

Fabrice Fernand Darche

Dr. med.

Generierung von humanen Schrittmacher-ähnlichen Zellen aus adulten und induzierten pluripotenten Stammzellen

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Patrick A. Schweizer

Ziel dieser Arbeit war die Generierung von Zellen mit Schrittmacherzell-ähnlichem Phänotyp aus humanen Stammzellen. Hierfür wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) und humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) als Ausgangszellen eingesetzt. hMSC wurden sowohl aus dem Knochenmark als auch aus dem Fettgewebe gewonnen. Die Differenzierung von hMSC erfolgte für 2 Wochen in serumfreiem Zellkulturmedium RPMI-1640, das unter anderem mit *B27-Supplement* und knochenmorphogenetischem Protein 4 (Bmp4) substituiert wurde. Im Vergleich zu hMSC aus dem Knochenmark (hbMSC) zeigten hMSC aus dem Fettgewebe (haMSC) höhere Proliferationsraten im nativen Zustand und wiesen ein günstigeres Genexpressions- und immunzytochemisches Profil hinsichtlich kardialer Schrittmachermarker auf. Insbesondere waren hohe Level an Connexinen nachweisbar, welche die Ausbildung interzellulärer Kontakte zwischen differenzierten haMSC (dhaMSC) und benachbarter Kardiomyozyten ermöglichen. Kokulturen bestehend aus dhaMSC und neonatalen ventrikulären Rattenkardiomyozyten (NRVM) zeigten länger anhaltende Eigenfrequenzen, die synchroner und regelmäßiger waren als NRVM-Monokulturen. Des Weiteren zeigten dhaMSC hohe Expressionslevel für schrittmacherrelevante Calcium-Kanäle und adrenerge Rezeptoren, passend zu der guten Ansprechbarkeit der Kokulturfrequenzen auf adrenerge Stimulation mit Isoproterenol. Aufgrund der Tatsache, dass trotz Differenzierung der wichtige Schrittmacherkanal *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel 4* (HCN4) in dhaMSC nicht exprimiert wurde, erfolgte eine lentivirale Transduktion mit einem *HCN4*-Konstrukt. Die *HCN4*-Expression führte interessanterweise sowohl im nativen als auch im differenzierten Zustand zu einer Hochregulation der schrittmacherzelltypischen Gene *T-box transcription factor 3* (*TBX3*), *T-box transcription factor 18* (*TBX18*) und *short stature homeobox 2* (*SHOX2*), was auf eine zusätzliche Induktion der nodalen Differenzierung durch *HCN4* hindeutet. In Kokultur-Experimenten mit *HCN4*-transduzierten haMSC zeigte sich eine signifikant höhere Schlagfrequenz als in Kokulturen mit nicht *HCN4*-transduzierten haMSC. Um die Frage nach der Verträglichkeit einer zellulären Transplantation von MSC ins Myokard zu untersuchen, wurden dhaMSC in die freie Wand des linken Ventrikels von Versuchsschweinen eingebracht und vier Wochen nach Transplantation histologisch

untersucht. Hier ergab sich histologisch kein Anhalt für eine Abstoßungsreaktion. Ferner konnten in den transplantierten dhaMSC hohe Fluoreszenzsignale für die bereits *in vitro* detektierten schrittmacherzelltypischen Marker nachgewiesen werden. Darüber hinaus fielen in den transplantierten dhaMSC neu aufgetretene starke Fluoreszenzsignale für HCN4 auf, die vor Implantation in den immunzytochemischen Analysen nicht nachweisbar gewesen waren, was eine weitere Differenzierung dieser Zellen im lebenden Myokard nach Transplantation anzeigt. Die Kombination aus einer *in vitro*-Vordifferenzierung von MSC aus dem Fettgewebe gefolgt von einer zellulären *in vivo*-Differenzierung nach Transplantation ins Myokard scheint also ein interessantes Konzept zur Generierung eines nodalen kardialen Phänotyps darzustellen und sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Die Kokultivierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) mit viszeralen endodermalen Zellen (END-2-Zellen) in einem serumfreien Medium generierte spontan schlagende Cluster nach 10-12 Tagen. Diese zeigten hohe Expressionen der schrittmacherzelltypischen Gene *HCN4*, *TBX3* und *TBX18*, weshalb Versuche zur Transdifferenzierung der Zellen in einen primär nodalen Phänotyp unternommen wurden. Es konnte beobachtet werden, dass eine kardiomyogene Differenzierung durch Transfer von frühen differenzierten hiPSC-Clustern (dhiPSCC) in ein mit fetalem-Kälberserum (FBS) -angereichertes Zellkulturmedium unmittelbar nach dem Beginn der spontanen Aktivität der Zellen zugunsten einer primär nodalen Differenzierung unterdrückt werden konnte. Nach 6 Wochen Kulturdauer wiesen die ausdifferenzierten dhiPSCC hohe Mengen an schrittmacherzelltypischen Transkripten (*HCN4*, *TBX3*, *TBX18* und *SHOX2*) auf, während myokardiale Marker wie *NKX2.5* und *TBX5* deutlich herunterreguliert waren. Die folglich als schrittmacherzelltypische Cluster (SCC) bezeichneten Zellen zeichneten sich funktionell durch regelmäßige und stabile Schlagfrequenzen (70-90 Schläge/Minute) aus und generierten spontane Calcium-Transienten, wie sie typischerweise in kardialen Schrittmacherzellen auftreten. Passend hierzu zeigten Aktionspotentiale (AP) von aus SCC isolierten Einzelzellen, überwiegend Sinusknoten-typische AP-Konfigurationen. Somit ist es gelungen unter Verwendung von hiPSC ein neuartiges Differenzierungsprotokoll zu etablieren, mit dem ein Schrittmacherzell-artiger Phänotyp zuverlässig und reproduzierbar generiert werden konnte. Dieses Ergebnis könnte eine wichtige Grundlage für zukünftige Studien darstellen: Das etablierte Differenzierungsprotokoll ermöglicht zum einen die Generierung eines zellulären *in vitro*-Modells der Sinusknotenerkrankung unter Verwendung von patientenspezifischen hiPSC, mit der Perspektive neue Einblicke in zelluläre Pathomechanismen zu erlangen. Ferner bietet das Differenzierungsprotokoll eine Plattform für Medikamententestungen und eine zelluläre Grundlage für die Generierung eines biologischen Herzschrittmachers. Alle drei Ansätze sind innovative und vielversprechende Konzepte zukünftiger biomedizinischer Forschung.