungen in Propylenoxid. Die Infiltration des Einbettungsmediums erfolgte durch Eintauchen in ein 1:1-Gemisch aus Propylenoxid und Epon (Science Services, Deutschland), gefolgt von reinem Epon und 48-stündigem Aushärten bei 60 °C. Für die Elektronenmikroskopie wurden Ultradünnschnitte von 60 nm geschnitten, welche auf Kupfergitter montiert und mit Uranylacetat und Bleicitrat angefärbt wurden. Die Schnitte wurden unter Verwendung eines Elektronenmikroskops EM902 (Carl Zeiss AG) untersucht und fotografiert, welches mit einer TRS 2K-Digitalkamera (A. Tröndle, Moorenweis, Deutschland) ausgestattet war.

Es erfolgte eine Besprechung der angefertigten Bilder gemeinsam mit Frau Dr. Ulmer im Zentrum für molekulare Neurobiologie. Folgend wurden die angefertigten Bilder zur Auswertung an uns übergeben.

#### **4.11 Statistik**

Zur Verarbeitung und Auswertung der Daten aus den Messungen der Messapparatur wurden mit dem *WhiteBox-pdf-Converter* Microsoft Excel Dateien erstellt. Mittels ImageJ wurden die Abbildungen aus den Messprotokollen der Messapparatur und die Bilder der Immunfluoreszenzfärbungen vermessen. Mittels Adobe Photoshop wurden die Abbildungen aus den Messprotokollen der Messapparatur zur besseren Übersichtlichkeit bearbeitet. Mit der GraphPad Prism 5 Software wurden folgend alle erhobenen Daten weiter ausgewertet und graphisch dargestellt.

In den graphischen Abbildungen werden die Daten als arithmetischer Mittelwert oder als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SD) gezeigt. Zur besseren Übersichtlichkeit werden die Daten der Kraft- und Schlagfrequenzentwicklung als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) gezeigt. Die n-Zahl bezieht sich auf die Anzahl der EHTs und die Versuchsdurchläufe.

Als statistische Analyse für ungepaarte Vergleiche zweier Versuchsgruppen wurden *Student's t-Tests*, für mehr als zwei Versuchsgruppen *One-way ANOVA* oder für Vergleiche mehrerer Versuchsgruppen und Bedingungen der *Two-way ANOVA* mit anschließendem *Bonferroni's Post-Test* verwendet. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant bewertet. In den Abbildungen wurde 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.

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Herstellung und Kultivierung der künstlichen Herzgewebe in verschiedenen Medien**

Es erfolgten drei Versuchsdurchläufe mit Engineered Heart Tissues (EHTs) hergestellt aus je einer Million Stammzell-abgeleiteten Kardiomyozyten von zwei gesunden weiblichen Kontrollzelllinien (ERC001 und ERC018) des Hamburger Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie. Die EHTs wurden zunächst in serumhaltigem Standard-EHT-Medium (Complete) kultiviert, bis ein synchrones Kontrahieren während der Messungen der Ausgangslage beobachtet werden konnte. Folgend wurden die Vergleiche in den unterschiedlichen Kulturkonditionen begonnen.

#### **5.1.1 Erster Versuchsdurchlauf mit ERC001-EHTs**

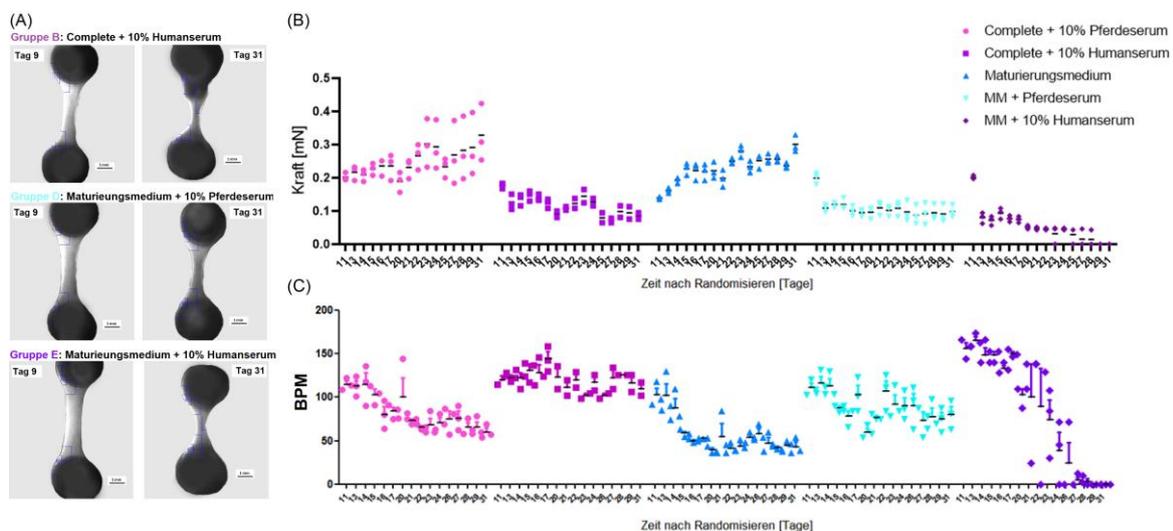
Im ersten Versuchsdurchlauf sollte das Maturierungsmedium mit dem Standard-EHT-Medium mit 10% Pferdeserumzusatz (Gruppe A), sowie mit der Wirkung einer abgewandelten Zusammensetzung des Standard-EHT-Mediums mit 10% Humanserum (Gruppe B), verglichen werden. Das Maturierungsmedium wurde ohne Serumzugabe (Gruppe C) und mit Zusatz von 10% Pferdeserum (Gruppe D) oder 10% Humanserum (Gruppe E) verwendet. Die genauen Zusammensetzungen der Medien sind der Tabelle 4.2 zu entnehmen.

Das Randomisieren der ERC001-EHTs am Tag neun erfolgte nach erneuter Messung der Ausgangslage, um je drei EHTs mit ähnlicher Kraftentwicklung einer der fünf Versuchsgruppen zuordnen zu können. Zu starke und zu schwache EHTs wurden keiner Versuchsgruppe zugeordnet. Die Gruppen C - E erhielten das Maturierungsmedium aus Stanford ohne Serumzusatz oder mit den oben genannten Zugaben. Das Medium der Gruppe A wurde nicht gewechselt, weil laut Medium-Wechselprotokoll des Instituts erst am darauf folgenden Tag ein Wechsel anstand. Gruppe B erhielt bei diesem Wechsel noch einmal das Standard-EHT-Medium, um einen möglichen akuten Effekt des Mediumwechsels zu kontrollieren. Daraufhin erfolgte eine Messung der EHTs in der Messapparatur über Nacht (17 h, 60 s/EHT, stündliche Messung), um den Erstkontakt mit dem Medium aus Stanford festzuhalten. Alle EHTs überlebten den Wechsel in die jeweiligen Kulturmedien ohne Veränderungen in ihrer Kontraktilität. Auf eine Darstellung der Einzelmessungen über Nacht wird deshalb verzichtet, da die letzte Messung des Experiments über Nacht als erste Messung der EHT-Entwicklung nach dem

Randomisieren in den unterschiedlichen Konditionen verwendet wurde (Abbildungen 5.1 B und C sowie Abbildung 5.3).

Am zehnten Tag erfolgte für Gruppe B der Wechsel in das Medium mit 10% Humanserum. Die EHTs der Gruppe A und alle nicht randomisierten EHTs wurden weiter im Standard-EHT-Medium kultiviert. Für Gruppe A und B wurde das Wechselprotokoll des Hamburger Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, welches einen Wechsel dreimal wöchentlich vorgibt, eingehalten und fortgeführt. Der erste Wechsel des Maturierungsmediums erfolgte für die Gruppen C - E dreieinhalb Tage nach dem Erstkontakt. Alle folgenden Mediumwechsel erfolgten alle vier bis fünf Tage.

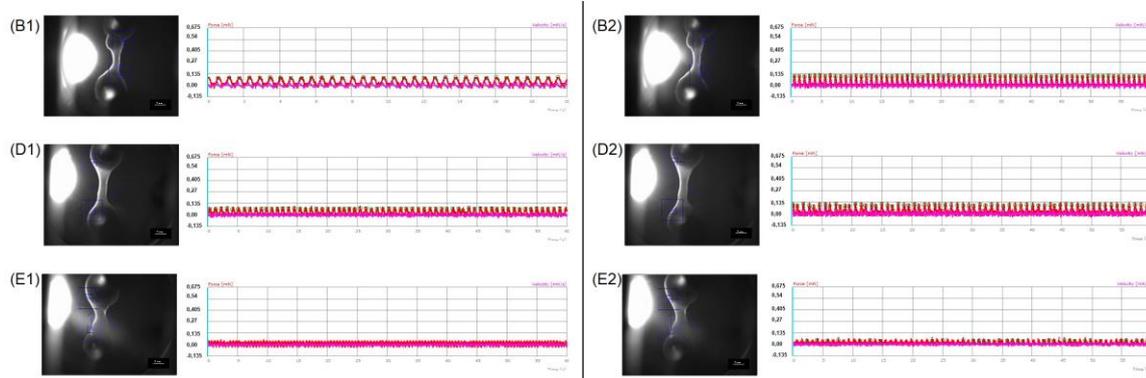
In den Gruppen B, D und E erfolgte ein Verlust der Kontraktionskraft innerhalb der ersten zwei Wochen nach dem Randomisieren. Die EHTs verkürzten und versteiften sich (Abbildung 5.1A), sodass die Gewebe kaum noch kontrahieren konnten (Abbildung 5.1 B und C). In die funktionellen Experimente konnten diese EHTs nicht miteinbezogen werden.



**Abbildung 5.1:** Verlust der Kontraktionskraft in den Gruppen B, D und E. (A) Entwicklung der EHT-Morphologie der Gruppen B, D und E im Verlauf der Kulturzeit. (B) und (C) Entwicklung der Kraft sowie Schläge pro Minute (BPM, Beats per minute) der Gruppen A - E. Die Daten der EHTs sind gruppiert dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n=3$  EHTs/Gruppe) ab dem Zeitpunkt der Randomisierung an Tag 11.

An Tag 27 nach dem Randomisieren erfolgte für die EHTs der Gruppen B, D und E ein Experiment über Nacht in Medium, welches als Energiequelle ausschließlich Laktat enthielt. Dieses Experiment sollte den Grund für die Verkürzung und Versteifung aufklären: Falls die Verkürzung der EHTs durch stark proliferierende Fibroblasten

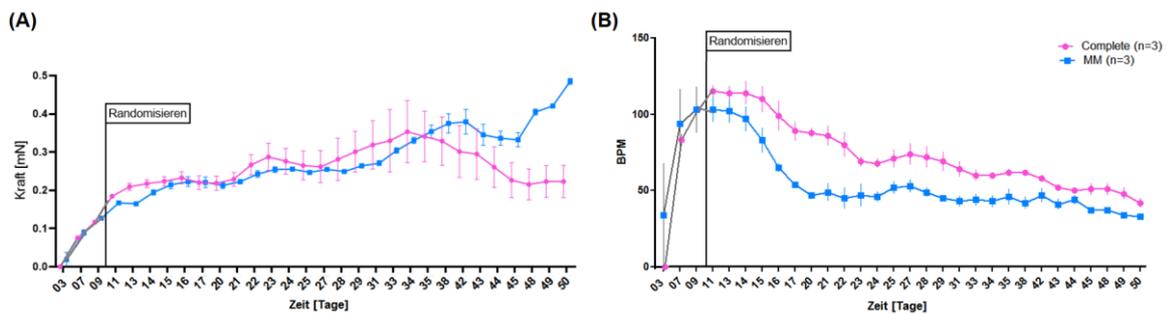
entstand, hätten die EHTs sich nach ein paar Stunden im Laktat-Medium wieder entfaltet, weil Kardiomyozyten omnivor sind, Fibroblasten jedoch kein Laktat verstoffwechseln können. Es fand keine Veränderung der EHT-Länge statt, sodass die Verkürzung der EHTs durch einen anderen Faktor im Medium oder im Serum bedingt sein musste. Kleine oder unregelmäßige Ausschläge mit geringer Kontraktionskraft konnten von der Messapparatur im Verlauf der Messungen über Nacht erkannt und gemessen werden (Abbildung 5.2). Allerdings war die Kontraktionskraft und Kontraktionsmöglichkeit der EHTs weiterhin so gering, dass die Versuchsansätze beendet wurden. Die EHTs der Gruppen B, D und E wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren.



**Abbildung 5.2:** Analyse der Verkürzung und Versteifung in den Gruppen B, D und E mittels Laktat-Experiment über Nacht. Dargestellt sind Bilder der EHTs der Gruppen B, D und E aus den Messprotokollen der Messapparatur, sowie Bilder der Kontraktionskraftaufnahmen der 60 Sekunden langen Messungen. Es erfolgte eine Messung pro Stunde. Dargestellt ist ein repräsentatives EHT pro Gruppe zum Zeitpunkt der ersten Messung des Experiments (1) und der letzten Messung des Experiments (2). (B1) EHT der Gruppe B zu Beginn des Laktat-Experiments mit sehr schwacher Kontraktionskraft von  $<0,135$  mN. (B2) EHT der Gruppe B am Ende des Laktat-Experiments. Keine Veränderung der EHT-Länge und minimaler Zunahme der Kontraktionskraft. (D1) EHT der Gruppe D zu Beginn des Laktat-Experiments mit sehr schwacher Kontraktionskraft von  $<0,135$  mN. (D2) EHT der Gruppe D am Ende des Laktat-Experiments mit unregelmäßigem Schlagmuster bei unveränderter Kontraktionskraft und unveränderter EHT-Länge. (E1) EHT der Gruppe E zu Beginn des Laktat-Experiments. Keine Kraftausschläge oberhalb des eingestellten Schwellenwertes von  $0,02$  mN messbar. (E2) EHT der Gruppe E am Ende des Laktat-Experiments. Vereinzelt Kraftausschläge oberhalb des eingestellten Schwellenwertes von  $0,02$  mN messbar.

Zusammengefasst zeigte sich kein positiver Effekt durch die Serumzugaben in den Gruppen B, D und E, weshalb auf eine Wiederholung dieser Konditionen in den folgenden Versuchsdurchläufen verzichtet wurde. In den folgenden Versuchsdurchläufen wurden die Konditionen der Gruppe A (Standard-EHT-Medium, Complete) und Gruppe C (Maturierungsmedium ohne Serumzugabe) zur Kultivierung genutzt und verglichen.

Die EHTs der Gruppen A und C wurden insgesamt 41 Tage in ihren jeweiligen Konditionen kultiviert und zeigten eine gute und positive Kraftentwicklung bei Verringerung der Schläge pro Minute im Verlauf der Kulturzeit. Die EHTs der Gruppe C zeigten untereinander eine einheitlichere Entwicklung als die EHTs der Gruppe A, bei denen größere Streuungen zu beobachten waren (Abbildung 5.3). Außerdem nahm die Kraft im späten Kulturverlauf im Maturierungsmedium zu, während es im Standardmedium zu einer Abnahme der Kraft kam.



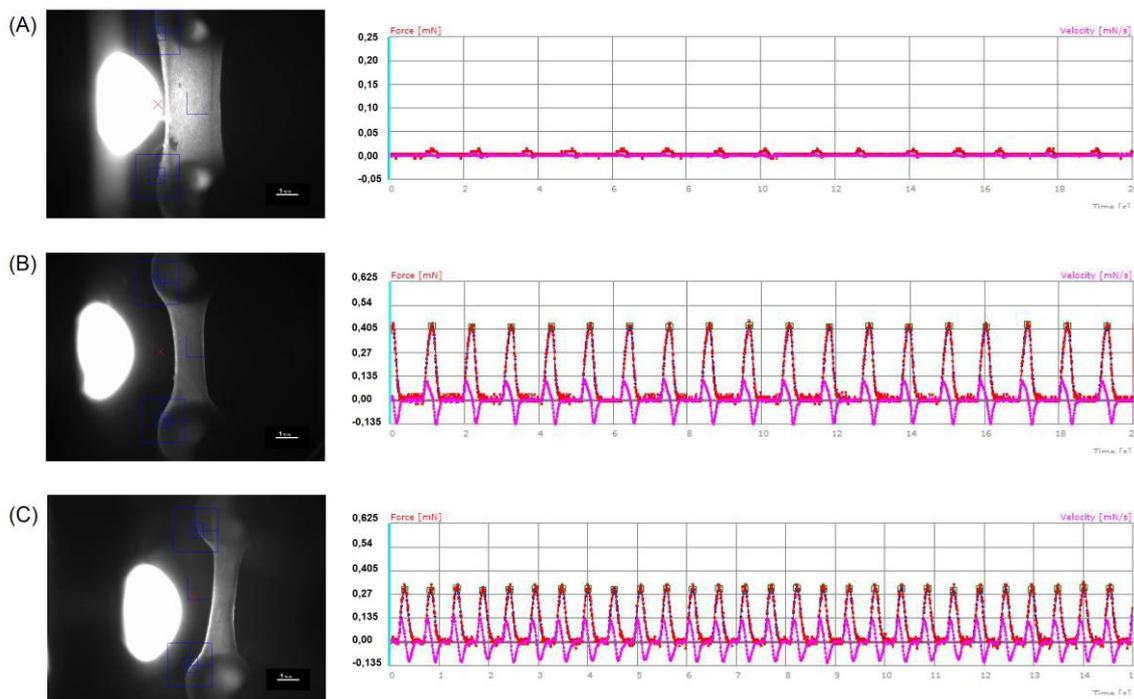
**Abbildung 5.3:** Kontinuierliche Entwicklung der (A) Kraft, sowie (B) Abnahme der Schläge pro Minute (BPM, Beats per minute) der Gruppen A und C der ERC001-EHTs während des Kulturverlaufes. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert der drei EHTs pro Gruppe  $\pm$  SEM. Es erfolgte eine Berechnung der Drei-Tage-Trend-Entwicklung der einzelnen EHTs und folgend die Berechnung des Mittelwertes der EHTs pro Versuchsgruppe. Es erfolgte eine Berechnung der Kulturanfangsphase im Standard-EHT-Medium separat für die jeweiligen EHTs der folgenden Konditionen, sowie eine Berechnung der EHTs in den jeweiligen Konditionen nach dem Randomisieren.

### 5.1.2 Zweiter Versuchsdurchlauf mit ERC018-EHTs

Um zu untersuchen, ob das Maturierungsmedium auch bereits direkt nach dem Gießen eingesetzt werden kann, wurden sieben der ERC018-EHTs direkt nach dem Gießen im Maturierungsmedium kultiviert. Die restlichen ERC018-EHTs ( $n=22$ ) wurden zunächst im Standard-EHT-Medium kultiviert und an Tag vierzehn erfolgte der Wechsel in das Maturierungsmedium für weitere acht EHTs. Das Vorgehen bei dem Randomisieren der ERC018-EHTs erfolgte aus Gründen der Praktikabilität über eine Zuordnung zu den Konditionen je nach Durchschnittskraft der Silikongestellrahmen. So konnte der Wechsel in die unterschiedlichen Medien reihenweise erfolgen.

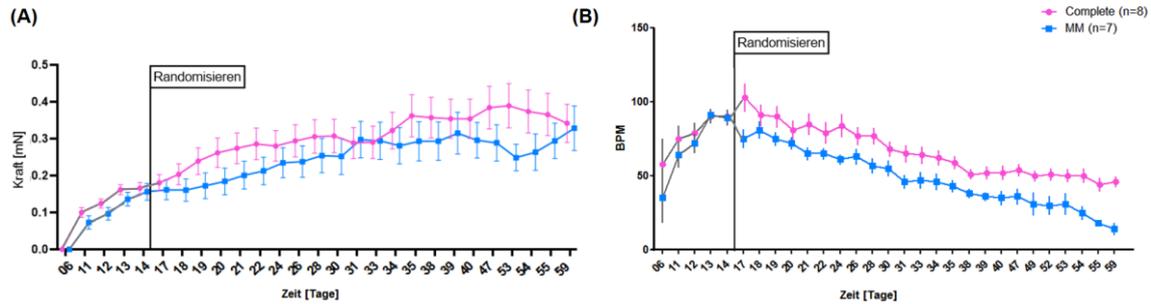
Am Tag 26 wurde der Versuch, EHTs direkt nach dem Gießen im Maturierungsmedium zu kultivieren, beendet, da unter dieser Bedingung keine Umbauprozesse der Gewebe erfolgten. An Tag 26 sahen die EHTs phänotypisch genauso aus wie nach dem Gießen (Abbildung 5.4A). Vereinzelt waren kleine Kontraktionen einzelner Kardiomyozyten im

Gewebekörper zu erkennen, welche allerdings unterhalb des eingestellten Schwellenwertes von 0,02 mN der Messapparatur lagen. Beim Entsorgen war die Konsistenz der EHTs geleeartig und die EHTs konnten wie Tropfen von den Silikongestellrahmen genommen werden. Die Versuche zeigten eindrücklich, dass Serum für die initiale EHT-Entwicklung notwendig war. Erst nach einer Formationsphase der EHTs ging ein Wechsel auf das Maturierungsmedium mit einer guten Kraftentwicklung einher (Abbildung 5.4B).



**Abbildung 5.4:** Vergleich repräsentativer ERC018-EHTs für die EHT-Entwicklung an Kulturtag 24 in den verschiedenen Kulturbedingungen. (A) EHT direkt nach dem Gießen im Maturierungsmedium kultiviert. Keine Umbauprozesse im Gewebekörper und keine Kraftentwicklung waren erkennbar. (B) EHT ab Tag 14 im Maturierungsmedium kultiviert. Umbauprozesse zu schlankem Gewebekörper erkennbar und Kontraktionskraft messbar. (C) EHT kultiviert im Standard-EHT-Medium. Umbauprozesse zu schlankem Gewebekörper erkennbar und Kontraktionskraft messbar.

Die EHTs der Gruppen A und C wurden insgesamt 45 Tage in ihren jeweiligen Medien kultiviert und zeigten eine gute und positive Kraftentwicklung bei Verringerung der Schläge pro Minute im Verlauf der Kulturzeit. Manche EHTs der Gruppe C schlugen zum Ende der Kulturzeit nur noch ein bis zweimal in der Minute spontan, während EHTs der Gruppe A zwar langsamer als zu Beginn der Kultur schlugen, aber immer noch eine mittlere Frequenz von 47 Schläge pro Minute entwickelten (Abbildung 5.5).

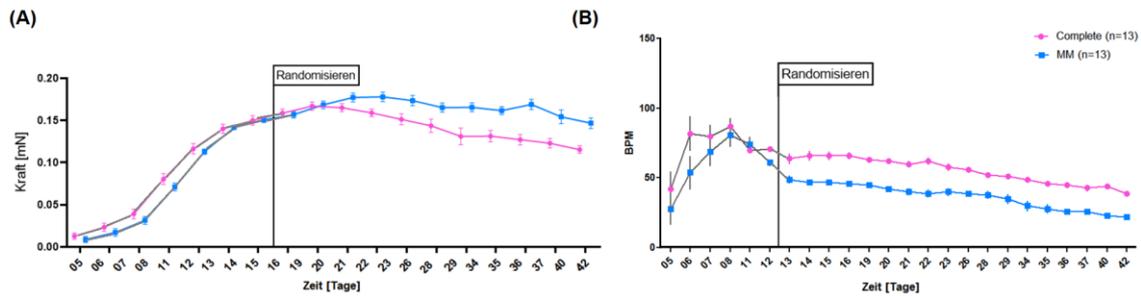


**Abbildung 5.5:** Kontinuierliche Entwicklung der (A) Kraft, sowie (B) Abnahme der Schläge pro Minute (BPM, Beats per minute) der Gruppen A und C der ERC018-EHTs während des Kulturverlaufes. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert der EHTs pro Gruppe  $\pm$  SEM. Es erfolgte eine Berechnung der Drei-Tage-Trend-Entwicklung der einzelnen EHTs und folgend die Berechnung des Mittelwertes der EHTs pro Gruppe. Es erfolgte eine Berechnung der Kulturanfangsphase im Standard-EHT-Medium separat für die jeweiligen EHTs der folgenden Konditionen, sowie eine Berechnung der EHTs in den jeweiligen Konditionen nach dem Randomisieren.

### 5.1.3 Dritter Versuchsdurchlauf mit ERC001-EHTs

Im dritten Versuchsdurchlauf remodellierten die EHTs sehr schnell und wurden sehr dünn. Dies beeinträchtigte das äußere Erscheinungsbild und bedingte die insgesamt kürzere Kulturzeit. Am Tag zwölf erfolgte vor dem Mediumwechsel das Randomisieren der ERC001-EHTs (n= 37) nach erneuter Messung der Ausgangslage. Das Vorgehen beim Randomisieren erfolgte wie bei den ERC018-EHTs über eine reihenweise Zuordnung je nach Durchschnittskraft der Silikongestellrahmen. Nach dem Randomisieren erfolgte der Wechsel in das Maturierungsmedium für dreizehn EHTs. Der Wechsel der Kulturmedien erfolgte jeweils in den gleichen Abständen, wie in den anderen beiden Versuchsdurchläufen.

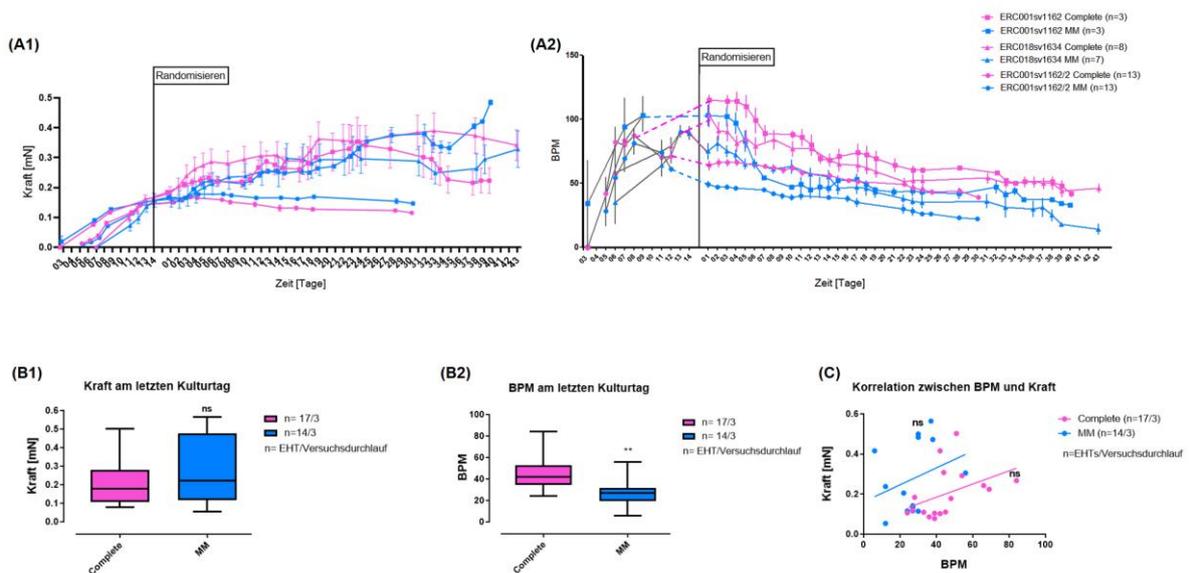
Die EHTs der Gruppen A und C wurden insgesamt 30 Tage in ihren jeweiligen Medien kultiviert und zeigten eine gute und positive Kraftentwicklung bei Verringerung der Schläge pro Minute während der Kulturzeit (Abbildung 5.6).



**Abbildung 5.6:** Kontinuierliche Entwicklung der (A) Kraft, sowie (B) Abnahme der Schläge pro Minute (BPM, Beats per minute) der Gruppen A und C der ERC001-EHTs während des Kulturverlaufes. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert der EHTs pro Gruppe  $\pm$  SEM. Es erfolgte eine Berechnung der Drei-Tage-Trend-Entwicklung der einzelnen EHTs und folgend die Berechnung des Mittelwertes der EHTs pro Gruppe. Es erfolgte eine Berechnung der Kulturanfangsphase im EHT-Standard-Medium separat für die jeweiligen EHTs der folgenden Konditionen, sowie eine Berechnung der EHTs in den jeweiligen Konditionen nach dem Randomisieren.

### 5.1.4 Zusammenfassung der drei Versuchsdurchläufe

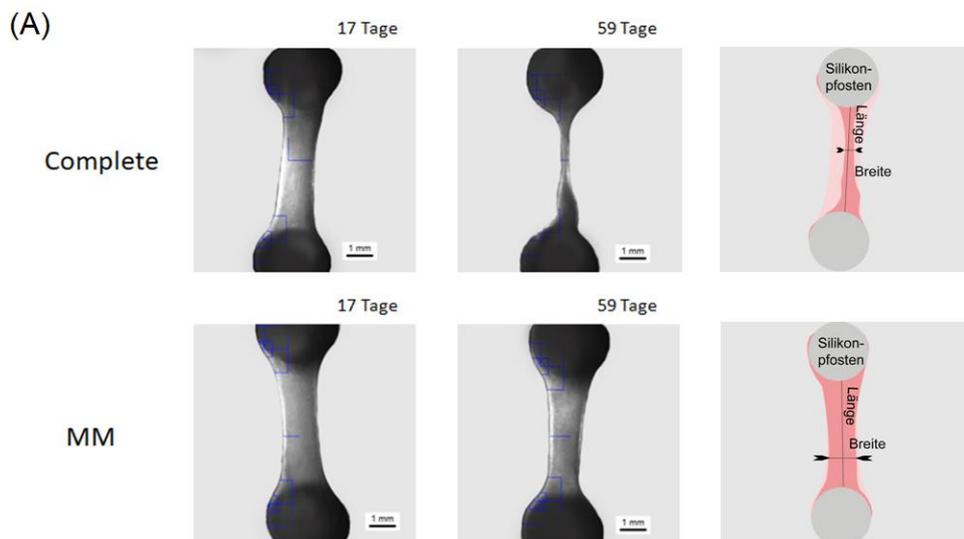
Die EHTs beider Versuchsgruppen zeigten in allen Versuchsdurchläufen eine stetige Kraftentwicklung im Verlauf der Kultur, während die Schlagfrequenz abnahm (Abbildung 5.7 A1 und A2). Es bestand keine Korrelation zwischen der Kraft und der Frequenz der EHTs (Abbildung 5.7C). Die EHTs der Gruppe C schlugen am letzten Tag der Kultur signifikant langsamer als die EHTs der Gruppe A (\*\* $p < 0,001$ , ungepaarter t-Test, Abbildung 5.7 B2). Die Kraftentwicklung der beiden Gruppen unterschied sich nicht signifikant (Abbildung 5.7 B1).

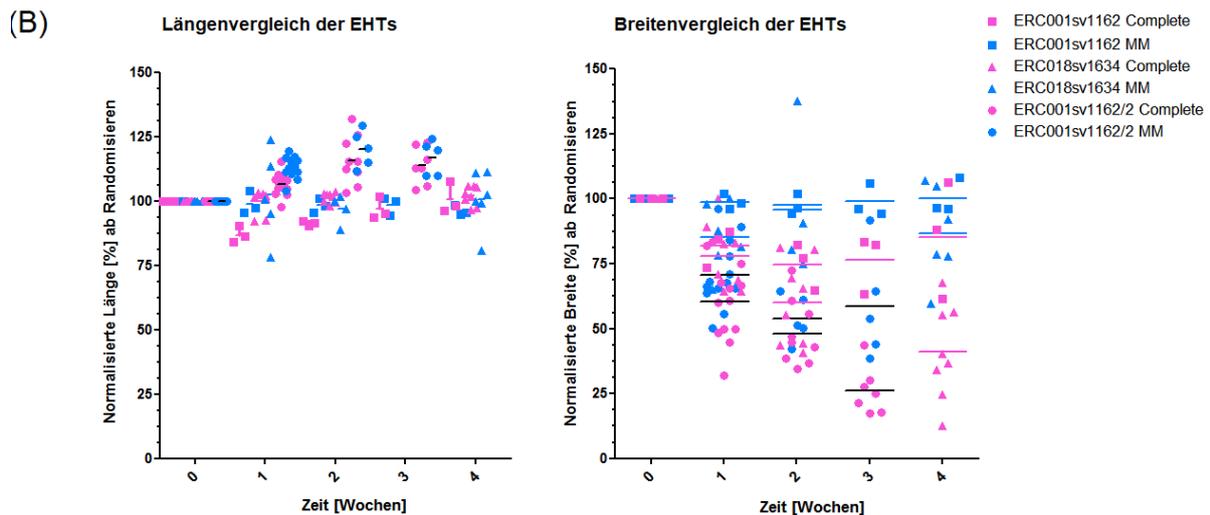


**Abbildung 5.7:** (A1) Zusammenstellung der Kraftentwicklung der drei Versuchsdurchläufe, sowie (A2) Abnahme der Schläge pro Minute (BPM, Beats per minute) der drei Versuchsdurchläufe mit berechnetem Mittelwert des Drei-Tage-Trends  $\pm$  SEM. (B1) Vergleich der Konditionen bezogen auf Kraft und (B2) Schläge pro Minute am letzten Tag der Kultur mit Ergebnis des *Student's t-Tests* (\*\* $p < 0,001$ ). (C) Es ergab sich keine Korrelation von Kraft und Schläge pro Minute im Vergleich der beiden Konditionen in den drei Versuchsdurchläufen ( $n = \text{EHT/Versuchsdurchlauf}$ ).

## 5.2 Längen- und Breitenverhältnisse im Verlauf der Kulturzeit

Um die Umbauprozesse der EHTs zu vergleichen, wurden Längen und Breiten der EHTs im Verlauf der Kulturzeit analysiert und mittels ImageJ ausgemessen. Die Länge der EHTs blieb im Verlauf der Kulturzeit nahezu unverändert. Die Breite der EHTs veränderte sich im Verlauf der Kulturzeit (Abbildung 5.8B). Die EHTs im Standard-EHT-Medium veränderten sich stärker und wurden zum Ende der Kulturzeit sehr schmal. Des Weiteren waren die Gewebe im Standard-EHT-Medium instabiler. In einigen Fällen bekamen die EHTs der Gruppe A Löcher, zerrissen oder lösten sich von den Silikonpfosten der Silikongestellrahmen ab (Abbildung 5.8A). Die EHTs im Maturierungsmedium veränderten sich während der Kulturzeit optisch kaum. Die EHTs im Maturierungsmedium waren stabiler im Zeitverlauf der Kultur und zeigten nur eine geringe Abnahme der Gewebebreite (Abbildung 5.8A).





**Abbildung 5.8:** Breitenveränderungen der EHTs bei unveränderten EHT-Längen während der Kulturzeit. (A) Vergleich der EHT-Erscheinung zwischen Anfang und Ende der Kulturzeit und Vergleich der beiden Konditionen. Gewählt wurden repräsentative Bilder von ERC018-EHTs. Außerdem wird eine schematische Darstellung der optischen Veränderung mit gleichzeitiger Erklärung der Bildinhalte gezeigt. (B) Graphische Auswertung der Längen und Breiten der EHTs der drei Versuchsdurchläufe während des Kulturverlaufs. Der Ausgangsmesswert, zum Zeitpunkt des Randomisierens, jedes einzelnen EHTs wurde gleich 100% gesetzt.

### 5.3 Funktionelle Analysen der EHTs

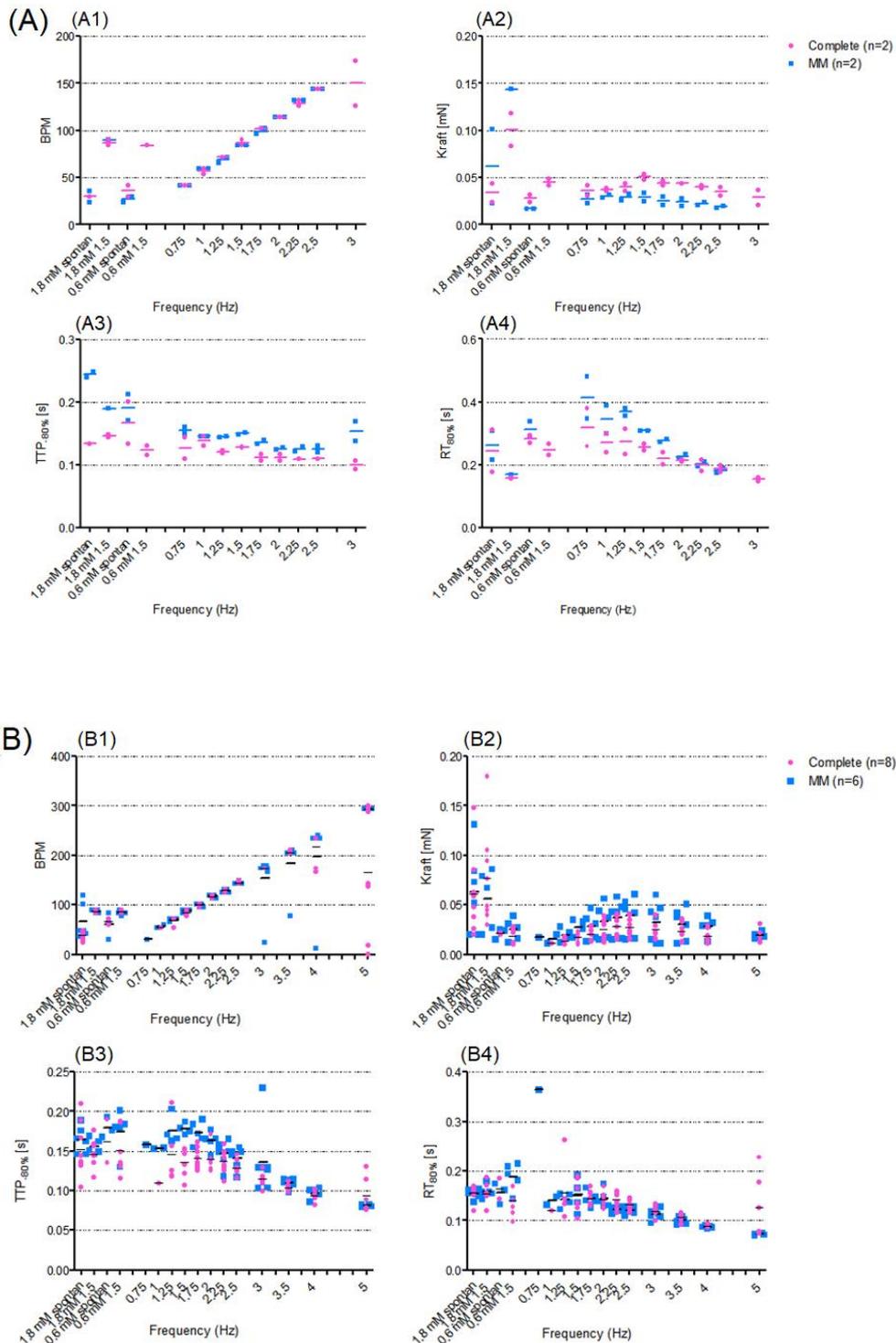
Um physiologische Reaktionen auf äußere Einflüsse abzufragen und zu vergleichen, wurden funktionelle Experimente mit den EHTs durchgeführt. In die Analysen der funktionellen Experimente wurden nur die EHTs in die Auswertung einbezogen, die der elektrischen Stimulation mit der entsprechenden Frequenz folgten. Die Kraft-Frequenz-Beziehung wurde vor der Wirkung von Isoprenalin und Carbachol getestet, um eine Verfälschung durch die Wirkstoffe zu vermeiden.

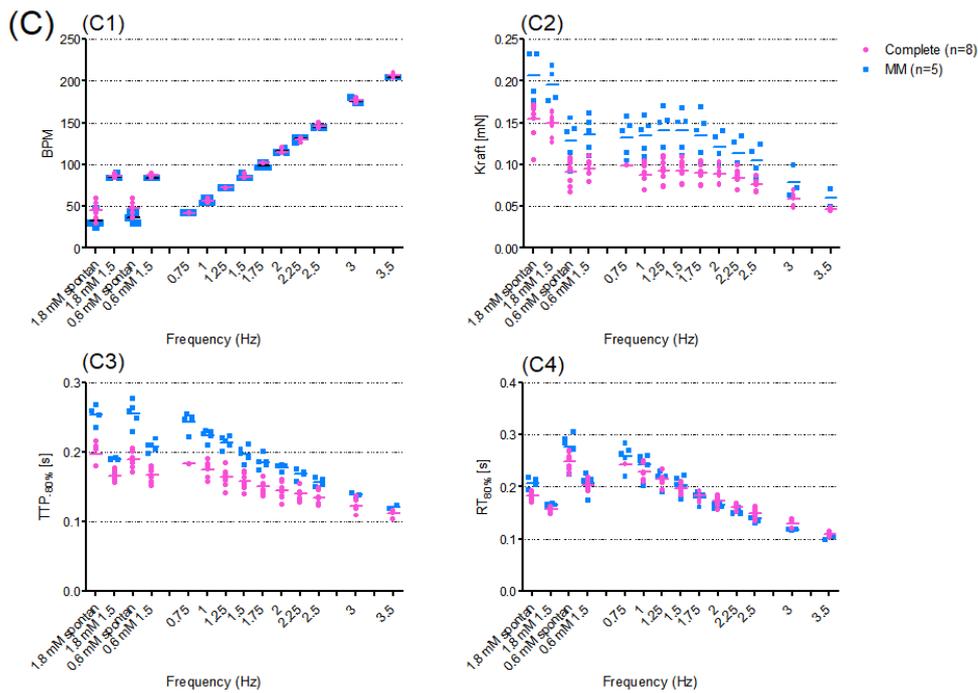
#### 5.3.1 Kraft-Frequenz-Beziehung

Die EHTs beider Versuchsgruppen zeigten in allen Versuchsdurchläufen eine gleiche Tendenz und positive Antwort auf die elektrische Stimulation. In allen Versuchsdurchläufen war zwischen 0,75 und ~1,5 Hz ein positiv-inotroper Effekt zu erkennen, der folgend in einen negativ-inotropen Effekt bei höher werdender Frequenz umschlug (Abbildungen 5.9 A2, B2 und C2).

Die ERC001-EHTs des ersten Versuchsdurchlaufes (Abbildungen 5.9 A1 - A4) der Gruppe A waren bis 3 Hz zu stimulieren. Die ERC001-EHTs der Gruppe C waren bis 2,5

Hz zu stimulieren. Die ERC018-EHTs (Abbildungen 5.9 B1 - B4) waren im Vergleich zu den ERC001-EHTs in der Tyrodelösung mit geringer Calciumkonzentration insgesamt schwächer. Beide Gruppen folgten der elektrischen Stimulation bis 5 Hz. Beide Gruppen der ERC001-EHTs aus dem dritten Versuchsdurchlauf (Abbildungen 5.9 C1 - C4) folgten der Stimulation bis 3,5 Hz. Die EHTs der Gruppe C zeigten eine stärkere Kontraktionskraft.

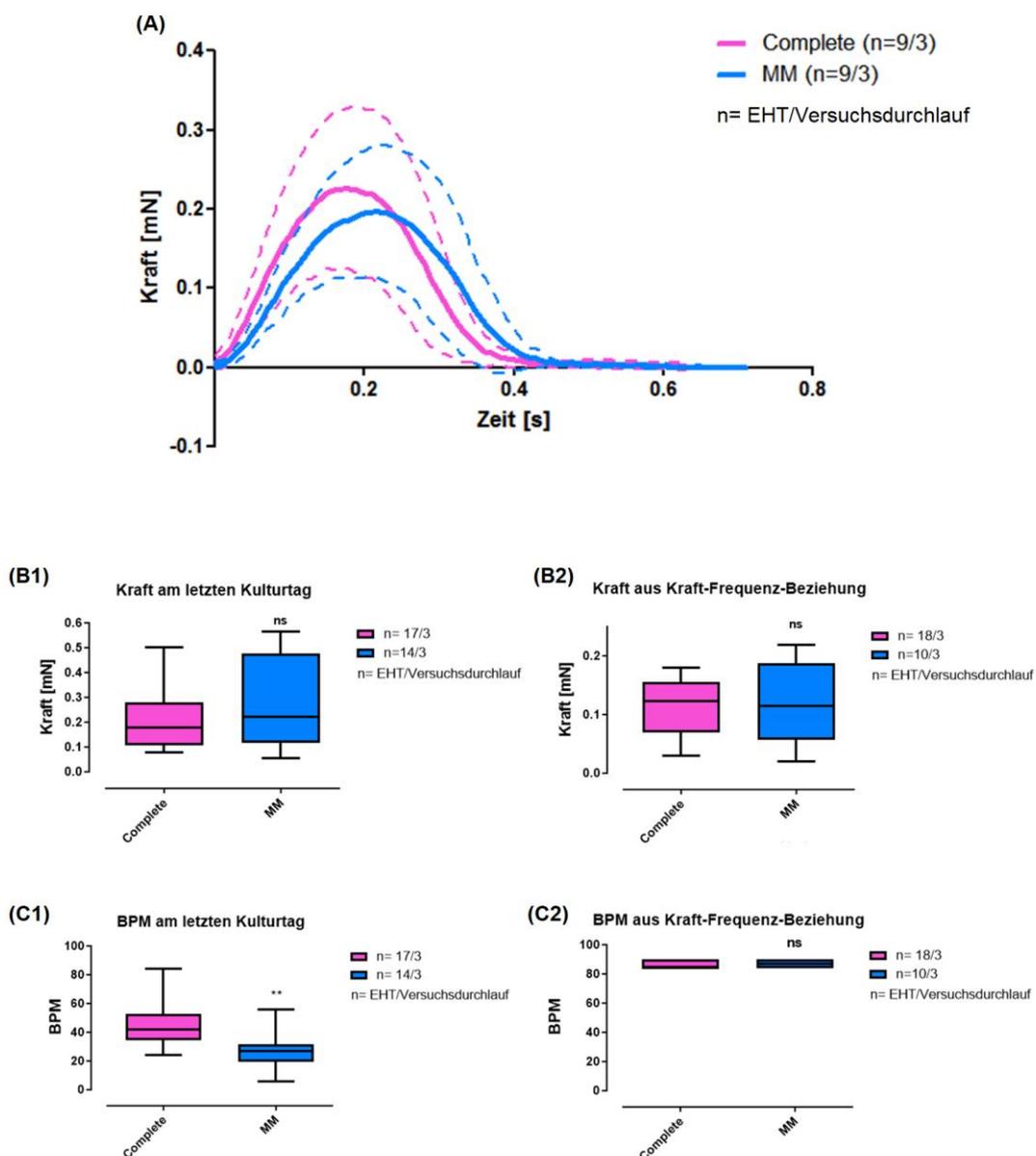


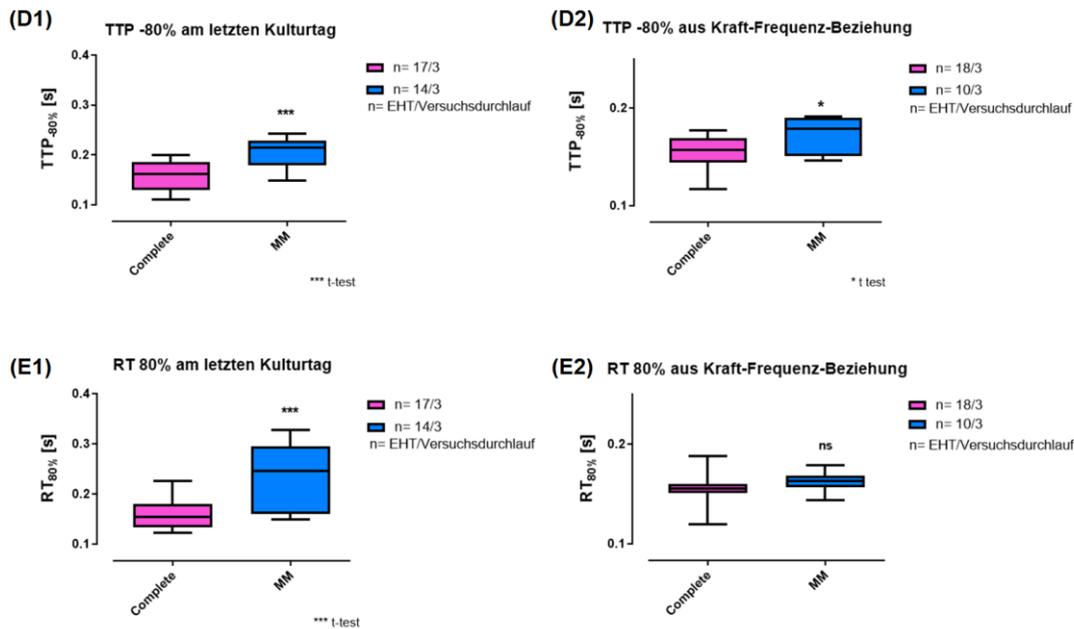


**Abbildung 5.9:** (A) Ergebnisse der Kraft-Frequenz-Beziehung der ERC001-EHTs des ersten Versuchsdurchlaufes. (A1 - A4) zeigen Ergebnisse der Schläge pro Minute (1, BPM, Beats per minute), der Kraft (2), der Aufstrichgeschwindigkeit (3) und der Relaxationszeit (4) im Verhältnis zu den geforderten und erreichten Frequenzen. (B) Ergebnisse der Kraft-Frequenz-Beziehung der ERC018-EHTs. (B1 - B4) zeigen Ergebnisse der Schläge pro Minute (1), der Kraft (2), der Aufstrichgeschwindigkeit (3) und der Relaxationszeit (4) im Verhältnis zu den geforderten und erreichten Frequenzen. (C) Ergebnisse der Kraft-Frequenz-Beziehung der ERC001-EHTs des dritten Versuchsdurchlaufes. (C1 - C4) zeigen Ergebnisse der Schläge pro Minute (1), der Kraft (2), der Aufstrichgeschwindigkeit (3) und der Relaxationszeit (4) im Verhältnis zu den geforderten und erreichten Frequenzen.

Gemittelte Kontraktionskurven (Abbildung 5.10A), aus Daten der Ausgangslagemessung aller Experimente der Kraft-Frequenz-Beziehung in 1,8 mM Calcium-haltiger Tyrodelösung unter elektrischer Stimulation von 1,5 Hz, zeigten, dass die EHTs aus der Gruppe C eine längere Zeit für den Aufstrich bis zu ihrem Kraftmaximum (*time-to-peak*, TTP) benötigten. Aufgrund dieser Beobachtung erfolgte ein Vergleich zwischen spontanen Kontraktionen am letzten Tag der Kultur (Abbildungen 5.10 B1, C1, D1 und E1) mit elektrisch stimulierten Kontraktionskurven aus den Experimenten der Kraft-Frequenz-Beziehung (Abbildungen 5.10 B2, C2, D2 und E2). In diesen Vergleich wurden alle EHTs der drei Versuchsdurchläufe einbezogen. Dabei bestätigte sich eine längere TTP -80% von EHTs im Maturierungsmedium, sowohl bei spontaner Kontraktion (\*\* $p < 0,001$ , Abbildung D1) als auch unter elektrischer Stimulation ( $p < 0,05$ , Abbildung 5.10 D2). Auch die Relaxationszeit RT 80% war bei spontan schlagenden EHTs im Maturierungsmedium länger als bei den EHTs der Standard-EHT-Kultur (\*\* $p < 0,001$ ,

Abbildung 5.10 E1). Dieser Befund war unter elektrischer Stimulation, das heißt gleicher Schlagfrequenz, nicht mehr zu beobachten (Abbildung 5.10 E2). Die EHTs der beiden Konditionen wiesen unter elektrischer Stimulation insgesamt weniger Unterschiede zueinander auf. Dies gilt vor allem, wie so eben beschrieben, für TTP -80%, RT 80% und weiterhin für die Schlagfrequenz pro Minute. Des Weiteren unterstützen diese Beobachtungen und Berechnungen die Aussage, dass die EHTs im Maturierungsmedium spontan langsamer schlugen, der elektrischen Stimulation jedoch weiterhin folgten und sich den geforderten Schlagfrequenzen anpassen konnten.



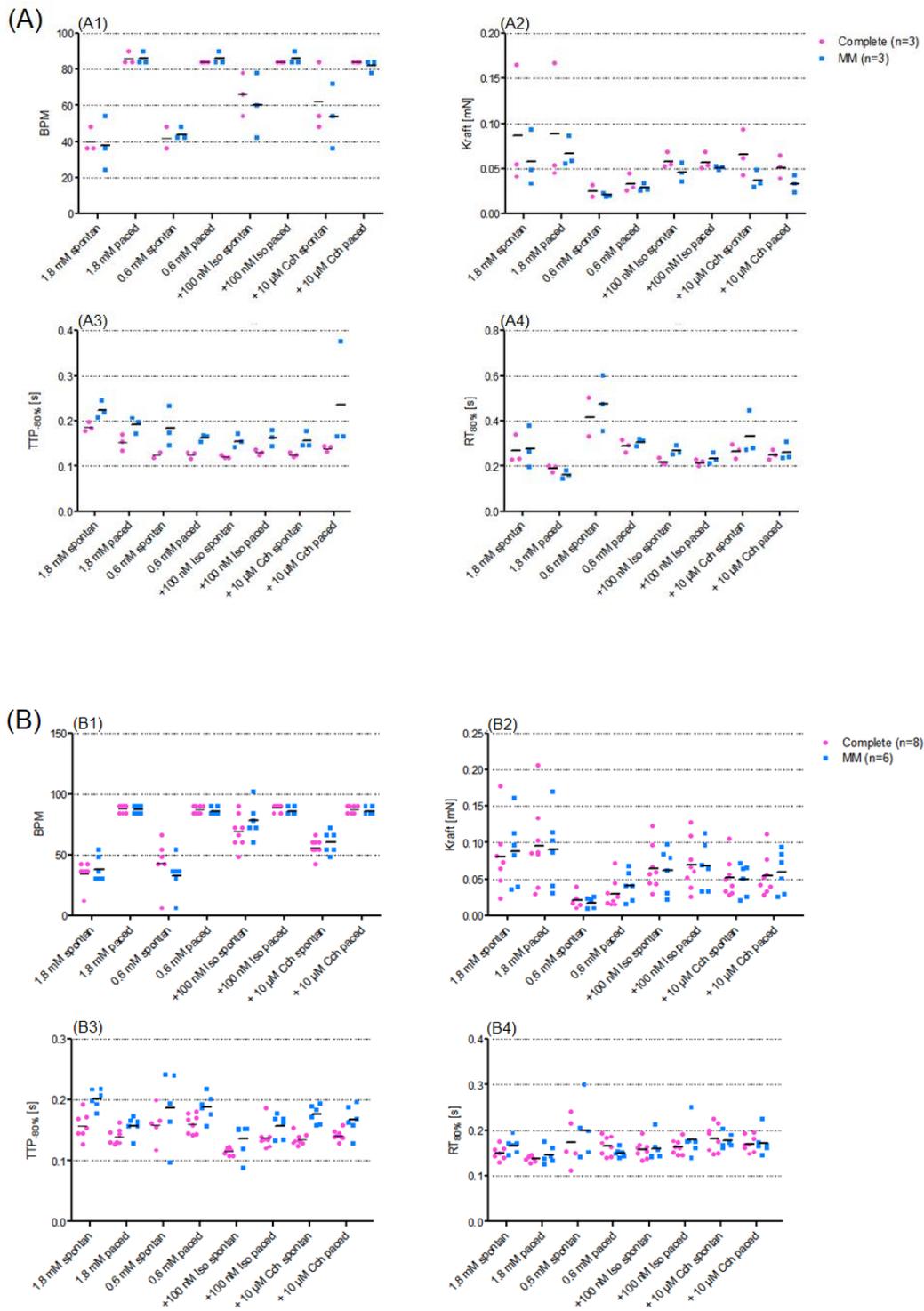


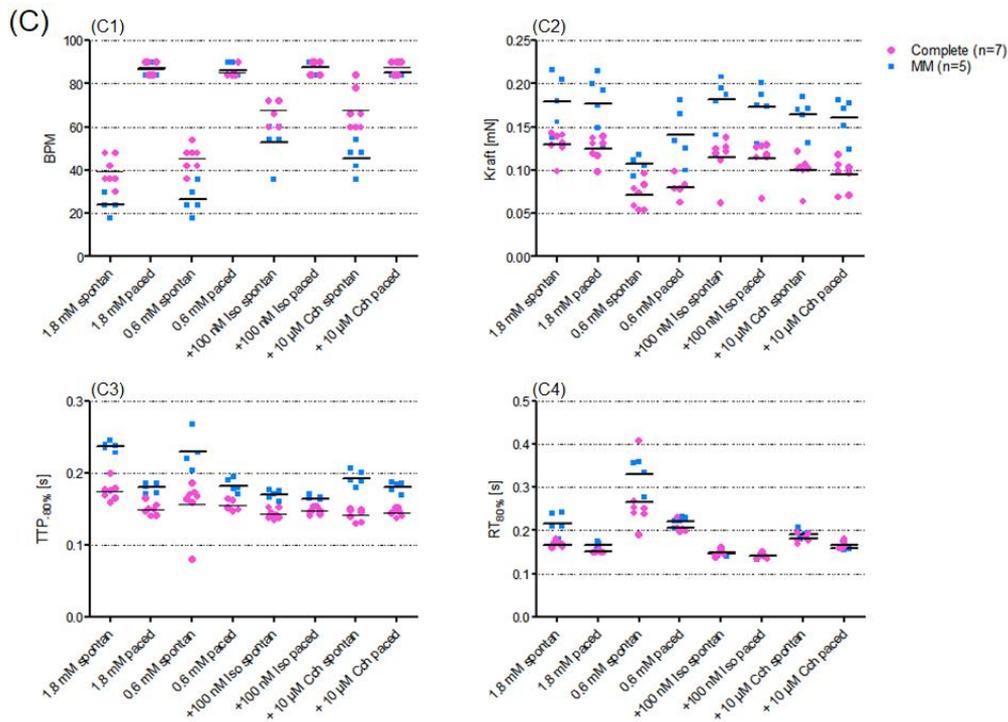
**Abbildung 5.10:** Vergleich der beiden Konditionen unter normalen Kulturbedingungen am letzten Tag der Kultur und unter elektrischer Stimulation von 1,5 Hz während dem Experiment der Kraft-Frequenz-Beziehung. (A) Kontraktionskurven von je drei EHTs der drei Versuchsdurchläufe (n=EHT/Versuchsdurchlauf), dargestellt als Mittelwert (durchgezogene Linien)  $\pm$  SD (gestrichelte Linien). (B1) Kraft am letzten Tag der Kultur. (B2) Kraftwerte aus dem Experiment der Kraft-Frequenz-Beziehung unter elektrischer Stimulation von 1,5 Hz. (C1) Schläge pro Minute (BPM) am letzten Tag der Kultur. (C2) Schläge pro Minute der EHTs im Experiment der Kraft-Frequenz-Beziehung unter elektrischer Stimulation von 1,5 Hz. (D1) TTP -80% am letzten Tag der Kultur. (D2) TTP -80% aus dem Experiment der Kraft-Frequenz-Beziehung unter elektrischer Stimulation von 1,5 Hz. (E1) RT 80% Vergleich am letzten Tag der Kultur. (E2) RT 80% aus dem Experiment der Kraft-Frequenz-Beziehung unter elektrischer Stimulation von 1,5 Hz. Die einzelnen Graphen sind jeweils dargestellt mit dem Ergebnis des *Student's t-Test*.

### 5.3.2 Wirkung von Isoprenalin und Carbachol

Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse fand dieser Versuch unter elektrischer Stimulation für alle EHTs aller Versuchsdurchläufe bei 1,5 Hz statt. Die EHTs beider Versuchsgruppen zeigten in allen Versuchsdurchläufen eine gleiche und positive Antwort auf Isoprenalin und Carbachol (Abbildungen 5.11 A - C). Die EHTs reagierten erwartungsgemäß mit einer Kraftzunahme unter Isoprenalinzugabe und einer Kraftabnahme unter Carbacholzugabe (Abbildungen 5.11 A2, B2 und C2). Die ERC018-EHTs (Abbildungen 5.11 B1 - B4) verhielten sich qualitativ wie ERC001-EHTs (Abbildungen 5.11 A1 - A4 und C1 - C4), waren aber insgesamt schwächer in der Tyrodelösung mit geringer Calciumkonzentration.

Die EHTs der beiden Konditionen wiesen unter elektrischer Stimulation weniger Unterschiede auf. Dies wurde in diesem Experiment vor allem bei Betrachtung der Schlagfrequenz pro Minute deutlich (Abbildungen 5.11 A1, B1 und C1).





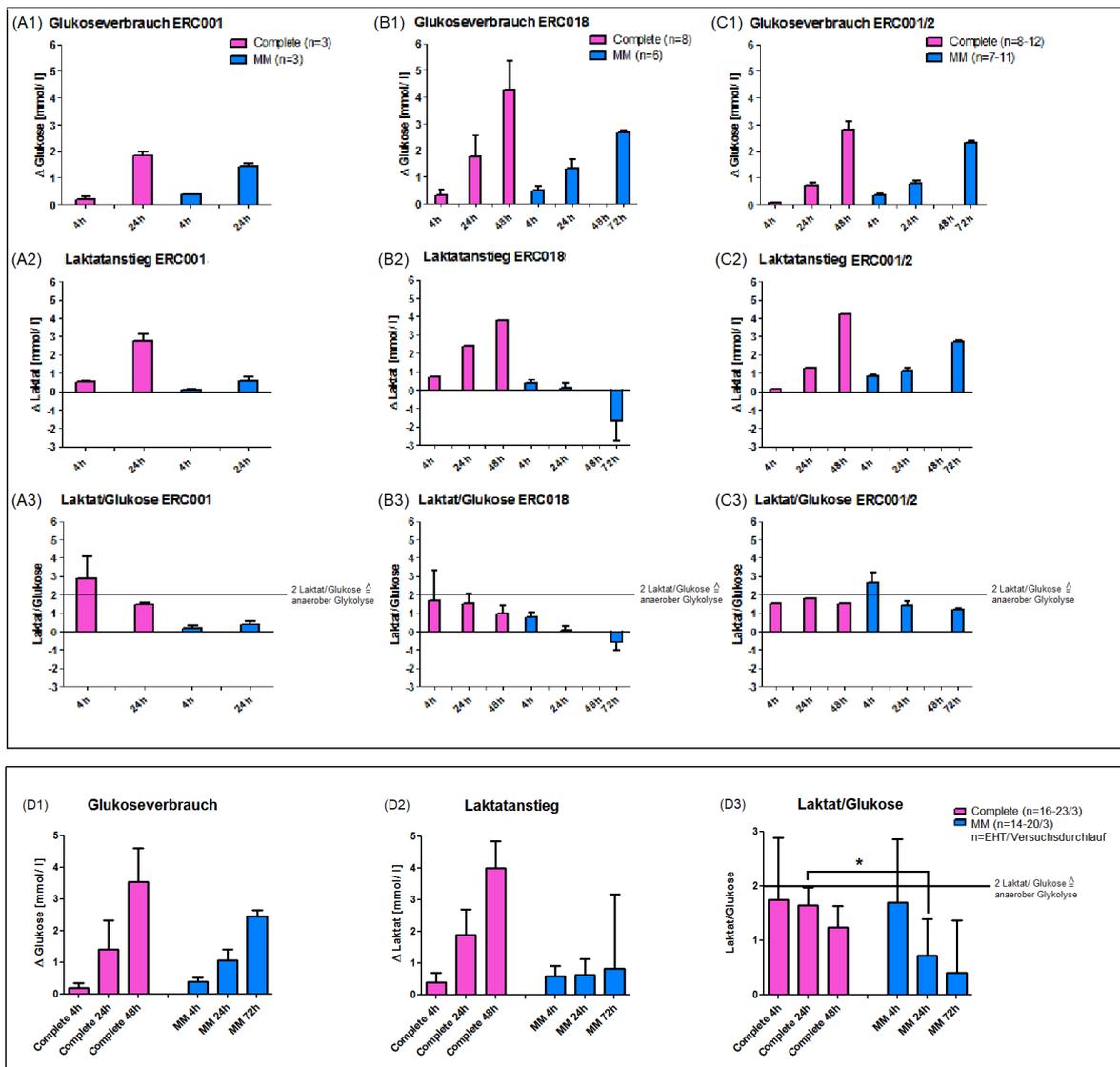
**Abbildung 5.11:** (A) Isoprenalin-Carbachol-Wirkung auf die ERC001-EHTs des ersten Versuchsdurchlaufes. (A1 - A4) zeigen Ergebnisse der Schläge pro Minute (1, BPM, Beats per minute), der Kraft (2), der Aufstrichgeschwindigkeit (3) und der Relaxationszeit (4) im Verhältnis zu den zugegebenen Medikamenten bei einer Frequenz von 1,5 Hz. (B) Isoprenalin-Carbachol-Wirkung auf die ERC018-EHTs. (B1 - B4) zeigen Ergebnisse der Schläge pro Minute (1), der Kraft (2), der Aufstrichgeschwindigkeit (3) und der Relaxationszeit (4) im Verhältnis zu den zugegebenen Medikamenten bei einer Frequenz von 1,5 Hz. (C) Isoprenalin-Carbachol-Wirkung auf die ERC001-EHTs des dritten Versuchsdurchlaufes. (C1 - C4) zeigen Ergebnisse der Schläge pro Minute (1), der Kraft (2), der Aufstrichgeschwindigkeit (3) und der Relaxationszeit (4) im Verhältnis zu den zugegebenen Medikamenten bei einer Frequenz von 1,5 Hz.

## 5.4 Metabolismus der EHTs

Das Mercola Labor berichtete, dass in ihrem Medium, mit einer initialen Glukosekonzentration von 3 mmol/l, die Glukose nach 24 Stunden aufgebraucht sei. Laut Protokoll aus Stanford erfolge ein Mediumwechsel alle vier Tage. Damit entsteht ein etwa dreitägiger Glukoseentzug, der die Maturierung der hiPSC-Kardiomyozyten verbessern soll, da diese gezwungen werden andere Substrate, wie Laktat und Fettsäuren, oxidativ zu verstoffwechseln. Für die Metabolismusanalyse der EHTs erfolgte eine Abnahme der Medien nach vier Stunden, nach vierundzwanzig Stunden und vor dem nächsten Wechsel des Mediums. Der Wechsel des Standard-EHT-Mediums stand nach 48 Stunden an. Das Maturierungsmedium wurde frühestens alle 72 Stunden gewechselt.

Des Weiteren erfolgte eine Analyse der Ausgangslage der Medien für die Berechnungen und Auswertungen. Die Analyse mit dem Blutgasanalysegerät Radiometer ABL90 SERIE (Radiometer GmbH) ergab für das Standard-EHT-Medium eine Glukose-Ausgangskonzentration von 4,8 mmol/l und eine Laktat-Ausgangskonzentration von 0,5 mmol/l. Für das Maturierungsmedium ergaben sich eine Glukose-Ausgangskonzentration von 2,7 mmol/l und eine Laktat-Ausgangskonzentration von 7,6 mmol/l.

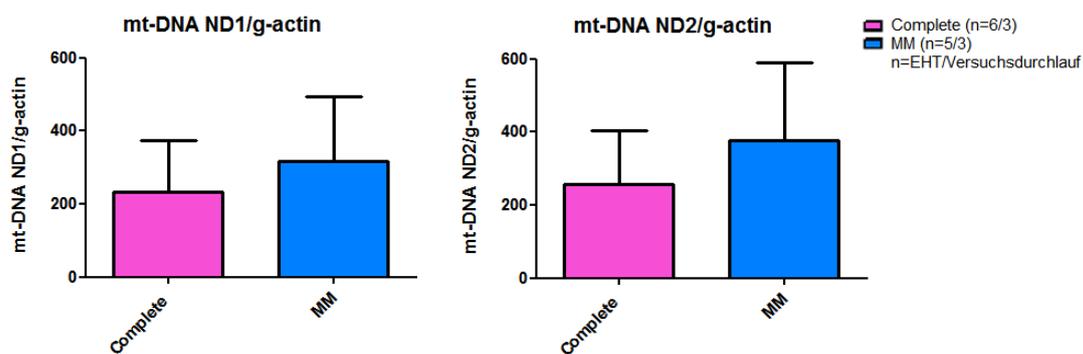
Vier Stunden nach dem Mediumwechsel war in beiden Gruppen nur wenig Glukose von der Ausgangskonzentration verbraucht bei geringem Anstieg der Laktatkonzentrationen (Abbildungen 5.12 D1 - D3). Im Verhältnis entstanden in beiden Gruppen nahezu zwei Laktat pro Glukosemolekül. Nach 24 Stunden war im Maturierungsmedium noch 1,6 mmol/l Glukose (minus 1,1 mmol/l gegenüber der Ausgangslage) und im Standard-EHT-Medium noch 3,55 mmol/l Glukose (minus 1,25 mmol/l gegenüber der Ausgangslage) vorhanden. Das bedeutet, dass der Glukoseverbrauch in beiden Gruppen in den ersten 24 Stunden sehr ähnlich war. Initial verbrauchten beide Gruppen Glukose unter Anstieg der Laktatkonzentration. Im Verlauf der Kultur erfolgte bei den EHTs der Gruppe C ein geringerer Anstieg der Laktatkonzentration. Der Anstieg der Laktatkonzentration im Standard-EHT-Medium blieb im Verhältnis von Glukoseverbrauch zu Laktatanstieg bei fast zwei. Das Verhältnis zwischen Glukoseverbrauch zu Laktatanstieg wurde in Gruppe C kleiner zwei (Abbildungen 5.12 D1 - D3). Das Verhältnis von Laktatanstieg zu Glukoseverbrauch war 24 Stunden nach Mediumwechsel signifikant geringer für die EHTs im Maturierungsmedium im Vergleich zur Standard-EHT-Kultur (\* $p < 0,05$ , Abbildung 5.12 D3). Vor dem Wechsel des Mediums war nahezu die gesamte Glukose verbraucht. Im Standard-EHT-Medium war nach 48 Stunden die Glukose nahezu vollständig verbraucht und die Laktatkonzentration stark angestiegen. Das Verhältnis zwischen Glukoseverbrauch und Laktatanstieg wurde etwas kleiner im Vergleich zu dem Verhältnis nach 24 Stunden (Abbildungen 5.12 D1 - D3). Im Maturierungsmedium war die Glukose nach 72 Stunden ebenfalls nahezu vollständig verbraucht. Die Laktatkonzentration war gering angestiegen und wies eine hohe Streuung auf. Bei Einzelbetrachtung der Versuchsdurchläufe wiesen die ERC018-EHTs einen negativen Laktatanstieg (Abbildung 5.12 B2) und die ERC001-EHTs des dritten Versuchsdurchlaufes einen positiven Laktatanstieg (Abbildung 5.12 C2) auf. Das Verhältnis zwischen Glukoseverbrauch und Laktatanstieg wurde insgesamt kleiner, wies jedoch ebenfalls eine hohe Streuung auf. Bei Einzelbetrachtung der Versuchsdurchläufe wiesen die ERC018-EHTs ein Verhältnis von Laktatanstieg zu Glukoseverbrauch im negativen Bereich auf (Abbildung 5.12 B3). Die ERC001-EHTs des dritten Versuchsdurchlaufes wiesen ein Verhältnis von Laktatanstieg zu Glukoseverbrauch im positiven Bereich auf (Abbildung 5.12 C3).



**Abbildung 5.12:** (A) Metabolismusanalyse der ERC001-EHTs des ersten Versuchsdurchlaufes. (B) Metabolismusanalyse der ERC018-EHTs des zweiten Versuchsdurchlaufes. (C) Metabolismusanalyse der ERC001-EHTs des dritten Versuchsdurchlaufes. (A1 – C1) Vergleich des Glukoseverbrauches der EHTs in den verschiedenen Konditionen zu den Zeitpunkten der Mediumabnahmen. (A2 – C2) Vergleich des Laktatanstiegs der EHTs in den verschiedenen Konditionen zu den Zeitpunkten der Mediumabnahmen. (A3 – C3) Verhältnis von Glukoseverbrauch zu Laktatanstieg zu den Zeitpunkten der Mediumabnahmen. (D) Ergebnisse der drei Versuchsdurchläufe beider Konditionen im Durchschnitt. (D1) Vergleich des Glukoseverbrauches der drei Versuchsdurchläufe in den verschiedenen Konditionen zu den Zeitpunkten der Mediumabnahmen. (D2) Vergleich des Laktatanstiegs der drei Versuchsdurchläufe in den verschiedenen Konditionen zu den Zeitpunkten der Mediumabnahmen. (D3) Verhältnis von Glukoseverbrauch zu Laktatanstieg zu den Zeitpunkten der Mediumabnahmen. Für den Zeitpunkt von 24 Stunden nach Mediumwechsel ergab sich ein signifikanter Unterschied von weniger Laktatanstieg pro Glukoseverbrauch im Maturierungsmedium (\* $p < 0,05$ ).

Um der Tendenz der verminderten Neigung zur anaeroben Glykolyse und damit verbesserter oxidativer Kapazität für Stoffwechselprozesse in Gruppe C nachzugehen,

wurden die Auswertungen der DNA-Analysen herangezogen. Die Verhältnisse der mitochondrialen Gene NADH-Dehydrogenase 1 (ND1) und NADH-Dehydrogenase 2 (ND2) zu g-actin waren in beiden Gruppen gleich mit einer nicht-signifikanten Tendenz zu mehr mitochondrialer DNA in Gruppe C (Abbildung 5.13).



**Abbildung 5.13:** Quantitative PCR zur Analyse des Verhältnisses des mitochondrialen DNA-Gehaltes von NADH-Dehydrogenase 1 (ND1) und NADH-Dehydrogenase 2 (ND2) zu g-actin. Es konnte kein signifikant veränderter mitochondrialer DNA-Gehalt festgestellt werden (n=EHT/Versuchsdurchlauf).

## 5.5 Histologie

### 5.5.1 Immunhistochemie

Um die Morphologie der EHTs zu analysieren, wurden die Versuchsdurchläufe einzeln und jeweils am Ende der Kulturzeit immunhistochemisch untersucht (Abbildungen 5.14 1 und 2 und 5.15 1 und 2). Zusätzlich wurden zum Vergleich der Ausgangslage direkt nach dem Gießen der ERC001-EHTs des zweiten Versuchsdurchlaufs EHTs fixiert (Abbildung 5.14 1.0 und 2.0 und 5.15 1.0 und 2.0).

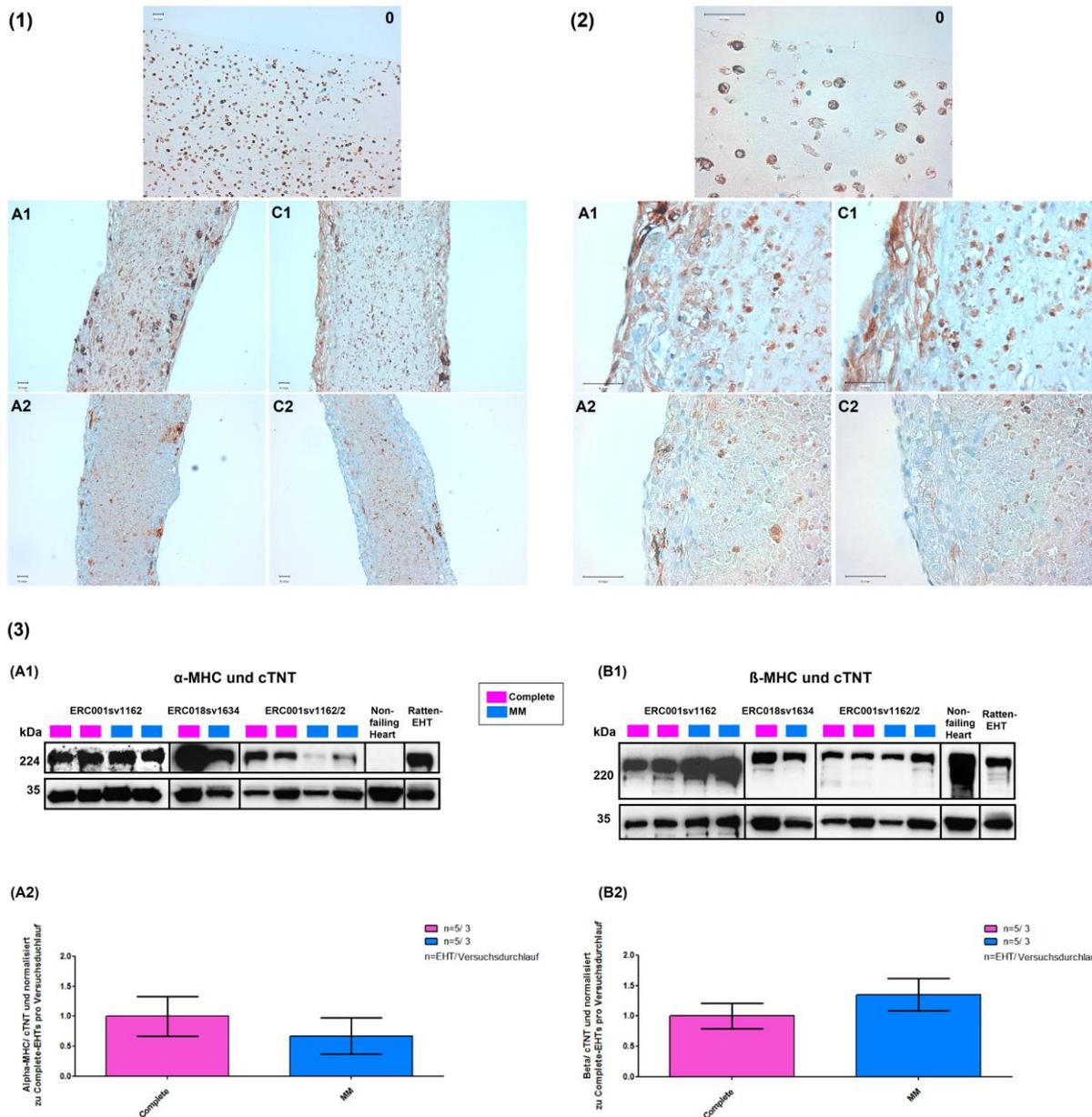
Die bereits beschriebenen optischen Veränderungen der EHTs im Verlauf der Kulturzeit (Abbildung 5.8A) waren auch in den histologischen Schnitten wiederzuerkennen. Die EHTs der Gruppe A waren im Vergleich zu denen der Gruppe C schmäler und wiesen teilweise Einrisse oder Unterbrechungen in den Paraffinschnitten auf.

Zur Darstellung der atrialen und ventrikulären Isoform der Myosinmoleküle wurden spezifische Antikörper verwendet. In den histologischen Schnitten wurden die atriale und ventrikuläre Isoform der Myosin-Leichtketten (MLC2a und MLC2v) angefärbt. Im Western Blot wurden die Myosin-Schwerketten ( $\alpha$ -MHC und  $\beta$ -MHC) quantifiziert. Das humane

Myosinmolekül besteht sowohl aus zwei schweren als auch zwei Paaren leichter Myosinketten (Schaub et al. 1998). Eine verstärkte Expression der ventrikulären Isoform entspricht einem verbesserten Reifestatus und einer Ausdifferenzierung hin zu ventrikulären Kardiomyozyten (Weber et al. 2016).

Die Färbungen zur Darstellung der atrialen Isoform der Myosin-Leichtkette (MLC2a) zeigten sehr viele MLC2a-positive Zellen in der EHT-Ausgangslage (Abbildung 5.14 1.0 und 2.0). Vor allem im Vergleich zur Ausgangslage ergab sich ein starker Rückgang atrialer Zellen für beide Gruppen. Die MLC2a-Färbungen vom Ende der Kulturzeit zeigten eine Tendenz zu weniger atrialen Zellen in den EHTs aus Gruppe A (Abbildung 5.14 1.A1 und 1.A2 sowie 2.A1 und 2.A2) und noch weniger atrialen Zellen in den EHTs aus Gruppe C (Abbildung 5.14 1.C1 und 1.C2 sowie 2.C1 und 2.C2). Um dieser Tendenz der Myosin-Komposition nachzugehen, wurden die Auswertungen des Western Blots herangezogen (Abbildungen 5.14 3).

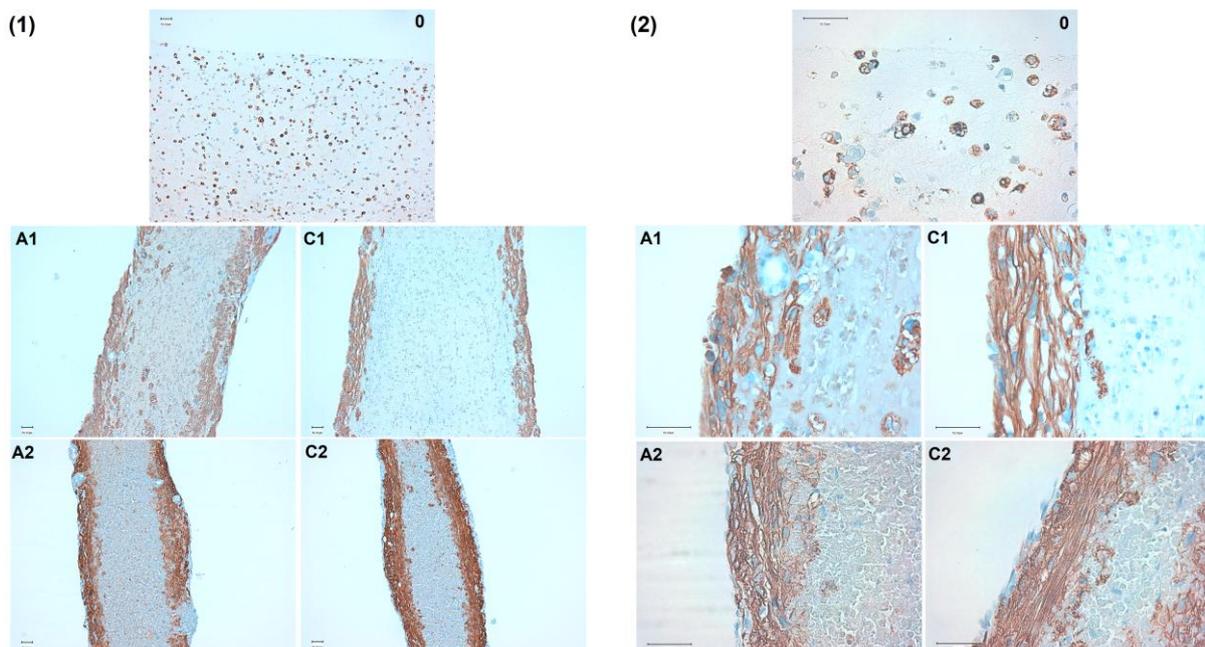
Im Western Blot wurden die Myosin-Schwerketten ( $\alpha$ -MHC und  $\beta$ -MHC) quantifiziert. Die Tendenz der Myosin-Komposition bestätigte sich im Western Blot und ergab im Durchschnitt weniger  $\alpha$ -MHC (Abbildungen 5.14 3.A1 und 3.A2) und mehr  $\beta$ -MHC (Abbildungen 5.14 3.B1 und 3.B2) für die EHTs der Maturierungsmedium-Kultur. Allerdings zeigte sich eine Variabilität zwischen den einzelnen Versuchsdurchläufen. Die ERC001-EHTs des ersten Versuchsdurchlaufes zeigten für beide Konditionen mehr  $\beta$ -MHC als  $\alpha$ -MHC, wobei Gruppe C ein noch größeres Verhältnis an  $\beta$ -MHC aufwies. Die ERC018-EHTs beider Konditionen wiesen insgesamt mehr  $\alpha$ -MHC als  $\beta$ -MHC auf. Das Verhältnis von  $\beta$ -MHC war in Gruppe C etwas größer als in Gruppe A. Die ERC001-EHTs der Standard-EHT-Kultur des dritten Versuchsdurchlaufes wiesen mehr  $\alpha$ -MHC als  $\beta$ -MHC auf. Die ERC001-EHTs der Maturierungsmedium-Kultur wiesen mehr  $\beta$ -MHC als  $\alpha$ -MHC auf. Die Non-failing Heart Probe als Positivkontrolle zeigte, wie im gesunden adulten Herzen physiologisch, eine starke und breite Bande für  $\beta$ -MHC und keine Bande für  $\alpha$ -MHC. Im Vergleich zur Non-failing Heart Probe war der  $\alpha$ -MHC-Gehalt der EHTs noch sehr hoch. Die Negativkontrolle des Ratten-EHTs zeigte, wie für Rattenherzen typisch, einen höheren Anteil an  $\alpha$ -MHC im Vergleich zu  $\beta$ -MHC.



**Abbildung 5.14:** Immunhistochemische Färbungen für MLC2a. Paraffinlängsschnitte in der Übersicht (1) und in Vergrößerung (2). Die Maßstabsleiste entspricht 50  $\mu$ m. (1.0) Ausgangssituation nach dem Gießen. (1.A1) ERC001-EHT der Standard-EHT-Kultur des ersten Versuchsdurchlaufes. (1.A2) ERC001-EHT der Standard-EHT-Kultur des dritten Versuchsdurchlaufes. (1.C1) ERC001-EHT der Maturierungsmedium-Kultur des ersten Versuchsdurchlaufes. (1.C2) ERC001-EHT der Maturierungsmedium-Kultur des dritten Versuchsdurchlaufes. (2.0) Ausgangssituation nach dem Gießen. (2.A1) ERC001-EHT der Standard-EHT-Kultur des ersten Versuchsdurchlaufes. (2.A2) ERC001-EHT der Standard-EHT-Kultur des dritten Versuchsdurchlaufes. (2.C1) ERC001-EHT der Maturierungsmedium-Kultur des ersten Versuchsdurchlaufes. (2.C2) ERC001-EHT der Maturierungsmedium-Kultur des dritten Versuchsdurchlaufes. (3.A1) Ergebnisse des Western Blots für  $\alpha$ -MHC und cTNT. Abgebildet sind von links nach rechts alle drei Versuchsdurchläufe mit jeweils beiden Konditionen. Folgend die Positivkontrolle (Non-failing Heart) und die Negativkontrolle (neonatale ventrikuläre Kardiomyozyten eines Ratten-EHTs). (3.A2) Ergebnisse des Western Blots für  $\alpha$ -MHC/cTNT und Normalisieren zu den Standard-EHT-Medium-EHTs pro Versuchsdurchlauf. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. (3.B1) Ergebnisse des Western Blots für  $\beta$ -MHC und cTNT. Abgebildet sind von links nach rechts alle drei Versuchsdurchläufe mit jeweils beiden Konditionen. Folgend die

Positivkontrolle (Non-failing Heart) und die Negativkontrolle (neonatale ventrikuläre Kardiomyozyten eines Ratten-EHTs). (3.B2) Ergebnisse des Western Blots für  $\beta$ -MHC/cTNT und Normalisieren zu den Standard-EHT-Medium-EHTs pro Versuchsdurchlauf. Dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

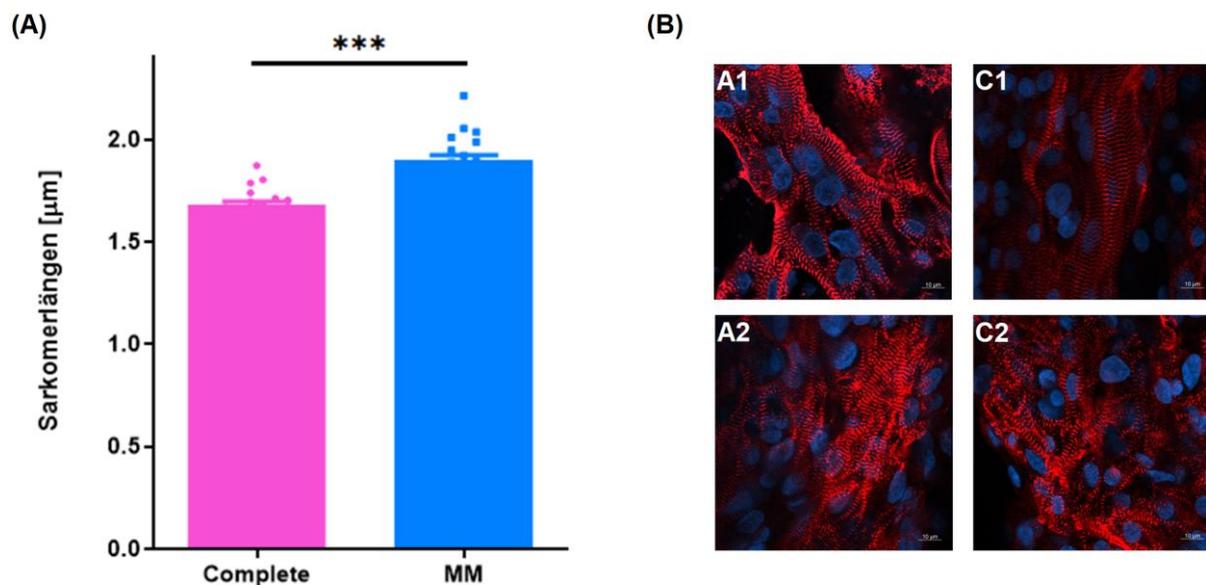
Die Färbungen zur Darstellung der ventrikulären Isoform der Myosin-Leichtkette (MLC2v) zeigten wenig MLC2v-positive Zellen in der EHT-Ausgangslage (Abbildungen 5.15 1.0 und 2.0). Vor allem im Vergleich zur Ausgangslage waren am Ende der Kulturzeit in beiden Gruppen die meisten Kardiomyozyten MLC2v-positiv. Die MLC2v-Färbungen vom Ende der Kulturzeit ergaben eine Tendenz zu mehr ventrikulären Zellen in den EHTs aus Gruppe A (Abbildungen 5.15 1.A1 und 1.A2 sowie 2.A1 und 2.A2) und noch mehr ventrikulären Zellen in den EHTs aus Gruppe C (Abbildungen 5.15 1.C1 und 1.C2 sowie 2.C1 und 2.C2). Die Kardiomyozyten waren am Rand der Gewebeschnitte zu erkennen. In beiden Gruppen ließ sich eine deutliche Längsausrichtung der Kardiomyozyten erkennen. Im Vergleich zu Gruppe A ergab sich für Gruppe C die Tendenz eines breiteren Kardiomyozyten-Zellstreifens mit besser definierter Ultrastruktur. Die Sarkomerstruktur ließ sich in Gruppe C besser und einfacher darstellen.



**Abbildung 5.15:** Immunhistochemische Färbungen für MLC2v, Paraffinlängsschnitte in der Übersicht (1) und in Vergrößerung (2). Die Maßstabsleiste entspricht 50  $\mu$ m. (1.0) Ausgangssituation nach dem Gießen. (1.A1) ERC001-EHT der Standard-EHT-Kultur des ersten Versuchsdurchlaufes. (1.A2) ERC001-EHT der Standard-EHT-Kultur des dritten Versuchsdurchlaufes. (1.C1) ERC001-EHT der Maturierungsmedium-Kultur des ersten Versuchsdurchlaufes. (1.C2) ERC001-EHT der Maturierungsmedium-Kultur des dritten Versuchsdurchlaufes. (2.0) Ausgangssituation nach dem Gießen. (2.A1) ERC001-EHT der Standard-EHT-Kultur des ersten Versuchsdurchlaufes. (2.A2) ERC001-EHT der Standard-EHT-

Kultur des dritten Versuchsdurchlaufes. (2.C1) ERC001-EHT der Maturierungsmedium-Kultur des ersten Versuchsdurchlaufes. (2.C2) ERC001-EHT der Maturierungsmedium-Kultur des dritten Versuchsdurchlaufes.

Um diese Tendenz einer definierten Ultrastruktur in Gruppe C zu quantifizieren, wurden die Längen der Sarkomere in den Bildern der Immunfluoreszenzfärbungen von ERC018-EHTs des zweiten Versuchsdurchlaufes (Abbildungen 5.16 B.A1 und B.C1) und ERC001-EHTs des dritten Versuchsdurchlaufes (Abbildungen 5.16 B.A2 und B.C2) gemessen. Die Analyse der Sarkomerlängen ergab längere Sarkomere für die EHTs der Maturierungsmedium-Kultur ( $1,90 \mu\text{m} \pm 0,025 \mu\text{m}$ ) im Vergleich zur Standard-EHT-Kultur ( $1,68 \mu\text{m} \pm 0,02 \mu\text{m}$ ). Der *Student's t-Tests* zeigte einen signifikanten Unterschied der Sarkomerlängen für die EHTs der Gruppe C für beide Versuchsdurchläufe ( $***p < 0,001$ , Abbildung 5.16 A).



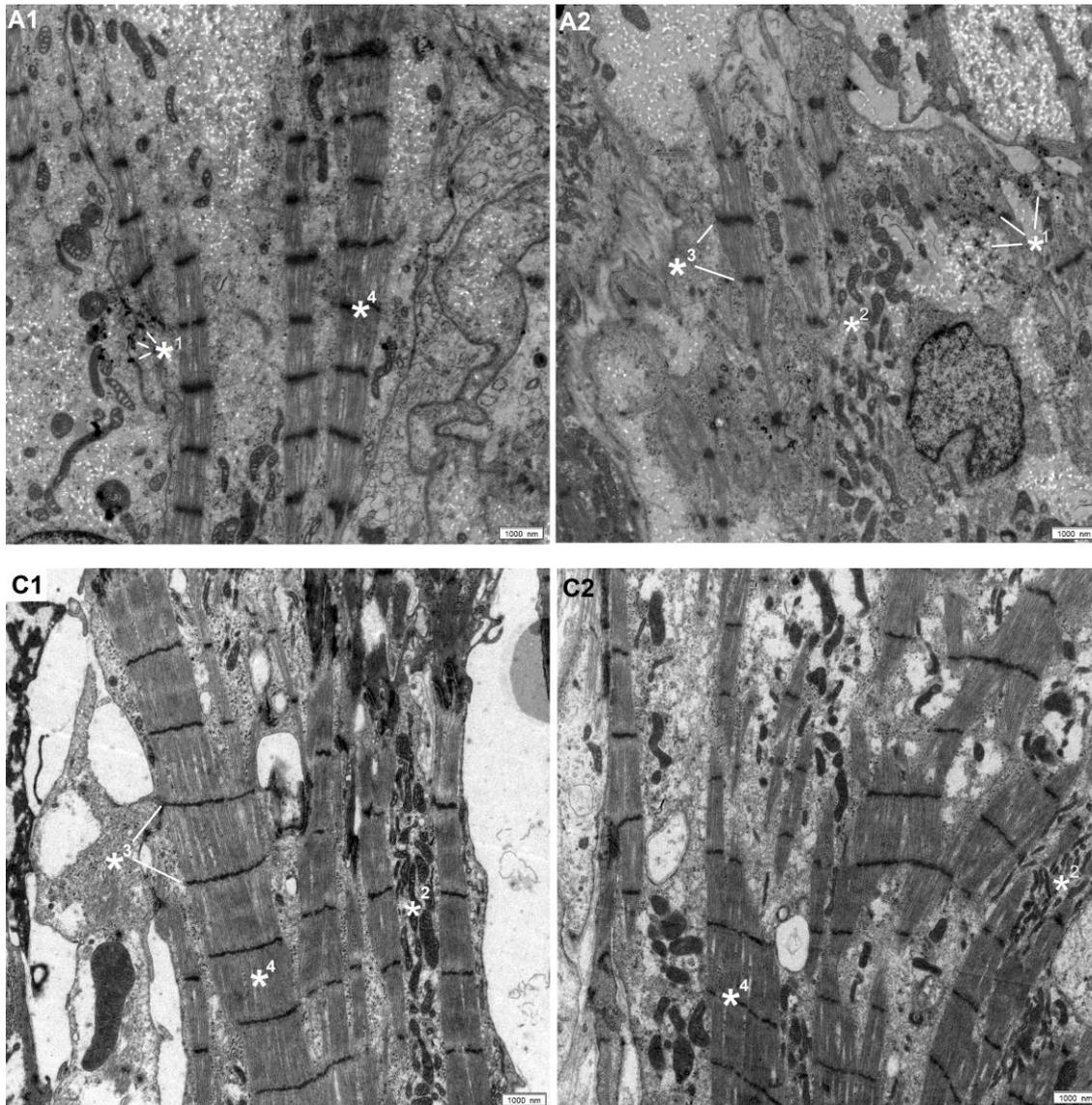
**Abbildung 5.16:** (A) Sarkomerlängen der EHTs beider Konditionen des zweiten und dritten Versuchsdurchlaufes mit Ergebnis des *Student's t-Tests* ( $***p < 0,001$ ). (B) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder des zweiten und dritten Versuchsdurchlaufes. Die Maßstabsleiste entspricht  $10 \mu\text{m}$ . (A1) Immunfluoreszenzbild für  $\alpha$ -actinin und Hoechst eines Standard-EHT-Medium-EHTs der ERC018-EHTs des zweiten Versuchsdurchlaufes. (C1) Immunfluoreszenzbild für  $\alpha$ -actinin und Hoechst eines Maturierungsmedium-EHTs der ERC018-EHTs des zweiten Versuchsdurchlaufes. (A2) Immunfluoreszenzbild für  $\alpha$ -actinin und Hoechst eines Standard-EHT-Medium-EHTs der ERC001-EHTs des dritten Versuchsdurchlaufes. (C2) Immunfluoreszenzbild für  $\alpha$ -actinin und Hoechst eines Maturierungsmedium-EHTs der ERC001-EHTs des dritten Versuchsdurchlaufes.

Die immunhistochemischen Färbungen von Actin und Connexin-43 waren in beiden Gruppen vergleichbar. Der Vergleich der Schnitte ergab keine aussagekräftigen Ergebnisse oder Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Des Weiteren gilt Ähnliches für die angefertigten Querschnitte und die Immunfluoreszenzbilder der Phalloidin- und Hoechst-Färbungen.

Teilweise war ein Vergleich der eben genannten Färbungen nicht möglich, aufgrund von Verlust einer der beiden Kulturkonditionen durch technische Schwierigkeiten oder zu schlechte EHT-Qualität. Dies machte eine Vergleichbarkeit unmöglich.

### **5.5.2 Elektronenmikroskopie**

Zur genauen Analyse intrazellulärer Strukturen wurde aus dem ERC018 Versuchsdurchlauf ein EHT pro Kondition durch Frau Dr. Schweizer elektronenmikroskopisch untersucht und repräsentative Bilder beider Konditionen analysiert (Abbildung 5.17). Das EHT der Gruppe C (Abbildungen 5.17 C1 und C2) wies ein klareres, homogeneres und physiologischeres Gewebegesamtbild auf. Im EHT der Gruppe A (Abbildungen 5.17 A1 und A2) waren Anzeichen für vermehrten Zelltod und das Auflösen der Gewebestrukturen zu erkennen. Außerdem waren Vakuolen und Vesikel mit Einspeicherungen zu erkennen, die Glykogeneinspeicherungen sein könnten (\*<sup>1</sup>). Das Gesamtbild von Gruppe A zeigte sich inhomogener und undefinierter im Vergleich zur Gruppe C. In dem EHT der Gruppe C waren die Mitochondrien interfibrillär lokalisiert mit deutlicheren und definierteren Cristae der Mitochondrien (\*<sup>2</sup>). Auch die Sarkomerstrukturen (\*<sup>3</sup>) zeigten sich länger und deutlicher definiert im Vergleich zu Gruppe A mit weniger und dünneren Myofilamenten (\*<sup>4</sup>). Damit unterstützten die Bilder der Elektronenmikroskopie den Gesamteindruck der anderen Ergebnisse.



**Abbildung 5.17:** Repräsentative Bilder der Elektronmikroskopie. (A1 und A2) Bilder des ERC018-EHTs der Gruppe A. (C1 und C2) Bilder des ERC018-EHTs der Gruppe C. (\*<sup>1</sup>) Vakuolen und Vesikel im EHT der Gruppe A. (\*<sup>2</sup>) Mitochondrien. In Gruppe C waren die Mitochondrien interfibrillär lokalisiert mit deutlicheren und definierten Christae. (\*<sup>3</sup>) Die Striche zeigen auf die Z-Scheiben eines Sarkomers. (\*<sup>4</sup>) Myofilament aufgebaut aus vielen Sarkomeren.

## **6 Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir den Einfluss eines neuen, serumfreien Maturierungsmediums auf die Reife von aus hiPSC-Kardiomyozyten hergestellten EHTs im Vergleich mit dem Standard-EHT-Medium auf Pferdeserumbasis. Das in dem Mercola Labor (Stanford, Vereinigte Staaten) entwickelte Medium soll nicht nur eine weitere Reifeförderung der EHTs erzielen, sondern als serumfreies Medium auch die Anforderungen der guten Herstellungspraxis (GMP) erfüllen. Dafür wurden die EHTs einer extendierten Kultur in unterschiedlichen Medienansätzen mit verschiedenen Intervallen des Mediumwechsels ausgesetzt und funktionellen Test unterzogen.

### **6.1 Herstellung und normale Kultivierung der künstlichen Herzgewebe: Vergleichbarkeit der Versuchsdurchläufe**

Das Hamburger Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie stellte die hiPSC-Kardiomyozyten für dieses Projekt zur Verfügung, wodurch ermöglicht wurde, zwei verschiedene gesunde weibliche Kontrollzelllinien in drei aufeinander folgenden Versuchsdurchläufen mit jeweils mindestens drei EHTs pro Kondition vergleichen zu können. Dies ermöglichte ausreichend Wiederholungen von Versuchen für aussagekräftige Ergebnisse und gleichzeitig die Möglichkeit die Versuche im Verlauf anzupassen. Dabei ergab sich ein Spannungsfeld aus einer möglichst ähnlichen Versuchsdurchführung zum Nachweis der Reproduzierbarkeit, gleichzeitig sollten auch klar auf der Hand liegende technische Weiterentwicklungen inkludiert werden. Die Versuchsansätze wurden in vier Bereichen angepasst. Zum einen wurde in Versuchsdurchlauf zwei und drei auf Matrigel verzichtet, weiterhin erfolgte ein späteres Randomisieren der EHTs in Versuchsdurchlauf zwei und die Verwendung einer geringeren Silikonstärke der Silikongestellrahmen in Versuchsdurchlauf drei. Außerdem wurden die metabolischen Analysen in Versuchsdurchlauf zwei und drei um einen dritten Zeitpunkt der Mediumabnahme erweitert.

Der Verzicht auf einen Zusatz von Matrigel bedingte keine funktionellen Einschränkungen (Veerman et al. 2015, Tiburcy et al. 2017). Matrigel ist das Sekret von murinen Sarkomzellen und wurde lange Zeit als Stabilisator der extrazellulären Matrix beim Herstellen von Geweben zugegeben. Mittlerweile werden die hiPSC-Kardiomyozyten in eine Fibrinmatrix gegossen, die den hergestellten Geweben ausreichend Stabilität verleiht (Hansen et al. 2010, Weinberger et al. 2017). Des Weiteren polymerisiert Fibrin schneller als das damals verwendete Kollagen, wodurch kein Absinken der Kardiomyozyten auf den

Well-Boden erfolgt und eine homogene Verteilung der Zellen innerhalb des EHTs ermöglicht wird. Das Protokoll zum Gießen der EHTs wurde deshalb für den zweiten und dritten Versuchsdurchlauf angepasst. Ohne folgende Funktionseinschränkung konnte auf den Zusatz von Matrigel verzichtet werden. Auch im Hinblick auf die GMP-Anforderungen ist es wichtig, auf diese undefinierte Komponente verzichten zu können.

In vivo bedeutet die Kardiomyozytenreifung, bis zum Erlangen eines adulten Zellstatus, einen Entwicklungsprozess über mehrere Jahre (Yang et al. 2014b, Veerman et al. 2015). Derzeit ist es möglich hiPSC-Kardiomyozyten innerhalb von wenigen Wochen in großer Quantität zu generieren und im EHT-Format zu kultivieren - mit dem gleichzeitigen Verlangen der nativen Zellqualität innerhalb weniger Wochen gleichkommen zu wollen. Dabei ist es selbstverständlich, dass frisch dissoziierte Kardiomyozyten einen unreifen fetalen Phänotyp aufweisen (Machiraju und Greenway 2019). EHTs aus frisch dissoziierten Kardiomyozyten entwickelten sich wesentlich schneller zu synchron schlagenden EHTs als EHTs, die aus aufgetauten Kardiomyozyten gegossen wurden. Das Einsetzen von spontanen und synchronen Kontraktionen der EHTs wird nach sieben bis zehn Tagen erwartet (Schaaf et al. 2011, Stohr et al. 2013, Breckwoldt et al. 2017). Die Kardiomyozyten richten sich während dieser Formationsphase räumlich zueinander aus und es kommt zur Ausbildung von Synzytien, die als funktionelle Einheiten fungieren (Hirt et al. 2014b). Der Vergleich der verschiedenen Medien wurde begonnen, sobald ein synchrones Kontrahieren beobachtet werden konnte, um den Kontakt mit den verschiedenen Kulturbedingungen in einer noch stark anpassungsfähigen Phase der Kardiomyozyten zu beginnen und die serumhaltige Formationsphase möglichst kurz zu halten.

Im zweiten Versuchsdurchlauf, in dem EHTs aus tiefgefrorenen Kardiomyozyten hergestellt wurden, war es notwendig, eine längere Formationsphase in serumhaltigem Medium zu gewähren und dadurch später zu randomisieren. Es ist anzunehmen, dass der Unterschied zu frisch hergestellten Kardiomyozyten durch den Gefrier- und Auftauprozess zustande kommt, der die Zellen großem Stress aussetzt. Neben den Temperaturunterschieden von -150 °C auf +37 °C werden die Zellen dem Einfluss von chemischen Substanzen ausgesetzt. Das Medium, in dem die Zellen tiefgefroren werden, enthält Dimethylsulfoxid (DMSO), das die Oberflächenspannung der Zellmembranen herabsetzt und die Zellen während des Gefrierprozesses schützt, bei Raumtemperatur die Zellen jedoch angreifbar macht. Ein zügiges Resuspendieren in warmes serumhaltiges Resuspensionsmedium (NKM) ist deshalb zu diesem Herstellungszeitpunkt der EHTs

sehr wichtig. Nichtsdestotrotz benötigen die hiPSC-Kardiomyozyten eine gewisse Regenerationszeit bis auch sie eine funktionelle Einheit im Gewebeverband ausbildeten.

Des Weiteren zeigten die EHTs der ersten beiden Versuchsdurchläufe, kultiviert an Silikongestellrahmen mittleren Steifegrades, eine längere und stetigere Kontraktionskraftentwicklung als die EHTs des dritten Versuchsdurchlaufes, die an Silikongestellrahmen mit einem geringen Steifegrad kultiviert wurden. Für eine bessere und stetigere Kontraktionskraftentwicklung im Verlauf der Kulturzeit sollten EHTs daher standardmäßig an Silikongestellrahmen höheren Steifegrades kultiviert werden. EHTs führen durch die Kultur an Silikongestellrahmen auxotone Kontraktionen und Kontraktionsarbeit ähnlich wie in vivo durch (Ulmer und Eschenhagen 2019). Eine Kultur unter erhöhten Steifigkeitsbedingungen bedeutet eine höhere Nachlast, was wahrscheinlich eher der Entwicklung in vivo entspricht und dadurch die Reife durch eine verstärkte Myofibrillogenese fördert (Lundy et al. 2013). Gleichzeitig trainiert die Flexibilität der Silikonpfosten die Gewebe und legt das Ausmaß der maximal möglichen Kontraktion bei bestimmter Kraftentwicklung fest. In den ersten beiden Versuchsdurchläufen mit steiferen Silikongestellrahmen zeigte sich eine höhere Kraftentwicklung. Im letzten Versuchsdurchlauf erreichten die EHTs dagegen zu einem früheren Zeitpunkt ihr Kraftmaximum, was bedeuten könnte, dass die EHTs ihr Potential nicht vollständig ausbilden konnten, da die starke Flexibilität der Silikongestellrahmen die Kontraktionsmöglichkeiten determinierte. Bedauerlicherweise waren zum Zeitpunkt der EHT-Herstellung des dritten Versuchsdurchlaufes zu wenig steife Silikongestellrahmen vorhanden, um auch die letzte Versuchsreihe zwischen steifere Silikonpfosten zu gießen. Neben einer exakteren Vergleichbarkeit der durchgeführten Versuchsreihen, trotz Möglichkeit der Kraftberechnung, würde es sich bezogen auf das EHT-Potential lohnen, den Standard neu festzulegen. Andererseits wurden in diesem Experiment alle Vergleiche zwischen dem Maturierungsmedium und dem institutsinternen Standard an zum gleichen Zeitpunkt hergestellten und gleich kultivierten EHTs durchgeführt. Die Abweichungen zwischen den verschiedenen Versuchsdurchläufen sollten daher die Unterschiede zwischen dem Maturierungsmedium und der Standardkultur nicht wesentlich berühren.

## **6.2 Kultivierung in verschiedenen Medien: Effekt auf Kraft und spontane Schlagfrequenz**

Beim Randomisieren der EHTs wurde die Kraft der EHTs als Faktor gewählt, um die EHTs gleichmäßig auf die beiden Kulturkonditionen aufzuteilen. In den drei Versuchsdurchläufen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der

Kraftentwicklung. Die Entwicklung der Schlagfrequenz dagegen zeigte unterschiedliche Anpassungsreaktionen der EHTs auf die jeweiligen Kulturbedingungen. Die EHTs im Maturierungsmedium wiesen bereits kurze Zeit nach dem Randomisieren ein verlangsamtes Schlagmuster auf und zeigten im Vergleich zu der Standard-EHT-Kultur eine immer geringere spontane Schlagaktivität. Zum Ende der Kulturzeit schlugen einzelne EHTs im Maturierungsmedium teilweise nur noch zweimal in der Minute spontan. Kardiomyozyten des nativen Arbeitsmyokards legen ihre spontane Schlagaktivität im ausdifferenzierten Zustand vollständig nieder und folgen dem vorgegebenen Rhythmus der Schrittmacherzellen des Sinusknotens (Hirt et al. 2014a, Hirt et al. 2014b, Lemoine et al. 2017, Horikoshi et al. 2019).

Einerseits könnten hiPSC-Kardiomyozyten auf Grund ihrer spontanen Schlagaktivität als biologische Schrittmacher genutzt werden, womit weniger Rhythmusstörungen erwartet werden und möglicherweise auf eine lebenslange Immunsuppression der Patienten verzichtet werden könnte (Schulze et al. 2019). Andererseits bietet eine geringere spontane Schlagaktivität Vorteile für regenerative Therapieoptionen mit hiPSC-Kardiomyozyten. Der Ersatz von zu Grunde gegangenem Myokard durch eine Implantation von Herzmuskelzellpflastern benötigt adulte ausdifferenzierte Myokardzellen, die sich dem adulten Organismus und dessen vorgegebenen Rhythmus anpassen können (Lopaschuk und Jaswal 2010). Die Fähigkeit, das spontane Schlagen aufzugeben, ist ein Zeichen von verbesserter Zellreife mit einer Entwicklung zu ausdifferenzierterem Myokard. Interessanterweise blieben die EHTs bei Verringerung der spontanen Schlagaktivität während der gesamten Kulturzeit elektrisch stimulierbar und folgten den jeweils vorgegebenen Frequenzen. Dies zeigt, dass die Verringerung der Schlagfrequenz auf eine geringere spontane Eigenaktivität bei gleichzeitig guter Erregbarkeit beruht und kann damit als Zeichen von verbesserter Reife betrachtet werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, um das gesamte Potential von hiPSC-Kardiomyozyten unter Befolgung der GMP-Richtlinien ausschöpfen zu können, besteht darin ein serumfreies Kulturprotokoll zu entwickeln. Das in diesem Projekt getestete serumfreie Maturierungsmedium wurde im Labor von Mark Mercola (Stanford, Vereinigte Staaten) entwickelt. Im Mercola Labor führte die Verwendung des Maturierungsmediums in bisherigen 2D-Kulturen zu einer Verbesserung von hiPSC-Kardiomyozyten auf struktureller Ebene. Im Hamburger Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie wurde mit diesem Projekt das serumfreie Maturierungsmedium im EHT-Modell getestet, um zu prüfen, ob das Maturierungsmedium auch in der

dreidimensionalen Kultur, die als solches schon zu einer erhöhten Reifung von Kardiomyozyten führt, zu einer weiteren Verbesserung der Reife führen kann.

Es zeigte sich, dass eine anfängliche Kultur im EHT-Standard-Medium unerlässlich war, damit die EHTs nach dem Gießen anfangen sich zu entwickeln und synchron zu schlagen begannen. Den EHTs, die unmittelbar nach dem Gießen mit dem Maturierungsmedium kultiviert wurden, war es nicht möglich einen funktionellen Gewebeverband zu entwickeln. Es handelt sich bei dem Medium aus Stanford also um ein reines Maturierungsmedium für bereits kultivierte und reifere Gewebe. Demnach wird eine Möglichkeit zur serumfreien Anfangskultur benötigt, um den GMP-Anforderungen vollständig gerecht werden zu können. Eine Möglichkeit dafür wäre das vorhandene Maturierungsmedium zu modifizieren, um die Formationsphase der EHTs überbrücken zu können. Die Inhaltsstoffe des Maturierungsmediums sind noch nicht publiziert, weshalb zu diesem Zeitpunkt nur vorgeschlagen werden kann, in der Anfangsphase mehr Glukose, Hormone oder Wachstumsfaktoren zum Maturierungsmedium hinzuzufügen. Auch Mills et al. (2017) versuchten über den Wechsel der Substratzufuhr den Stoffwechsel der fetalen Kardiomyozyten durch ein sich stetig veränderndes Nährstoffangebot anzupassen. Im Verlauf der Kultur soll eine vermehrt postnatale Umgebung für die hiPSC-Kardiomyozyten geschaffen werden, mit dem Ziel die vorhandenen Bedingungen in vivo zu imitieren. Tiburcy et al. (2017) ersetzen in bereits vorhandenen Kulturprotokollen die serumhaltigen Herstellungs- und Kultivierungsschritte durch eine Kombination aus Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel TGF $\beta$ -1 (Transforming Growth Factor  $\beta$  1), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1), FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und B27. Vor allem TGF $\beta$ -1 wurde als ein wichtiger Zusatz in den ersten Kulturtagen für eine gute Kraftentwicklung ausgemacht. In den serumfreien Bedingungen von Tiburcy und Kollegen zeigten hiPSC-Kardiomyozyten eine morphologische, molekulare und funktionelle Reifesteigerung. Mills und Kollegen erzielten mit ihrem Maturierungsmedium hiPSC-Kardiomyozyten mit einer funktionellen und metabolisch verbesserten Reife im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe.

Eine weitere Möglichkeit wäre eine Anpassung der Intervalle der Mediumwechsel. Zu Beginn der Kultur könnte ein hochfrequenter Wechsel des Mediums eine ausreichende Substratzufuhr gewährleisten. Im Verlauf der Kultur wäre eine Abnahme der Intervalle nach erfolgter Formationsphase möglich. Das Mercola Labor empfahl, nach erfolgter Formationsphase, einen ersten Wechsel des Mediums nach drei Tagen und folgend einen Wechsel alle vier Tage. Der Mediumwechsel könnte im Verlauf der Kultur weiter auf bis zu sechs oder sieben Tage extendiert werden.

Ein modifiziertes Kulturprotokoll, in welchem die EHTs verschiedenen Phasen ausgesetzt werden, würde die Bedingungen von nativem Gewebe in vivo imitieren. Während der Gewinnung von hiPSC und der folgenden Differenzierung zu hiPSC-Kardiomyozyten erfolgt ein enormer und beeindruckender Aufwand mit unterschiedlichen Kulturstadien und Behandlungen der hiPSC, um die Embryonalentwicklung nachzuahmen (Breckwoldt et al. 2017). Folgend werden aus den generierten hiPSC-Kardiomyozyten EHTs gegossen, welche ab diesem Zeitpunkt mit gleichbleibenden und konstanten Kulturbedingungen behandelt und mit hohen Erwartungen beobachtet werden, sich ab diesem Zeitpunkt weiterhin zu verändern und zu adultem Herzgewebe zu entwickeln. Die Weiterführung der stetigen Veränderung äußerer Einflüsse während der EHT-Kultur könnte also ebenfalls eine Reifesteigerung bedingen, da die EHTs gezwungen wären sich den verändernden Bedingungen anzupassen.

### **6.3 Längen- und Breitenverhältnisse im Verlauf der Kulturzeit**

Nach dem Gießen der EHTs erfolgt ein Umbauprozess, der zur Kompression und Umgestaltung des EHTs führt. Innerhalb des EHTs bilden sich interzelluläre Verbindungen aus und der interne Wassergehalt verringert sich im Verlauf der Kulturzeit, sodass es zur Verkleinerung des EHTs kommt (Eschenhagen et al. 1997, Hirt et al. 2014b). Die Länge der EHTs blieb nahezu unverändert. Die Breite der EHTs veränderte sich im Verlauf der Kulturzeit. Die EHTs der Standard-EHT-Kultur waren instabiler, bekamen Löcher, zerrissen oder lösten sich von den Silikonpfosten der Silikongestellrahmen ab. Die EHTs im Maturierungsmedium waren dagegen stabiler im Zeitverlauf der Kultur und zeigten nur eine geringe Abnahme der Gewebebreite. Stabilere Kulturverhältnisse bieten die Aussicht auf extendierte Langzeitkulturen bzw. Langzeitexperimente und die Möglichkeit einen Durchlauf EHTs für viele Versuche nutzen zu können. Im Hinblick darauf, das EHT-Format als erschwingliche klinische Applikation nutzen zu wollen, wäre dies von großem Interesse. Vor allem bezogen auf Krankheitsmodellierungen oder (individuelle) Langzeittests von Medikamenten. Häufig zeigen sich kardiotoxische Nebenwirkungen erst nach Mehrfachgabe und einem gewissen Zeitintervall. Bei einmaliger Gabe besteht die Möglichkeit, Nebenwirkungen durch Kompensationsmechanismen zu unterdrücken und keine Änderung der Funktion hinnehmen zu müssen. Allerdings darf nicht vergessen werden, dass das EHT-Format weiterhin ein Modell des Herzens darstellt. Der lebende Organismus besitzt wesentlich mehr Kompensationsmechanismen um Fehlregulationen zu umgehen oder zu kompensieren, wodurch das EHT-Format jedoch die Aussicht bietet auch kleine

Anomalitäten zu zeigen und entdecken zu können, da in diesem Format die Kompensationsmechanismen des Gesamtorganismus nicht greifen können (Stohr et al. 2013).

#### **6.4 Funktioneller Reifestatus**

Eine mechanische Belastung der Kardiomyozyten ist wichtig für die Organisation und Ausrichtung der Zellen im Gewebeverband. Außerdem fördert die EHT-Kultur an den Silikonpfosten die morphologische Reife der hiPSC-Kardiomyozyten, wodurch gleichzeitig eine bessere Funktion und Kontraktilität durch eine höhere Anzahl und verbesserte Organisation der Zellorganellen erzielt wird (Hirt et al. 2014b, Ulmer et al. 2018). Mittels der video-optischen Messapparatur können automatisiert und reproduzierbar Funktionsversuche durchgeführt werden (Hansen et al. 2010, Mannhardt et al. 2016). Die unter den beiden Konditionen kultivierten EHTs wiesen unter elektrischer Stimulation weniger funktionelle Unterschiede als unter spontan schlagenden Bedingungen auf. Das galt sowohl im Vergleich zueinander als auch innerhalb der Konditionen zwischen den einzelnen EHTs. Die EHTs beider Konditionen zeigten eine gleiche und positive Kraft-Frequenz-Beziehung und reagierten wie erwartet positiv auf die sympathischen und parasympathischen Zusätze. Beides zeichnet einen guten Reifegrad aus (Hirt et al. 2014a, Weinberger et al. 2017, Ulmer et al. 2018).

Die Fähigkeit die spontane Schlagaktivität aufzugeben, ist, wie bereits beschrieben, ein Zeichen gesteigerter Reife. Die EHTs im Maturierungsmedium schlugen langsamer als die EHTs der Standard-EHT-Kultur und zeigten unter spontanen, sowie unter elektrisch stimulierten Bedingungen, eine längere Zeit für den Aufstrich bis zu ihrem Kraftmaximum (*time-to-peak*, TTP). Ein höherer  $\beta$ -MHC-Gehalt sollte theoretisch mit einer langsameren Kontraktionskinetik und damit einer verlängerten Zeit bis zum Kraftmaximum einhergehen. Die EHTs im Maturierungsmedium wiesen im Durchschnitt mehr  $\beta$ -MHC als die EHTs der Standard-EHT-Kultur auf, wodurch sich ein verbesserter Reifestatus der Kultur im Maturierungsmedium mittels der Western Blot Ergebnisse bestätigen ließ. Eine verbesserte Kontraktionskinetik geht im humanen adulten nativen Herzgewebe mit einem Wechsel der Expression von der schnelleren Alpha-Myosin-Schwerkette ( $\alpha$ -MHC) zu der langsameren Beta-Myosin-Schwerkette ( $\beta$ -MHC) einher.  $\alpha$ -MHC stellt den fetalen Phänotyp der Myosin-Schwerkette während der fetalen Genexpression dar und befindet sich im adulten Herzen ausschließlich in den Vorhöfen. Der  $\alpha$ -MHC-Anteil korreliert mit einem Anstieg der Herzfrequenz.  $\beta$ -MHC stellt die adulte und in den Ventrikeln des Herzens vorherrschende Isoform dar (Schaub et al. 1998, Lundy et al. 2013, Yang et al.

2014a). Bei Nagetieren dagegen repräsentiert  $\beta$ -MHC die fetale und  $\alpha$ -MHC die adulte Isoform der Myosin-Schwerketten.

Die geringere Unterschiedlichkeit der Konditionen in den funktionellen Experimenten zeigt erneut, dass durch die Kultur im EHT-Format derzeit Kardiomyozyten mit einem ausgereiften funktionellen Stand generiert werden können. Die ebenfalls gute funktionelle Entwicklung der EHTs durch eine Kultur im Maturierungsmedium auf den gleichen funktionellen Stand der Standard-EHT-Kultur entsprechend, bietet die Kombinationsmöglichkeit zu einer serumfreien EHT-Kultur. Dies bedeutet dem Ziel, das volle Potential der hiPSC-Kardiomyozyten ausschöpfen zu können, näher gekommen zu sein.

## 6.5 Metabolischer Reifestatus

Das Herz ist das am stärksten metabolisch aktive Organ im Körper und hat einen hohen Energiebedarf. Während der fetalen kardialen Entwicklung dient die anaerobe Glykolyse als Hauptenergiequelle der Kardiomyozyten. Ausdifferenzierte Kardiomyozyten nutzen dagegen vermehrt oxidative Stoffwechselwege zur Energiegewinnung. Im adulten Herzen werden 60 - 90% der Energie über die Fettsäureoxidation gewonnen (Lopaschuk und Jaswal 2010, Brown et al. 2017). Je nach Sauerstoff- und Nährstoffangebot können Kardiomyozyten ihre Stoffwechselprozesse anpassen und umstellen. Adulte Kardiomyozyten sind omnivor und können neben Glukose auch Laktat und Fettsäuren verstoffwechseln. Es wurde bereits gezeigt, dass hiPSC-Kardiomyozyten in Glukose-freiem Laktat- und Fettsäure-haltigem Medium überleben können. Bei Bereitstellung aller Energiesubstrate decken hiPSC-Kardiomyozyten, kultiviert als EHTs unter institutsinternen Standards, 14% ihres Energiebedarfs über die anaerobe Glykolyse. Allerdings enthält das Standard-EHT-Medium im Wesentlichen nur Glukose und geringe Mengen an Laktat und Fettsäuren. Die Kardiomyozyten befinden sich im Randbereich der EHTs, da dort eventuell eine verbesserte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung besteht. Eine Steigerung der metabolischen Reife von hiPSC-Kardiomyozyten durch eine physiologischere Zusammensetzung des Kulturmediums steht daher im Zentrum der derzeitigen Forschung (Ulmer und Eschenhagen 2019).

Die Glukose-Ausgangskonzentration der Standard-EHT-Kultur beträgt 4,8 mmol/l und entspricht damit nahezu der maternalen Glukosekonzentration von  $\sim$ 5,5 mmol/l, die über die Placenta den Fetus erreicht (Ulmer et al. 2018). Die spätere Nahrung enthält zunehmend mehr Fette und Proteine und weniger Kohlenhydrate, sodass der Organismus

sich an geringeren Glukosekonzentrationen anpasst und zunehmend den Energiebedarf über oxidative Stoffwechselwege deckt. Diese Veränderungen gehen unter anderem mit einer vermehrten Biogenese von Mitochondrien einher. Das Mercola Labor berichtete, dass das Maturierungsmedium eine initiale Glukosekonzentration von 3 mmol/l enthält. Unsere Analysen bestätigten diesen Wert mit einer initialen Glukosekonzentration von 2,7 mmol/l. Außerdem weist das Maturierungsmedium mit 7,6 mmol/l, im Vergleich zum Standard-EHT-Medium mit 0,5 mmol/l, eine wesentlich höhere initiale Laktatkonzentration auf. Diese Umstände erklären außerdem, weshalb EHTs eine initiale Kultur benötigen, bis sie die adulte Nährstoffumgebung des Maturierungsmediums überleben können. Des Weiteren berichtete das Mercola Labor, dass die Glukose im Maturierungsmedium nach 24 Stunden aufgebraucht sei. Laut Protokoll aus Stanford erfolgt ein Mediumwechsel alle vier Tage, womit sich ein Glukoseentzug für drei Tage ergibt. Dieser soll die Maturierung der Kardiomyozyten verbessern, da diese gezwungen werden andere Substrate zu verstoffwechseln und vermehrt oxidative Stoffwechselwege nutzen. Vier Stunden nach dem Wechsel der Kulturmedien entstanden in beiden Gruppen im Verhältnis nahezu zwei Laktat pro Glukosemolekül, welches der Ausbeute der anaeroben Glykolyse entspricht. Dieses Verhältnis blieb bei den EHTs der Standard-EHT-Kultur zu den weiteren Analysezeitpunkten bestehen. Die EHTs im Standard-EHT-Medium gewannen demnach ihre Energie hauptsächlich über die anaerobe Glykolyse. Die EHTs im Maturierungsmedium waren im Vergleich zu den EHTs der Standard-EHT-Kultur in der Lage vermehrt oxidative Stoffwechselprozesse zu nutzen und unter Glukosekarenz auf andere Substrate zurückzugreifen. Mills et al. (2017) erzielten mit ihrem Maturierungsmedium hiPSC-Kardiomyozyten mit einer funktionellen und metabolischen verbesserten Reife im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe. Deren serumfreies Maturierungsmedium enthält wenig Glukose, viel Palmitat und kein Insulin. In diesem Maturierungsmedium ist kein Insulin enthalten, da Insulin die Glykolyse auslöst und proliferative Effekte auf Zellen ausübt. Insulin ist in den meisten Kulturmedien als essentieller Bestandteil für Überleben und Funktion der hiPSC-Kardiomyozyten enthalten (Ulmer und Eschenhagen 2019). Horikoshi et al. (2019) kultivieren hiPSC-Kardiomyozyten über eine Anfangsphase von 20 Tagen im Glukose-haltigen Medium. Es folgt eine Reinigung der Kardiomyozyten für sieben Tage in Glukose-freiem Laktatmedium und folgend eine Phase von drei bis sieben Tagen im Glukose-freien Fettsäure-haltigen Maturierungsmedium. Dieser Kulturansatz führte zu einer verbesserten metabolischen und strukturellen Reife mit vermehrter oxidativer Kapazität.

Der Fakt, dass bei EHTs im Gegensatz zur 2D Kultur nach 24 Stunden im Maturierungsmedium aus Stanford die Glukose noch nicht vollständig verbraucht ist,

impliziert eine stärkere Nutzung anderer Substrate. Ein weiteres Extendieren bis zum Wechsel der Kulturmedien auf sechs oder sieben Tage könnte, neben einer Zeit- und Kostenersparnis im Laboralltag, die metabolische Maturierung noch weiter vorantreiben. Des Weiteren sind Argumente zur Kosten-Nutzen-Relation nicht außer Acht zu lassen, um das EHT-Format praktikabel und bezahlbar in den klinischen Alltag integrieren zu können (Breckwoldt et al. 2017).

In den EHTs der Maturierungsmedium-Kultur konnte im Vergleich zur Standard-EHT-Kultur keine höhere Mitochondrienbiogenese erzielt werden. Die Analyse der mitochondrialen DNA-Gehalte im Vergleich zum genomischen DNA-Gehalt ergaben gleiche Ergebnisse in beiden Konditionen, obwohl eine höhere Mitochondriendichte bei erhöhter oxidativer Atmungskapazität erwartet werden konnte. Eine hohe Mitochondriendichte ist notwendig und physiologisch, um den hohen Energiebedarf des Herzens zu decken (Ulmer und Eschenhagen 2019). Es wurde bereits gezeigt, dass Kardiomyozyten im EHT-Format im Vergleich zu 2D-Kulturen eine 1,5-fach erhöhte Mitochondrienmasse entwickeln und damit verstärkt die Fähigkeit zu oxidativen Stoffwechselprozessen besitzen. Außerdem ist das Verhältnis von mitochondrialem zu genomischem DNA-Gehalt im EHT-Format dreimal so groß wie in 2D-Kulturen, dennoch weiterhin 1,5-fach geringer als in nativem Herzgewebe (Ulmer et al. 2018). Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass diese Änderungen nicht auf Transkriptions-, sondern auf Proteomebene stattfinden. Dies bedeutet, dass es zu keinen Änderungen in der Genexpression von Stoffwechselgenen in 2D- und 3D-Kulturen kommt. Im EHT-Format ergibt sich die verbesserte Oxidationskapazität vermutlich durch posttranslationale Regulationen bei der Enzymherstellung.

## **6.6 Struktureller Reifestatus**

Durch die dreidimensionale Kultivierung der Kardiomyozyten im EHT-Format konnte bereits eine deutliche Verbesserung des strukturellen Reifegrades erzielt werden. Im Frühstadium sind die Kardiomyozyten abgerundete kleine Zellen, die unorganisiert im Gewebe verteilt sind. In den Paraffinschnitten der Ausgangslage waren sehr viele kleine und runde Zellen unorganisiert in den EHT-Gewebekörper eingebettet. Die frisch kultivierten Kardiomyozyten waren sowohl MLC2a- als auch MLC2v-positiv. Durch die Kultivierung zwischen den Silikonpfosten wird eine räumliche Orientierung und Längsausrichtung der Kardiomyozyten mit verbesserter Ultrastruktur unter vermehrter Ausbildung von Gap junctions und Zellorganellen erreicht, wodurch gleichzeitig eine Verbesserung der Kontraktionskraft erzielt wird (Schaaf et al. 2011, Lundy et al. 2013).

Die bereits beschriebenen optischen Veränderungen der EHTs im Verlauf der Kulturzeit waren auch in den histologischen Untersuchungen wiederzuerkennen. Die EHTs der Standard-EHT-Kultur waren im Vergleich zu den EHTs im Maturierungsmedium schmäler und wiesen Einrisse oder mehr Unterbrechungen in den Gewebeschnitten auf. Die bessere Langzeitstabilität der EHTs im Maturierungsmedium wurde weiter von den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie bestätigt. Quantitative Aussagen konnten anhand der Elektronenmikroskopie nicht getroffen werden, da nur je ein EHT pro Kondition aus dem ERC018-Versuchsdurchlauf an das Zentrum für molekulare Neurobiologie gegeben wurde. Dennoch unterstützen und bestätigen die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie, sowie die unabhängigen Eindrücke von Frau Dr. Schweizer, die Tendenzen, Beobachtungen und Ergebnisse. Das EHT der Standard-EHT-Kultur zeigte ein wesentlich inhomogeneres Gewebebild mit undefinierterer Ultrastruktur. Des Weiteren gab es vermehrte Einlagerungen und Anzeichen für vermehrten Zelltod in der Standard-EHT-Probe, wohingegen das EHT der Maturierungsmedium-Kultur ein homogenes Gewebebild mit physiologischerem Gewebekörper zeigte. In dem EHT der Maturierungsmedium-Kultur waren die Mitochondrien interfibrillär lokalisiert mit deutlicheren und definierteren Cristae der Mitochondrien. Auch die Sarkomere des EHTs im Maturierungsmedium zeigten sich länger mit deutlich definierteren Z-Scheiben. Die Immunfluoreszenzbilder bestätigten die Tendenz einer definierteren Ultrastruktur mit längeren Sarkomeren für die EHTs der Maturierungsmedium-Kultur ( $1,90 \mu\text{m} \pm 0,025 \mu\text{m}$ ) im Vergleich zur Standard-EHT-Kultur ( $1,68 \mu\text{m} \pm 0,02 \mu\text{m}$ ). Die Sarkomerlängen der Standard-EHT-Kultur glichen eher dem Phänotyp unreifer Kardiomyozyten, während die EHTs der Maturierungsmedium-Kultur nahezu Sarkomerlängen nativer Kardiomyozyten erreichten. Im nativen Herzgewebe sind die Sarkomere ca.  $2,2 \mu\text{m}$  lang. Unreife hiPSC-Kardiomyozyten weisen Sarkomerlängen von ca.  $1,65 \mu\text{m}$  auf (Yang et al. 2014a, Kolanowski et al. 2017, Machiraju und Greenway 2019).

Die Auswertungen der immunhistochemischen Färbungen ergaben im Vergleich der beiden Konditionen, sowohl für die Färbungen der atrialen Isoform der Myosin-Leichtkette (MLC2a) als auch der ventrikulären Isoform der Myosin-Leichtkette (MLC2v), die Tendenz für ein besseres Ergebnis für die EHTs im Maturierungsmedium. Im Vergleich der beiden Konditionen ergab sich die Tendenz für einen stärkeren Rückgang von MLC2a-positiven Zellen und noch mehr MLC2v-positiven Zellen im Vergleich zur Ausgangslage für die EHTs der Maturierungsmedium-Kultur. Eine verstärkte Expression der ventrikulären Isoform entspricht einem erwünschten und verbesserten Reifestatus und einer Ausdifferenzierung hin zu ventrikulären Kardiomyozyten (Schaub et al. 1998, Weber et al.

2016, Brandao et al. 2017). Das humane Myosinmolekül besteht sowohl aus zwei schweren als auch zwei Paaren leichter Myosinketten (Schaub et al. 1998). Im Western Blot wurden die Myosin-Schwerketten ( $\alpha$ -MHC und  $\beta$ -MHC) quantifiziert. Bei Einzelbetrachtung der Versuchsdurchläufe zeigte sich ein variables Ergebnis der  $\alpha$ -MHC- und  $\beta$ -MHC-Verhältnisse. Dies kann auf die unterschiedlichen Ladungsmengen pro Reaktionstasche und unterschiedlichen cTNT-Mengenverhältnisse zurückgeführt werden. Im Gesamtdurchschnitt wiesen jedoch die EHTs der Maturierungsmedium-Kultur mehr  $\beta$ -MHC als die EHTs der Standard-EHT-Kultur auf. Das Schilddrüsenhormon Triiodthyronin (T3) fördert die  $\alpha$ -MHC Expression. Das Standard-EHT-Medium enthält durch den Zusatz von Pferdeserum Triiodthyronin (Schaub et al. 1998, Yang et al. 2014b). Dies könnte die ermittelte Tendenz zu verhältnismäßig mehr  $\alpha$ -MHC in der Standard-EHT-Kultur bedingen und den Wechsel der Expression in diesen EHTs stören.

Im nativen Herzgewebe erfolgt während der Entwicklung ein Wechsel der Expression von der schnelleren  $\alpha$ -MHC-Isoform zu einer Zunahme der Transkriptkonzentration der langsameren  $\beta$ -MHC-Isoform (Schaaf et al. 2011, Lundy et al. 2013).  $\alpha$ -MHC stellt die fetale und atriale Isoform dar, wohingegen  $\beta$ -MHC die adulte und ventrikuläre Isoform darstellt. Im humanen erwachsenen Herzen ist  $\alpha$ -MHC zusammen mit der artialen MLC auf das Atrium beschränkt, während  $\beta$ -MHC zusammen mit der ventrikulären MLC in den Ventrikeln vorzufinden ist (Schaub et al. 1998). Eine verstärkte Expression der ventrikulären Isoformen entspricht einem verbesserten strukturellen Reifestatus (Weber et al. 2016). Im Vergleich zur Non-failing Heart Probe wiesen die EHTs beider Konditionen jedoch insgesamt noch einen großen Anteil an  $\alpha$ -MHC auf, womit der erwünschte Reifestatus noch nicht vollständig erreicht ist.

## 6.7 Ausblick

Die Ergebnisse zeigen, dass das serumfreie Maturierungsmedium die Reifung und Stabilität von EHTs weiter steigern konnte und damit dazu beitragen kann, das volle Potenzial von hiPSC-Kardiomyozyten für humantherapeutische Möglichkeiten auszuschöpfen. Mit der Kultur im Maturierungsmedium konnte vor allem eine deutliche Steigerung der metabolischen und strukturellen Reife erzielt werden. Mit der Kultur von EHTs im Maturierungsmedium besteht die Möglichkeit zur serumfreien Kultur von hiPSC-Kardiomyozyten, die sich als sehr unaufwendig und zeitsparend herausstellte. Das Kulturprotokoll muss zur Ausschöpfung des hiPSC-Potentials weiter ausgearbeitet werden, um den GMP-Anforderungen gänzlich gerecht werden zu können. Viele Herstellungsschritte der EHTs basieren noch auf serumhaltigen Schritten und die initiale

Kultur in serumhaltigem Medium zur Entwicklung der EHTs stellte sich in diesem Versuch als unumgänglich heraus. Zur initialen Kultur muss entweder ein serumfreies Medium zur Formation entwickelt oder das vorhandene Medium modifiziert werden. Möglicherweise könnte dem Medium humanes patientenzugehöriges Serum zugegeben werden. Patientenzugehöriges Serum ist xeno-free und könnte den GMP-Anforderungen gerecht werden. Andererseits wären dafür weitere kostenintensive Tests notwendig und die Humanserum-haltige Kultur als Zusatz zum Maturierungsmedium stellte sich in diesem Versuch als schlecht heraus. Den Ablauf als klinische Applikation würde demnach eine initiale oder durchgehende Kultur der EHTs mit patienteneigenem Serum verteuern und den Alltag im Umgang mit der Applikation, allein durch den Mehraufwand der Serumgewinnung vom Patienten, erschweren. Eine klinische Applikation sollte kostengünstig, erschwinglich und erreichbar für jedermann gestaltet werden mit möglicher Aussicht auf Übernahme der Kosten von den Krankenkassen. Eine Modifizierung des Maturierungsmediums über einen Zusatz von Glukose, Hormonen oder Wachstumsfaktoren könnte effektiver und kostengünstiger sein. Des Weiteren könnte ein Kulturprotokoll mit verschiedenen Kulturphasen jeweils angepasster an adulte Bedingungen, wie es auch Mills et al. (2017) oder Horikoshi et al. (2019) beschrieben haben, die hiPSC-Kardiomyozyten von ihrem fetalen Zustand hin zu reifen adulten Kardiomyozyten begleiten.

Die serumhaltigen Herstellungs- und Kulturschritte und die begrenzte Anzahl der Versuchsdurchläufe limitieren die Resultate dieser Arbeit. In zukünftigen Analysen und Projekten muss ein Kulturprotokoll herausgearbeitet werden, welches das volle Potenzial von hiPSC-Kardiomyozyten für humantherapeutische Möglichkeiten nutzbar macht. Je definierter und bekannter die Herstellungsschritte und die Kultur von EHTs werden, desto sicherer kann das Produkt eingestuft und für therapeutische Zwecke eingesetzt werden. Die Anpassungen der Kultur im Maturierungsmedium mit der Ausarbeitung eines serumfreien Kulturprotokolls, welches ein Zusammenspiel der reifefördernden Maßnahmen beinhaltet, erscheinen umsetzbar - im Vergleich zu dem, was bis heute in diesem Bereich bereits erreicht worden ist.

## 7 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen eine der häufigsten Todesursachen europa- und weltweit dar. Mit derzeitig angewandten Therapieoptionen werden lediglich Symptome verbessert und das weitere Fortschreiten der Krankheit verlangsamt. Individualisierte kausale Therapieansätze fehlen bislang. Kardiomyozyten abgeleitet aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC-Kardiomyozyten) könnten neue therapeutische und diagnostische Optionen bei kardiovaskulären Erkrankungen bieten, aber der momentane unreife, eher fetale Zustand und die undefinierten serumbasierten Kulturprotokolle schränken ihr Potenzial ein. Die Kultur von hiPSC-Kardiomyozyten als dreidimensional konstruiertes Herzgewebe (Engineered Heart Tissue, EHT) fördert die physiologische, strukturelle und metabolische Reife.

In dieser Arbeit wurde das Standard-EHT-Medium auf Pferdeserumbasis mit einem serumfreien Maturierungsmedium (Mercola Labor, Stanford, Vereinigte Staaten, unveröffentlichtes Protokoll) verglichen, welches in 2D-Kulturen zu beeindruckenden Ergebnissen führte. In drei aufeinander folgenden Versuchsdurchläufen mit zwei verschiedenen weiblichen gesunden Kontrollzelllinien wurde analysiert, ob zusätzliche Maturierungseffekte bei hiPSC-Kardiomyozyten in EHT-Kultur erzielt werden können. Nach einer Formationsphase in serumhaltigem Standard-EHT-Medium wurde die Hälfte der EHTs für 30 - 50 Tage in dem Maturierungsmedium kultiviert oder im Standardmedium belassen. Die videooptischen Analysen der Kontraktionen zeigten eine ähnliche Kraftentwicklung über die Kulturzeit sowie eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung und  $\beta$ -adrenerge Reaktion in beiden Gruppen. Als Hinweis auf die funktionelle Reifung blieben die EHTs im Maturierungsmedium formstabiler und hörten nach 50 Tagen nahezu auf spontan zu schlagen, reagierten jedoch weiterhin positiv auf elektrische Stimulation. Des Weiteren wiesen sie einen vermehrt oxidativen Metabolismus und eine bessere histologische Struktur bei Immunfärbungen von MLC2v und  $\alpha$ -Actinin, sowie in elektronenmikroskopischen Aufnahmen auf.

Die Ergebnisse legen nahe, dass das neue serumfreie Maturierungsmedium die Reife und Stabilität von EHTs weiter erhöhen und dazu beitragen kann, das volle Potenzial von hiPSC-Kardiomyozyten auszuschöpfen. Die für die Generierung von EHTs notwendigen Herstellungs- und Kulturschritte in serumhaltigem Medium und die begrenzte Anzahl der Versuchsdurchläufe limitieren die Aussagekraft dieser Arbeit. In zukünftigen Analysen und Projekten muss ein Kulturprotokoll herausgearbeitet werden, welches den Anforderungen

der guten Herstellungspraxis (good manufacturing practice, GMP) komplett gerecht wird und das volle Potenzial von hiPSC-Kardiomyozyten für humantherapeutische Möglichkeiten nutzbar macht. Je definierter und bekannter die Herstellungsschritte und die Kultur von EHTs werden, desto sicherer kann das Produkt eingestuft und für therapeutische Zwecke eingesetzt werden.

## 8 Summary

Cardiovascular diseases are one of the most common causes of death in Europe and around the world. The currently available treatment options improve symptoms but only slow the progression of the disease. Individualized causal therapeutic approaches are so far missing. Cardiomyocytes derived from humane induced pluripotent stem cells (hiPSC-CM) could offer new therapeutic and diagnostic options for heart diseases, but the current immature and rather fetal state and undefined serum-based culture protocols limit their potential. The culture of hiPSC-CM as Engineered Heart Tissues (EHT) promotes physiological, structural, and metabolic maturity.

In this thesis the standard horse serum-based EHT medium was compared with a serum-free maturation medium (Mercola Lab, Stanford, United States of America, unpublished protocol), which produced impressive results in previous 2D cultures. EHTs from three independent differentiation runs with two different female healthy control cell lines were compared whether a serum-free culture in maturation medium further increases maturation of hiPSC-CM. After a formation phase in serum-containing standard EHT medium, half of the EHTs were transferred to the maturation medium for 30 - 50 days or left in the standard medium. The video-optical analysis of the contractions showed a similar force development over culture time, a positive force-frequency relationship and  $\beta$ -adrenergic reaction in both groups. As an indication of functional maturation, EHTs in the maturation medium remained more stable and almost stopped beating spontaneously after 50 days, but remained responsive to electrical stimulation. Furthermore, they showed a better oxidative metabolism and a better histological structure in immunostaining of MLC2v and  $\alpha$ -actinin and in electron microscopy.

The results suggest that the new serum-free maturation medium further increases the maturation and stability of EHTs and help to unravel the full potential of hiPSC-CM. The serum-containing production and culture steps in the beginning of the EHT generation and the limited number of experimental runs limit the generalizability of the results. In future analyzes and projects, a culture protocol that adheres to good manufacturing practice (GMP) should be developed, which makes the full potential of hiPSC-CM available for human therapeutic possibilities. The more defined and better known the manufacturing steps and the culture of EHTs become, the safer the product can be classified and used for therapeutic purposes.

## 9 Literaturverzeichnis

- BRANDAO, K. O., TABEL, V. A., AT SMA, D. E., MUMMERY, C. L. & DAVIS, R. P. 2017. Human pluripotent stem cell models of cardiac disease: from mechanisms to therapies. *Dis Model Mech*, 10, 1039-1059.
- BRECKWOLDT, K., LETUFFE-BRENIERE, D., MANNHARDT, I., SCHULZE, T., ULMER, B., WERNER, T., BENZIN, A., KLAMPE, B., REINSCH, M. C., LAUFER, S., SHIBAMIYA, A., PRONDZYNSKI, M., MEARINI, G., SCHADE, D., FUCHS, S., NEUBER, C., KRAMER, E., SALEEM, U., SCHULZE, M. L., RODRIGUEZ, M. L., ESCHENHAGEN, T. & HANSEN, A. 2017. Differentiation of cardiomyocytes and generation of human engineered heart tissue. *Nat Protoc*, 12, 1177-1197.
- BROWN, D. A., PERRY, J. B., ALLEN, M. E., SABBAH, H. N., STAUFFER, B. L., SHAIKH, S. R., CLELAND, J. G., COLUCCI, W. S., BUTLER, J., VOORS, A. A., ANKER, S. D., PITT, B., PIESKE, B., FILIPPATOS, G., GREENE, S. J. & GHEORGHIAD, M. 2017. Expert consensus document: Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nat Rev Cardiol*, 14, 238-250.
- BRUYNEEL, A. A., MCKEITHAN, W. L., FEYEN, D. A. & MERCOLA, M. 2018. Will iPSC-cardiomyocytes revolutionize the discovery of drugs for heart disease? *Curr Opin Pharmacol*, 42, 55-61.
- BURKART, A. M., TAN, K., WARREN, L., IOVINO, S., HUGHES, K. J., KAHN, C. R. & PATTI, M. E. 2016. Insulin Resistance in Human iPS Cells Reduces Mitochondrial Size and Function. *Sci Rep*, 6, 22788.
- ESCHENHAGEN, T. & CARRIER, L. 2019. Cardiomyopathy phenotypes in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes-a systematic review. *Pflugers Arch*, 471, 755-768.
- ESCHENHAGEN, T., FINK, C., REMMERS, U., SCHOLZ, H., WATTCHOW, J., WEIL, J., ZIMMERMANN, W., DOHMEN, H. H., SCHAFFER, H., BISHOPRIC, N., WAKATSUKI, T. & ELSON, E. L. 1997. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *Faseb j*, 11, 683-94.
- FINK, C., ERGUN, S., KRALISCH, D., REMMERS, U., WEIL, J. & ESCHENHAGEN, T. 2000. Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. *Faseb j*, 14, 669-79.
- GOUVEIA, B. G., RIJO, P., GONCALO, T. S. & REIS, C. P. 2015. Good manufacturing practices for medicinal products for human use. *J Pharm Bioallied Sci*, 7, 87-96.
- HANSEN, A., EDER, A., BONSTRUP, M., FLATO, M., MEWE, M., SCHAAF, S., AKSEHIRLIOGLU, B., SCHWOERER, A. P., UEBELER, J. & ESCHENHAGEN, T. 2010. Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circ Res*, 107, 35-44.
- HIRT, M. N., BOEDDINGHAUS, J., MITCHELL, A., SCHAAF, S., BORNCHEN, C., MULLER, C., SCHULZ, H., HUBNER, N., STENZIG, J., STOEHR, A., NEUBER, C., EDER, A., LUTHER, P. K., HANSEN, A. & ESCHENHAGEN, T. 2014a. Functional improvement and maturation of rat and human engineered heart tissue by chronic electrical stimulation. *J Mol Cell Cardiol*, 74, 151-61.
- HIRT, M. N., HANSEN, A. & ESCHENHAGEN, T. 2014b. Cardiac tissue engineering: state of the art. *Circ Res*, 114, 354-67.
- HORIKOSHI, Y., YAN, Y., TERASHVILI, M., WELLS, C., HORIKOSHI, H., FUJITA, S., BOSNJAK, Z. J. & BAI, X. 2019. Fatty Acid-Treated Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human

- Cardiomyocytes Exhibit Adult Cardiomyocyte-Like Energy Metabolism Phenotypes. *Cells*, 8.
- KOLANOWSKI, T. J., ANTOS, C. L. & GUAN, K. 2017. Making human cardiomyocytes up to date: Derivation, maturation state and perspectives. *Int J Cardiol*, 241, 379-386.
- LEMOINE, M. D., MANNHARDT, I., BRECKWOLDT, K., PRONDZYNSKI, M., FLENNER, F., ULMER, B., HIRT, M. N., NEUBER, C., HORVATH, A., KLOTH, B., REICHENSPURNER, H., WILLEMS, S., HANSEN, A., ESCHENHAGEN, T. & CHRIST, T. 2017. Human iPSC-derived cardiomyocytes cultured in 3D engineered heart tissue show physiological upstroke velocity and sodium current density. *Sci Rep*, 7, 5464.
- LIAO, Y. J., CHEN, Y. S., LEE, J. X., CHEN, L. R. & YANG, J. R. 2018. Effects of Klf4 and c-Myc Knockdown on Pluripotency Maintenance in Porcine Induced Pluripotent Stem Cell. *Cell J*, 19, 640-646.
- LOPASCHUK, G. D. & JASWAL, J. S. 2010. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 56, 130-40.
- LUNDY, S. D., ZHU, W. Z., REGNIER, M. & LAFLAMME, M. A. 2013. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*, 22, 1991-2002.
- MACHIRAJU, P. & GREENWAY, S. C. 2019. Current methods for the maturation of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *World J Stem Cells*, 11, 33-43.
- MAILLET, M., VAN BERLO, J. H. & MOLKENTIN, J. D. 2013. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 38-48.
- MANNHARDT, I., BRECKWOLDT, K., LETUFFE-BRENIERE, D., SCHAAF, S., SCHULZ, H., NEUBER, C., BENZIN, A., WERNER, T., EDER, A., SCHULZE, T., KLAMPE, B., CHRIST, T., HIRT, M. N., HUEBNER, N., MORETTI, A., ESCHENHAGEN, T. & HANSEN, A. 2016. Human Engineered Heart Tissue: Analysis of Contractile Force. *Stem Cell Reports*, 7, 29-42.
- MARTINEZ-FERNANDEZ, A., NELSON, T. J., REYES, S., ALEKSEEV, A. E., SECRETO, F., PEREZ-TERZIC, C., BERALDI, R., SUNG, H. K., NAGY, A. & TERZIC, A. 2014. iPS cell-derived cardiogenicity is hindered by sustained integration of reprogramming transgenes. *Circ Cardiovasc Genet*, 7, 667-76.
- MAXWELL, J. T. & XU, C. 2018. Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes Grow Up: Start Young and Train Harder. *Cell Stem Cell*, 22, 790-791.
- MCGRATH, M., TAM, E., SLADKOVA, M., ALMANAIE, A., ZIMMER, M. & DE PEPPO, G. M. 2019. GMP-compatible and xeno-free cultivation of mesenchymal progenitors derived from human-induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 10, 11.
- MCMURRAY, J. J., ADAMOPOULOS, S., ANKER, S. D., AURICCHIO, A., BOHM, M., DICKSTEIN, K., FALK, V., FILIPPATOS, G., FONSECA, C., GOMEZ-SANCHEZ, M. A., JAARSMA, T., KOBER, L., LIP, G. Y., MAGGIONI, A. P., PARKHOMENKO, A., PIESKE, B. M., POPESCU, B. A., RONNEVIK, P. K., RUTTEN, F. H., SCHWITTER, J., SEFEROVIC, P., STEPINSKA, J., TRINDADE, P. T., VOORS, A. A., ZANNAD, F. & ZEIHNER, A. 2012. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*, 33, 1787-847.
- METRA, M., CARUBELLI, V., RAVERA, A. & STEWART COATS, A. J. 2017. Heart failure 2016: still more questions than answers. *Int J Cardiol*, 227, 766-777.

- MILLS, R. J., TITMARSH, D. M., KOENIG, X., PARKER, B. L., RYALL, J. G., QUAIFFE-RYAN, G. A., VOGES, H. K., HODSON, M. P., FERGUSON, C., DROWLEY, L., PLOWRIGHT, A. T., NEEDHAM, E. J., WANG, Q. D., GREGOREVIC, P., XIN, M., THOMAS, W. G., PARTON, R. G., NIELSEN, L. K., LAUNIKONIS, B. S., JAMES, D. E., ELLIOTT, D. A., PORRELLO, E. R. & HUDSON, J. E. 2017. Functional screening in human cardiac organoids reveals a metabolic mechanism for cardiomyocyte cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E8372-e8381.
- MUMMERY, C. L. 2018. Perspectives on the Use of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in Biomedical Research. *Stem Cell Reports*, 11, 1306-1311.
- PONIKOWSKI, P., ANKER, S. D., ALHABIB, K. F., COWIE, M. R., FORCE, T. L., HU, S., JAARSMA, T., KRUM, H., RASTOGI, V., ROHDE, L. E., SAMAL, U. C., SHIMOKAWA, H., BUDI SISWANTO, B., SLIWA, K. & FILIPPATOS, G. 2014. Heart failure: preventing disease and death worldwide. *ESC Heart Fail*, 1, 4-25.
- RICKENBACHER, P. 2001. *Herzinsuffizienz: Epidemiologie, Pathophysiologie*.
- RONALDSON-BOUCHARD, K., MA, S. P., YEAGER, K., CHEN, T., SONG, L., SIRABELLA, D., MORIKAWA, K., TELES, D., YAZAWA, M. & VUNJAK-NOVAKOVIC, G. 2018. Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. *Nature*, 556, 239-243.
- SCHAAF, S., SHIBAMIYA, A., MEWE, M., EDER, A., STOHR, A., HIRT, M. N., RAU, T., ZIMMERMANN, W. H., CONRADI, L., ESCHENHAGEN, T. & HANSEN, A. 2011. Human engineered heart tissue as a versatile tool in basic research and preclinical toxicology. *PLoS One*, 6, e26397.
- SCHAUB, M. C., HEFTI, M. A., ZUellig, R. A. & MORANO, I. 1998. Modulation of contractility in human cardiac hypertrophy by myosin essential light chain isoforms. *Cardiovasc Res*, 37, 381-404.
- SCHULZE, M. L., LEMOINE, M. D., FISCHER, A. W., SCHERSCHEL, K., DAVID, R., RIECKEN, K., HANSEN, A., ESCHENHAGEN, T. & ULMER, B. M. 2019. Dissecting hiPSC-CM pacemaker function in a cardiac organoid model. *Biomaterials*, 206, 133-145.
- STEFFEL, J. 2014. *Herz-Kreislauf*, Berlin u.a., Springer.
- STOHR, A., FRIEDRICH, F. W., FLENNER, F., GEERTZ, B., EDER, A., SCHAAF, S., HIRT, M. N., UEBELER, J., SCHLOSSAREK, S., CARRIER, L., HANSEN, A. & ESCHENHAGEN, T. 2013. Contractile abnormalities and altered drug response in engineered heart tissue from Mybpc3-targeted knock-in mice. *J Mol Cell Cardiol*, 63, 189-98.
- TAKAHASHI, K., TANABE, K., OHNUKI, M., NARITA, M., ICHISAKA, T., TOMODA, K. & YAMANAKA, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861-72.
- TAKAHASHI, K. & YAMANAKA, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-76.
- TIBURCY, M., HUDSON, J. E., BALFANZ, P., SCHLICK, S., MEYER, T., CHANG LIAO, M. L., LEVENT, E., RAAD, F., ZEIDLER, S., WINGENDER, E., RIEGLER, J., WANG, M., GOLD, J. D., KEHAT, I., WETTWER, E., RAVENS, U., DIERICKX, P., VAN LAAKE, L. W., GOUMANS, M. J., KHADJEH, S., TOISCHER, K., HASENFUSS, G., COUTURE, L. A., UNGER, A., LINKE, W. A., ARAKI, T., NEEL, B., KELLER, G., GEPSTEIN, L., WU, J. C. & ZIMMERMANN, W. H. 2017. Defined Engineered Human Myocardium With Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modeling and Repair. *Circulation*, 135, 1832-1847.

- ULMER, B. & ESCHENHAGEN, T. 2019. *Human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for studying energy metabolism.*
- ULMER, B. M., STOEHR, A., SCHULZE, M. L., PATEL, S., GUCEK, M., MANNHARDT, I., FUNCKE, S., MURPHY, E., ESCHENHAGEN, T. & HANSEN, A. 2018. Contractile Work Contributes to Maturation of Energy Metabolism in hiPSC-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cell Reports*, 10, 834-847.
- VEERMAN, C. C., KOSMIDIS, G., MUMMERY, C. L., CASINI, S., VERKERK, A. O. & BELLIN, M. 2015. Immaturity of human stem-cell-derived cardiomyocytes in culture: fatal flaw or soluble problem? *Stem Cells Dev*, 24, 1035-52.
- WEBER, N., SCHWANKE, K., GRETEN, S., WENDLAND, M., IORGA, B., FISCHER, M., GEERS-KNORR, C., HEGERMANN, J., WREDE, C., FIEDLER, J., KEMPF, H., FRANKE, A., PIEP, B., PFANNE, A., THUM, T., MARTIN, U., BRENNER, B., ZWEIGERDT, R. & KRAFT, T. 2016. Stiff matrix induces switch to pure beta-cardiac myosin heavy chain expression in human ESC-derived cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol*, 111, 68.
- WEINBERGER, F., BRECKWOLDT, K., PECHA, S., KELLY, A., GEERTZ, B., STARBATTY, J., YORGAN, T., CHENG, K. H., LESSMANN, K., STOLEN, T., SCHERRER-CROSBIE, M., SMITH, G., REICHENSPURNER, H., HANSEN, A. & ESCHENHAGEN, T. 2016. Cardiac repair in guinea pigs with human engineered heart tissue from induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med*, 8, 363ra148.
- WEINBERGER, F., MANNHARDT, I. & ESCHENHAGEN, T. 2017. Engineering Cardiac Muscle Tissue: A Maturing Field of Research. *Circ Res*, 120, 1487-1500.
- YANG, X., PABON, L. & MURRY, C. E. 2014a. Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res*, 114, 511-23.
- YANG, X., RODRIGUEZ, M., PABON, L., FISCHER, K. A., REINECKE, H., REGNIER, M., SNIADOCKI, N. J., RUOHOLA-BAKER, H. & MURRY, C. E. 2014b. Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol*, 72, 296-304.
- YOSHIDA, S., MIYAGAWA, S., FUKUSHIMA, S., KAWAMURA, T., KASHIYAMA, N., OHASHI, F., TOYOFUKU, T., TODA, K. & SAWA, Y. 2018. Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes by Soluble Factors from Human Mesenchymal Stem Cells. *Mol Ther*, 26, 2681-2695.
- ZIMMERMANN, W. H., SCHNEIDERBANGER, K., SCHUBERT, P., DIDIE, M., MUNZEL, F., HEUBACH, J. F., KOSTIN, S., NEUHUBER, W. L. & ESCHENHAGEN, T. 2002. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res*, 90, 223-30.

## 10 Danksagung

Mit diesem Kapitel möchte ich mir erneut bewusst werden wer mir diesen wunderschönen Ausflug und Einblick in die Wissenschaft ermöglichte und mich ganz herzlich bedanken.

Als Erstes möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Eschenhagen für die richtige Tendenz bedanken, mich für ein experimentelles Projekt begeistern zu können. Die Pflege meiner EHTs und die Bearbeitung des Themas haben mir sehr viel Freude bereitet. Die Arbeit in Ihrem Institut hat, nach Ihren bescheidenen Beschreibungen, meine Erwartungen vollkommen übertroffen. Vielen Dank für die Erlaubnis, die Einrichtungen des Institutes nutzen und für kurze Zeit Teil Ihres wundervollen Teams werden zu dürfen.

Bei Frau Dr. Bärbel Ulmer möchte ich mich für die fachliche und fürsorgliche Betreuung der praktischen Durchführung dieser Arbeit, mit stetigem Erweitern meiner Selbstständigkeit im Labor, ganz herzlich bedanken. Ich bin froh von einer so leidenschaftlichen und selbstlosen Wissenschaftlerin betreut worden zu sein und dankbar, dass ich so viel Wissen und Geduld habe erfahren dürfen! Die gemeinsame Zeit hat mir sehr gut getan und es war umso schöner auch Zeit außerhalb des Laboralltags verbracht zu haben.

Weiter möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanken, die ich auf dem Weg meiner Auswertungen besser kennen lernen durfte und von denen ich immer eine hilfsbereite und freundliche Unterstützung erfahren habe. Ich habe mich immer willkommen und sehr gut aufgenommen gefühlt. Bei Thomas Schulze möchte ich mich für die mühevollen Einarbeitung im Labor bedanken und die vielen interessanten und lustigen Gespräche in der Denkzeile, gemeinsam mit Philine Braun. Des Weiteren möchte ich mich für die Generierung und Bereitstellung der hiPSC-Kardiomyozyten bedanken, wo mein besonderer Dank an Birgit Klampe gerichtet ist.

Ein großer Dank an meinen Partner, Sven Nahrstedt, der mit viel Ausdauer, Geduld und Aufregung die täglichen Geschichten und Neuigkeiten der EHT-Entwicklung mitverfolgte.

Bei meinem Vater möchte ich mich am allermeisten bedanken. Bisher konnten alle meine Wünsche, kleinen und großen Projekte mit Deiner Unterstützung in Erfüllung gehen. Mit Dir involviert habe ich das Gefühl immer eine Lösung finden und das Ziel erreichen zu können. Ich bin sehr dankbar für Alles was ich bisher von Dir lernen durfte und freue mich darauf noch weiter von Dir lernen zu dürfen.

## **11 Lebenslauf**

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## 12 Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift: .....