

Aus der I. Medizinischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. D. Dürschmied)

Weiterführende Untersuchungen zur kardialen Mischkultur aus humanen
induzierten pluripotenten Stammzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Angela Wendel
aus
Jefremowka (Kasachstan)
2024

Dekan: Prof. Dr. med. S. Goerdts

Referent: Prof. Dr. med. I. Akin

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG.....	5
1.1 Klinische Relevanz struktureller Herzerkrankungen	5
1.2 Kardiale Histologie und Physiologie aus Kardiomyozyten-basierter Grundlagenforschung.....	7
1.3 Induzierte, pluripotente Stammzellen und Kardiomyozytendifferenzierung .	11
1.4 Ziele der Arbeit.....	12
2 MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1 Methoden	14
2.1.1 Ethikvotum und Bereitstellung der Zellen	14
2.1.2 Zellkulturelles Arbeiten	14
2.1.3 Kardiomyozytendifferenzierung	17
2.1.4 Quantitative Polymerasekettenreaktion	21
2.1.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	25
2.1.6 Immunhistochemie	27
2.1.7 Durchflusszytometrie	30
2.2 Material.....	34
2.2.1 Medien, Supplemente und Puffer	34
2.2.2 Materialien und Primer für PCR.....	36
2.2.3 Materialien und Antikörper für IHC	38
2.2.4 Materialien und Antikörper für FACS	39
2.2.5 Materialien für ELISA.....	40
2.2.6 Sonstige Materialien	40
2.2.7 Technische Gerätschaften.....	41
2.3 Statistische Auswertung	42

3	ERGEBNISSE	44
3.1	Analysen der Zellkultur im Differenzierungsprozess	44
3.1.1	Pluripotenz-assoziierte Gene	44
3.1.2	Kardiomyozyten- und Kardiomyogenese-assoziierte Gene	46
3.1.3	Zellmorphologie	47
3.1.4	Transmembranöse Ionenkanäle	50
3.1.5	Adhäsionsmoleküle	51
3.2	Subgruppenanalyse	56
3.2.1	Fibroblasten-assoziierte Gene	56
3.2.2	Endothelzellen-assoziierte Gene	58
3.2.3	Glatte Muskelzellen-assoziierte Gene	60
3.2.4	Fettstoffwechsel-assoziierte Gene	62
4	DISKUSSION	64
4.1	Differenzierungsprozess von hiPSC-CM	64
4.2	Subgruppenanalyse der kardialen Mischkultur	71
4.2.1	Fibroblasten-assoziierte Gene	71
4.2.2	Endothelzell-assoziierte Gene	72
4.2.3	Glatte Muskelzellen-assoziierte Gene	73
4.2.4	Fettstoffwechsel-assoziierte Gene	75
4.3	Limitationen	76
5	ZUSAMMENFASSUNG	78
6	LITERATURVERZEICHNIS	80
7	LEBENS LAUF	96
8	DANKSAGUNG	97

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
24-WP	24 Well Platte
96-WP	96 Well Platte
A(260nm)	Absorption bei 260nm
AA	Activin A
ACTA 2	Alpha Actinin 2
AF647	Alexa Fluor 647
AG	Antigen
AK	Antikörper
AMV	Reverse Transkriptase des Avian Myeloblastosis Virus
APC	Allophycocyanin
APOA1	Apolipoprotein A1
ASC	Ascorbinsäure
AV-Knoten	Atrioventrikular-Knoten
B27	Supplement B27
BMP4	bone morphogenetic protein 4, Knochenmorphogenetisches Protein 4
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca	Kalzium
CD	Cluster of Differentiation
CDM	cardiac differentiation medium, kardiales Differenzierungsmedium
cDNA	complementary DNA, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CF	cardiac fibroblasts, kardiale Fibroblasten
CHIR	Chir99021, Wnt-Signalweg Aktivator GSK3 β -Inhibitor
Cl	Chlorid
CM	cardiomyocytes, Kardiomyozyten
cMYC	MYC-Protoonkogen
Coll-I	Collagenase Typ 1
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CS	Chamberslides
CTF1	Cardiotrophin 1
Ct-Wert	Cycle Threshold-Wert, Schwellenwertzyklus

Cx	Connexin
d	day, Tag
D1er	hiPSC-Zellreihe D1
D2er	hiPSC-Zellreihe D2
DAPI	Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DZHK	Deutsches Zentrum für Herz- und Kreislaufforschung
E8	TeSR™-E8™ Kulturmedium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
FABP3	fatty acid binding protein 3, Fettsäure bindendes Protein 3
FACS	fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FGF2	Fibroblast growth factor 2, Fibroblastenwachstumsfaktor 2
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FSC	forward scatter, Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GJ	Gap Junction
GJA1/5/7	Gap Junction Protein Alpha 1/5/7
h	hour, Stunde
HCN2/4	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium and sodium channel 2/4, durch Hyperpolarisation aktivierte, zyklische, Nukleotid-gesteuerte Kanäle
HDL	High Density Lipoprotein
HI	Herzinsuffizienz
hiPSC	human iPSC, humane induzierte pluripotente Stammzellen

hiPSC-CM	aus hiPSC generierte Kardiomyozyten
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
HRST	Herzrhythmusstörungen
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
ICD-10	Internationale, statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
iPSC	induced stem cell, induzierte pluripotente Stammzelle
IWP4	Inhibitor of Wnt-Production 4
KHK	koronare Herzkrankheit
KLF4	Kruppel-like-factor 4
KM	kardiales Medium
KS	Kühlschrank
MCP	Mercaptoethanol
MDM	mesodermales Medium
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minute
miPSC	murine iPSC
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
μ	mikro
NANOG	Homöoboxprotein NANOG, Transkriptionsfaktor
NCM	non-cardiomyocytes, Nichtkardiomyozyten
NCX	Natrium- Kalzium- Exchanger
nm	Nanometer
NYHA	New York Heart Assosiation
OCT4	Oktamer bindender Transkriptionsfaktor 4
p	p-Wert, Signifikanzwert
p(dT)15	Primer mit 15 Desoxythymidinnukleotiden
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat gepufferte Salzlösung

PCR	polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
PECAM1	platelet and endothelial cell adhesion molecule 1
POU5F1	POU Klasse 5 Homöobox 1
qPCR	quantitative PCR
RLT	RNeasy Lysis Buffer
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
Rock1	Rho-Kinase Inhibitor Y27632, StemMACS
RPE	2. Waschpuffer für die RNA-Präparation
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, Zellkulturmedium
RT	Reverse Transkriptase
RW1	1. Waschpuffer für RNA-Präparation
SCN5A	sodium voltage-gated channel alpha subunit 5
SCU	Stem Cell Unit-Göttingen
s	Sekunde
SF	serumfreies Medium
SLC8A1	solute carrier family 8 member A1
SM	Selektionsmedium
SMA	alpha-smooth-muscle-actin, Alpha-Glattmuskel-Aktin
SOX2	SRY-Box-Transkriptionsfaktor 2
SSC	side scatter, Seitwärtsstreulicht
T25er	Zellkulturflasche mit 25cm ² Bodenfläche
T75er	Zellkulturflasche mit 75cm ² Bodenfläche
TNNT2	Troponin T, kardialer Typ
TTN	Titin
UV	ultraviolett
Wnt	nach einer flügellosen Fliegenart (englisch: wingless) und dem Int-Gen benannter Ligand eines Signalwegs in der Embryogenese

1 EINLEITUNG

1.1 Klinische Relevanz struktureller Herzerkrankungen

Die Versorgung von Patientinnen und Patienten mit einer strukturellen Herzerkrankung wird dank neuer Untersuchungs- und Behandlungsmethoden stetig verbessert. Trotzdem sterben immer noch die meisten Menschen an den Folgen einer kardiovaskulären Erkrankung wie Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, oder ischämisch-cerebraler Insult. Zu den häufigsten Todesursachen gehören chronisch ischämische Herzkrankheit, akuter Myokardinfarkt sowie akute und chronische Herzinsuffizienz (HI) (Tabelle 1). 2019 betrug die vollstationäre Hospitalisationsrate für Herzerkrankungen wie koronare Herzkrankheit (KHK), kardialer Insult, HI, Herzklappenerkrankungen und Herzrhythmusstörungen (HRST) 8,8 %¹. Die KHK ist als Hospitalisationsgrund seit Jahren rückläufig. Verglichen mit 2016 gab es 2019 3,8 % weniger vollstationäre Fälle mit der Diagnose KHK. Schwerere Verläufe, die zur Hospitalisation führen, können durch stetig verbesserte primäre sowie sekundäre Präventionsmaßnahmen und verbesserte Therapie- und Interventionsmöglichkeiten verhindert werden. Die Inzidenzen der Herzklappenerkrankungen, der HI und der HRST haben seit 2016 jedoch insgesamt um mehr als 5 % zugenommen^{1, 2}.

Tabelle 1: Todesursachenstatistik in Deutschland (2019)

ICD-10 Positionsnummer	Todesursache	Gestorbene, absolut	Anteil in %
I25	Chronische ischämische Herzkrankheit	75.482	7,7
F03	Nicht näher bezeichnete Demenz	45.492	4,6
C34	Bösartige Neubildung der Bronchien und der Lunge	44.786	4,5
I21	Akuter Myokardinfarkt	44.529	4,5
I50	Herzinsuffizienz	34.855	3,5
J44	Sonstige chronische obstruktive Lungenkrankheit	29.443	3,0
I11	Hypertensive Herzkrankheit	23.549	2,4
R99	Sonstige ungenau oder nicht näher bezeichnete Todesursachen	22.208	2,3
C25	Bösartige Neubildung des Pankreas	18.922	1,9
C50	Bösartige Neubildung der Brustdrüse [Mamma]	18.591	1,9

Auflistung der absoluten Sterbefälle der häufigsten 10 Todesursachen mit Anteil an der Gesamtsterberate in Prozent. ICD-10= International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme)

In den Leitlinien wird die HI als Zustand unzureichender Herzleistung, um den Körper in Ruhe- oder Belastungssituationen mit oxygeniertem, nährstoffreichen Blut zu versorgen, definiert. Klinisch äußert sich diese Funktionsstörung durch Dyspnoe, Leistungsminderung und Flüssigkeitsretention. Pathophysiologisch steht bei der

chronischen HI die myokardiale Schädigung durch dauerhafte Druck- oder Volumenbelastung im Vordergrund. In den meisten Fällen sind Vorerkrankungen wie KHK oder arterielle Hypertonie ursächlich. Ebenso führt plötzlicher Gewebsuntergang zu einer Einschränkung der Myokardfunktionalität³. Herzklappenerkrankungen, HRST und nicht ischämische Kardiomyopathien, aber auch Alkoholmissbrauch oder bestimmte Arzneimittel können ebenfalls eine Schädigung des Myokards und somit eine HI auslösen³⁻⁵. In Tabelle 2 werden die Risikofaktoren für HI zusammengefasst. Die Herzleistung kann bei fortschreitender myokardialer Funktionseinschränkung nicht mehr suffizient aufrechterhalten werden, weshalb Kompensationsmechanismen, wie die Erhöhung der Herzfrequenz, aktiviert werden. Kurzzeitig kann somit eine Besserung erzielt werden, langfristig resultiert es aber in der Manifestation der HI durch progrediente Schädigung des Myokards (kardiales Remodeling)³. Die pharmakologischen Therapieansätze greifen in die Regulationsmechanismen ein und versuchen somit dieser Schädigung vorzubeugen oder sie abzumildern (reverses Remodeling). Die Behandlung der Komorbiditäten, wie arterielle Hypertonie oder Diabetes mellitus, spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Therapie^{6, 7}.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Risikofaktoren für Herzinsuffizienz

Risikofaktoren für Herzinsuffizienz
- Vorerkrankungen: arterielle Hypertonie, KHK, Diabetes mellitus
- Lebensstil: Nikotinabusus, Alkoholabusus, Adipositas
- Familiäre Disposition
- Sekundär: Arzneimittel (z.B. Amiodaron), Therapien von Tumorerkrankungen (z.B. Chemotherapie mit Antrazyklinen)

Die Zusammenfassung ist angelehnt an die Auflistung der Risikofaktoren in der Herzinsuffizienz Leitlinie der European Society of Cardiology von 2021³

Die Hospitalisations- und Rehospitalisationsraten aufgrund von dekompensierter HI sind trotz aller Therapieansätze sehr hoch und werden mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert⁸. Außerdem wird die Schwere der Erkrankung, welche klinisch durch die NYHA-Klassifikation (New York Heart Association) eingestuft wird, ebenfalls mit der Mortalitätsrate in Verbindung gesetzt⁹. Die HI gehört zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland (Tabelle 1¹⁰): die zweithäufigste Todesursache bei Frauen und die vierthäufigste bei Männern³.

Aus dem oben genannten Kontext ergibt sich die Notwendigkeit für Grundlagenforschung und für klinische Forschung an humanem Herzgewebe zur Erweiterung des Verständnisses der Physiologie und Pathologie des Myokards. Zusätzlich wird

dadurch eine Möglichkeit geschaffen bestehende Therapieoptionen sowie ambulante und stationäre Versorgungstechniken zu optimieren und neue Therapieoptionen zu entwickeln.

1.2 Kardiale Histologie und Physiologie aus Kardiomyozyten-basierter Grundlagenforschung

Erste Versuche an Kardiomyozyten (englisch: cardiomyocytes, CM) wurden mit kultivierten Hühnerembryozellen und isolierten, embryonalen Zellen von Mäusen, Hamstern und Ratten durchgeführt¹¹⁻¹⁷. Die Isolation adulter CM war komplizierter, da die Zellen starke interzelluläre Verbindungen (Disci intercalares) aufwiesen und bei dem Versuch der Isolation beschädigt wurden¹⁸. Erst 1960 wurde eine Methode entwickelt um adulte, ventrikuläre CM aus Rattenmyokard zu isolieren¹⁶. Diese isolierten, adulten CM waren jedoch zu fragil und konnten nicht ausreichend lange kultiviert werden, um ihr Expressionsverhalten oder kardiale Pathologien zu erforschen¹⁹. 1986 beschrieben Jacobson und Piper zwei grundlegende Methoden zur Kultivierung adulter CM aus Säugetiermyokard²⁰. Ihnen war es gelungen adulte CM bis zu zwei Wochen lang zu kultivieren²⁰. Jedoch gab es bei beiden Methoden Schwierigkeiten die CM in ihrer ursprünglichen Form und Struktur zu erhalten²⁰. Versuche der Kultivierung von humanen, adulten CM aus Myokardbiopsien, welche beispielsweise bei Herzoperationen oder durch transkutane Biopsien gewonnen wurden, waren ebenfalls nicht effektiv genug, um umfangreiche Langzeitexperimente mit den Zellen durchzuführen^{18, 21, 22}.

Die Generierung von CM konnte mithilfe von pluripotenten, embryonalen Stammzellen (englisch: embryonic stem cells, ESC) erreicht werden. Sie besitzen eine hohe Proliferationsfähigkeit und können sich in verschiedene Gewebe differenzieren²³. Die Differenzierung von aus tierischen ESC generierten CM (ESC-CM) wurde bereits in den frühen 90er Jahren erfolgreich durchgeführt^{24, 25}. Die Gewinnung von humanen ESC und die Forschung daran unterliegt in Deutschland jedoch streng dem Embryonenschutzgesetz und wird aufgrund der starken Einschränkungen nicht praktiziert²⁶.

Der Aufbau des Myokards wurde mithilfe von Tierexperimenten genaustens untersucht^{20, 27, 28}. Morphologisch nimmt das Myokard eine Stellung zwischen Skelettmuskulatur und glatter Muskulatur ein. Es weist eine Querstreifung wie die Skelettmuskulatur auf. Die einzelnen CM sind jedoch nicht vollständig voneinander

isoliert, sondern bilden ein funktionelles Synzytium²⁹⁻³¹. Das Myokard setzt sich aus Zellen des Arbeitsmyokards und Zellen des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystems zusammen³². Der Anteil der CM an der Gesamtzellanzahl des Herzens beträgt knapp 30 %, allerdings nehmen sie 70 % des Gesamtvolumens ein^{28, 33, 34}. Sie befinden sich in einem dreidimensionalen Netzwerk aus Kollagenfasern - der extrazellulären Matrix (EZM)³⁵. Die weiteren Zellarten im Myokard sind beispielsweise Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Neuronen, Endothelzellen oder Fettzellen^{28, 34, 36, 37}. Bei Myokardschädigung kann das Gewebe nicht in Form einer Restitutio ad integrum wieder komplett durch funktionelles Gewebe ersetzt werden, denn adulte CM haben eine sehr geringe Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Lediglich 1 % der CM werden im Laufe eines Jahres ersetzt³⁸. Durch diese niedrige Regenerationsrate kann myokardialer Schaden nicht effizient kompensiert werden. Es resultieren funktionelle Defizite bis hin zur chronischen HI^{38, 39}. Durch Fibrose der EZM und Hypertrophie der intakten CM entsteht eine Defektheilung (Remodeling), dabei nehmen vor allem kardiale Fibroblasten (englisch: cardiac fibroblasts, CF), eine wichtige Nichtkardiomyozytenart (englisch: non-cardiomyocytes, NCM), eine entscheidende Rolle ein⁴⁰. Zu den wichtigsten kardialen Strukturproteinen gehören TNNT2, TTN und CTF1. TNNT2 ist ein spezifisches Gen für Kardiomyozyten. Es kodiert für Troponin T2 (kardialer Typ), welches als Untereinheit des kardialen Troponin-Komplexes der Muskelkontraktion dient⁴¹. TTN ist das Gen für Titin, welches Bestandteil der funktionellen Einheit des quergestreiften Muskels ist⁴¹. CTF1 steht für Cardiotrophin 1, ein Zytokin, welches zur Induktion der Kardiomyozytenhypertrophie und der Angiogenese im kardialen Muskel beiträgt⁴². Wichtige Kardiomyozyten-typische Ionenkanäle sind HCN2, HCN4, SCN5A und SLC8A1. Die Gene HCN2 (englisch: hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium and sodium channel 2) und HCN4 (englisch: hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4) kodieren für hyperpolarisationsabhängige Kationenkanäle, welche durch Natrium- und Kaliumefflux und -influx an der Erzeugung der Schrittmacheraktivität von CM beteiligt sind⁴¹. HCN2 und HCN4 werden vorzugsweise in Herz und Gehirn exprimiert⁴³. SCN5A (englisch: sodium voltage-gated channel alpha subunit 5) ist das Gen des spannungsabhängigen Natriumkanals, welcher in der initialen Depolarisationsphase des kardialen Aktionspotentials mitwirkt. Das Gen SLC8A1 (englisch: solute carrier family 8 member A1) oder auch NCX1 (englisch: Na⁺/Ca²⁺ exchanger 1) steht für einen Natrium-Kalzium-Austauscher, welcher die

intrazelluläre Kalziumkonzentration in CM reguliert. Mutationen in diesen Genen führen zu verschiedenen HRST⁴¹.

Die Verbindungsbereiche zwischen den CM werden Disci intercalares genannt. Sie beinhalten Gap Junctions (GJ), Desmosomen und Adherens Junctions^{44, 45}. Desmosomen und Adherens Junctions sind für die Kraftübertragung und Festigkeit der Zellverbände zuständig⁴⁴. GJ dienen der interzellulären metabolischen und elektrischen Kommunikation und spielen in Bereichen der Zellphysiologie, wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose, eine wichtige Rolle^{29, 46}. Außerdem sind sie in pathologischen Prozessen, wie der Entstehung von Herzinsuffizienz, Neuropathologien, Taubheit oder sogar Krebsgeschehen, involviert^{47, 48}. Sie bestehen aus Transmembranproteinen, den Connexinen (Cx)^{49, 50}. Insgesamt wurden Stand 2023 21 verschiedene Cx in Wirbeltieren beschrieben⁵¹⁻⁵³. Im Myokard werden Cx40, Cx43 und Cx45 am häufigsten exprimiert^{54, 55}. Die Zahlen im Namen repräsentieren das erwartete Molekulargewicht der jeweiligen Cx-Isoformen in Kilodalton^{56, 57}. Durch ihren porenähnlichen Aufbau gewährleisten GJ eine kontrollierte Erregungsweiterleitung und einen interzellulären, molekularen Austausch⁴⁹. Ihre Permeabilitätseigenschaften werden durch die Zusammensetzung aus jeweils 6 Cx definiert^{52, 58, 59}. Es gibt isomere, also nur aus einer Cx-Art bestehende, und heteromere GJ⁴⁹. Die Zusammensetzung der GJ sowie deren Verteilungsmuster im Herzen wurden mithilfe von verschiedenen Tiermodellen beschrieben^{27, 51, 60-65}. Jedes Herzareal weist eine spezifische Zusammensetzung und Verteilung der GJ auf, wodurch die Gewebe jeweils optimal an ihre Funktion und die beispielsweise damit verbundenen Ansprüche der elektrischen Weiterleitung angepasst sind⁶⁶⁻⁶⁸. Cx43 ist Hauptbestandteil der GJ im Ventrikelmyokard, es wurde aber auch im Vorhof und in den Purkinje Fasern nachgewiesen^{64, 69}. Cx40 bildet Kanäle mit hoher Leitgeschwindigkeit. Es wird überwiegend im Vorhof und im Erregungsleitungssystem, dominierend im His-Purkinje-System, exprimiert^{60, 69}. Kanäle mit Cx45 werden hauptsächlich im Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) und in den His-Bündeln gefunden. Durch ihre niedrige Leitungsgeschwindigkeit ermöglichen sie eine kontrollierte Impulsausbreitung zwischen den Vorhöfen und den Ventrikeln^{60, 70}. Jede Modifizierung der Zusammensetzung oder Verteilung der Cx in diesen Bereichen könnte proarrhythmisch wirken^{49, 71}. Studien an murinen CM zeigen, dass während eines pathologischen Prozesses ein Remodeling der GJ stattfindet⁶². Im ischämischen Myokard wird die Expression von Cx43 in den infarktfernen Herzabschnitten

herunterreguliert^{57, 60}. Diese Veränderungen führen zu einer verlangsamten Erregungsweiterleitung und zu einer Diskontinuität im Ionenaustausch, was sich proarrhythmogen auswirken könnte⁶². Beim Linksherzversagen wird die Expression von Cx43 ebenfalls herunterreguliert, wobei Cx45 vermehrt exprimiert wird, was ebenfalls mit einer abnormalen Impulsweiterleitung assoziiert wird⁷².

Eine der wichtigsten NCM-Arten im Herzen sind Fibroblasten²⁷. Camelliti et al. beschrieben ihre Morphologie und Funktion sowie ihre Wechselbeziehungen zu den CM in unterschiedlichen Säugetiermodellen mit Maus-, Schaf-, oder Rattenmyokard⁷³. Fibroblasten tragen zur Herzentwicklung, Herzstruktur, Zellsignalisierung und zur elektromechanischen Funktion bei gesundem und krankem Myokard bei⁷⁴⁻⁷⁶. Sie sind essentielle Zellen im kardialen Verband⁷³. Aufgrund ihres enormen Proliferationspotentials überwachen Fibroblasten CM *in vitro*²⁷. Zur optimalen Forschung an CM werden die CM-Kulturen deshalb so optimiert, dass ein maximal hoher CM-Anteil resultiert. Aktuelle Differenzierungsprotokolle bringen Kulturen mit 80-90 % CM hervor⁷⁷. Der Anteil an NCM ist *in vitro* somit deutlich geringer als *in vivo*³⁵. Endothelzellen sind die zahlenmäßig am häufigsten vorkommenden NCM und spielen neben Fibroblasten ebenfalls eine essentielle Rolle im Myokard³⁴. Weitere wichtige NCM sind glatte Muskelzellen und Adipozyten. Die Oberflächenantigene CD31, CD54, ACTA2, APOA1, FABP3 und CD36 sind für diese Zellarten relevant. CD31, oder PECAM1 (englisch: platelet and endothelial cell adhesion molecule 1), kodiert für ein Protein, welches interzelluläre Endothelzellkontakte begünstigt. Es ist außerdem häufig auf der Oberfläche von Blutplättchen, Monozyten oder Neutrophilen zu finden. Das Gen CD54, oder ICAM1 (englisch: intercellular adhesion molecule 1), steht für ein Zelloberflächenglykoprotein von Endothelzellen und Zellen des Immunsystems. ACTA2, oder Actin Alpha 2 ist das Gen eines Aktinproteins der glatten Muskulatur⁴¹. Es kommt häufig im Endometrium und in Gefäßwänden vor. APOA1 kodiert für Apolipoprotein A1, eine Proteinkomponente von High Density Lipoprotein (HDL), welche den Cholesterintransport steuert und vor allem in der Leber vorkommt⁴¹. Zudem hat HDL eine kardioprotektive Wirkung⁷⁸. FABP3 (englisch: fatty acid binding protein 3) steht für das fettsäurebindende Protein vom Herztyp und regelt den intrazellulären Transport von Fettsäuren und anderen lipophilen Substanzen in den CM⁴¹. Es steuert somit den kardialen Lipidstoffwechsel. Fettsäuren sind ein wichtiger Teil des Energiestoffwechsels der CM⁷⁹. Außer in CM kommt FABP3 in geringeren Mengen auch in allen anderen Zellarten der EZM wie Endothelzellen, glatten

Muskelzellen und in Fibroblasten vor⁸⁰⁻⁸². Das Gen CD36 kodiert für ein Transmembranglykoprotein, welches als Fettsäuren-Translokase bekannt ist und an der Lipidhomöostase, Angiogenese, Immunantwort und anderen zellulären Geschehen beteiligt ist⁸³. Außerdem wird CD36 als Marker für Adipozyten-Progenitorzellen verwendet⁸⁴.

1.3 Induzierte, pluripotente Stammzellen und Kardiomyozytendifferenzierung

Takahashi, Yamanaka et al. entwickelten 2006 eine Methode zur Generierung von induzierten, pluripotenten Stammzellen (englisch: induced pluripotent stem cells, iPSC)⁸⁵. Murine, entdifferenzierte Hautfibroblasten konnten mit dieser Methode durch retrovirale Transduktion von 4 Transkriptionsfaktoren (Oktamer-bindendes Protein 4 (OCT4), SRY-Box-Transkriptionsfaktor 2 (SOX2), MYC-Protoonkogen (c-MYC) und Kruppel-like Faktor 4 (KLF4)) in einen pluripotenten Zustand zurück geführt werden⁸⁵. Dieselbe Methodik wurde anschließend angewandt um auch aus humanen Fibroblasten humane iPSC (hiPSC) zu generieren^{86, 87, 88}. HiPSC sind pluripotente Zellen mit einer hohen Proliferationsneigung. Dies stellte einen Paradigmenwechsel dar, da bis dato die Differenzierung von Zellen nur in eine Richtung gelang. In den darauffolgenden Jahren wurden die Differenzierungsmethoden immer weiter optimiert. Zur Eliminierung von transduktionsassoziierten Problemen, wie der retroviral induzierten Insertionsmutagenese, erfolgte das Übertragen der Gene durch Adenoviren oder Plasmide^{89, 90}. Die Reinheit der Zellkulturen und die kontrollierte Reproduzierbarkeit des generierten Gewebes war ein wichtiges Ziel⁹¹. Neben Fibroblasten konnte die Pluripotenzinduktion auch in anderen somatischen Zellarten beschrieben werden^{87, 92}. Die Gewinnung der Ausgangszellen erfolgte durch minimalinvasive Eingriffe wie Hautbiopsien oder Blutprobenentnahmen⁹². Zur Erforschung genetischer Erkrankungen konnten dadurch krankheitsspezifische hiPSC aus Biopsaten von Patientinnen und Patienten mit angeborenen Erkrankungen generiert werden⁹³. Diese hiPSC trugen identische, genetische Merkmale wie die Spenderinnen und Spender⁹³. Durch spezielle Kultivierungsmethoden konnten aus diesen hiPSC autologe, patientenspezifische Gewebe erzeugt werden⁹³. Eine intensive Forschung an krankheitsspezifischem Gewebe in Bezug auf Pathogenese oder pharmakologische Interaktionen wurde hierdurch ermöglicht^{89, 90}.

Die Generierung von CM aus ESC wurde bereits ausführlich an Tiermodellen beschrieben^{94, 95}. Park et al. wandten diese Methode erfolgreich an, um hiPSC zu

hiPSC-CM zu differenzieren⁹². Zu Beginn der Versuchsreihen mit hiPSC wurden die ESC-Differenzierungsprotokolle angewandt⁹². Verschiedene Studien zeigten, dass hiPSC und ESC keine wesentlichen Unterschiede in den grundlegenden Eigenschaften besitzen und somit molekular und funktionell als gleichwertig betrachtet werden konnten^{96, 97}. Beide Zellarten zeigten nach der Differenzierung zu CM nahezu gleiche Genexpressions- und Proliferationsmuster. Es ließen sich keine Unterschiede in der immunhistochemischen Darstellung der intrazellulären Organisation der Sarkomere feststellen^{98, 99}. Mithilfe von elektrophysiologischen Studien wurde gezeigt, dass hiPSC-CM und ESC-CM sich zu nodalen, atrialen und ventrikulären CM ausdifferenzierten⁹⁶. Ferner ähnelten die hiPSC-CM den aus Myokardbiopsien gewonnenen CM. Sie zeigten morphologische Merkmale von ventrikulären, atrialen und Erregungsleitungssystem-Zellen¹⁰⁰⁻¹⁰⁴.

Die Forschung mit hiPSC stößt jedoch in verschiedenen Bereichen an ihre Grenzen. Die „Reprogrammierung“ adulter Zellen wird mithilfe von Faktoren induziert, welche die Proliferation begünstigen⁸⁸. Die in vitro Kultivierung kann ebenfalls unkontrollierte Proliferation begünstigen. Diese beiden Punkte können Mutationen im Gewebe auslösen und zu Tumorgenese führen^{105, 106}. Außerdem weisen einige Studien darauf hin, dass die Reife der hiPSC-CM nicht mit adulten humanen CM vergleichbar sei und sie eher fetalen CM ähneln¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

1.4 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll zunächst der Differenzierungsprozess von hiPSC zu hiPSC-CM beschrieben werden. Dabei sollen vor allem die Genexpression verschiedener Kardiomyozyten-typischer Gene und die zelluläre Morphologie der hiPSC-CM genauer betrachtet werden. Zur besseren Vergleichbarkeit der hiPSC-CM mit adulten CM sollen nach Abschluss der Differenzierung Kardiomyozyten-typische Strukturproteine und transmembranöse Proteine mithilfe von Immunhistochemie (IHC) in den hiPSC-CM dargestellt werden. Für eine bessere Einordnung der hiPSC-CM-Kultur in die kardiale Forschung soll der Anteil der hiPSC-CM an der gesamten Mischkultur bestimmt und eine Aufschlüsselung der zellulären Zusammensetzung der NCM-Arten in der hiPSC-CM-Mischkultur durchgeführt werden. Dies soll mithilfe von Genexpressions- und Durchflusszytometrie (englisch: fluorescence activated cell sorting, FACS) -Analysen ermittelt werden. Anschließend soll eine Visualisierung der verschiedenen Zellarten mithilfe von IHC erfolgen. Ferner sollen GJ, im Genaueren die

Cx-Gene, in Expressionsverhalten und morphologischer Anordnung zum besseren Verständnis der interzellulären Kommunikation und Konnektivität der hiPSC-CM beschrieben werden. Dies soll ebenfalls durch Genexpressionsuntersuchungen, FACS-Analysen und IHC-Darstellungen geschehen.

Mit dieser Arbeit sollen gezielte Ansätze für hiPSC-basierte Forschung an CM generiert werden. Die Subgruppenanalyse der Mischkultur soll die Einordnung der bereits generierten Forschungsergebnisse in den ganzheitlichen Kontext erleichtern. Durch die Beschreibung der Zellzusammensetzung der kardialen Mischkultur sollen ferner Hinweise generiert werden, ob für Untersuchungen wie Medikamenten- oder Inflammationsexperimente auch der NCM-Anteil relevant sei.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Methoden

2.1.1 Ethikvotum und Bereitstellung der Zellen

Die hiPSC wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. J. Utikal vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der hiPSC wurden nach schriftlicher Einverständniserklärung Hautbiopsien von Spenderinnen und Spendern entnommen. Die Entnahme und Bearbeitung der Biopsate wurden nach Vorschrift der positiven Ethikvoten der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Mannheim und der Universität Heidelberg (Zulassungsnummer: 2009-350N-MA, 2018-637N-MA) durchgeführt. Die hiPSC der Zellreihe D1 (D1er) stammen von einer gesunden, weiblichen Spenderin. Die hiPSC der Zellreihe D2 (D2er) stammen von einem gesunden, männlichen Spender. Die hiPSC wurden in Kryoröhrchen in einem Nitrogen-Tank mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren aufbewahrt. In diesem Zustand konnten sie mehrere Jahre gelagert werden.

Die Differenzierung der hiPSC erfolgte nach dem Protokoll der Stem Cell Unit (SCU) Göttingen des Deutschen Zentrums für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK)¹¹⁰.

2.1.2 Zellkulturelles Arbeiten

Zur Vermeidung von Kontamination wurde vor Beginn der zellkulturellen Arbeit auf gründliche Desinfektion der Hände sowie Anlegen von Schutzkleidung wie Kittel, Mundschutz, Haube und Handschuhe geachtet. Alle Arbeitsschritte mit den Zellkulturen und den Medien wurden an der Sterilarbeitsbank durchgeführt. Diese wurde nach jeder Benutzung mit alkoholhaltigem Desinfektionsspray desinfiziert und nach abgeschlossener Tagesarbeit für eine Stunde (h) mit ultraviolettem Licht (UV-Licht, d/s Modus der Sterilarbeitsbank) bestrahlt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einer atmosphärischen Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Konzentration von 5 %. Die Zellen wurden regelmäßig lichtmikroskopisch auf Kontaminationen untersucht. Als kontaminationsverdächtig galt eine Trübung des Nährmediums, oder ein Wachstum von nicht Kardiomyozyten-typischen Strukturen. Eine Kontamination mit Pilzsporen konnte im Lichtmikroskop als eine extrazellulär wachsende, rundliche Struktur mit feinen Ausläufern erkannt werden. Bei

Kontamination wurden die Behälter entleert und tot autoklaviert. Zusätzlich wurde ein Dekontaminationsprogramm des Inkubators bei 95°C für 20 h durchgeführt. Alle nicht betroffenen Zellen wurden für diese Zeit in einen sauberen Inkubator transferiert. Eine gezielte Dekontaminationsbehandlung der betroffenen Zellen mit Antibiotika oder Antimykotika wurde nicht durchgeführt.

Die Chemikalien wurden abhängig von ihrer Toxizität in angrenzenden Laborräumen entweder in einem Chemikalienregal oder in einem Giftschränk gelagert. Noch nicht vorbereitete Basislösungen für die Kulturmedien wurden nach Herstellerangaben im Kühlschrank (KS) bei +4°C gelagert. Die Supplemente wurden bei -20°C entweder als Rohmaterial oder als vorbereitete Aliquote gelagert.

Vor dem Beginn der Differenzierung wurden die Behältnisse für die Zellen vorbereitet. Diese waren Zellkulturflaschen mit 25 cm² Bodenfläche (T25er) zum Auftauen der hiPSC, Zellkulturflaschen mit 75 cm² Bodenfläche (T75er) zum Heranzüchten der hiPSC, 24-Well-Platten (24-WP) für den Differenzierungsprozess der hiPSC-CM und Chamberslides (CS) für immunhistochemische Darstellungen. Jedes Behältnis wurde mit einer Mischung aus Phosphate buffered saline (PBS) und Matrigel im Verhältnis 50:1 beschichtet. Das Matrigel bildete eine basalmembran-artige Matrix auf dem Boden der Behältnisse, welche die Adhäsion der Zellen begünstigte¹¹¹. Das PBS/Matrigel-Gemisch konnte laut Hersteller für bis zu drei Wochen in einem 50 ml Falcon Zentrifugenröhrchen (Tube) im KS gelagert werden. Bei Bedarf wurden die Behältnisse mit diesem Gemisch beschichtet und für mindestens 30 Minuten (min) im Inkubator erwärmt. Pro T25er wurden je 2 ml, pro T75er je 10 ml, pro Well einer 24-WP je 250 µl und pro Chamber eines CS je 250 µl pipettiert.

Für das Auftauen der Zellen wurde eine beschichtete T25er und 10 ml TeSR™-E8™ (E8) mit 5 µl Rho-Kinase Inhibitor Y27632 (Rockl) benötigt. Durch das Hinzufügen des Rockl in das Kulturmedium E8 wurde der dissoziationsinduzierten Apoptose entgegen gewirkt^{112, 113}. Nach Absaugen des PBS/Matrigel-Gemischs wurde die vorgewärmte T25er mit 2,5 ml E8/Rockl gefüllt. Das Kryoröhrchen mit den hiPSC wurde von außen desinfiziert und in der Hand erwärmt. Nach dem Auftauen wurde die hiPSC-Zellsuspension in einem 50 ml Tube mit 5 ml E8/Rockl mehrmals auf- und abpipettiert und anschließend bei 1200 revolutions per minute (rpm) für 4 min bei 20°C zentrifugiert. Am Boden des Tubes entstand ein Zellpellet. Der Überstand wurde vorsichtig, ohne das Zellpellet zu berühren, abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit den restlichen 2,5 ml E8/Rockl durch viermaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und

in die T25er gefüllt. Durch sanftes Hin- und Herschwenken wurden die Zellcluster auf dem Flaschenboden verteilt. Ein vermehrtes Auf- und Abpipettieren, oder ein zu intensives Schwenken der T25er resultierte in einer zu starken Vereinzelnung der Zellen. Für eine optimale Entwicklung sollten die Zellen jedoch in kleinen Clustern vorliegen. Die T25er wurde im Inkubator gelagert und am Folgetag mit 5 ml E8 ohne Rockl gefüttert. Die anschließenden Wechsel des Kulturmediums erfolgten zweitägig. Um das Zellwachstum zu beurteilen, wurden die Zellen regelmäßig lichtmikroskopisch begutachtet. Die hiPSC wuchsen in rundlichen Kolonien mit einer zentralen Verdichtung. Bei konfluierendem Wachstum der Kolonien erhöhte sich die spontane Differenzierungsrate, deshalb wurden die hiPSC spätestens alle 3-4 Tage passagiert. Nach zweimaligem Passagieren und einer Zelldichte von über 85 % wurden die hiPSC auf 24-WP transferiert. Während der Kultivierung der Zellen wurde auf Klarheit und auf den Farbumschlag des Kulturmediums geachtet. Ein Farbumschlag von rot/rosa zu orange/gelb deutete auf einen guten Stoffwechsel der Zellen hin. Jegliche Trübung des Kulturmediums deutete auf eine Kontamination hin.

Die hiPSC wurden nach dem Auftauen zunächst in einer T25er kultiviert, anschließend in eine T75er passagiert, um eine größere Zellzahl zu generieren. Es wurden 6 ml Ethylendiamintetraessigsäure (2mM) (EDTA) mit 3 µl Rockl und 20 ml E8 mit 10 µl Rockl benötigt. Das Kulturmedium in der T25er wurde abgesaugt, 3 ml EDTA/Rockl hineinpipettiert und nach kurzem, sanftem Schwenken direkt wieder abgesaugt. Die restlichen 3 ml EDTA/Rockl wurden anschließend für 4-6 min in der Zellkulturflasche inkubiert bis sich die Zellzwischenräume vergrößerten, was durch lichtmikroskopische Betrachtung verifiziert wurde. Durch das Einwirken von EDTA lockerten sich die Zell-Zell-Kontakte. Das PBS/Matrigel-Gemisch wurde aus der T75er und das EDTA/Rockl aus der T25er abgesaugt. Durch mehrmaliges Abspülen der Zellen mit 5 ml E8/Rockl lösten sich die hiPSC endgültig vom Boden der T25er und es entstand eine Zellsuspension, welche mit E8/Rockl verdünnt und in die vorbereitete T75er transferiert wurde. Die Verdünnung wurde jeweils an die gewünschte Zelldichte angepasst. Eine Mischung aus 0,5 ml der Zellsuspension und 14,5 ml E8/Rockl erwies sich als zielführend. Falls sich die Zellen nicht durch das sanfte Abspülen lösten, konnte eine längere EDTA-Einwirkzeit von maximal 8 min in Betracht gezogen werden. Alternativ konnte durch leichte Wischbewegungen mit einem Cell Scraper auf dem Boden der Zellkulturflasche das Ablösen der Zellen bewirkt werden. Beide Methoden

können jedoch aufgrund der mechanischen und chemischen Beanspruchung der Zellen deren Qualität beeinträchtigen.

Um eine adäquate Zellzahl zu erhalten, wurde eine T75er nach Inkubation auf mehrere, beispielsweise fünf T75er, gesplittet. Das Passagieren erfolgte äquivalent dem Ablauf bei der T25er, lediglich mit 15 ml EDTA+7,5 µl Rockl (6 ml für das Waschen und 9 ml zum Einwirken) und 20 ml E8+10 µl Rockl (5 ml zum Abspülen und je 15 ml neues Medium pro neue T75er) pro T75er. Ab dem Folgetag wurden je 30 ml E8 ohne Rockl pro T75er als Kulturmedium benutzt.

2.1.3 Kardiomyozytendifferenzierung

2.1.3.1 Differenzierung der hiPSC-CM

Die Differenzierung der hiPSC zu hiPSC-CM erfolgte in 24-WP. Am Tag vor Beginn der Differenzierung wurden die Zellen aus den T75ern in 24-WP transferiert. Dieser Vorgang wurde „Aussäen“ genannt. Der Tag an dem die Differenzierung begonnen wurde, wurde als Tag 0 (d0) definiert, somit war der Tag des Aussäens d-1. Die hiPSC sollten in homogenen, isolierten, rundlichen Kolonien wachsen und mindestens 85 % des Flaschenbodens ausfüllen^{77, 114}. Die benötigten 24-WP wurden an d-1 für 30 min im Inkubator erwärmt. Es wurden 15 ml EDTA+7,5 µl Rockl und 5 ml E8+2,5 µl Rockl pro T75er benötigt. Nach dem Absaugen des Kulturmediums aus den T75ern wurde mit 6 ml EDTA+Rockl gewaschen. Anschließend wurden 9 ml EDTA+Rockl für 6 min dazugegeben. In dieser Zeit wurde das PBS/Matrigel-Gemisch aus den 24-WP abgesaugt und diese mit Zellreihe, Datum (d-1) und der Zellkonzentration/Well beschriftet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das EDTA+Rockl abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 5 ml E8+Rockl vollständig vom Boden der T75er abgespült. Die komplette Zellsuspension wurde in ein leeres 50 ml Tube gegeben. Zur Ermittlung der Zellanzahl wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl 0,4%iger Trypanblaulösung vermischt und auf einem Objektträger mit einer Neubauer-Zählkammer untersucht. Unter dem Mikroskop erschienen geschädigte oder tote Zellen blau, da bei Zellmembrandiskontinuität die Trypanblaulösung ins Zellinnere absorbiert wurde, während vitale Zellen ungefärbt blieben. Diese wurden in zwei Quadranten der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Zellanzahl gemittelt. Die Bestimmung der Zellanzahl in der Suspension erfolgte mit dieser Formel: $Zellmittelzahl \times 2 \times 10^4 = Zellanzahl/ml$. Außerdem wurde die Vereinzelung der Zellen beurteilt. Für eine erfolgreiche Differenzierung mussten die Zellen komplett vereinzelt vorliegen, um sich

dann in einem gleichmäßigen Monolayer in den Wells anzuordnen. Bei noch vorhandenen Zellclustern wurde die Zellsuspension erneut mehrmals auf- und abpipettiert. Die Verdünnung erfolgte mit E8+RockI mit dem Ziel durchschnittlich 200 000 Zellen pro 0,5 ml Lösung zu erhalten. Pro Well wurde 0,5 ml der verdünnten Suspension distribuiert. Die Zusammensetzung der benutzten Medien wird unter „Material“ (Kapitel 2.2.1.) aufgeführt.

Die Differenzierung wurde in eine Induktionswoche, eine Woche der Wnt-Signalweg-Inhibition, eine Selektionswoche sowie eine abschließende Ruhewoche eingeteilt.

Die Induktionswoche begann an d0. In dieser Woche wurde das mesodermale Medium (MDM) benutzt, welches vier Supplemente beinhaltete: GSK3 β -Inhibitor Chir99021 (CHIR), Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4), Activin A (AA) und Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2). An d0 wurde jedes Well mit 1 ml 37°C warmem, kardialen Medium (KM) gewaschen. In der gesamten Woche wurde täglich MDM als Kulturmedium benutzt. Die Menge des MDM pro Well war abhängig von der Zellreihe. Bei den D1ern wurde 1 ml und den D2ern 0,5 ml MDM benutzt.

In der zweiten Woche erfolgte die Inhibition des Wnt-Signalwegs durch Inhibitor of Wnt-Production 4 (IWP4)¹¹⁵. In der Embryogenese ist der Wnt-Signalweg essentiell. Der hierfür wichtigste Ligand Wnt wurde nach einer flügellosen Fliegenart (englisch: wingless) und dem Int-Gen benannt. Nach Absaugen des Kulturmediums und einem Waschvorgang mit 1 ml KM pro Well wurde 1 ml serumfreies Medium (SF) mit 1 μ l IWP4 pro Well pipettiert. Das Medium wurde für zwei Tage in den Wells belassen, damit die Zellen keinem zusätzlichen Stress ausgesetzt wurden und die Inhibition erfolgreich ablaufen konnte. An d6 wurde ein Teil des Kulturmediums abgesaugt, dann sanft gegen die Kante der WP geklopft, um tote Zellen loszulösen und anschließend der Rest des Mediums abgesaugt. Jedes Well wurde daraufhin mit 0,5 ml KM gewaschen und es wurden 0,5 ml SF+IWP4 hinein pipettiert. Dieser Vorgang wurde an d8 noch einmal wiederholt. Nach jedem SF-Wechsel folgte ein Ruhetag. An d10 wurde pro Well die doppelte Menge SF+IWP4 dazugegeben.

Die letzte Woche der Differenzierung war die Selektionswoche. In dieser Woche wurde nach einem Waschvorgang mit 1 ml raumtemperaturwarmem PBS an d13, täglich 0,5 ml raumtemperaturwarmes Selektionsmedium (SM) pro Well pipettiert. Das SM enthielt keine Glukose, sondern Laktat. Die metabolische Fähigkeit der CM Laktat zu verwerten, wurde hierdurch ausgenutzt, um den Anteil der CM in der Mischkultur zu erhöhen. Der Anteil an NCM wurde dadurch minimiert, da diesen die Fähigkeit der

Laktatmetabolisierung fehlt³⁷. Bei erfolgreicher Differenzierung fingen die Zellen um d16-d17 an mikroskopisch sichtbar zu schlagen. Falls keine Zellkontraktilität in dieser Woche wahrnehmbar war, konnte die Selektionswoche für maximal drei weitere Tage verlängert werden.

Anschließend folgte eine Erholungswoche, in der einmalig mit 1 ml PBS pro Well gewaschen und danach in zweitägigen Abständen jeweils 1 ml SF pro Well als Kulturmedium benutzt wurde. Ab d24 konnten die Experimente begonnen werden.

Zusätzlich wurde die Differenzierung auch mit der Version des Differenzierungsprotokolls der SCU Göttingen aus dem Jahr 2018 durchgeführt. Ziel war es zu eruieren, ob die vorgenommenen Änderungen des Protokolls zu einer effizienteren Differenzierung führten. Die hiPSC wurden hierbei ebenfalls in 24-WP ausgesät. Die Unterschiede der beiden Protokolle werden in Tabelle 3 gegenübergestellt.

Tabelle 3: Vergleich der hiPSC-CM-Differenzierungsprotokolle der SCU Göttingen von 2014 und 2018

Vergleichspunkte	Differenzierungsprotokoll der SCU Göttingen 2014	Differenzierungsprotokoll der SCU Göttingen 2018
Verwendetes Basismedium für Mesoderminduktion und Wnt-Inhibition	Serumfreies Medium (SF) (RPMI mit Glutamax mit 1% Natrium- Pyruvat und 1% Penicillin/ Streptomycin zugesetzt mit 2% B27 und ASC)	Kardiales Differenzierungsmedium (CDM) (RPMI mit Glutamax und HEPES, zugesetzt mit Albumin und ASC)
Supplemente zur Mesoderminduktion	CHIR, AA, BMP4, FGF2	CHIR
Dauer der Mesoderminduktion	72 mit täglichem Mediumwechsel	24 h mit CHIR und anschließend 48 h mit CDM
Supplemente für Wnt-Inhibition	IWP4	IWP2
Dauer der Wnt-Inhibition	10 d mit viermaligem Mediumwechsel	2 d ohne Mediumwechsel
Selektionswoche	Nach der Wnt-Inhibition mit Selektionsmedium zur Purifikation der Zellkultur, eine Woche lang täglicher Mediumwechsel	keine
Beginn der spontanen Zellkontraktionen	Nach d17	Nach d8-10

SF= serumfreies Medium, CDM= kardiales Differenzierungsmedium, RPMI= Basismedium für kardiale Differenzierung, AA= Activin A, CHIR= GSK3 β -Inhibitor, BMP4= Bone morphogenetic Protein 4, FGF2= Fibroblastenwachstumsfaktor 2, Wnt= Signalprotein in der Embryogenese, IWP= Inhibitor des Wnt-Signalwegs

Zusammengefasst benötigte das Protokoll von 2014 quantitativ mehr Supplemente und mehr Kulturmedium, außerdem dauerte es eine Woche länger bis makroskopisch

schlagende hiPSC-CM resultierten. Das Protokoll von 2018 war somit effektiver und kostengünstiger als das von 2014.

2.1.3.2 Vereinzeln der Kardiomyozyten

Für IHC-Darstellungen und für FACS-Analysen wurden die hiPSC-CM aus ihrem Zellverband herausgelöst und als Einzelzellen in die benötigten Behältnisse transferiert. Im ersten Schritt wurde 300 µl 37°C warme Collagenase-I (Coll-I) pro Well hinzugefügt und für 40 min inkubiert, dadurch lösten sich die Zellkontakte zum Boden der Wells¹¹⁶. Anschließend wurden die Zellen durch sanftes Auf- und Abpipettieren der Coll-I vom Boden abgespült. Die Zellsuspension aus je vier Wells wurde in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß (Eppi) kombiniert. Nach jedem Arbeitsschritt wurde das Eppi bei 1500-2000 rpm für 2 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dabei entstand ein Zellpellet am Boden des Gefäßes. Der Überstand wurde vorsichtig, ohne das Zellpellet zu berühren, abgesaugt. Falls Zellfäden, oder noch kein sichtbares Zellpellet vorhanden waren, wurde für eine weitere Minute bei maximal 2500 rpm nachzentrifugiert. Als zweiter Schritt wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 500 µl PBS resuspendiert. Um die Zell-Zell-Kontakte zu lösen, wurde 300 µl raumtemperaturwarme 0,05%ige Trypsinlösung zugegeben, das Zellpellet darin gelöst und bei 37°C für mehrere Minuten inkubiert (für FACS- Analysen 2 min lang, für IHC 3 min lang). Eine längere Inkubation mit der Endopeptidase Trypsin würde die Zellen irreversibel beschädigen¹¹⁶. Nach der angegebenen Zeit wurden 300 µl RPMI+FKS (270 µl eines Zellkulturmediums, welches am Roswell Park Memorial Institute entwickelt wurde (RPMI) + 30 µl fetales Kälberserum (FKS)) dazu gegeben. Das FKS deaktiviert das Trypsin und stoppt den enzymatischen Vorgang¹¹⁷. Das RPMI war Hauptbestandteil des Kulturmediums für hiPSC-CM. Im letzten Schritt wurde das Zellpellet mit SF resuspendiert. Die Menge des SF war abhängig von der Zellanzahl und dem jeweils anschließenden Experiment. Für IHC wurden pro Chamber 0,5 ml SF benötigt. Vor Überführung der Zellsuspension in die CS, musste das PBS/Matrigel-Gemisch in den Chambers abgesaugt werden. Pro Chamber wurden anschließend zweitägig je 0,5 ml frisches SF pipettiert. Vor Beginn der Experimente mussten die hiPSC-CM auf dem Chamberboden haften und wurden dafür 2-4 d in den CS kultiviert. Für FACS-Analysen wurde die Zellsuspension in Eppis gefüllt und die FACS-Präparation durchgeführt (Kapitel 2.1.7).

2.1.3.3 Lyse der Zellen

Für die quantitative Polymerasekettenreaktion (englisch: quantitative polymerase chain reaction, qPCR)-Untersuchungen wurden die Zellen an acht verschiedenen Tagen – d0, d3, d10, d13, d17, d24, d35, d50 - lysiert. Jeweils vier Wells wurden lysiert und zu einer Probe zusammengeführt. Für Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-Versuche wurden je 750 µl des Kulturmediums pro Well an diesen Tagen abpipettiert und in Eppis schockgefroren. Das restliche Medium wurde komplett abgesaugt. Die Zellen hafteten am Boden der Wells. Für die Lyse der Zellen von vier Wells wurden je 700 µl RNeasy Lysis Buffer (RLT) mit 7 µl beta-Mercaptoethanol (MCP) benötigt. Das MCP bewirkte die Denaturierung der Zellmembran und eine Deaktivierung der RNAsen, sodass intrazellulär befindliche Ribonukleinsäure-Stränge (englisch: ribonucleic acid, RNA) frei in Lösung übergehen konnten¹¹⁸. Je 350 µl des RLT+MCP wurden in zwei der vier Wells pipettiert und der Boden der Wells vorsichtig damit abgespült. Die gleiche Prozedur wurde mit zwei weiteren Wells wiederholt. Das gesamte Zelllysate wurde in ein Auffangröhrchen mit einem QIAshredder Homogenisator pipettiert. Durch das anschließende Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min wurde eine Homogenisierung des Lysats erreicht. Der QIAshredder Homogenisator hielt Zellbestandteile zurück. Im aufgefangenen Lysat befand sich die RNA. Die Proben konnten entweder sofort weiterverarbeitet oder schockgefroren bei -80°C gelagert werden.

2.1.4 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die qPCR dient der Darstellung des zum Zeitpunkt der Zell-Lyse vorhandenen mRNA-Angebots und somit zur Erfassung der Genaktivität in den Zellen. Für die qPCR wird komplementäre Desoxyribonukleinsäure (englisch: complementary desoxyribonucleic acid, cDNA) benötigt, welche vorher aus der isolierten messenger Ribonukleotidsäure (englisch: messenger ribonucleic acid, mRNA) revers transkribiert werden muss¹¹⁹.

2.1.4.1 mRNA-Präparation

Für die mRNA-Präparation wurde ein RNeasy Mini Kit von Qiagen benutzt. Die Proben der zuvor lysierten Zellen (siehe Kapitel 2.1.3.3) wurden entweder für 15-20 min in einem Heating Block aufgewärmt, falls sie schockgefroren gelagert wurden, oder direkt nach dem Lysieren verarbeitet. Im ersten Schritt wurde 70%ige Ethanol- Lösung dem Probematerial in äquivalentem Volumen zugefügt und gut durchgemischt. Von dieser

Mischung wurden 700 µl auf die Silikatmembran des RNeasy Mini Columns pipettiert und für 15 Sekunden (s) bei 12000 rpm zentrifugiert. Die mRNA wurde dabei an der Silikatmembran gebunden und vom übrigen Zelllysat separiert. Der Durchfluss wurde entsorgt und der Vorgang mit den restlichen 700 µl des Gemischs wiederholt. 350 µl eines Waschpuffers (RW1) wurden hinein pipettiert und für 15 s bei 12000 rpm zentrifugiert. Das RW1 enthielt Guanidinisothiocyanat sowie Ethanol und wurde zum Auswaschen von Biomolekülen wie Kohlenhydraten, Proteinen oder Fettsäuren, die unspezifisch an der Silikatmembran gebunden haben, benutzt¹²⁰. 80 µl 12,5%iger DNase-Lösung wurden auf die Silikatmembran gegeben und für 15 min bei 25°C im Heating Block inkubiert. Die DNase spaltete noch vorhandene DNA-Fragmente, welche dann durch anschließende Waschschriffe rausgespült wurden. Der Waschschriff mit RW1 wurde zum Auswaschen der DNase wiederholt. Nach jedem Waschschriff wurde der Durchfluss entsorgt. Um Reste von Salzen und andere Bestandteile des RW1 auszuwaschen, wurde zweimal mit 500 µl eines zweiten Waschpuffers (RPE) gewaschen und für 15 s sowie für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert¹²¹. Zum Lösen der gesammelten mRNA aus der Silikatmembran wurden 30 µl RNase-freies Wasser in das Mini Column pipettiert. Der Durchfluss wurde nach der Zentrifugation bei 12000 rpm für 1 min in ein steriles, RNase-freies Eppi transferiert. Das Eppi wurde auf Eis oder gefroren aufbewahrt. Für die Herstellung der cDNA aus der isolierten mRNA musste zunächst die Konzentration und die Reinheit der mRNA mittels Spektrophotometer bestimmt werden. Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und bei 280 nm ($A(260\text{nm})/A(280\text{nm})$) spiegelte die Reinheit der mRNA wider und sollte zwischen 1,6 und 2,1 liegen. Das Gerät berechnete die Konzentration der mRNA mit folgender Formel: *mRNA-Konzentration (µg/µl) = 40 x A(260 nm) x Verdünnungsfaktor*. Für die Messungen wurden je 198 µl RNase-freies Wasser mit 2 µl mRNA in einer Mikro- Küvette (UV-Küvette) gemischt. Als Referenzwert wurde eine UV-Küvette mit 200 µl RNase-freiem Wasser benutzt. Die Konzentration der mRNA wurde drei Mal gemessen und gemittelt. Dieser Wert wurde als Ausgangswert für die Reverse Transkription (RT) benutzt.

2.1.4.2 Reverse Transkription

Die RT bezeichnet den Vorgang, bei dem aus der zuvor isolierten mRNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase cDNA hergestellt wird, welche als Ausgangsprodukt für die qPCR dient¹²². Die notwendigen Schritte und die Konzentrationen der benutzten Substrate waren abhängig von der gemessenen mRNA-Konzentration der Proben. Die

mRNA wurde mit RNase-freiem Wasser und 6 µl eines 25 µM p(dT)15-Primers vermischt. Dieser Primer bestand aus 15 Desoxythymidinnukleotiden ((dT)15), war komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA und diente als Startpunkt der RT¹²². Das Anlagern der p(dT)15-Primer an die mRNA wurde durch ein 6-minütiges Programm im Thermocycler katalysiert. Dabei wurden die Eppis auf 110°C erhitzt und anschließend für 4 min auf 72°C gebracht. Danach wurden sie zum Lagern auf 4°C heruntergekühlt. Der nächste Schritt war das Zufügen von RNase-freiem Wasser und des Master Mix. Der Master Mix bestand aus einem RT-Puffer, einem Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix (dNPT-Mix), RNase Out, bovinem Serumalbumin (BSA) und der Reversen Transkriptase des Avian Myeloblastosis Virus (AMV). Der dNTP-Mix bestand aus vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten: Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP) und Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in der finalen Konzentration von 220 µM. RNase Out war ein RNasen-Inhibitor und wurde in der Konzentration von 40 U/µl eingesetzt. BSA wurde in der Konzentration 10 mg/ml benutzt. Die RT erfolgte im Thermocycler für 90 min bei 42°C. Anschließend wurde die DNA/RNA-Hybridhelix bei 94°C über 10 min denaturiert. Mit der gewonnenen cDNA konnte direkt die qPCR angeschlossen werden. Alternativ konnte die cDNA in Eppis tiefgefroren gelagert werden.

2.1.4.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die qPCR-Vorbereitung erfolgte in speziellen 96-Well-Platten (96-WP). Die Experimente wurden mit 4 biologischen Replikaten mit je 2 technischen Replikaten durchgeführt, somit wurden 8 Einzelwerte (n=8) für die statistische Auswertung benutzt. Bei der qPCR wurde die entstandene DNA kontinuierlich gemessen, es erfolgte also keine Endpunktbestimmung¹²³. Für diese Messungen wurde der Farbstoff SYBR-Green benutzt, welcher nach der Bindung an die DNA zu fluoreszieren begann¹²⁴. Insgesamt wurden 40 Zyklen durchgeführt. Bei jedem Zyklus fand eine exponentielle Vermehrung der DNA statt und somit eine Zunahme der Fluoreszenz (Abbildung 1b). Diese Fluoreszenzzunahme wurde in jedem Zyklus gemessen und wurde in einem Diagramm als Verlaufskurve abgebildet (Abbildung 1d). Die dabei entstandenen Amplifikationskurven stellten zusätzlich den Schwellenwert (englisch: Cycle Threshold, Ct-Wert) jeder Probe dar (Abbildung 1c). Dieser Wert beschrieb, ab wann die Fluoreszenz der Probe über die ubiquitäre Fluoreszenz des Hintergrunds anstieg und war in Abbildung 1 als Schnittpunkt der horizontalen Linie (Schwellenwert

der Hintergrundfluoreszenz, Abbildung 1a) und der Amplifikationskurve dargestellt. Der Ct-Wert war abhängig von der DNA-Konzentration, die sich anfangs in der Probe befand: je mehr DNA, desto schneller wurde der Ct-Wert erreicht. Die vorhandene Menge der DNA konnte mithilfe der Amplifikationskurven abgeleitet werden.

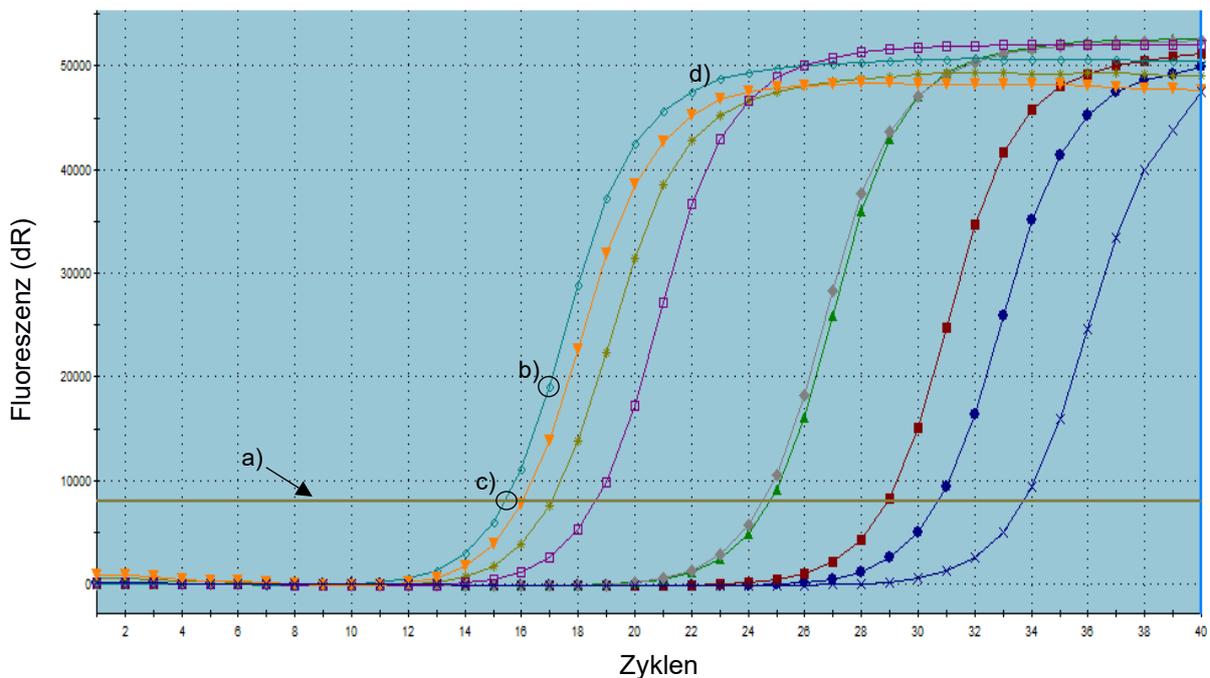


Abbildung 1: Exemplarische Darstellung der Amplifikationskurven

- a) Schwellenwert der Hintergrundfluoreszenz (horizontale Linie)
- b) Messpunkt der Fluoreszenz in einem Zyklus
- c) Ct-Wert (Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit der horizontalen Linie)
- d) Zusammenfassung der Messpunkte einer Probe zu einer Amplifikationskurve, jede Kurve in unterschiedlicher Farbe dargestellt

Je 1 μl einer cDNA-Probe wurde in ein Well der 96-WP pipettiert. 1 μl eines Primers (oder 1,5 μl der Primer Assay Lösung), 10,5 μl des RNase-freien Wassers und 12,5 μl des SybrOx-Mastermix wurden dazugegeben. Der SybrOx-Mastermix bestand aus folgenden Substanzen: mit Antikörpern blockierte Taq-DNA-Polymerase, PCR-Buffer mit 3 mM MgCl, 400 μM von jedem dNTP und 0,1 μM ROX reference dye. Es wurden entweder bereits fertige Primer der Firma Qiagen, oder QuantiTech Primer Assays benutzt. Diese wurden durch Zugabe von RNase-freiem Wasser zu der Assaylösung hergestellt. Als Negativkontrolle für jeden Primer wurde je ein Well mit Wasser und dem Primer-Mastermix-Gemisch benutzt. Als Referenzwert für die Genaktivitäten der cDNA-Proben wurde die Aktivität der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Positivkontrolle benutzt. GAPDH ist ein Haushaltsgen, also ein Gen, das ubiquitär vorkommt und dessen Expression unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen konstant bleibt¹²⁵. Die 96-WP wurden nach dem Pipettieren kurz

zentrifugiert. Das qPCR-Programm wurde am Stratagene MX3000P durchgeführt und dauerte 1 h 52 min 51 s (Abbildung 2). Als Erstes erfolgte dabei die initiale Denaturierung der DNA-Stränge bei 95°C, danach die Anlagerung (Annealing) der spezifischen Primer und anschließend die Amplifikation der DNA bei 60°C. Dieser Zyklus wurde 40-mal wiederholt. Dabei entstanden Amplifikationskurven der DNA-Proben und der Wasser-Proben.

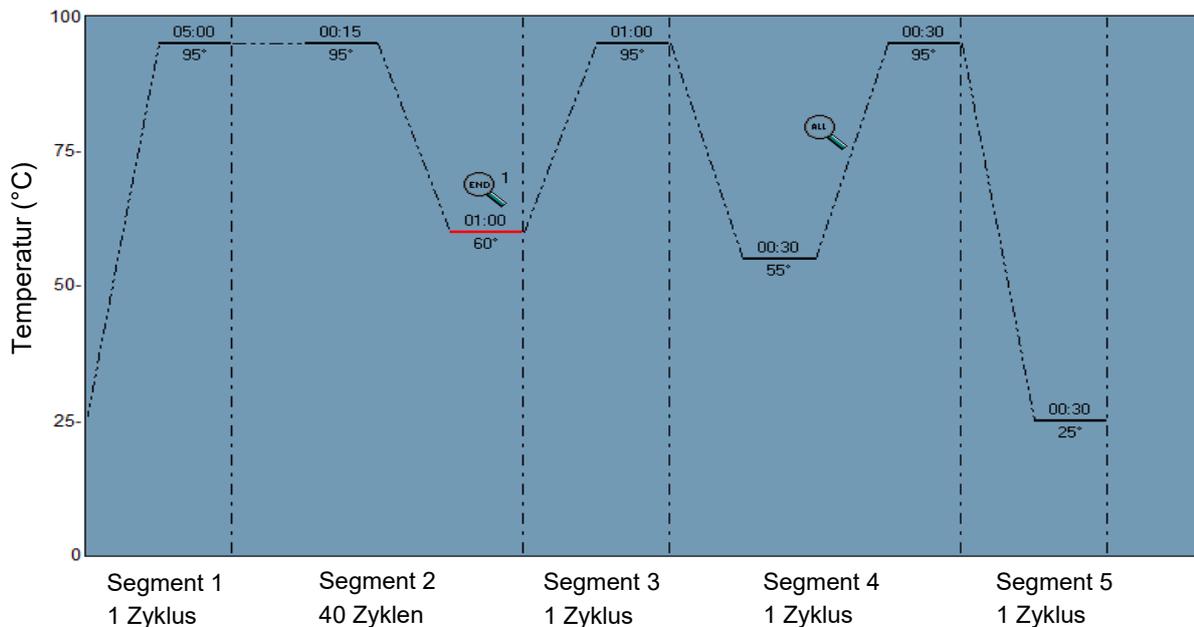


Abbildung 2: Thermal Profil der quantitativen Polymerasekettenreaktion

Dauer des Programms: 1h 52 min 51 s. In Segment 1 werden die Proben auf 95°C erwärmt und für 5 min bei der Temperatur belassen. Segment 2 besteht aus 40 Zyklen, die je 15 s bei 95°C und dann 1 min bei 60°C ablaufen. Segment 3 dauert 1 min bei 95°C. Segment 4 beginnt bei 55°C und endet bei 95°C, je 30 s. In Segment 5 wird auf 25°C abgekühlt.

Zum Auswerten der Ergebnisse wurde mit dem Programm Microsoft Excel eine Tabelle erstellt, in der aus den Ct-Werten der cDNA-Proben und den Ct-Werten der GAPDH-Proben die delta Ct- und die delta delta Ct-Werte errechnet wurden. Diese Methode lieferte normalisierte Werte, welche miteinander verglichen werden konnten. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit dem delta Ct-Wert mittels One Way Anova oder mit dem Dunnet Test ermittelt (siehe Kapitel 2.3).

2.1.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Das Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Nachweisverfahren, bei dem durch Markierung von Proteinen mit spezifischen Antikörpern (AK) eine enzymatische Farbreaktion ausgelöst wird, welche zur Bestimmung der

Substratkonzentration genutzt wird^{126, 127}. Es wurden je 750 µl des Kulturmediums pro Well an d0, d3, d10, d13, d17, d24, d35 und d50 entnommen und in sterilen Eppischockgefroren. Ein ELISA-Kit für humanes Troponin T der Firma RayBiotech mit einer 96-WP als Reaktionsgefäß wurde nach Herstellerangaben verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden auf Raumtemperatur durchgeführt. Der Boden der Wells war mit einem spezifischen AK für humanes Troponin T beschichtet. Im ersten Schritt wurden 100 µl des unverdünnten Kulturmediums pro Well hineingegeben. Das Troponin T im Kulturmedium wurde durch diese AK gebunden. Zusätzlich wurde eine für dieses Kit spezifische Verdünnungsreihe mit festgelegten Standards erstellt, anhand welcher im Auswertungsprogramm Magellan V7.1 der Firma Tecan die Substratkonzentrationen der Proben errechnet wurde. Als zweiter Schritt wurde nach Abkippen des Kulturmediums und vier Waschvorgängen ein biotinylierter AK für 1 h dazugegeben. Dieser war ebenfalls spezifisch für humanes Troponin T und heftete sich an das bereits durch die AK am Boden der WP gebundene Troponin T. Zusätzlich bot der biotinylierte AK durch das angeheftete Biotin eine Bindungsstelle für das Streptavidin, welches im nächsten Schritt verwendet wurde¹²⁷. Zum Detektieren der AK wurde nach dem Waschen der Wells als dritter Schritt Streptavidin, das mit einer Horseradish Peroxidase (HRP) konjugiert war, für 45 min dazugegeben. Das HRP-Streptavidin wurde im darauf folgenden Schritt mit einem Tetramethylbenzidin-Substrat aktiviert und erzeugte eine Farbreaktion¹²⁷ (Abbildung 3). Die Farbintensität war von der quantitativen AK Bindung des Substrats in den Wells, also von der Konzentration des Substrats im Kulturmedium, abhängig. Um eine überschießende Farbreaktion zu vermeiden und statistisch relevante und vergleichbare Werte zu erhalten, wurde die Reaktion nach 30 min mit einer schwefelsäurehaltigen Lösung gestoppt. Die Auswertung erfolgte am Mikroplatten-leser Tecan infinite M200. Die Farbintensität wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

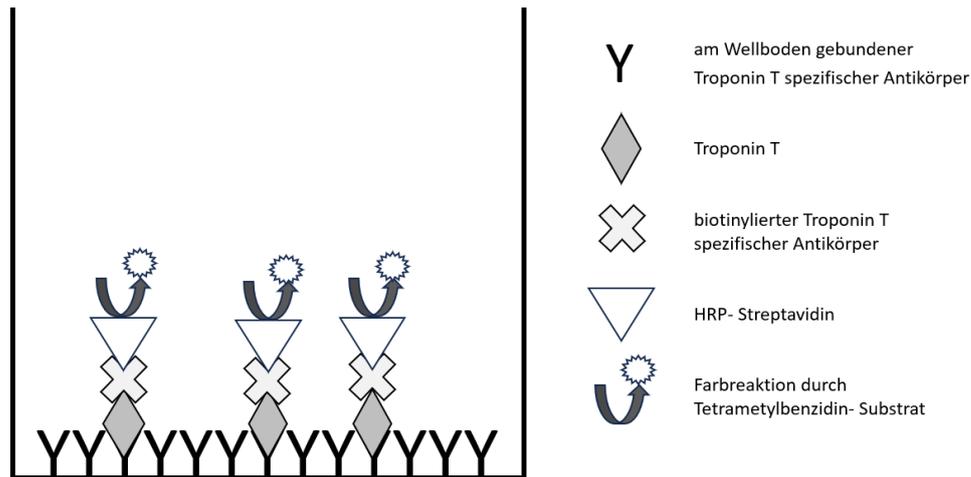


Abbildung 3: Schematischer ELISA-Versuchsaufbau in einem Well

2.1.6 Immunhistochemie

Die IHC ermöglicht die Darstellung von intrazellulären und intramembranösen Zellbestandteilen durch deren Markierung mit AK^{128, 129}. Jeder AK bindet dabei an ein bestimmtes Epitop¹²⁹. Die AK sind zusätzlich mit verschiedenen Detektionssystemen ausgestattet und ermöglichen dadurch die Darstellung des markierten Gewebes¹²⁸. Die Immunfluoreszenz (IF) ist eine Unterform der IHC und arbeitet mit fluoreszierenden AK. Es gibt zwei Arten der IF: die direkte und indirekte IF. Bei der direkten IF binden die konjugierten AK direkt an die Antigene (AG) und können sofort mikroskopiert werden. Bei der indirekten IF wird erst ein unkonjugierter AK benutzt, um das AG zu markieren. Danach wird ein zweiter, mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierter AK benutzt, welcher den unkonjugierten AK bindet. Die dabei entstehende Fluoreszenzantwort fällt intensiver aus, als bei der direkten IF^{130, 131}. Fluoreszenzfarbstoffe senden eine bestimmte Wellenlänge des Lichts aus (Emissionsspektrum), wenn sie durch eine passende Wellenlänge angeregt wurden (Anregungsspektrum)¹³². Diese Emission kann im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden und als Bild festgehalten werden. Die dabei entstehenden Bilder haben einen schwarzen Hintergrund und nur die mit AK markierten Zellbestandteile sind farblich hervorgehoben.

Zur Darstellung verschiedener Strukturen eines Präparats in unterschiedlichen Farben mussten die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedliche Anregungs- und Emissionsspektren haben. Die DNA im Zellkern wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. DAPI wird durch UV-Licht angeregt und emittiert im kurzwelligen, blauen Wellenlängenbereich. Die Zellkerne wurden damit

blau dargestellt¹³³. Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe, die verwendet wurden, um Zellbestandteile anzufärben, waren Alexa Fluor 647 (AF647) und Fluorescein Isothiocyanat (FITC). AF647 fluoreszierte rot und FITC grün. Um die Fluoreszenzfarbstoffe im Mikroskop anzuregen, musste für jedes Konjugat eine individuelle Belichtungszeit bestimmt werden. Anschließend konnte eine Bildaufnahme angefertigt werden. Es entstanden einzelne Bilder der Konjugate, welche durch das Leica LAS X Programm aufgenommen und zu einem Image Overlay zusammengefügt wurden. Eine zu lange Belichtungszeit führte zum Ausbleichen (Fading) der Präparate¹³⁴. Beim Fading entsteht durch verlängerte Aktivierung der fluoreszierenden Farbstoffe eine Reaktion mit den umgebenden Molekülen und somit ein irreversibler Verlust der Fluoreszenzfähigkeit¹³⁴.

Zur Durchführung der IHC wurden die Zellen nach d24 vereinzelt und in CS transferiert (siehe Kapitel 2.1.3.2.). Die Zellen mussten komplett vereinzelt vorliegen, damit im Färbeprozess die einzelnen Zellbestandteile deutlich sichtbar wurden und es nicht zu starken Überlagerungseffekten kam. Nach 24 h hafteten die Zellen am Boden der CS und konnten für die IHC-Darstellungen markiert werden. Die CS bestanden aus vier 15 mm² großen, einzelnen Kammern auf einem Objektträger, welche durch ein Plastikgerüst begrenzt waren.

Die Vorbereitung der hiPSC-CM für IHC erfolgte in einer Abzugsarbeitsbank. Im ersten Arbeitsschritt wurde das Kulturmedium abgekippt und für 5 min 1 ml PBS pro Chamber hinein pipettiert. Zum Fixieren der Zellen wurden anschließend je 250 µl 4 %iges Formaldehyd (Histofix) pro Chamber für 10 min dazugegeben. Das CS wurde zum Ausspülen des Histofix in einen Behälter mit PBS eingetaucht, kurz geschwenkt, entleert und am Zellstoff abgetupft. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschrift mit PBS. Zur Betrachtung der intrazellulären Zellbestandteile, wie Troponin T, mussten die Zellen permeabilisiert werden. Dazu wurde pro Chamber 1 ml 0,5 %ige Triton-Lösung (0,5 ml Triton in 100 ml PBS (ohne Kalzium (Ca), ohne Magnesium (Mg))) für 10 min hineingegeben. Danach wurde es abgekippt, in einem frischen PBS-Bad ausgespült und mit 1 ml PBS gewaschen. Die Blockierung der reaktiven Bereiche erfolgte mit 1 ml 1 %iger BSA-Lösung (1 g BSA in 100 ml PBS (ohne Ca, ohne Mg)) für 30 min. Andernfalls würden die reaktiven Bereiche zu einer unspezifischen Bindung der AK und somit zu einer unspezifischen Fluoreszenzantwort führen¹³⁵. Anschließend wurden die Chambers im PBS-Bad ausgespült. Mit diesem Schritt war die Vorbereitung der Zellen für IHC-Darstellungen abgeschlossen.

Zur korrekten Darstellung der Zellbestandteile wurden zunächst Titrationsmessungen zur Bestimmung der optimalen AK-Konzentration durchgeführt. In der anschließenden Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop wurde darauf geachtet, dass der AK die zu detektierenden Strukturen spezifisch gebunden hat.

Konjugierte AK wurden nach der Vorbereitung direkt als PBS/AK-Mischung in die Chambers gegeben. Nach 1 h Inkubation bei 4°C wurden die AK mit PBS ausgewaschen. Als letzter Schritt wurde ein Tropfen DAPI pro Chamber hineingegeben. Zum Einwirken wurden die CS für 5 min lichtgeschützt auf einem Schüttler bei langsamer Geschwindigkeit hin und herbewegt. Das überschüssige DAPI wurde anschließend vorsichtig abgeklopft. Abschließend wurde der Chamberaufsatz vom Objektträger abgespalten und ein Deckglas vorsichtig aufgesetzt. Das Deckglas durfte nicht zu stark gedrückt und danach auch nicht mehr verschoben werden, da sonst die gefärbten Zellen geschädigt worden wären.

Bei Verwendung von unkonjugierten AK musste ein zusätzlicher Schritt durchgeführt werden. Zunächst wurde die Mischung aus unkonjugiertem AK und PBS in die Chambers pipettiert und bei 4°C für 24 h in einer Feuchtkammer auf einer ebenen Fläche abgedeckt inkubiert. Anschließend wurden dieselben Schritte, wie mit konjugierten AK, durchgeführt. Der Ablauf der IHC-Vorbereitungen wird in Abbildung 4 schematisch zusammengefasst.

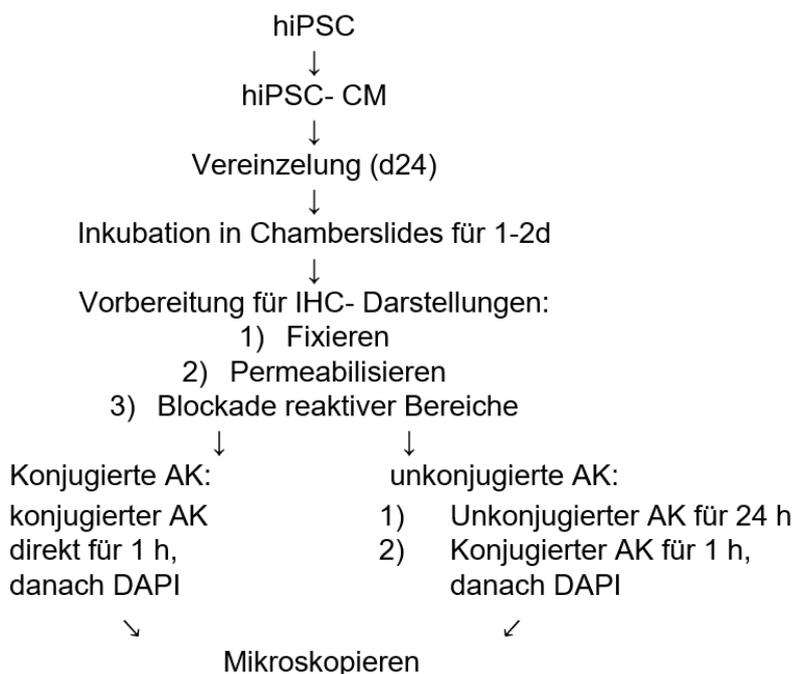


Abbildung 4: Schematische Darstellung der IHC-Vorbereitungen

2.1.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder FACS ist eine Methode, mit der Zellen anhand von Größe, Granularität und Markierung mit AK unterschieden werden können¹³².

Für FACS-Analysen mussten die Zellen komplett vereinzelt vorliegen (siehe Kapitel 2.1.3.2). Nach der Resuspension mit SF wurde für 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit PBS/Formalin (37 ml PBS mit 1 ml 37%iges Formalin). Das Zellpellet wurde in 500 µl PBS/Formalin gelöst, für 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zur Darstellung intrazellulärer Moleküle wie Troponin T mussten die Zellen permeabilisiert werden. Hierfür wurde 1 ml der PermWash-Lösung (1 ml PermWash mit 9 ml AquaDest) vorsichtig in dem Eppi mit dem Zellpellet bis zum Schäumen auf- und abpipettiert. Das Eppi wurde lichtgeschützt für 10 min im KS inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2000 rpm für 2 min wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit 500 µl PBS resuspendiert und abhängig von der Zellanzahl und Anzahl der Experimente auf 100/ 200/ 250 µl der Mischung pro FACS-Röhrchen aufgeteilt. Jedes Röhrchen wurde mit PBS auf 500 µl Inhalt aufgefüllt und bei 2800 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Damit war die FACS-Vorbereitung abgeschlossen und die Zellen konnten mit AK markiert werden. Die benötigte Konzentration der konjugierten AK wurde vorher in Titrationsmessungen ermittelt. Die benutzten Materialien und AK sind in Kapitel 2.2.4 aufgeführt. Die Färbung erfolgte mit einer PBS/AK-Mischung (100 µl PBS mit AK in der benötigten Konzentration). Die FACS-Röhrchen wurden lichtgeschützt für 30 min im KS inkubiert. Zum Auswaschen der AK wurden 400 µl PBS hinzugefügt, bei 2800 rpm für 2 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit 100 µl PBS resuspendiert. Nach diesem Schritt waren die Zellen bereit für FACS-Messungen.

Die Messungen erfolgten direkt im Anschluss an einem FACS Canto II-Gerät mit der Software BD FACSDiva™. Unterschiedliche Zelleigenschaften wurden genutzt, um die Zellen differenziert zu quantifizieren. Die Zellen passierten nacheinander einen Laserstrahl, dabei wurde das Licht in verschiedene Richtungen gestreut und der Fluoreszenzfarbstoff angeregt¹³⁶. Alles, was den Laserstrahl passierte, wurde als Ereignis (englisch: event) registriert und nach den Eigenschaften des gestreuten Lichts charakterisiert. Die Größe der Zellen wurde durch das Vorwärtsstreulicht (englisch: forward scatter, FSC) und die Granularität durch das Seitwärtsstreulicht (englisch: side

scatter, SSC) erfasst¹³⁶. Zusätzlich wurden die Events nach dem Fluoreszenzsignal der AK markierten Zellbestandteile eingeordnet¹³⁶.

In der Zellsuspension befanden sich nicht nur Einzelzellen, sondern auch Zelldetritus, oder Zelldubletten, welche jeweils auch als Events gemessen wurden. Für unsere Messungen waren jedoch nur die Einzelzellen relevant. Zum Ausschluss der nicht relevanten Events mussten die Messbereiche angepasst werden. Dafür wurden alle gemessenen Events zunächst in einem Dot Plot-Diagramm, welches die Events nach FSC und SSC einteilte, dargestellt. Jeder Punkt bildete dabei ein Event ab. Ein Zielbereich (englisch: gate) (P1) wurde definiert, dabei wurden Events, die sich zu weit links auf der x-Achse befanden, ausgeschlossen (Abbildung 5a). Diese Events stellten Zelldetritus dar und sollten nicht berücksichtigt werden. Zusätzlich wurde ein Contour-Plot erstellt, welches FSC-A (englisch: area, A) als x-Achse und FSC-W (englisch: width, W) als y-Achse hatte. Innerhalb der einzelnen Contour-Linien befanden sich Zellen gleicher Größe. Alle Zellen, die sich außerhalb der Linien befanden, waren deutlich inhomogener und von unterschiedlicher Größe. In dem Contour-Plot wurde ein horizontales Gate (P2 \triangleq Einzelzellen) festgelegt, welches Einzelzellen von Dubletten abgrenzte (Abbildung 5b). Mit diesen zwei Diagrammen wurden die Bereiche festgelegt, in denen sich Events befanden, welche als Einzelzellen definiert wurden.

Zur weiteren Charakterisierung der Einzelzellen wurden zwei Histogramme erstellt, welche die Fluoreszenzsignale der beiden benutzten AK (in Abbildung 5 FITC und APC (Allophycocyanin)) darstellten. Im Histogramm wurde die Fluoreszenzintensität (x-Achse) in Abhängigkeit zur Häufigkeit dieser Events (y-Achse) abgebildet. Zum Festlegen der Grenzen von spezifischer und unspezifischer Fluoreszenz wurden zusätzlich ungefärbte Zellen gemessen und ihre Eigenfluoreszenz berücksichtigt. Im Histogramm zeigte sich bei Messungen der mit AK markierten Zellen idealerweise ein Doppelgipfel (Abbildung 5c), wobei der erste Gipfel für die unspezifische Eigenfluoreszenz und der zweite Gipfel für die spezifische AK-Fluoreszenz der Zellen stand.

Es erfolgte stets eine Doppelfärbung der Zellen mit den Konjugaten FITC und APC beziehungsweise AF675. Diese Konjugate wurden benutzt, weil sich ihre Emissionsspektren nicht überschneiden und somit keine Kompensationsmessung notwendig war. Zur besseren Übersicht der mit den fluoreszierenden AK markierten Zellen wurde ein Dot Plot mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen erstellt und die

verschiedenen Anteile in einem Vier-Quadranten-Gate hervorgehoben. Die vier Quadranten zeigten die Aufteilung der Zellen, die entweder keine AK Markierung, mit einem AK oder mit zwei AK markiert wurden (Abbildung 5d).

Eine Populationshierarchie zeigte die prozentualen Anteile der Subpopulationen sowie die absolute Anzahl der Events (Abbildung 5e). In der statistischen Auswertung wurde zusätzliche die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) tabellarisch aufgeführt (Abbildung 5f).

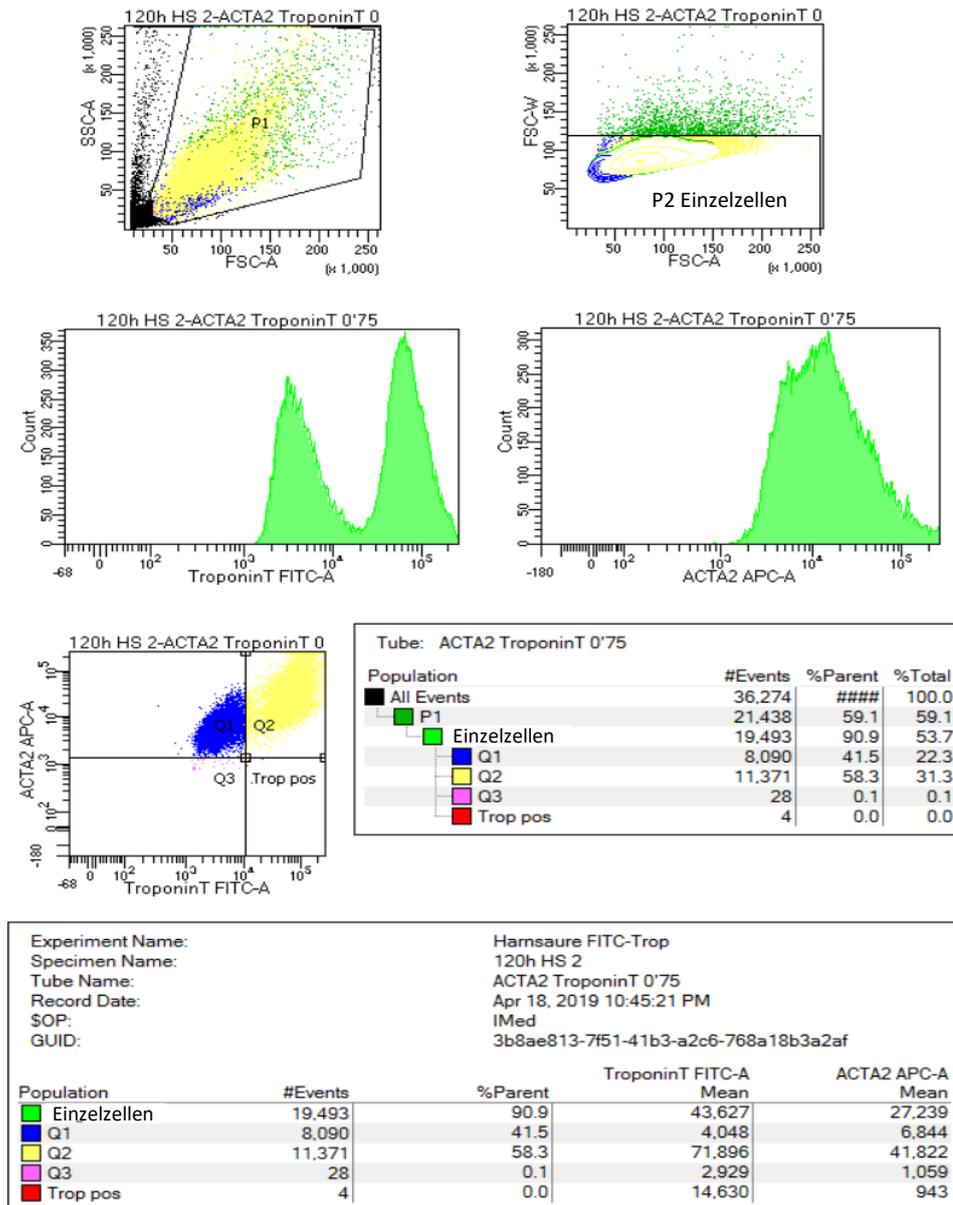


Abbildung 5: Exemplarische FACS-Messung

a) Dot Plot mit Forward und Side Scatter (FSC-A ($A \triangleq$ area), SSC-A). Jeder Punkt im Diagramm stellt ein Event dar. FSC ist ein Maß für die Größe, SSC ein Maß für Granularität der Events. Definition des Messgates P1 (solide Zellen). Ausgeschlossene Events aus dem P1-Gate stellen Zelldetritus dar. Die verschiedenen Farben stellen unterschiedliche Populationen dar.

b) Contour Plot mit FSC-A und FSC-W ($W \triangleq$ width). Senkrechtes Gate, welches die Contouren einschließt. Innerhalb dieser befinden sich Zellen, die homogen groß sind. Alle sich darüber befindenden Zellen unterscheiden sich in ihrer Größe deutlich von den anderen. Definition des Messgates P2 (Einzelzellen).

c) Histogramme mit Verteilung der Events innerhalb der FITC-/ APC-Intensität. Das FITC-Histogramm zeigt die typische Doppelgipfligkeit, welche die spezifischen und unspezifischen AK-Bindungen darstellt.

d) Dot Plot mit einem Quadranten Gate mit der Doppelfärbung FITC-A und APC-A. Q1= nur APC positiv, Q2= APC und FITC positiv, Q3= negativ für APC und FITC, Q4= nur FITC positiv.

e) Darstellung der Hierarchie innerhalb der Gates mit jeweils der Anzahl der gemessenen Events und dem prozentuellen Anteil an der Gesamtpopulation und an der übergeordneten Population.

f) Tabellarische Darstellung der statistischen Auswertung mit jeweils der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI).

FITC \triangleq Fluorescein Isothiocyanat, APC \triangleq Allophycocyanin

Die FACS-Messungen wurden genutzt um die Effektivität beider Differenzierungsprotokolle (2014 vs 2018) in Bezug auf hiPSC-CM Anteil in der Mischkultur zu vergleichen. Zusätzlich wurde der Anteil der NCM an der Mischkultur ermittelt.

2.2 Material

2.2.1 Medien, Supplemente und Puffer

Die Medien, Supplemente oder Puffer werden hier in chronologischer Reihenfolge in der zellkulturellen Arbeit und der kardialen Differenzierung aufgeführt. Zusätzlich werden die Zusammensetzungen der verschiedenen Medien aufgelistet. Die Supplemente wurden nach Herstellerangaben vorbereitet und gelagert.

Benötigte Materialien:

- DPBS, with calcium, with magnesium (Katalognummer: 14040091), Gibco™, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
- Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix, *LDEV-Free, 10mL (Katalognummer: 354230), Corning, New York, Vereinigte Staaten
- 500ml TeSR™-E8™ (Katalognummer: 05990), Stemcell Technologies Inc., Vancouver, Kanada
- Rock- Inhibitor Y27632 (Katalognummer: 130-103-922), Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
- EDTA- Lösung (pH8,0) 0,5M (Katalognummer: A4892.0500), AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- DPBS, ohne Calcium, ohne Magnesium (Katalognummer: 14190144), Gibco™, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
- Natrium Chlorid (NaCl) (Katalognummer: S7653-250G), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (Katalognummer: 15140122), Gibco™, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
- 0,4%ige Trypanblaulösung (Katalognummer: T8154), Merck, Darmstadt, Deutschland
- RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement (Katalognummer: 61870044), Gibco™, Thermo Fischer Scientific Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten

- Sodium Pyruvate (100 mM) (Katalognummer: 11360039), Gibco™, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
- B-27® Supplement (50X), serum free (Katalognummer: 17504044), Gibco™ Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
- L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate (Katalognummer: A8960-5G), Merck, Darmstadt, Deutschland
- StemMACS CHIR99021 (Katalognummer: 130-103-926), Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
- Recombinant Human BMP-4 Protein (Katalognummer:314-BP-010), R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, Vereinigte Staaten
- Recombinant Human/Mouse/Rat Activin A Protein (Katalognummer: 338-AC-010), R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, Vereinigte Staaten
- Human FGF-2, premium grade (Katalognummer: 130-093-841), Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
- IWP-4 (Katalognummer: 72552), StemCell Technologies, Vancouver, Kanada
- IWP-2 (Katalognummer: 72122), StemCell Technologies, Vancouver, Kanada
- RPMI 1640 Medium, no glutamine (Katalognummer: 01-101-1A), Biological Industries, Beit HaEmek, Israel
- HEPES (1M) (Katalognummer: 15630080), Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
- Albumin human (Katalognummer: A9731-5G), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Sodium DL-lactate solution 50% (Katalognummer: 72713), Merck, Darmstadt, Deutschland
- 2-Mercaptoethanol (50 mM) (Katalognummer: 31350010), Gibco™, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten

Zusammensetzungen der Medien:

- EDTA: 250 µl EDTA Stock solution (0,5M) + 250 ml PBS (-Ca, -Mg) + 225 mg NaCl
- E8: 480 ml TeSR- E8 Medium + 20 ml 25x Supplement + 5 ml P/S
- KM: 500 ml RPMI 1640 mit Glutamax + 5 ml P/S + 5 ml Natrium- Pyruvat
- SF: 49 ml KM + 1 ml B27 + 50 µl L-Ascorbinsäure (ASC) (200µM)
- MDM: 50 ml SF + 5 µl CHIR + 25 µl BMP4 + 45 µl AA + 25 µl FGF2

- SM: 49 ml RPMI ohne Glutamax + 500 µl P/S + 250 µl Sodium Lactate Stock (440mM) (SLS) + 100 µl 2-Mercaptoethanol (50mM)
- SLS: 500 µl 50% Sodium Lactate Solution + 4,5 ml HEPES (1M)
- CDM: 500 ml RPMI 1640 mit Glutamax + 5 ml P/S+ 12,5 ml HEPES+ 250 mg Albumin+ 100 mg ASC
- CCM: 500 ml RPMI 1640 mit Glutamax + 5 ml P/S+ 12,5 ml HEPES + 10 ml B27

2.2.2 Materialien und Primer für PCR

- RNeasy Mini Kit (Katalognummer: 74106), Qiagen, Venlo, Niederlande
- RNase-Free DNase Set (Katalognummer: 79254), Qiagen, Venlo, Niederlande
- Collection Tubes (Katalognummer: 19201), Qiagen, Venlo, Niederlande
- QIAshredder (Katalognummer: 79656), Qiagen, Venlo, Niederlande
- dNTP-Mix (10 mM) (Katalognummer: 18427013), Invitrogen™, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
- RNaseOUT™ (Katalognummer: 10777019), Invitrogen™, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
- Primer für cDNA-Synthese, oligo-p(dt)15 (Katalognummer: 10814270001), Roche, Basel, Schweiz
- Reverse Transkriptase AMV (Katalognummer: 10109118001), Roche, Basel, Schweiz
- MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL (Katalognummer: 4346907), life technologies™, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
- PCR-Röhrchen, 0.2 ml (Katalognummer:11376044), Axygen™, Corning, New York, Vereinigte Staaten
- SibirRoxHot Master Mix, ROX 0.1µM (Katalognummer: 119 405), Bioron, Ludwigshafen, Deutschland
- Real Time PCR Klebefolie 135x80 mm (Katalognummer: 26979), GeneOn, Ludwigshafen, Deutschland

Primer:

- RT² qPCR Primer Assay for Human GAPDH, (Katalognummer: PPH00150F-200), Qiagen, Venlo, Niederlande
- RT² qPCR Primer Assay for Human GJC1, (Katalognummer: PPH02456E-200), Qiagen, Venlo, Niederlande
- RT² qPCR Primer Assay for Human GJA1, (Katalognummer: PPH02781E-200), Qiagen, Venlo, Niederlande
- RT² qPCR Primer Assay for Human GJA5, (Katalognummer: PPH06113F-200), Qiagen, Venlo, Niederlande
- RT² qPCR Primer Assay for Human APOA1, (Katalognummer: PPH02456E-200), Qiagen, Venlo, Niederlande
- RT² qPCR Primer Assay for Human Scn5A, (Katalognummer: PPH02456E-200), Qiagen, Venlo, Niederlande
- RT² qPCR Primer Assay for Human HCN2, (Katalognummer: PPH06874B-200), Qiagen, Venlo, Niederlande
- RT² qPCR Primer Assay for Human HCN4, (Katalognummer: PPH14624C-200), Qiagen, Venlo, Niederlande
- RT² qPCR Primer Assay for Human CTF1, (Katalognummer: PPH02456E-200), Qiagen, Venlo, Niederlande
- RT² qPCR Primer Assay for Human TTN, (Katalognummer: PPH02456E-200), Qiagen, Venlo, Niederlande
- QuantiTect Primer Assay for SLC8A1, (Katalognummer: QT00075376), Qiagen, Venlo, Niederlande
- QuantiTect Primer Assay for SCN5A, (Katalognummer: QT00091812), Qiagen, Venlo, Niederlande
- QuantiTect Primer Assay for TNNT2, (Katalognummer: QT00089782), Qiagen, Venlo, Niederlande
- QuantiTect Primer Assay for TTN, (Katalognummer: QT01677277), Qiagen, Venlo, Niederlande
- QuantiTect Primer Assay for POU5F1, (Katalognummer: QT02323405), Qiagen, Venlo, Niederlande
- QuantiTect Primer Assay for SOX2, (Katalognummer: QT00026964), Qiagen, Venlo, Niederlande

- QuantiTect Primer Assay for NANOG, (Katalognummer: QT01886549), Qiagen, Venlo, Niederlande
- QuantiTect Primer Assay for FABP3, (Katalognummer: QT00018809), Qiagen, Venlo, Niederlande
- QuantiTect Primer Assay for ACTA2, (Katalognummer: QT01876469), Qiagen, Venlo, Niederlande

2.2.3 Materialien und Antikörper für IHC

- Roti®-Histofix 4 % (Katalognummer: P087.5), ROTH, Karlsruhe, Deutschland
- Triton™ (Katalognummer: X-100-100ML), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Bovine Serum Albumin (Katalognummer: 11930.03), SERVA, Heidelberg, Deutschland
- CultureSlides (Katalognummer: 354114), Falcon, Corning, New York, Vereinigte Staaten
- VECTASHIELD with DAPI, 10 ml(Katalognummer: VEC-H-1200), Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, Vereinigte Staaten

Konjugierte Antikörper mit Fluoreszenzmarkern in Klammern:

- Anti-Cardiac Troponin T-AK (FITC) (Katalognummer: orb187249), Biorbyt, Cambridge, Vereinigtes Königreich
- Anti-Cardiac Troponin T-AK (AF647) (Katalognummer: 565744), BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
- Anti-CD36-AK (FITC) (Katalognummer: 60084FI), Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
- Anti-ACTA2-AK (APC) (Katalognummer: NBP2-47698AF647), Novus Biologicals, Centennial, Colorado, Vereinigte Staaten
- Goat anti mouse-AK (FITC) (Katalognummer: ABIN2145562), antibodies-online, Aachen, Deutschland
- Goat anti rat-AK (FITC) (Katalognummer: ABIN638344), antibodies-online, Aachen, Deutschland
- Goat anti rabbit-AK (FITC) (Katalognummer: QL230437), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten

Unkonjugierte Antikörper:

- Oligoklonal Rabbit Anti-Connexin 40-AK (Katalognummer: 1965913), Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten
- Purified Mouse Anti-Connexin 43-AK (Katalognummer:610062), BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
- Monoklonal Mouse Anti-Connexin 45-AK (Katalognummer: MAB3100-C), Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, Vereinigte Staaten
- Monoklonal Rat Anti-Fibroblast-AK (ER-TR7) (Katalognummer: MA1-410076), Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
- Monoklonal Mouse Anti-Vimentin-AK (Katalognummer: V6389), Merck, Darmstadt, Deutschland

2.2.4 Materialien und Antikörper für FACS

- Formaldehyde solution 37% (Katalognummer: 252549), Merck, Darmstadt, Deutschland
- BD Perm/Wash™ (Katalognummer: 554723), BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
- Ampuwa Spüllösung (Katalognummer: B207151-06), Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland

Konjugierte Antikörper mit Fluoreszenzmarker in Klammern:

- Anti-Cardiac Troponin T-AK (FITC) (Katalognummer: orb187249), Biorbyt, Cambridge, Vereinigtes Königreich
- Anti-Cardiac Troponin T-AK (AF647) (Katalognummer: 565744), BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
- Anti-CD36-AK (FITC) (Katalognummer: 60084FI), Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
- Anti-ACTA2-AK (AF647) (Katalognummer: NBP2-47698AF647), Novus Biologicals, Centennial, Colorado, Vereinigte Staaten
- Anti-CD54-AK (FITC) (Katalognummer: ABIN2144636), antibodies-online, Aachen, Deutschland
- Anti-CD31-AK (AF647) (Katalognummer: 558094), BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten

- Anti-NLRP3-AK (AF647) (Katalognummer: IC7578R), R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, Vereinigte Staaten
- Anti-CD14-AK (AF647) (Katalognummer: 325612), Biolegend, San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten

2.2.5 Materialien für ELISA

- Human Troponin T ELISA Kit (Katalognummer: ELH-Troponin T), RayBiotech, Norcross, Georgia, Vereinigte Staaten

2.2.6 Sonstige Materialien

- Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0.5 mL, Eppendorf Biopur®, farblos, 50 Stück, einzeln verpackt (Katalognummer: 30121570), Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1.5 mL, Eppendorf Biopur®, farblos, 100 Stück, einzeln verpackt (Katalognummer: 30121589), Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2.0 mL, Eppendorf Biopur®, farblos, 100 Stück, einzeln verpackt (Katalognummer: 30121597), Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Eppendorf® ep Dualfilter T.I.P.S.® volume × L 50-1,000 µL × 76 mm (blue) (Katalognummer: Z741106), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Eppendorf® ep Dualfilter T.I.P.S.® volume × L 2-200 µL × 55 mm (yellow) (Katalognummer: Z741104), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Eppendorf® ep Dualfilter T.I.P.S.® volume × L 0.1-10 µL × 34 mm (dark grey) (Katalognummer: Z741098), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Falcon® 75cm² Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Vented Cap (Katalognummer: 353136), Falcon, New York, Vereinigte Staaten
- Falcon® 25cm² Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Vented Cap (Katalognummer: 353108), Falcon, New York, Vereinigte Staaten
- Falcon® 24 Well Clear Flat Bottom TC-Treated Multiwell Cell Culture Plate, with Lid, Sterile, 50/Case (Katalognummer: 353047), Falcon, New York, Vereinigte Staaten

- Falcon® 5mL Serological Pipet, Polystyrene, 0.1 Increments, Individually Packed, Sterile, 50/Bag, 200/Case (Katalognummer: 357543), Falcon, New York, Vereinigte Staaten
- Falcon® 10mL Serological Pipet, Polystyrene, 0.1 Increments, Individually Packed, Sterile, 50/Bag, 200/Case (Katalognummer: 357551), Falcon, New York, Vereinigte Staaten
- Falcon® 25mL Serological Pipet, Polystyrene, Space Saver, 0.25 Increments, Sterile, 50/Pack, 200/Case (Katalognummer: 357525), Falcon, New York, Vereinigte Staaten
- Falcon® 50mL High Clarity PP Centrifuge Tube, Conical Bottom, Sterile, (Katalognummer: 352070), Falcon, New York, Vereinigte Staaten
- Falcon® 15mL High Clarity PP Centrifuge Tube, Conical Bottom, with Dome Seal Screw Cap, (Katalognummer: 352096), Falcon, New York, Vereinigte Staaten
- Corning™ Falcon™ Cell Scrapers (Katalognummer: 353085), Falcon, New York, Vereinigte Staaten
- Parafilm M Verschlussfolie 10 cm x 38 m (Katalognummer: 701605), Merz, Frankfurt am Main, Deutschland
- EMD Millipore Stericup™ Sterile Vacuum Filter Units 1000ml (Katalognummer: SCVPU11RE), Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten

2.2.7 Technische Gerätschaften

- Sterilbank HERA safe, (Katalognummer: 51022515), Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland
- Inkubator HERA cell 240, (Katalognummer: 5536009), Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland
- Zentrifuge Spectrafuge 24 D (Katalognummer: D402066), Labnet International Inc., Edison, Ney Jersey, Vereinigte Staaten
- Zentrifuge Mikro 20 Typ 2004 (Katalognummer: 0009491-01-00), Hettich, Tuttlingen, Deutschland
- Zentrifuge Multifuge 1 S-R (Katalognummer: 75004331), Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland

- Ultratiefkühlschrank -86°C (Katalognummer. 17045), Haier Biomedical, Qingdao, China
- Thermomixer comfort (Katalognummer: 535503183), Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Vortex Gerät REAX top (Katalognummer: 541-10000-00-0), Heidolph, Schwabach, Deutschland
- peqSTAR 2xThermocycler (Katalognummer: PQ95-07002), VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Stratagene Mx3000P Multiplex Quantitative PCR System, (Katalognummer: 401405), Stratagene, La Jolla, Kalifornien, Vereinigte Staaten
- Lichtmikroskop Leica DM3000 (Katalognummer: 090-136.001), Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
- BD FACSCanto™ II, (Katalognummer: 338960), BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten
- Mikroplattenleser Tecan infinite M200 (Katalognummer: 30016056), Tecan, Grödig, Österreich

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad InStat®, Version 3.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten). Sofern nicht anders angegeben, wurden die Experimente in folgenden Replikationen durchgeführt qPCR: n=8, ELISA: n=4, FACS: n=6. Die Daten aus den qPCR-Experimenten sowie die Daten aus den ELISA-Experimenten, wurden mit dem Dunnett Multiple Comparisons Post-Test (Vergleich mit Kontroll-Gruppe) statistisch ausgewertet. Als Kontroll-Gruppe wurde d0 festgelegt. Für die Berechnung der Signifikanz wurden die delta Ct-Werte benutzt. Zu Errechnung der delta Ct-Werte wurde mittels Microsoft Office Excel eine Tabelle erstellt, in der die Ct-Werte der verschiedenen Gen-Proben mit den Ct-Werten der dazugehörigen GAPDH-Proben verrechnet wurden. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurden Diagramme mit Microsoft Office Excel erstellt. Die signifikanten Ergebnisse wurden bei $p < 0,05$ mit * (signifikant), bei $p < 0,01$ mit ** (sehr signifikant) und bei $p < 0,001$ mit *** (extrem signifikant) markiert. Nicht signifikante Ergebnisse wurden nicht zusätzlich markiert. Die Berechnung der Signifikanz für die FACS-Experimente erfolgte mittels One Way

Anova. Die verwendeten Abbildungen der IHC-Untersuchungen wurden mit dem Leica Mikroskop erstellt und anschließend im Microsoft Office Powerpoint zu einer 4 Felder Abbildung zusammengestellt. Die Overlay Bilder wurden mit dem Programm Leica LAS X erstellt.

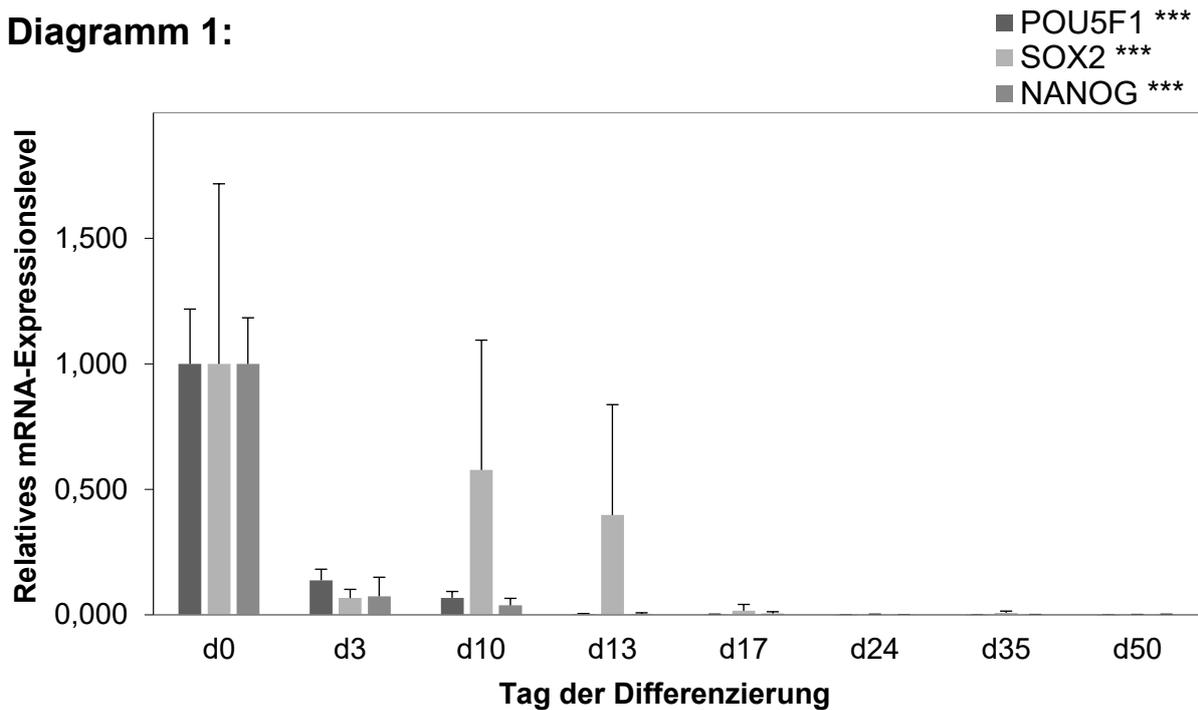
3 ERGEBNISSE

3.1 Analysen der Zellkultur im Differenzierungsprozess

Im ersten Abschnitt der hiPSC-CM-Studien erfolgte eine deskriptive Analyse der Zellen im kardialen Differenzierungsprozess. Hierbei wurden Pluripotenz- und Kardiomyozyten-assoziierte Gene in den ersten 50 Tagen nach Beginn der Differenzierung untersucht. Ferner wurden Gene, welche für kardiale Strukturproteine wie Ionenkanäle, Adhäsionsmoleküle, intrazelluläre Zytoskelettproteine und Mikrofilamente kodieren, untersucht. Als Referenzwert diente d0, da an diesem Tag die Zellen im hiPSC-Stadium vorlagen. Als Untersuchungstage wurden relevante Tage des Differenzierungsprozesses ausgewählt, an denen wesentliche Veränderungen der Zusammensetzung des Kulturmediums erfolgten. Außerdem erfolgten IHC-Darstellungen verschiedener intrazellulärer und transmembranöser Strukturen.

3.1.1 Pluripotenz-assoziierte Gene

Zum Nachweis der Pluripotenz wurde das Expressionsverhalten der Stammzellmarkergene POU5F1, SOX2 und NANOG im Differenzierungsverlauf mittels qPCR untersucht. Während SOX2 an d10 und d13 minimale Anstiege der Genexpression zeigte, fielen die Expressionslevel der anderen beiden Gene nach d0 stark ab. Nach d17 waren alle drei Gene nicht mehr nachweisbar (Ct-Wert >40, Diagramm 1).

Diagramm 1:**Diagramm 1:**

qPCR-Analysen der mRNA-Expressionslevel der Pluripotenzmarker im Verlauf der kardialen Differenzierung, d0- d50, n=8. Untersucht wurden POU5F1= POU class 5 homeobox 1, SOX2= SRY-box transcription factor 2 und NANOG= Nanog homeobox. Die Balken stellen das relative mRNA-Expressionslevel als Mittelwert mit Standardabweichung dar. d0 \triangleq hIPSC-Status. Die statistische Auswertung erfolgte mit One Way Anova. * $\triangleq P < 0,05$; ** $\triangleq P < 0,01$; *** $\triangleq P < 0,001$

Nach Beginn der kardialen Differenzierung nahm die Expression der Stammzellmarkergene ab und war nach d17 nicht mehr nachweisbar.

3.1.2 Kardiomyozyten- und Kardiomyogenese-assoziierte Gene

Im Verlauf der Differenzierung der hiPSC zu hiPSC-CM erfolgten qPCR-Untersuchungen der Kardiomyozyten-assoziierten Gene TNNT2, TTN und CTF1. TNNT2 und TTN zeigten im Verlauf der Differenzierung eine Zunahme des Expressionslevels über das Zehntausendfache, während CTF1 eine geringere Zunahme aufwies. Besonders ab d10, dem Abschlussstag der Wnt-Inhibitionswoche, stiegen die Expressionslevel aller drei Gene an (Diagramm 2).

Diagramm 2:

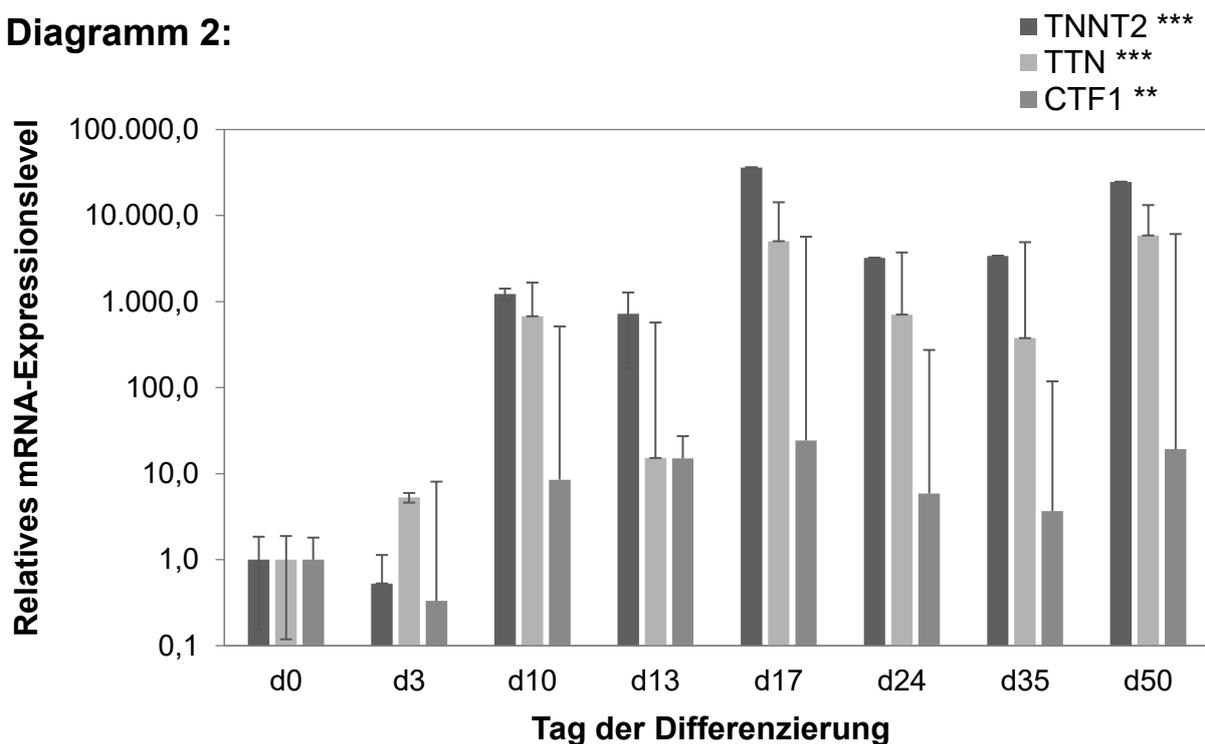
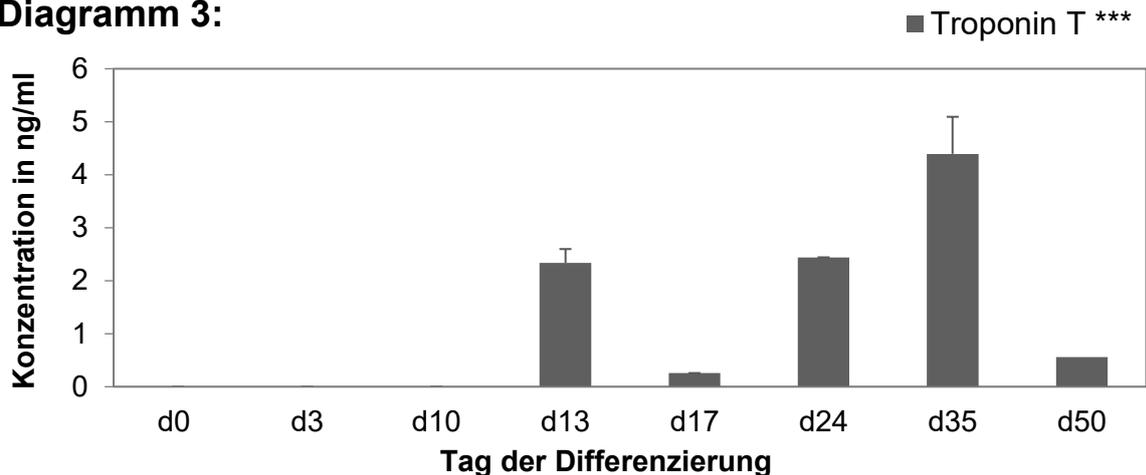


Diagramm 2:

qPCR-Analysen der mRNA-Expressionslevel der Kardiomyozyten-assoziierten Gene im Verlauf der kardialen Differenzierung, d0- d50, n=8. Untersucht wurden TNNT2 = Troponin T 2, kardialer Isotyp, TTN = Titin und CTF1= Cardiotrophin 1. Die Balken stellen das relative mRNA-Expressionslevel als Mittelwert mit Standardabweichung dar. d0 $\hat{=}$ hiPSC-Status. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Dunnett Multiple Comparisons Post-Test mit d0 als Vergleichswert. * $\hat{=}$ $P < 0,05$; ** $\hat{=}$ $P < 0,01$; *** $\hat{=}$ $P < 0,001$

Zusätzlich zu Bestimmungen der intrazellulären Genexpression erfolgte der Nachweis des Proteins Troponin T im Kulturmedium mittels ELISA. An den ersten drei Untersuchungstagen zeigte sich kein messbarer Nachweis des Proteins Troponin T. Ab d13 stieg die Konzentration stetig an, mit Ausnahme von d17, und fiel an d50 wieder ab (Diagramm 3).

Diagramm 3:**Diagramm 3:**

Messung der Konzentration des Proteins Troponin T im Überstand des Kulturmediums im Verlauf der Differenzierung mittels ELISA an d0-d50. Die Konzentrationen an den jeweiligen Messtagen sind als Mittelwert mit Standardabweichung in ng/ml dargestellt (n=4, keine Verdünnung). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Dunnett Multiple Comparisons Post-Test mit d0 als Vergleichswert. * $\triangleq P < 0,05$; ** $\triangleq P < 0,01$; *** $\triangleq P < 0,001$

Anschließend erfolgten FACS-Analysen zur Bestimmung des Anteils der Troponin T-positiven Zellen in der kardialen Mischkultur. Die differenzierten Zellen wurden nach dem FACS-Protokoll vorbereitet (siehe Material und Methoden 2.1.7). Die FACS-Analysen zeigten einen durchschnittlichen Anteil von 73,8% Troponin T-positiven Zellen. Nach Differenzierung mit dem neuen Protokoll der SCU Göttingen von 2018 enthielt die Mischkultur durchschnittlich 79,3% Troponin T-positive Zellen. Morphologisch zeigten die hiPSC-CM beider Protokolle keine Unterschiede.

Die qPCR-Analysen der kardialen Gene sowie die ELISA-Untersuchungen auf Troponin T, zeigten eine Kardiomyozyten-typische Gen- und Proteinexpression, welche sich im Verlauf der Differenzierung etablierte und nach Abschluss der Differenzierung eine hiPSC-CM-dominierte Mischkultur bestätigte.

3.1.3 Zellmorphologie

Vor Beginn der Differenzierung wurden die hiPSC in T75ern kultiviert. Bei regelgerechter Kultivierung ohne spontane Differenzierung der hiPSC waren diese größtenteils in rundlichen Kolonien mit einer zentralen kuppelartigen Verdichtung der Zellen angeordnet. Eine gesonderte Betrachtung einzelner Zellen dieses Stadiums war nicht möglich, da sie in einem festen Zellverband vorlagen und war auch nicht angestrebt.

Nach dem Transfer der Zellen in WP, also zu Beginn der Differenzierung, hatten die hiPSC eine spindelartige Form mit einem rund-ovalen Zellkern, welcher sich hauptsächlich im breitesten Bereich der Zelle befand. Die Zellen lagen dicht nebeneinander.

Zur detaillierten Betrachtung der Zellmorphologie der hiPSC-CM erfolgten IHC-Darstellungen mit fluoreszierenden Anti-Troponin T-AK an d27-d33. Die Zellkerne wurden mit DAPI dargestellt. Die Zellkernmorphologie kam in den meisten hiPSC-CM ähnlich zur Darstellung. In Einzelzellen zeigte er sich rund mit einer dunkler erscheinenden, runden Struktur intranukleär. Die Troponin T-bindenden Anteile waren in Linien angeordnet und bildeten eine streifige Bandenstruktur im Zytoplasma. Dieses Bandenmuster zeigte sich intrazellulär deutlich verzweigt. In kleineren Zellen erschien die Konzentration der Troponin T-positiven Banden deutlich erhöht. In größeren Zellen zeigten sich die Abstände der einzelnen Banden erweitert. Eine empirische Erfassung dieser optisch deskriptiven Beobachtungen war technisch nicht durchführbar. Die hiPSC-CM waren polymorph. Sie konnten runde, ovale, eckige oder diverse andere Konfigurationen annehmen. Die Größe der Zellen differierte ebenfalls zwischen unter 50 µm bis über 400 µm Durchmesser (Abbildung 6 und 7).

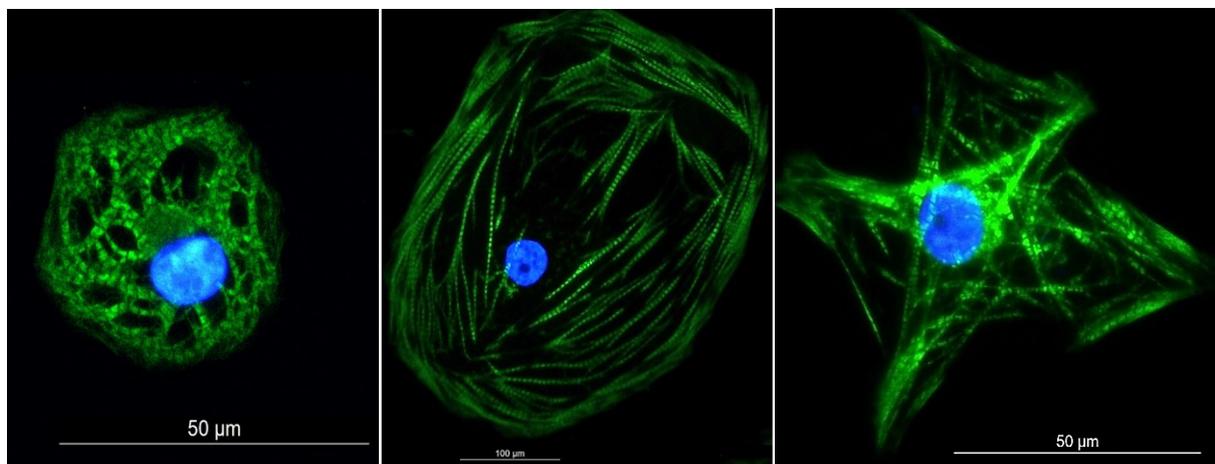


Abbildung 6:

Immunhistochemische Darstellung der hiPSC-CM an d32 mit Kardiomyozyten-typischem Bandenmuster und unterschiedlicher Zellmorphologie. Folgende AK wurden benutzt: DAPI (blau), FITC-Anti-Troponin T-AK (grün). Dargestellt sind Overlay Aufnahmen beider AK. Ein Referenzbalken mit Größenangabe ist aufgeführt.

Der Großteil der immunhistochemisch dargestellten hiPSC-CM besaß einen einzelnen Zellkern und ein kräftiges, intrazelluläres, Troponin T-positives Bandenmuster. Es ließen sich aber auch vereinzelt Zellen mit zwei Zellkernen darstellen. Dabei befanden sich die Zellkerne zentral in der Zelle. Diese Zellen waren deutlich größer als andere dargestellte hiPSC-CM. Das Troponin T-positive Bandenmuster stellte sich

konzentrisch um die Zellkerne dar und kumulierte an zwei gegenüberliegenden Polen der Zelle (Abbildung 7).

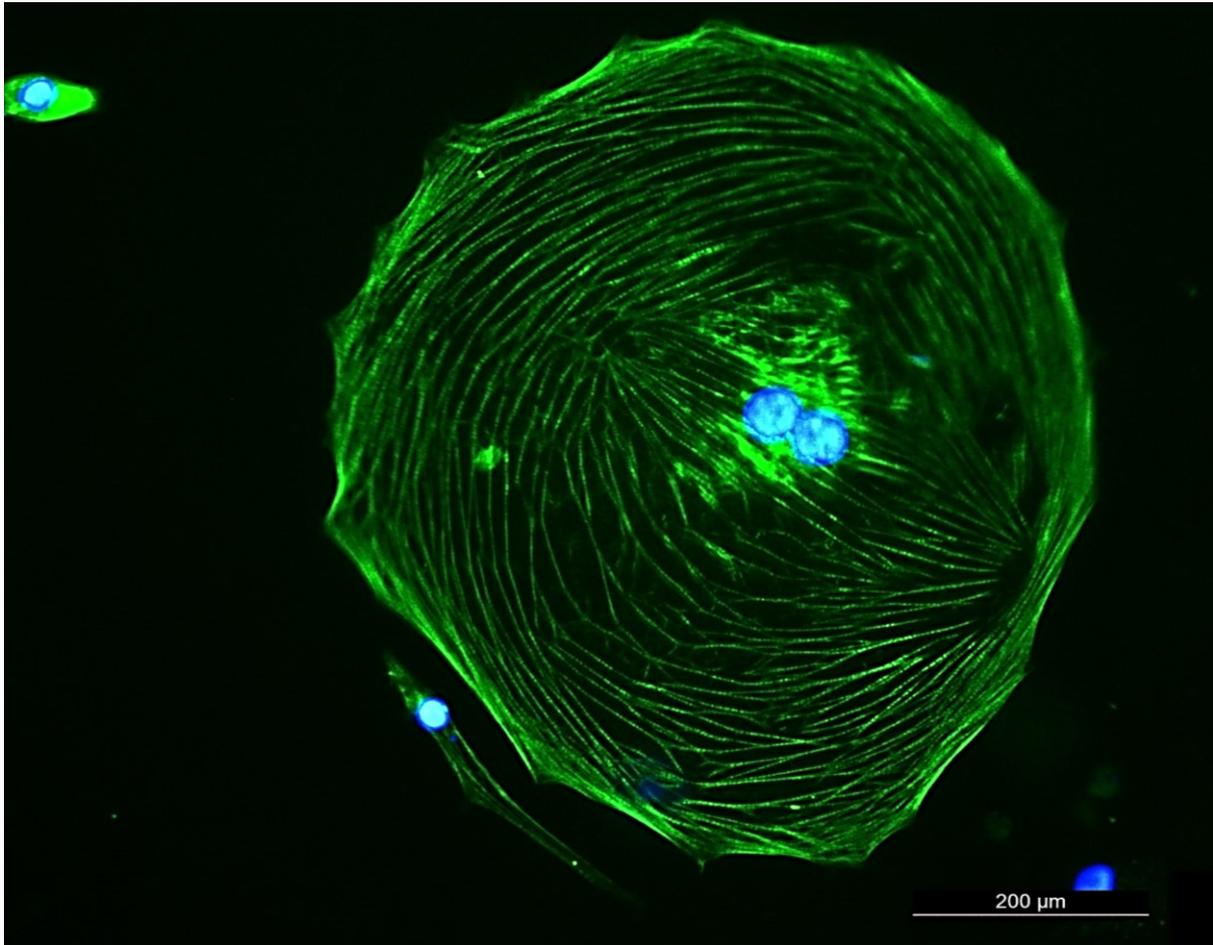


Abbildung 7:

Immunhistochemische Darstellung der hiPSC-CM an d30. Folgende AK wurden benutzt: DAPI (blau), FITC-Anti-Troponin T-AK (grün). In der Overlay Abbildung beider AK zeigen sich zwei Zellkerne zentral in der Zelle. Ein Referenzbalken zur Größenangabe ist aufgeführt.

Im zusammenhängenden Zellverband kamen die Zellen eher länglich-oval zur Darstellung. Die Querstreifung war innerhalb einer Zelle durchgängig nachverfolgbar. An den Zellgrenzen wurde die Kontinuität der Banden unterbrochen, wodurch die Form der Zellen deutlich zur Darstellung kam. Die Zellkerne stellten sich im Vergleich zu den Einzelzellen abgeflachter und länglicher dar. Das Binnenmuster der Zellkerne war vergleichbar mit dem der Einzelzellen. Es hatte ebenfalls eine intranukleäre, runde, dunklere Struktur. Am häufigsten befanden sich die Zellkerne zentral in den Zellen (Abbildung 8).

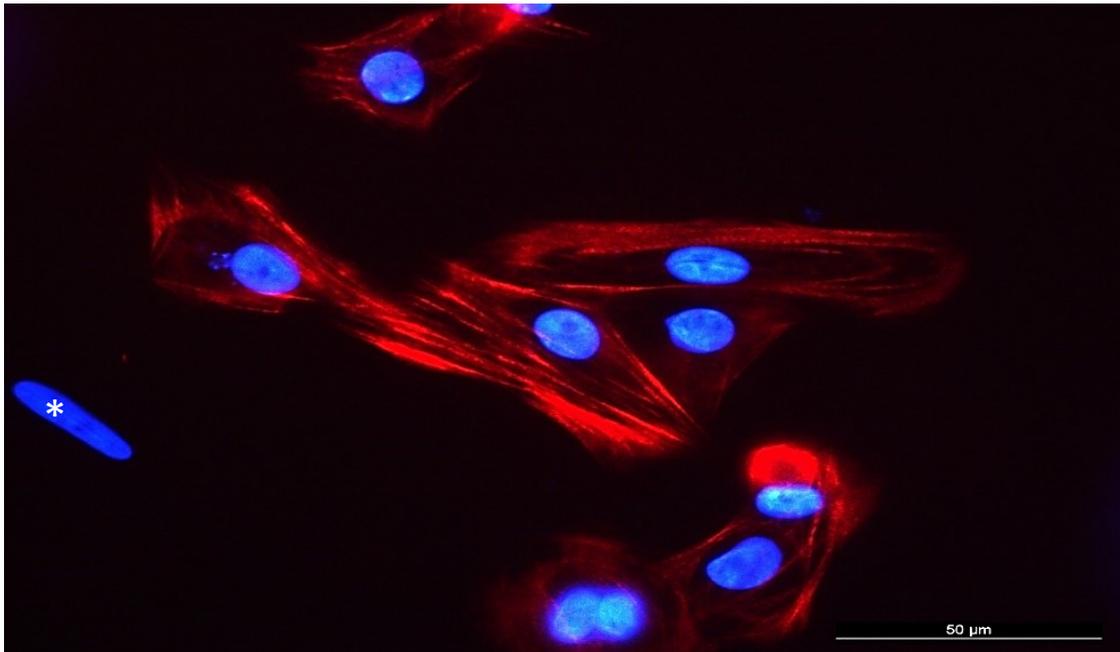


Abbildung 8:

Immunhistochemische Darstellung der Zellmorphologie der hiPSC-CM im Zellverband an d30 mit folgenden AK: DAPI (blau), AF647-Anti-Troponin T-AK (rot) als Overlay Abbildung beider AK. Ein Referenzbalken mit Größenangabe ist aufgeführt.

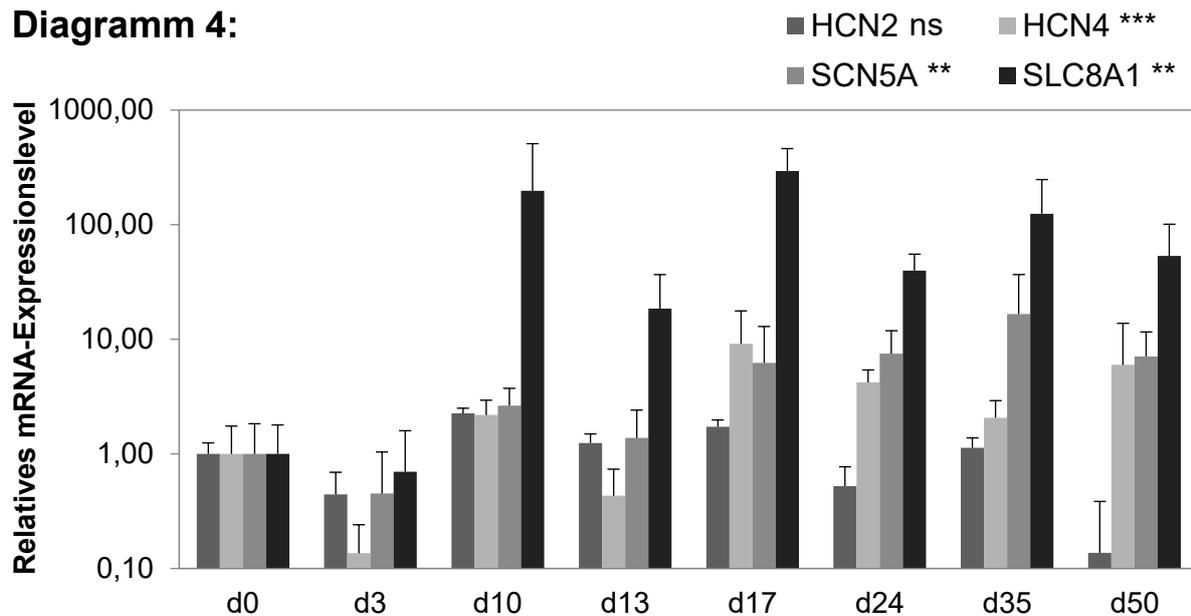
* \triangle außerhalb des Zellverbands gelegene, nicht Troponin-T positive Zelle

Bei den IHC-Darstellungen mit Anti-Troponin T-AK wurde der Großteil der untersuchten Zellen mit einem positiven Fluoreszenzsignal detektiert. Ein kleinerer Teil der Zellpopulation zeigte kein Troponin T-positives Signal bei einem DAPI-positiven Zellkernsignal (Abbildung 8, markiert mit Sternchen). Eine statistische Erfassung war methodenlimitiert nicht möglich.

Zusammengefasst ließen sich die hiPSC-CM als polymorphe Zellen mit einem Troponin T-positiven Bandenmuster darstellen.

3.1.4 Transmembranöse Ionenkanäle

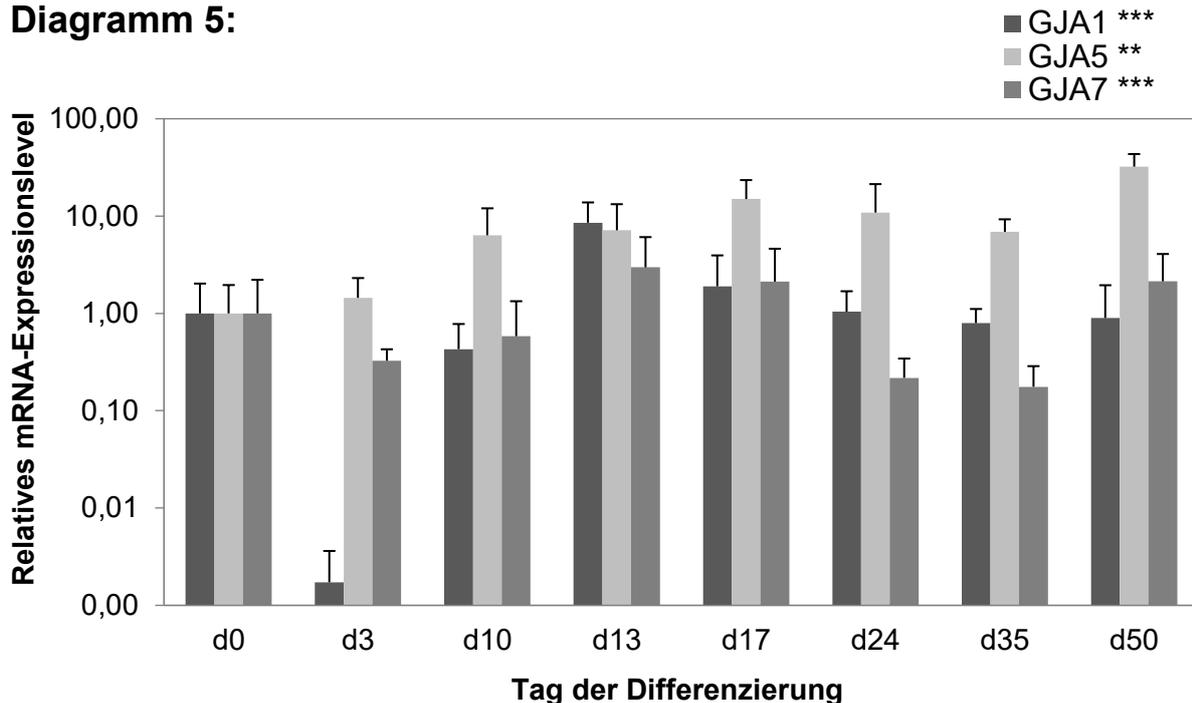
Im nächsten Schritt erfolgten qPCR-Untersuchungen des Expressionsverhaltens verschiedener Kardiomyozyten-typischer Ionenkanäle im Differenzierungsprozess. SLC8A1 zeigte die höchsten relativen Expressionslevel der Ionenkanalgene mit einem über hundertfachen Anstieg. Die Gene HCN2, HCN4 und SCN5A zeigten ebenfalls Anstiege im Expressionsverhalten ab d10 mit unterschiedlichem Expressionsmaximum (Diagramm 4).

Diagramm 4:**Diagramm 4:****Tag der Differenzierung**

qPCR-Analysen der mRNA-Expressionslevel verschiedener Ionenkanäle im Verlauf der kardialen Differenzierung, d0- d50, n=8. Untersucht wurden die Gene HCN2= hyperpolarisationsabhängiger Kationenkanal 2, HCN4= hyperpolarisationsabhängiger Kationenkanal 4, SCN5A= spannungsabhängiger Natriumkanal der Untergruppe 5, SLC8A1 = gelöstes Carrierprotein der Familie 8 A1. Die Balken stellen das relative mRNA-Expressionslevel als Mittelwert mit Standardabweichung dar. d0 \triangleq hIPSC-Status. Die statistische Auswertung erfolgte mit One Way Anova. * \triangleq $P < 0,05$; ** \triangleq $P < 0,01$; *** \triangleq $P < 0,001$; ns \triangleq $P > 0,05$

3.1.5 Adhäsionsmoleküle

Es erfolgte eine Analyse der GJ-assoziierten Gene, welche am häufigsten in CM exprimiert werden: Cx40, Cx43 und Cx45. Alle drei Genexpressionslevel zeigten an d13 einen Anstieg, wobei GJA5 auf einem hohen Level blieb. Die Expressionslevel der anderen beiden Gene fielen im Verlauf ab. GJA1 und GJA7 zeigten an den ersten beiden Untersuchungstagen zusätzlich einen Abfall der Expression im Vergleich zu d0. GJA5 zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der Expression bis zum Abschluss des Differenzierungsprozesses (Diagramm 5).

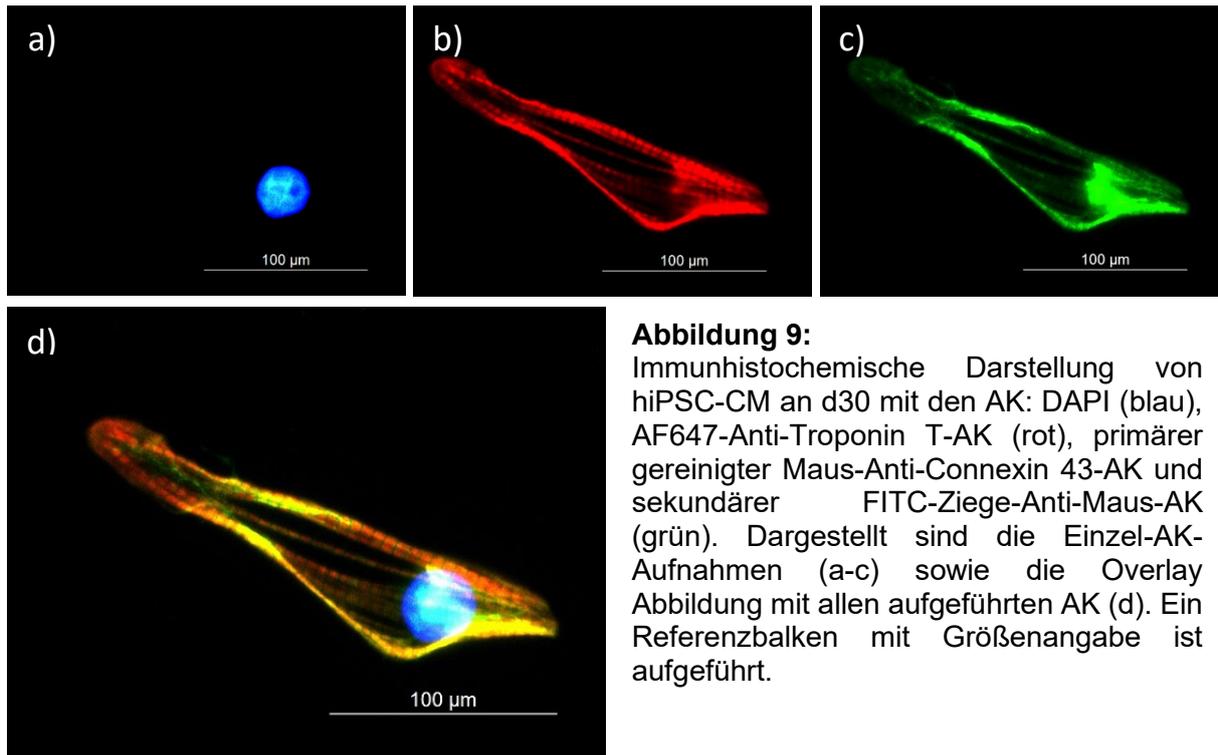
Diagramm 5:**Diagramm 5:**

qPCR-Analysen der mRNA-Expressionslevel der Connexine im Verlauf der kardialen Differenzierung, d0- d50, n=8. Untersucht wurden GJA1=Gap Junction Protein Alpha 1 (Cx43), GJA5=Gap Junction Protein Alpha 5 (Cx40) und GJA7=Gap Junction Protein Alpha 5 (Cx45). Die Balken stellen das relative mRNA-Expressionslevel als Mittelwert mit Standardabweichung dar. d0 \triangleq hiPSC-Status. Die statistische Auswertung erfolgte mit Dunnett Multiple Comparisons Post-Test mit d0 als Vergleichswert. * \triangleq $P < 0,05$;

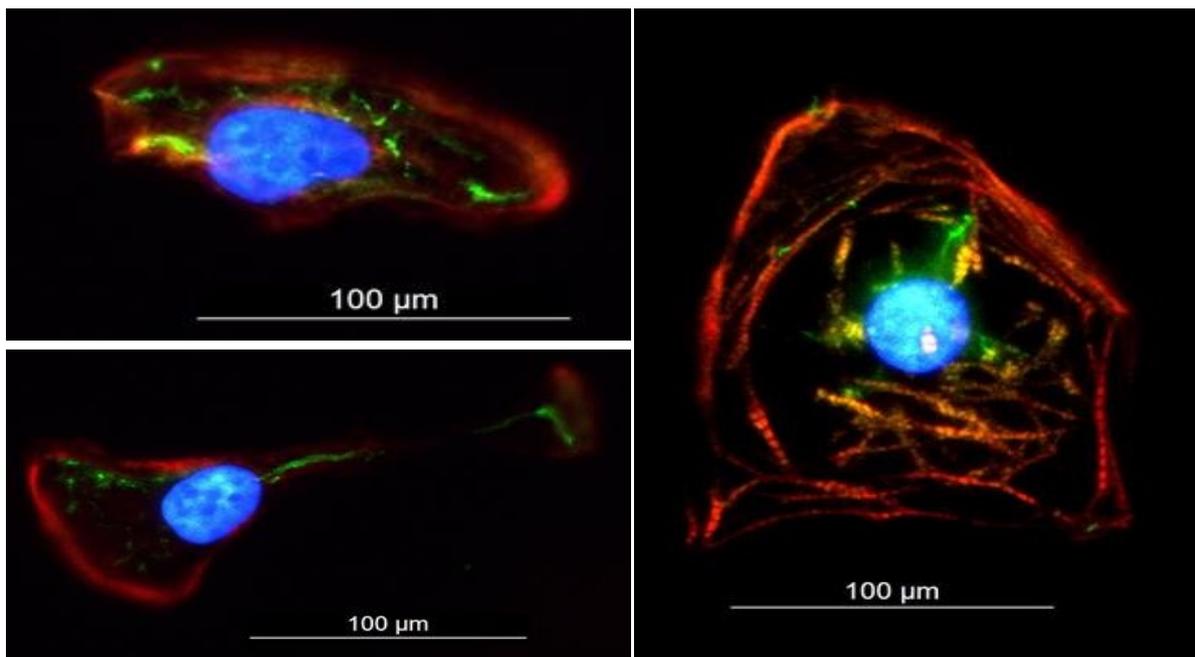
** \triangleq $P < 0,01$; *** \triangleq $P < 0,001$

Die Visualisierung verschiedener Cx in hiPSC-CM wurde mithilfe IHC-Darstellungen durchgeführt.

Abbildung 9 und 10 zeigen die Darstellung von Cx43 in den hiPSC-CM. Die Cx-positiven Fluoreszenzsignale verteilten sich hauptsächlich in der Peripherie der Zelle und perinukleär (Abbildung 9c). Die Troponin T-positiven Fluoreszenzsignale ließen sich, wie bereits in Kapitel 3.1.3 beschrieben, in einem Kardiomyozyten-typischen Querstreifenmuster darstellen. In Abbildung 9d zeigten sich Strukturen in orangener Farbe. Am ehesten kann man diese Farbentstehung durch Überlagerung der Fluoreszenzsignale der beiden Farbstoffe FITC und AF647 erklären, was durch die die Anordnung der Cx43-positiven Signale an den Troponin T-positiven Signalen in diesen Bereichen der Zelle entstanden sein könnte.

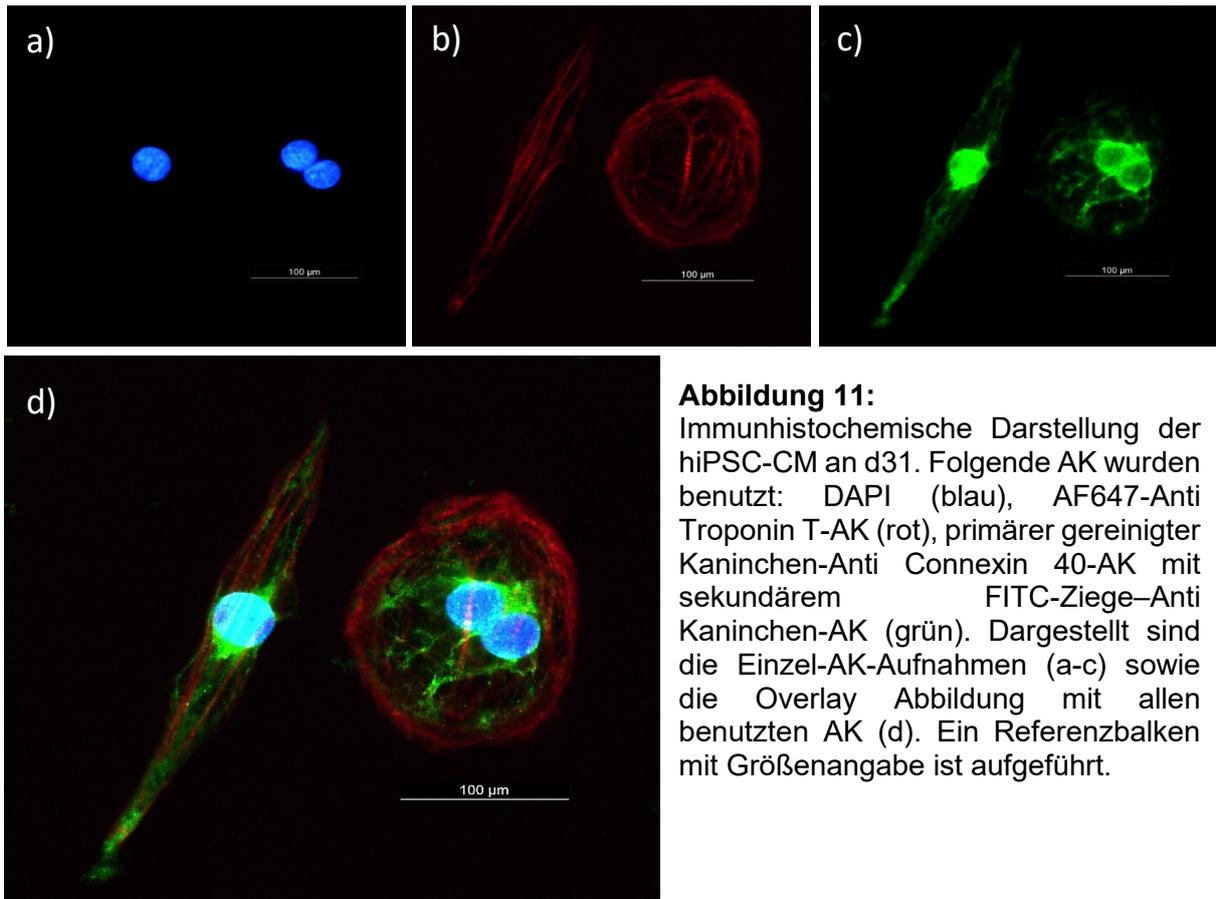
**Abbildung 9:**

Immunhistochemische Darstellung von hiPSC-CM an d30 mit den AK: DAPI (blau), AF647-Anti-Troponin T-AK (rot), primärer gereinigter Maus-Anti-Connexin 43-AK und sekundärer FITC-Ziege-Anti-Maus-AK (grün). Dargestellt sind die Einzel-AK-Aufnahmen (a-c) sowie die Overlay Abbildung mit allen aufgeführten AK (d). Ein Referenzbalken mit Größenangabe ist aufgeführt.

**Abbildung 10:**

Immunhistochemische Darstellung der hiPSC-CM an d30. Folgende AK wurden benutzt: DAPI (blau), AF647-Anti-Troponin T-AK (rot), primärer gereinigter Maus-Anti-Connexin 43-AK und sekundärer FITC-Ziege-Anti-Maus-AK (grün). Dargestellt sind die Overlay Abbildungen mit allen aufgeführten AK. Ein Referenzbalken mit Größenangabe ist aufgeführt.

Abbildungen 11 und 12 zeigen die Verteilung der Cx40-positiven Fluoreszenzsignale in den hiPSC-CM. Perinukleär ließ sich eine deutliche Verdichtung der Cx40-positiven Fluoreszenzsignale darstellen (Abbildung 11c). Die periphere, intrazelluläre Anordnung der Cx40-positiven Signale kam eher als eine linienförmige, verzweigte Aufreihung von punktuellen Signalen zur Darstellung, grenzte sich jedoch deutlich von den Troponin T-positiven Bereichen ab, somit entstand keine Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzfarben.



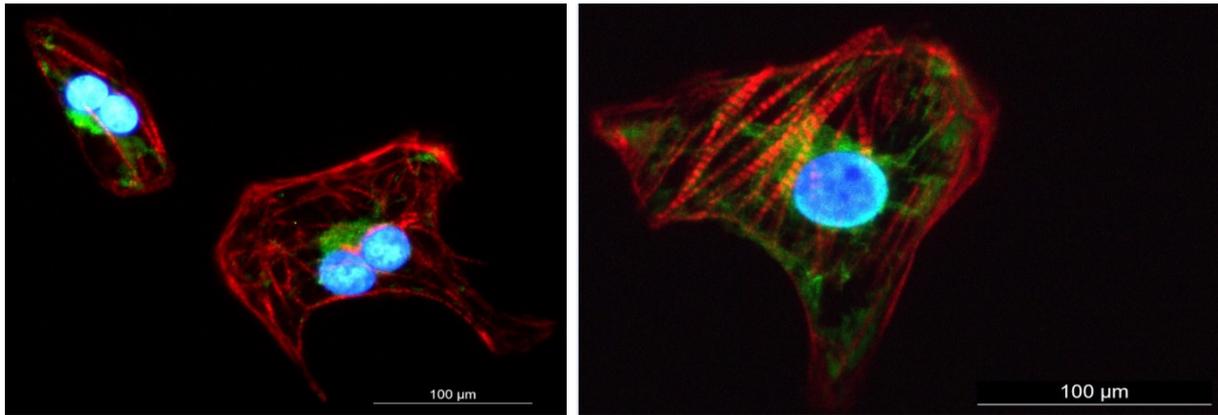


Abbildung 12:

Immunhistochemische Darstellung der hiPSC-CM an d36. Folgende AK wurden benutzt: DAPI (blau), AF647-Anti Troponin T-AK (rot), primärer gereinigter Kaninchen-Anti Connexin 40-AK mit sekundärem FITC-Ziege-Anti Kaninchen-AK (grün). Dargestellt sind Overlay Abbildungen mit allen benutzten AK. Ein Referenzbalken mit Größenangabe ist aufgeführt.

Die Verteilung der positiven Fluoreszenzsignale für Cx45 in den hiPSC-CM variierte zu der von Cx43 und Cx40. Perinukleär und peripher zeigte sich weniger Signalintensität im Vergleich zu Cx43 und Cx40. Die positiven Fluoreszenzsignale ließen sich eher als einzelne, punktförmige Signale ubiquitär intrazellulär verteilt darstellen (Abbildung 13c).

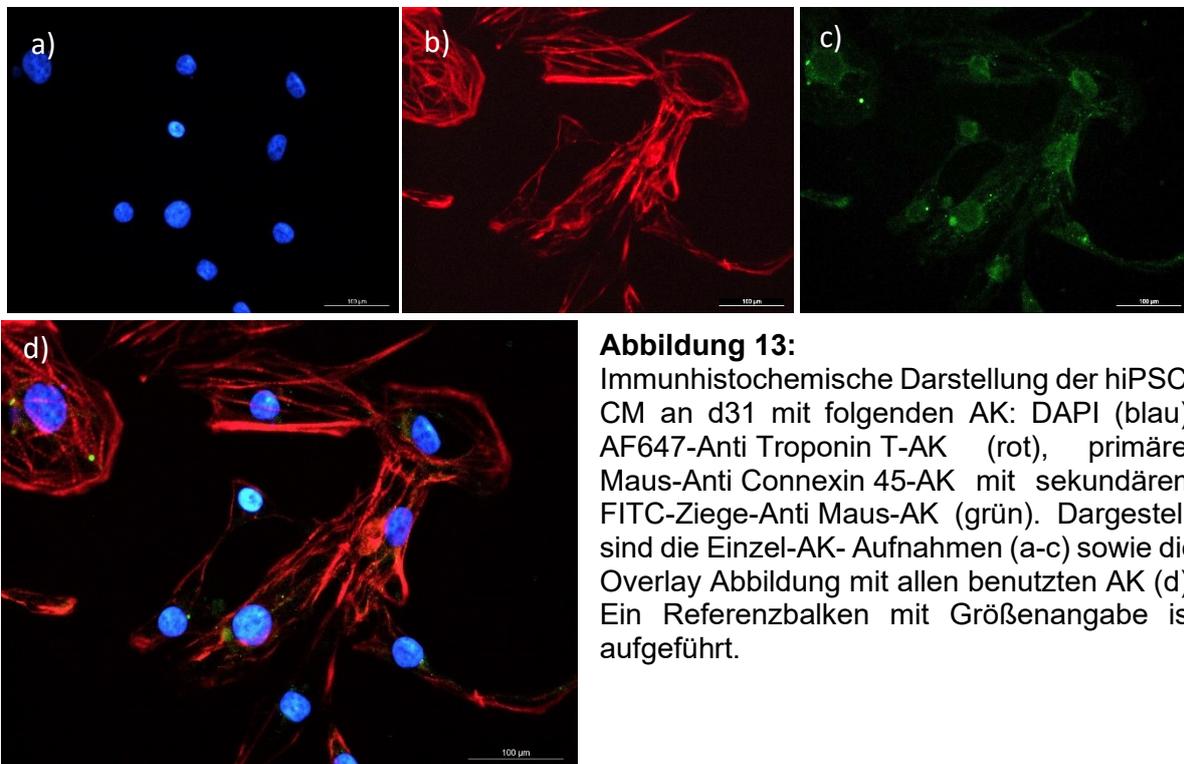


Abbildung 13:

Immunhistochemische Darstellung der hiPSC-CM an d31 mit folgenden AK: DAPI (blau), AF647-Anti Troponin T-AK (rot), primärer Maus-Anti Connexin 45-AK mit sekundärem FITC-Ziege-Anti Maus-AK (grün). Dargestellt sind die Einzel-AK-Aufnahmen (a-c) sowie die Overlay Abbildung mit allen benutzten AK (d). Ein Referenzbalken mit Größenangabe ist aufgeführt.

Zusammenfassend zeigten die qPCR-Analysen einen signifikanten Anstieg der Expression aller drei Cx-Gene. Die IHC-Darstellungen der drei untersuchten Cx konnten intrazelluläre Färbemuster mit unterschiedlichem Verteilungsmuster innerhalb der hiPSC-CM zeigen.

3.2 Subgruppenanalyse

In der folgenden Studienreihe wurde untersucht, ob in der differenzierten hiPSC-CM-Mischkultur unterschiedliche NCM nachweisbar waren und welche Zellarten dabei vertreten waren.

3.2.1 Fibroblasten-assoziierte Gene

Die IHC-Darstellung von Fibroblasten-assoziierten Strukturen wurde zunächst mit dem sekundären AK für ER-TR7 versucht. Diese Versuche blieben jedoch mit unterschiedlichsten Konzentrationen des AK erfolglos. Mit einem Anti-Vimentin-AK gelangen die Darstellungen hingegen sehr gut. In den Abbildungen erschienen die positiven Fluoreszenzsignale des Anti-Vimentin-AK am ehesten als eng beieinander liegende, einzelne Punkte in zellulären Verbänden mit DAPI-positiven Zellkernen. Im Vergleich zu den hiPSC-CM stellen sich diese Zellen eher länglich mit schmalen Ausläufern dar. Sie haben keine eindeutige Zellform und umgeben die hiPSC-CM mit ihren Ausläufern. In Abbildung 14 lässt sich erkennen, dass eine der Vimentin-positiven Zellen deutlich langgestreckt zur Darstellung kommt. In Zusammenschau mit dem Messbalken erscheint die Länge dieser Zelle am ehesten 300 µm.

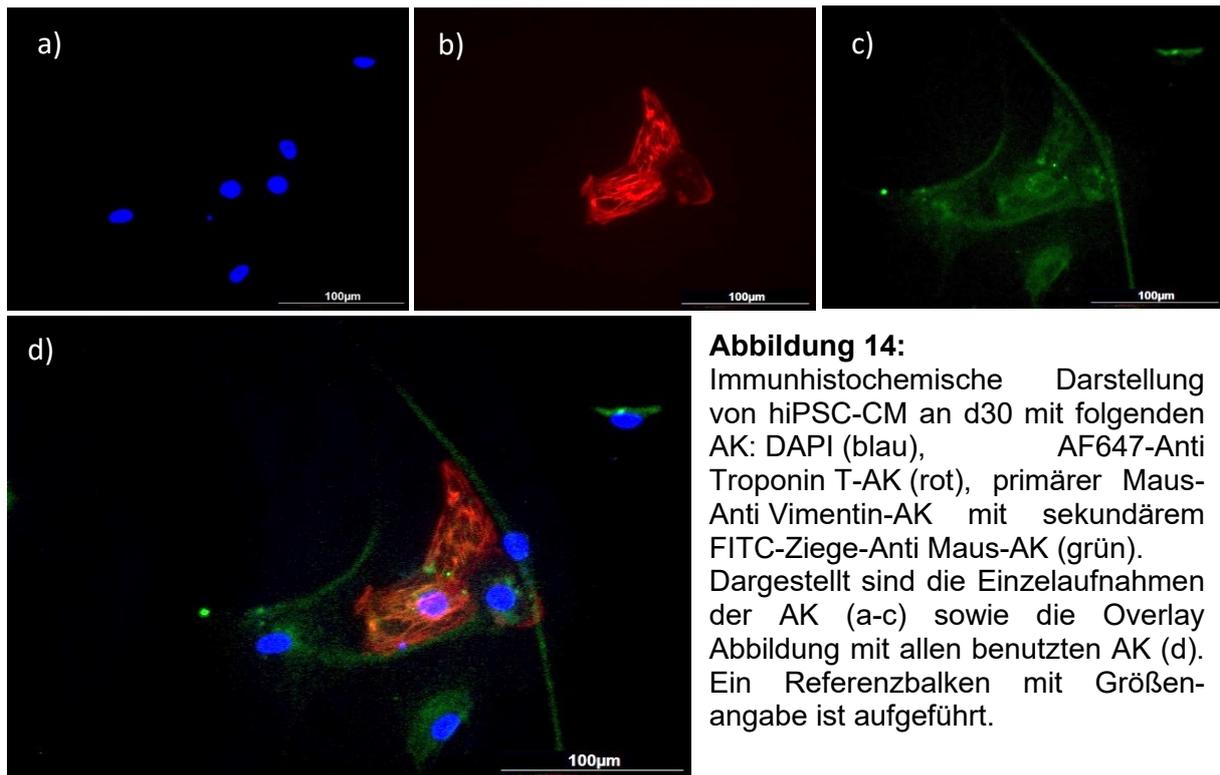


Abbildung 14: Immunhistochemische Darstellung von hiPSC-CM an d30 mit folgenden AK: DAPI (blau), AF647-Anti Troponin T-AK (rot), primärer Maus-Anti Vimentin-AK mit sekundärem FITC-Ziege-Anti Maus-AK (grün). Dargestellt sind die Einzelaufnahmen der AK (a-c) sowie die Overlay Abbildung mit allen benutzten AK (d). Ein Referenzbalken mit Größenangabe ist aufgeführt.

In Abbildung 15 wurden Troponin T- und Vimentin-positive Zellen im größeren Zellverband dargestellt.

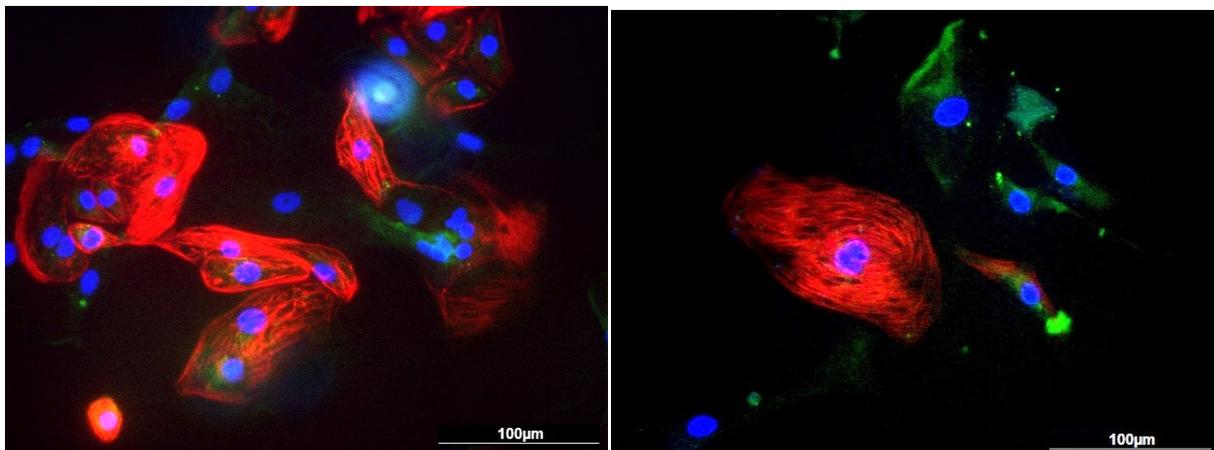


Abbildung 15:

Immunhistochemische Darstellung von hiPSC-CM an d30 mit folgenden AK: DAPI (blau), AF647-Anti Troponin T-AK (rot), primärer Maus-Anti Vimentin-AK mit sekundärem FITC-Ziege-Anti Maus-AK (grün). Dargestellt sind Overlay Abbildungen mit allen benutzten AK. Ein Referenzbalken mit Größenangabe ist aufgeführt.

Die IHC-Darstellung von Fibroblasten-assoziierten Strukturen in der hiPSC-CM-Mischkultur konnte erfolgreich mithilfe des Anti-Vimentin-AK erreicht werden. Das intrazelluläre Verteilungsmuster und somit die Zelldarstellung Vimentin-positiver Zellen unterscheidet sich von hiPSC-CM. Sie sind eher länglich, haben ein punktförmiges

Innenmuster und DAPI-positive, ovale Zellkerne. Intrazelluläre positive Troponin T-Signale weisen diese Zellen nicht auf.

3.2.2 Endothelzellen-assoziierte Gene

Zur Detektion von Endothelzell-assoziierten Genen wurden zunächst qPCR-Analysen der mRNA-Expressionslevel der Gene CD31 und CD54 im Differenzierungsprozess durchgeführt. Die Expressionslevel beider Gene zeigen einen deutlichen Anstieg mit jeweils unterschiedlichen Expressionsmaxima (Diagramm 6).

Diagramm 6:

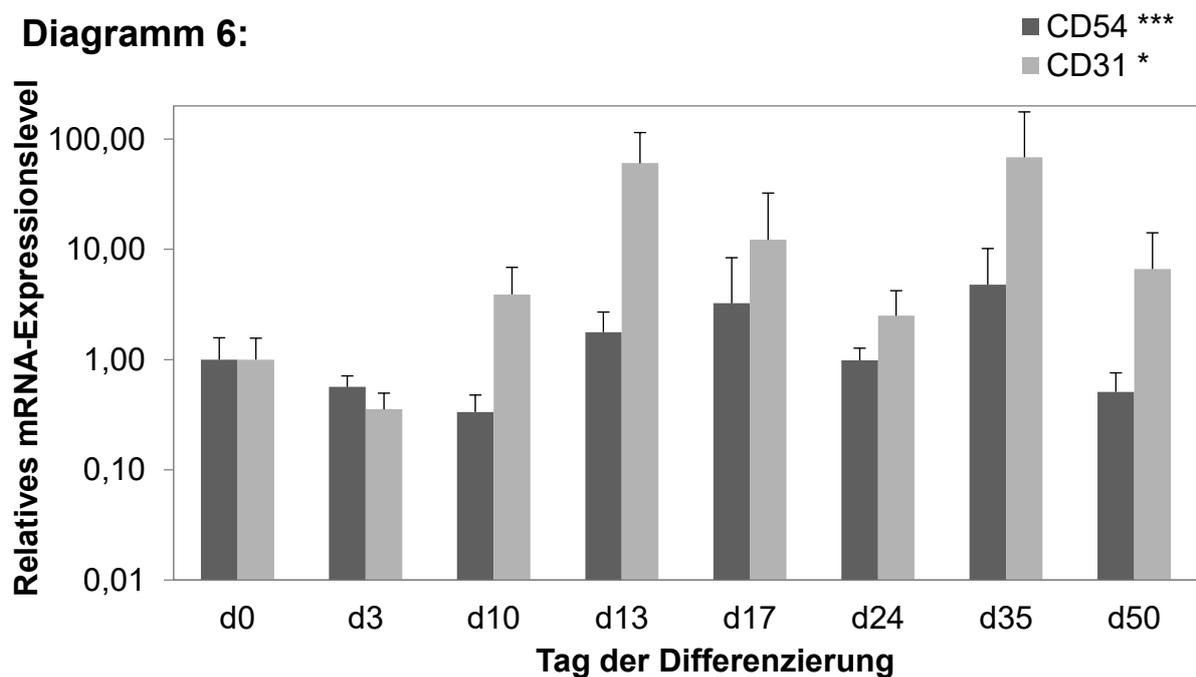


Diagramm 6:

qPCR-Analysen der mRNA-Expressionslevel verschiedener Gene, welche mit Endothelzellen assoziiert sind, im Verlauf der kardialen Differenzierung, d0- d50, n=8. Untersucht wurden CD54=ICAM1 intercellular adhesion molecule 1 und CD31=PECAM1 platelet and endothelial cell adhesion molecule 1. Die Balken stellen das relative mRNA-Expressionslevel als Mittelwert mit Standardabweichung dar. d0 \triangleq hPSC-Status. Die statistische Auswertung erfolgte mit Dunnett Multiple Comparisons Post-Test mit d0 als Vergleichswert. * $\triangleq P < 0,05$; ** $\triangleq P < 0,01$; *** $\triangleq P < 0,001$

Die IHC-Darstellung der Distribution und der Morphologie der Endothelzell-typischen Strukturen in der kardialen Mischkultur wurde mit einem Anti-CD54-AK erreicht (Abbildung 16). Die Troponin T-positiven Fluoreszenzsignale waren als Querstreifenmuster zu erkennen. Die CD54-positiven Signale konnten eindeutig von den Troponin T-positiven Signalen abgegrenzt und als Zellen mit einem DAPI-positiven Zellkern identifiziert werden. Die CD54-positiven Signale zeigten sich innerhalb dieser Zellen perinukleär verdichtet und intensiver als in der Peripherie der Zellen. Eine

Darstellung von CD31-positiven Fluoreszenzsignalen innerhalb der hiPSC-CM-Mischkultur konnte auch bei minimaler Verdünnung des AK nicht erreicht werden.

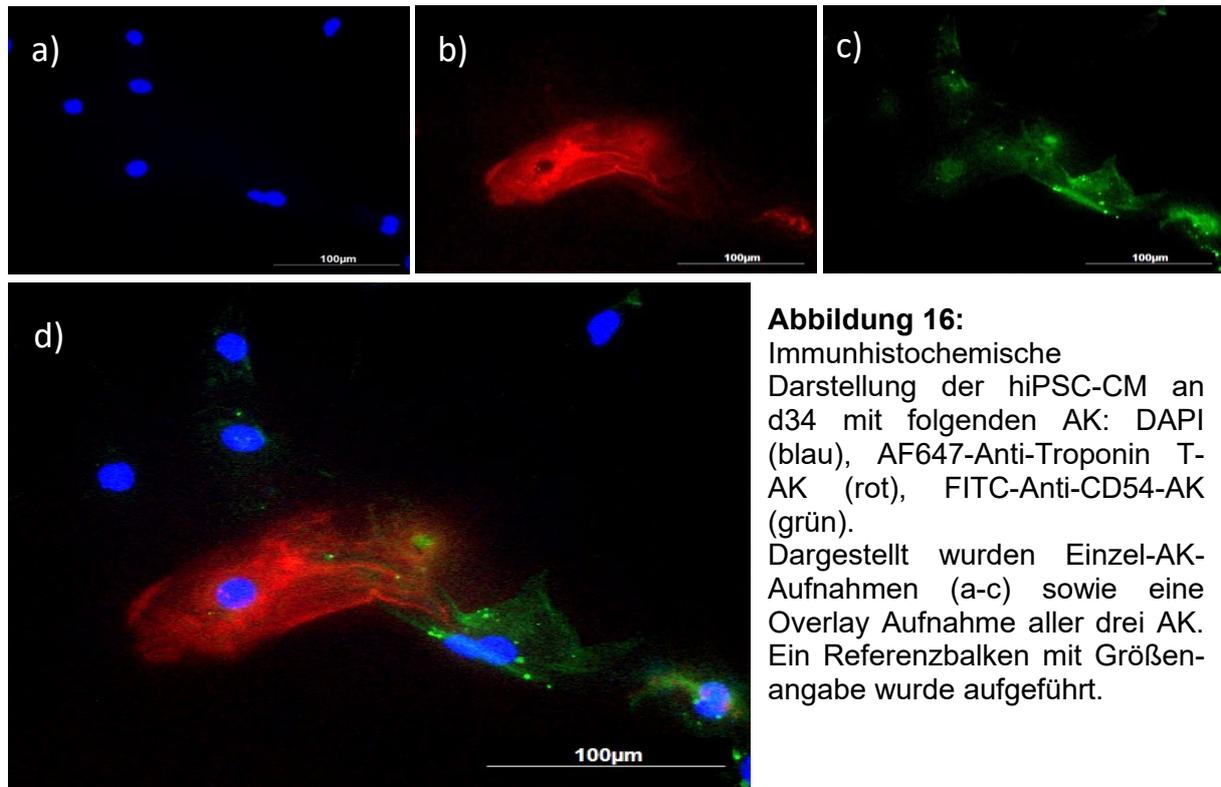


Abbildung 16:

Immunhistochemische Darstellung der hiPSC-CM an d34 mit folgenden AK: DAPI (blau), AF647-Anti-Troponin T-AK (rot), FITC-Anti-CD54-AK (grün).

Dargestellt wurden Einzel-AK-Aufnahmen (a-c) sowie eine Overlay Aufnahme aller drei AK. Ein Referenzbalken mit Größenangabe wurde aufgeführt.

In FACS-Analysen wurden durchschnittlich 1,87% der Events als alleinig CD31 positiv detektiert ($p < 0.001$, Tabelle 4).

Tabelle 4: Tabellarische Aufstellung der FACS-Ergebnisse für die Messung des Antikörpers CD31 und des Antikörpers Troponin T

n=6	CD31 negativ	CD31 positiv
Troponin T negativ	44,43%	1,87%
Troponin T positiv	42,12%	11,87%

Durchschnittlich 4,67% der Events waren nur CD54 positiv ($p < 0.001$, Tabelle 5).

Tabelle 5: Tabellarische Aufstellung der FACS-Ergebnisse für die Messung des Antikörpers CD54 und des Antikörpers Troponin T

n=6	CD54 negativ	CD54 positiv
Troponin T negativ	62,02%	4,67%
Troponin T positiv	32,32%	1,03%

Der Nachweis von Zellen, die Endothelzellmarker exprimieren, gelang mit dem Antikörper CD54 sowohl immunhistochemisch als auch in den FACS- und qPCR-Analysen. CD31 hingegen zeigte zwar höhere Expressionsmaxima in den qPCR-

Analysen als CD54, in den FACS-Analysen konnte jedoch nur ein sehr geringer Anteil detektiert werden.

3.2.3 Glatte Muskelzellen-assoziierte Gene

Zur weiteren Subgruppenanalyse wurde die hiPSC-CM-Mischkultur auf das Vorhandensein von glatten Muskelzellen untersucht. Der Fokus wurde dabei auf das Gen ACTA2 gelegt. In den qPCR-Untersuchungen stieg ab d10 das Expressionslevel dieses Gens auf über das Tausendfache des Ausgangswerts an und blieb auf einem sehr hohen Niveau (Diagramm 7).

Diagramm 7:

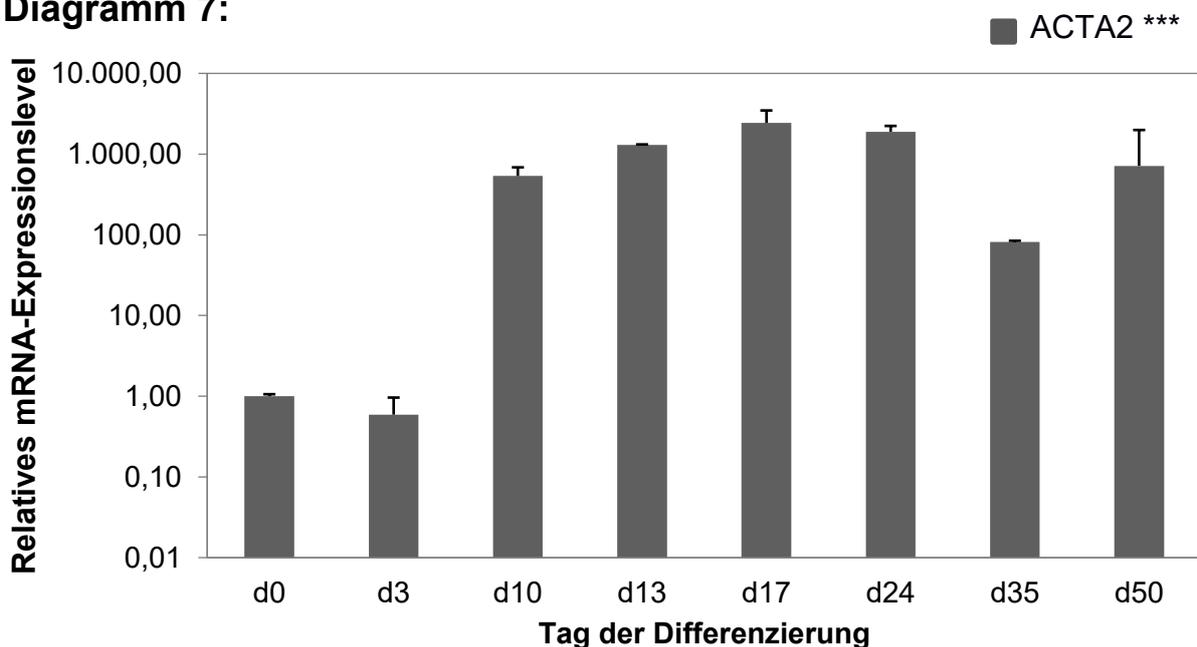


Diagramm 7:

qPCR-Analysen der mRNA-Expressionslevel des Gens ACTA2 im Verlauf der kardialen Differenzierung, d0- d50, n=8. ACTA2 = Actin alpha 2, smooth muscle (Aktin der glatten Muskulatur, welches in den Gefäßwänden vorkommt). Die Balken stellen das relative mRNA-Expressionslevel als Mittelwert mit Standardabweichung dar. d0 $\hat{=}$ hiPSC-Status. Die statistische Auswertung erfolgte mit Dunnett Multiple Comparisons Post-Test mit d0 als Vergleichswert. * $\hat{=}$ $P < 0,05$; ** $\hat{=}$ $P < 0,01$; *** $\hat{=}$ $P < 0,001$

Anschließend erfolgten IHC-Darstellungen mit einem fluoreszierenden Anti-ACTA2-AK. Dabei zeigten sich neben Zellverbänden mit der typischen Troponin T-positiven Querstreifung auch Bereiche, in denen ACTA2-positive Fluoreszenzsignale als zellartige Gruppierungen erschienen. Diese Zellverbände erschienen etwas größer als die Troponin T-positiven Zellen und wiesen eher eine lineare Streifung auf. Das DAPI-positive Zellkernsignal war in diesen Zellen deutlich erkennbar und wies ebenfalls eine Verdunkelung intranukleär auf (Abbildung 17 und 18).

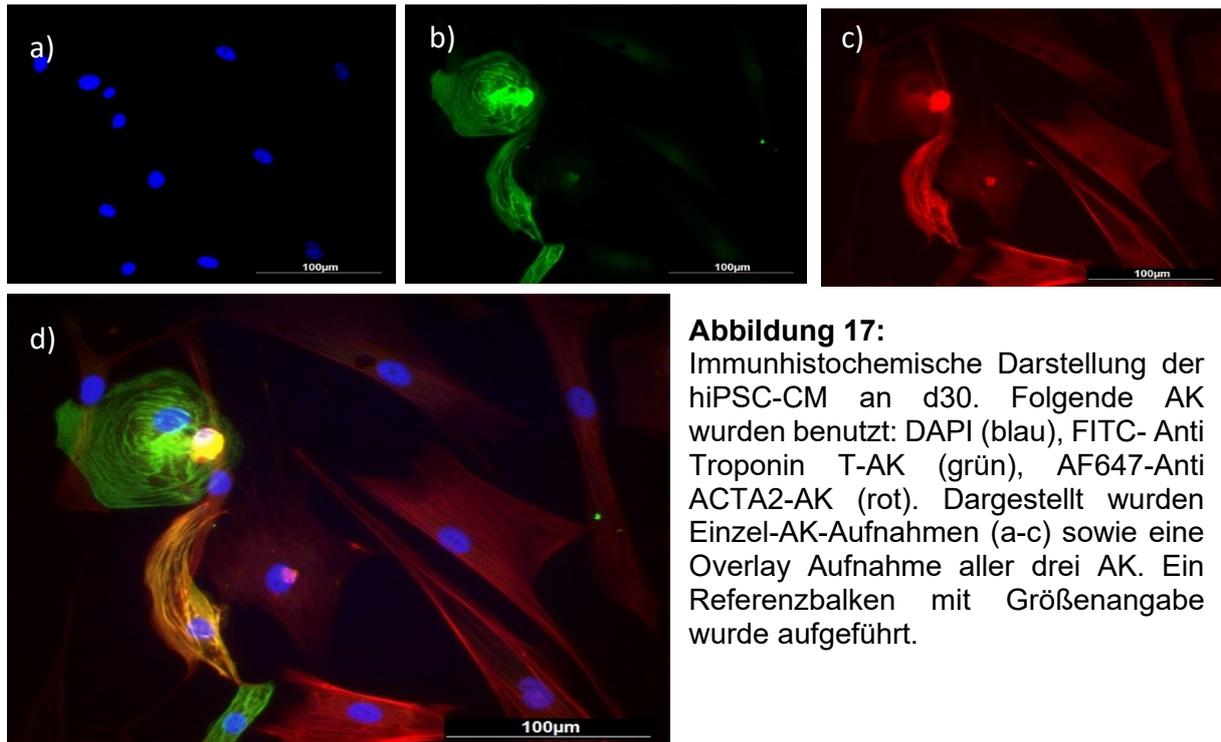


Abbildung 17:

Immunhistochemische Darstellung der hiPSC-CM an d30. Folgende AK wurden benutzt: DAPI (blau), FITC- Anti Troponin T-AK (grün), AF647-Anti ACTA2-AK (rot). Dargestellt wurden Einzel-AK-Aufnahmen (a-c) sowie eine Overlay Aufnahme aller drei AK. Ein Referenzbalken mit Größenangabe wurde aufgeführt.

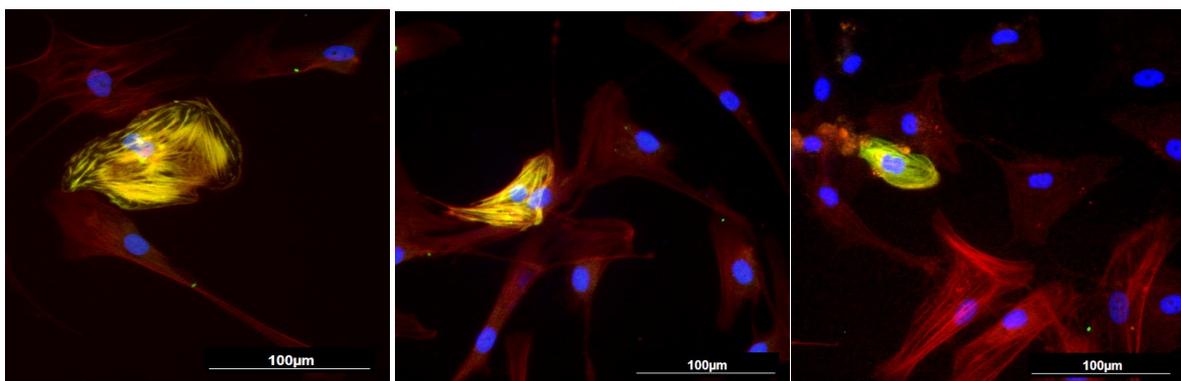


Abbildung 18:

Immunhistochemische Darstellung der hiPSC-CM an d30. Folgende AK wurden benutzt: DAPI (blau), FITC-Anti Troponin T-AK (grün), AF647-Anti ACTA2-AK (rot). Dargestellt wurden Overlay Aufnahmen mit allen drei AK. Ein Referenzbalken mit Größenangabe wurde aufgeführt.

Nach Abschluss der Differenzierung erfolgten FACS-Analysen an d35-40. In den als Einzelzellen definierten, untersuchten Zellen zeigten sich durchschnittlich 2,65% nur für ACTA2 positiv ($p < 0,001$, Tabelle 6).

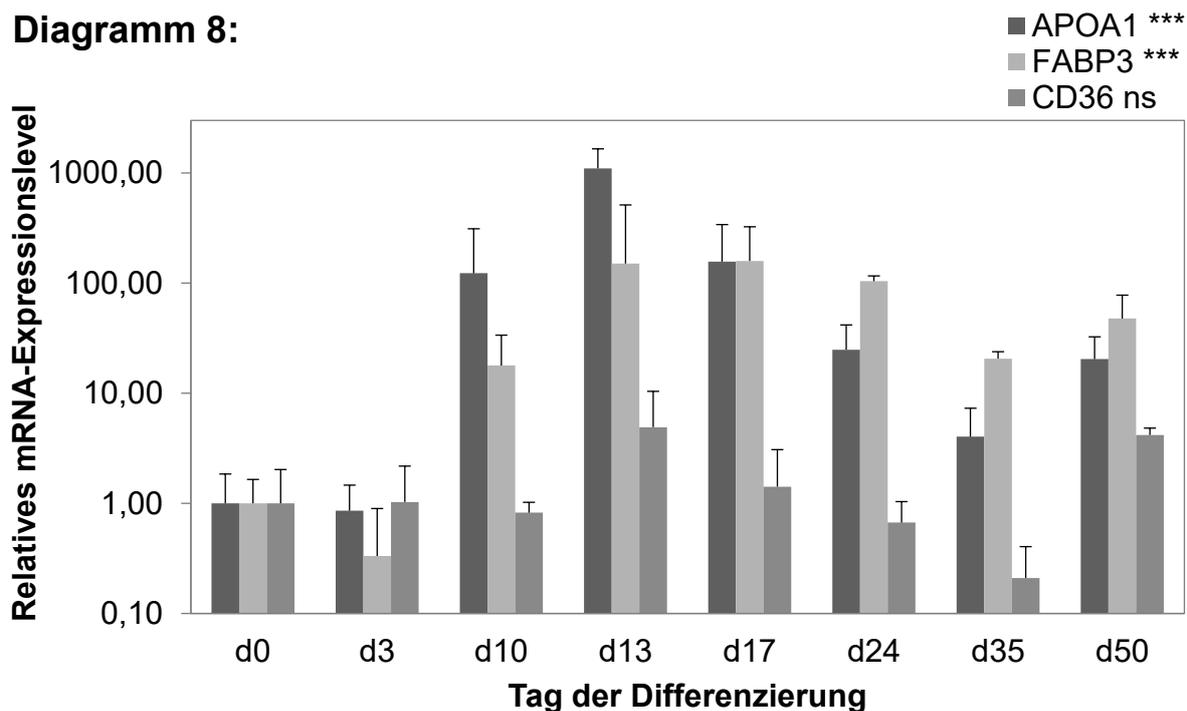
Tabelle 6: Tabellarische Aufstellung der FACS-Ergebnisse für die Messung des Antikörpers ACTA2 und des Antikörpers Troponin T

n=6	ACTA2 negativ	ACTA2 positiv
Troponin T negativ	26,75%	2,65%
Troponin T positiv	42,12%	28,93%

Der Nachweis von ACTA2-positiven Zellen gelang mithilfe von qPCR, IHC-Darstellung und FACS-Analysen.

3.2.4 Fettstoffwechsel-assoziierte Gene

Zur weiteren Subgruppenanalyse der hiPSC-CM-Mischkultur wurde das Vorkommen von Zellen untersucht, die am Fettstoffwechsel beteiligt sind. Es wurden die Gene APOA1, FABP3 und CD36 untersucht. Die Expressionslevel von APOA1 und FABP3 stiegen bis d13 stetig an und fielen danach ab, jedoch nie unter das Ausgangsniveau. Die Veränderungen der Expressionslevel bei CD36 waren nicht deutlich ausgeprägt (Diagramm 8).

Diagramm 8:**Diagramm 8:**

qPCR-Analysen der mRNA-Expressionslevel verschiedener am Fettstoffwechsel beteiligter Gene im Verlauf der kardialen Differenzierung, d0- d50, n=8. Untersucht wurden APOA1= Apolipoprotein A1, FABP3= Fatty acid binding protein 3, CD36= Cluster of differentiation 36. Die Balken stellen das relative mRNA Expressionslevel als Mittelwert mit Standardabweichung dar. d0 \triangleq hiPSC-Status. Die statistische Auswertung erfolgte mit Dunnett Multiple Comparisons Post-Test mit d0 als Vergleichswert. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns $P > 0,05$

IHC-Darstellungen von CD36 konnten sogar mit geringster Verdünnung nicht erstellt werden. Die CD36-positiven Bereiche kamen ubiquitär zur Darstellung und wurden als Artefakte gewertet.

In den FACS-Analysen wurden durchschnittlich 0,05% der als Einzelzellen definierten Zellen nur für CD36 positiv gewertet ($p = 0.1528$, Tabelle 7).

Tabelle 7: Tabellarische Aufstellung der FACS- Ergebnisse für die Messung des Antikörpers CD36 und des Antikörpers Troponin T

n=6	CD36 negativ	CD36 positiv
Troponin T negativ	26,28%	0,05%
Troponin T positiv	47,58%	0,43%

Zusammenfassend ließ sich das Vorhandensein von CD36-positiven Zellen in der hiPSC-CM-Mischkultur nicht bestätigen. Die qPCR-Ergebnisse ließen auf das Vorhandensein von APOA1- und FABP3-positiven Zellen schließen.

4 DISKUSSION

4.1 Differenzierungsprozess von hiPSC-CM

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde eine longitudinale Analyse des Differenzierungsprozesses von hiPSC zu hiPSC-CM durchgeführt. Dabei sollte die erfolgreiche Differenzierung der hiPSC-CM bestätigt und zusätzlich ihre Morphologie und zelluläre Zusammensetzung der generierten kardialen Mischkultur untersucht werden.

Pluripotente Stammzellen können sich in verschiedene Zellarten differenzieren^{87, 88, 101, 137}. Die hiPSC haben die Besonderheit humanen Ursprungs zu sein. Sie könnten somit zur gezielten Grundlagenforschung an humanem Gewebe sowie zur Erforschung von gewebespezifischen Pathologien und zielgerichteten Therapien besser geeignet sein als die meisten tierexperimentellen Ansätze¹³⁷⁻¹⁴⁰. Takahashi, Yamanaka et al. haben mit der Entwicklung der „Reprogrammierung“ von adulten, ausdifferenzierten Zellen zurück zum pluripotenten Stammzell-Zustand eine einfach reproduzierbare und nicht invasive Methodik zur Generierung von pluripotenten Zellen geschaffen⁸⁵. Mittlerweile ist die Differenzierung von vielen verschiedenen Zelltypen mithilfe von hiPSC möglich¹⁰⁷. Die hiPSC stellen aktuell eine wichtige Stütze in der Grundlagenforschung und Medikamentenentwicklung dar und werden ferner im Bereich der regenerativen Medizin und bei Krebsimmuntherapien zunehmend wichtiger¹⁴¹⁻¹⁴⁵. Sie werden zu diesen Forschungszwecken bereits in verschiedenen Krankheiten eingesetzt, unter anderem bei Diabetes, Makuladegeneration, Morbus Parkinson, koronarer Herzerkrankung und Myokardinfarkt, Hornhautepitheldysfunktion oder auch Rückenmarksverletzungen¹⁴¹. Das Potential einer stetigen Stammzell- und funktionellen Endzell-Quelle ist insbesondere im neurologischen und kardialen Bereich von Interesse, da hier einerseits das Zielgewebe in vivo nicht einfach zu isolieren und kultivieren ist, und andererseits gerade diese Zelltypen oft eine Defektheilung ohne funktionell gleichwertig ersetztes Gewebe aufzeigen, wie etwa myokardiale Narben nach durchgemachtem Herzinfarkt^{38, 144, 145}. Das bis dato erlangte Wissen über die molekularen Abläufe von Herz-Kreislauf-Erkrankungen stammt häufig aus Tiermodellen. Dieses ist aufgrund der biologischen, genetischen und elektrophysiologischen Unterschiede zwischen den Spezies nur eingeschränkt auf den Menschen projizierbar¹⁴⁶. Die hiPSC hingegen haben aufgrund des humanen Ursprunges keinerlei Einschränkungen in dieser Hinsicht und unterliegen im

Gegensatz zu embryonalen Stammzellen auch keinen ethisch-moralischen Diskussionen.

Die Protokolle der Differenzierung von hiPSC zu hiPSC-CM wurden kontinuierlich optimiert, um robustere, reproduzierbare und kostengünstigere Kulturen in größerem Maßstab generieren zu können¹¹⁴. Diese Kulturen werden zur Modellierung einer Vielzahl genetischer Herzerkrankungen und für die Entwicklung von Therapieansätzen eingesetzt. In der regenerativen Medizin kommen sie allerdings aus verschiedenen Gründen noch nicht zum Einsatz¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Im Gegensatz zu adulten CM weisen hiPSC-CM morphologisch, elektrophysiologisch und auch metabolisch eine gewisse „Unreife“ auf^{107, 108}. Die interzelluläre Kommunikation und elektrophysiologische Kopplung der Zellen können dadurch gestört sein, was letztlich häufiger Arrhythmien auslösen kann^{100, 150}. Ferner können hiPSC-CM durch fehlerhafte Mitosen oder durch in vitro Mutationen zur Teratombildung neigen^{137, 142}. Hierbei handelt es sich um Tumoren, die sich aus pluripotenten Stammzellen aufgrund von fehlerhafter Zellproliferation entwickeln¹⁵¹. Mithilfe von verschiedenen Stimulanzen, wie dem Einsatz von Hormonen, elektrischer Stimulation, spezifischen Nährmedien oder Co-Kulturen mit anderen Zellarten, wird versucht diese Probleme zu beheben und den hiPSC-CM-Reifungsprozess weiterzuentwickeln¹⁵²⁻¹⁵⁶.

Aufgrund der oben beschriebenen Problematik war es zunächst initiales Ziel im Rahmen dieser Arbeit, die Pluripotenz der hiPSC und den Erfolg der Differenzierung zu hiPSC-CM zu beschreiben. Zur Verifizierung der Pluripotenz wurde die Expression von Kardinalgenen der Stammzell-Befähigung SOX2, NANOG und POU5F1 mithilfe von qPCR untersucht. Diese sollte idealerweise nach d0 stetig abnehmen, was in unseren Experimenten auch gezeigt werden konnte. Nach d17 war keine Genexpression mehr nachweisbar (vgl. Diagramm 1). Unsere Ergebnisse deckten sich mit denen anderer Arbeitsgruppen und wurden als Bestätigung der erfolgreichen Umwandlung der hiPSC-CM durch Abnahme der Pluripotenz-Befähigung gedeutet^{114, 157}.

Im Rahmen des beschriebenen Differenzierungsprozesses durchlaufen die hiPSC verschiedene Reife- und Expressionsstadien. Zunächst findet in den ersten Differenzierungstagen die mesenchymale Induktion statt. Im Anschluss differenzieren sich die mesenchymalen Zellen zu kardialen Zellen im Rahmen der Kardiomyogenese. Zuletzt wird eine Selektionsbehandlung durchgeführt, in dessen Rahmen die generierte Mischkultur zugunsten eines Überlebensvorteils von CM mittels Änderung

des Nährmediums beeinflusst wird¹¹⁴. Während die ersten beiden Abschnitte embryologischen Entwicklungsprozessen nachempfunden sind und bereits in ESC-CM beschrieben wurden, beruht die Behandlung mit Laktat-betontem Selektionsmedium aus Erkenntnissen der unterschiedlichen Metabolismen von CM und NCM^{158, 159}. Dieser Einschnitt im Metabolismus sollte sich dann auch in den weiteren Ergebnissen zur Beschreibung der kardialen Differenzierung aufzeigen. Die Veränderungen der Expressionslevel der Kardinalgene für kardiale Differenzierung wie TNNT2, TTN und CTF1 zeigten eine rasante Zunahme im Expressionsverhalten. Ab d10, dem letzten Tag der Wnt-Inhibitionswoche, stiegen die Expressionslevel aller drei Gene rasant an und blieben anschließend auf einem sehr hohen Niveau (vgl. Diagramm 2). Die zusätzlichen ELISA-Untersuchungen zeigten einen korrelierenden, steilen, initialen Anstieg des Proteins TNNT2 und ebenfalls eine Plateauphase im Verlauf (vgl. Diagramm 3). Unsere Ergebnisse deckten sich mit denen anderer Arbeitsgruppen^{97, 137, 160, 161}. Neben der besagten metabolischen Komponente muss auch ein Ende der Differenzierung und eine hierdurch bedingte Abnahme der Proteinbiosynthese diskutiert werden.

Zusammenfassend konnten wir somit im ersten Teilabschnitt eine stetige Abnahme bis hin zur nicht mehr nachweisbaren Expression von Stammzellmarker-Genen sowie eine stetige Zunahme von kardialen Genen mit Plateauphase der Expression im Verlauf aufzeigen.

Um die Morphologie der hiPSC-CM mit intrazellulären und transmembranösen Proteinen weiter zu beschreiben, wurden IHC-Studien durchgeführt. Hier wiesen die differenzierten hiPSC-CM eine Kardiomyozyten-typische Querstreifung auf^{38, 162}. Ferner konnten mittels IHC Kardiomyozyten-typische Strukturproteine und Cx visuell aufgezeigt werden. Diese Erkenntnisse unterstrichen zusätzlich die erfolgreiche Differenzierung der hiPSC-CM.

Im Rahmen der IHC-Studien fielen ferner einige weitere interessante Aspekte auf. Der Phänotyp der hiPSC-CM richtete sich nach dem Ausmaß des Zellverbands; im Verbund sahen die Zellen anders aus als im vereinzelt Zustand. Der Zellkern erschien in Einzelzellen rundlich und im Zellverband länglich, am ehesten vergleichbar mit adulten Säugetierzellen³⁸. Die hiPSC-CM waren heteromorph und unterschiedlich groß. Die Formveränderung könnte einerseits durch die Verankerung der Einzelzellen im Matrigel bedingt sein. Andererseits könnte es auch an der „Unreife“ der hiPSC-CM liegen, da sich hiPSC-CM kleiner und polygonaler als adulte CM präsentieren (vgl. ^{107,}

¹⁶³). Ferner wirkte die Anordnung der Querstreifung in den hiPSC-CM durch viele Verzweigungen der Troponin T-positiven Banden „ungeordnet“ und „chaotisch“. Adulte CM weisen eine längliche Form und eine reguläre, lineare Anordnung des Querstreifenmusters auf (Abbildung 19)¹⁶⁴.

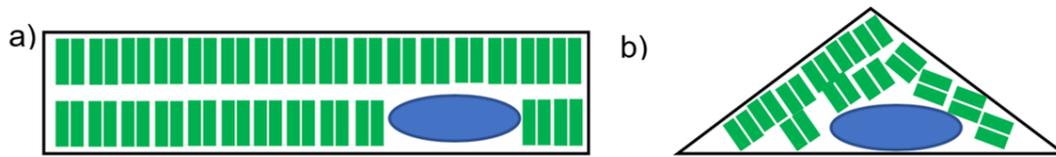


Abbildung 19:

Schematischer Vergleich eines isolierten, humanen, adulten Kardiomyozyten (a) und eines hiPSC-Kardiomyozyten (b).

Schwarze Linie \triangleq Zellmembran, grüner Block \triangleq Troponin T-positiver Querstreifung, blaues Oval \triangleq Zellkern

Die unterschiedlichen Größenverhältnisse der hiPSC-CM (von 50 μm bis über 400 μm Durchmesser) deuteten ebenfalls auf die „Unreife“ der Zellen hin (vgl. ^{107, 163}). Sehr große hiPSC-CM wiesen teilweise zwei Zellkerne und Verdichtungen der Querstreifung an gegenüberliegenden Polen auf (vgl. Abbildung 7). Dieser Phänotyp könnte auf eine sich in der Mitose befindliche Zelle mit ausgebildeten Spindelapparaten an beiden Zell-Polen hindeuten. Während adulte CM aufgrund ihrer geringen Regenerationsrate wenig Mitoseaktivität aufzeigen, sind hiPSC-CM mitotisch deutlich aktiver³⁸. Auch andere Arbeitsgruppen konnten unter anderem diese Eigenschaften und Ähnlichkeiten zu fetalen CM in hiPSC-CM aufzeigen^{107, 108, 164}.

Die anfänglichen hiPSC-CM-Differenzierungsprotokolle brachten vor allem Populationen mit einem Hauptanteil ventrikulärer Zellen von bis zu 90% hervor, die atrialen und nodalen Zellen waren dabei deutlich unterrepräsentiert^{165, 166}. Dies entspricht dem in vivo detektierten Verteilungsmuster der CM im Myokard^{28, 29, 40, 167}. Im Laufe der Jahre wurden die Protokolle modifiziert, um homogenere hiPSC-CM-Populationen aus bestimmten, kardialen Subtypen zu erhalten. Hierbei wurden Anteile von 90% atrialer oder 50% nodaler Zellen erreicht^{104, 168}. Diese Homogenisierung von hiPSC-CM-generierten kardiomyozytären Subgruppen eignet sich zur gezielten Untersuchung von kardialen Krankheitsmechanismen oder etwa für den Einsatz in der regenerativen Medizin^{28, 34, 104, 168}. Der Anteil an NCM in vitro ist in diesen Kulturen jedoch deutlich geringer als in vivo^{34, 35}, wo das Zusammenspiel von EZM, NCM- und den verschiedenen kardiomyozytären Subgruppen essentiell ist für die Funktionalität des Herzens ist. Mit Zellkulturen können diese Interaktionen punktuell betrachtet werden^{27, 35, 169, 170}. Zu diesem Zwecke wird unter anderem versucht, die kardialen

Kulturen in dreidimensionalen Strukturen zu kultivieren^{171, 172}. Mithilfe der Zellkultur-Ansätze, welche unter anderem auch Fibroblasten und Endothelzellen erfassen, wird der Reifungsprozess der hiPSC-CM und die Ausbildung einer differenzierteren EZM in vitro unterstützt^{171, 172}. Für die Erforschung von Medikamentenwirkungen hingegen ist eine Betrachtung ihrer Wirkung an homogenen, aber auch an Mischkulturen wichtig, um ein ganzheitliches Bild der Wirkungsweise und auch der Nebenwirkungen zu erhalten¹⁷³⁻¹⁷⁵. Um diesen Überlegungen Rechnung zu tragen, haben wir den hiPSC-CM-Anteil aus der generierten differenzierten Mischkultur mithilfe von FASC-Analysen umfassend untersucht. Dabei wurde ein Anteil von 70-80% hiPSC-CM in der Mischkultur ermittelt. Unsere Ergebnisse deckten sich mit vorher beschriebenen Ergebnissen aus anderen Studien^{165, 166}. Eine genauere Einordnung der unterschiedlichen CM-Subgruppen wurde jedoch nicht vorgenommen, da dies nicht Zielsetzung dieser Arbeit war.

Um die differenzierte hiPSC-CM-Kultur weiter zu beschreiben, erfolgten Studienreihen zu verschiedenen Kardiomyozyten-assoziierten Ionenkanälen und Adhäsionsmolekülen. Zu den wichtigsten Ionenkanälen in diesem Bereich zählen die durch Hyperpolarisation aktivierten, zyklischen, Nukleotid-gesteuerten Kanäle (HCN). HCN werden im Herzen, sowie im zentralen und peripheren Nervensystem aus vier verschiedenen Isoformen (HCN1-4) exprimiert^{176, 177}. Beim Menschen ist HCN4 die am häufigsten exprimierte, kardiale Isoform. Im Herzen sind die spannungsabhängigen Kanäle HCN2 und HCN4 für die Schrittmacheraktivität der CM verantwortlich¹⁷⁶. Außerhalb des Herzens sind HCN-Kanäle unter anderem für die myogene Aktivität der ableitenden Harnwege relevant¹⁷⁸. Eine veränderte Funktion der kardialen HCN-Kanäle ist mit einer Funktionsstörung des Sinusknotens und anderen Arrhythmien wie Vorhofflimmern, ventrikulärer Tachykardie und atrioventrikulärem Block assoziiert¹⁷⁷, weshalb sie Gegenstand aktueller Medikamentenforschung sind¹⁷⁹. Derzeit ist Ivabradin das einzige für die Behandlung von HI zugelassene Medikament, welches seine Wirkung über HCN-Kanäle entfaltet^{3, 176}. Durch die selektive Blockade von HCN-Kanälen und der konsekutiven Bradykardie kommt es langfristig zur Verbesserung der Herzleistung¹⁸⁰.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte auf mRNA-Ebene die Expression der Kardiomyozyten-typischen Ionenkanäle HCN2, HCN4, SCN5A und SLC8A1 bestätigt werden (vgl. Diagramm 4). Auch andere Arbeitsgruppen konnten das Vorhandensein dieser Ionenkanäle in der hiPSC-CM-Mischkultur nachweisen^{109, 114, 181}. HiPSC-CM

könnten daher bei der Erforschung von HCN-assoziierten Pathologien sowie bei der Entwicklung weiterer antiarrhythmischer Medikamente und weiterführenden Studien zu Ivabradin beitragen.

Neben HCN wurden im Rahmen dieser Arbeit die GJ-Antigene GJA1, GJA5 und GJA7 untersucht. Diese Gene kodieren für die essentiellen Strukturproteine Cx43, Cx40 und Cx45, die am häufigsten im Myokard vorkommenden GJ-Proteine^{58, 61, 182}. Sie ermöglichen die interzelluläre Kommunikation und spielen in verschiedenen Bereichen der Zellphysiologie eine wichtige Rolle^{29, 46}. Ihre Verteilung im Myokard unterstützt die Funktionalität der jeweiligen Areale^{60, 183}. Cx40 kommt in schnell leitendem Gewebe des His-Purkinje-Systems vor, während Cx45 im AV-Knoten und im His-Bündel vermehrt exprimiert wird⁶⁰. Cx43 kommt im Vorhof- und Ventrikelmyokard ubiquitär vor⁵⁷. Die Erkenntnisse zu den GJ stammen gehäuft aus tierexperimentellen Ansätzen^{64, 65, 69, 184-187}. Murine iPSC-CM (miPSC-CM) exprimieren deutlich weniger Cx43 als murine, adulte CM, was in einer verringerten interzellulären Kopplung und elektrischen Signalausbreitung innerhalb der miPSC-CM resultiert. Die Leitungsgeschwindigkeit in miPSC-CM ist also deutlich langsamer als in adulten CM, weshalb sie in verschiedenen Bereichen, wie zum Beispiel in der regenerativen Forschung, noch nicht eingesetzt werden können^{187, 188}. Neue Erkenntnisse zeigen, dass die Expression von Cx43 eine entscheidende Rolle bei der Bildung funktioneller GJ und bei der intrazellulären Organisation von Mikrotubuli spielt. Das korreliert mit einer ausgereifteren Funktionalität der iPSC-CM in Form einer schnelleren Leitungsgeschwindigkeit und verstärkter elektromechanischer Aktivität¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Diese Erkenntnisse wurden auch bei Experimenten mit hiPSC-CM gewonnen. Eine vermehrte Expression von Cx43 und verbesserte Ausrichtung der Mikrotubuli wird bei hiPSC-CM durch Kultivierung in dreidimensionalen Mikrogeweben erreicht¹⁹⁰. Bei zusätzlicher Co-Kultur mit CF zeigen sich die hiPSC-CM in einem deutlich reiferen Zustand als in konventionellen, zweidimensionalen Kulturen^{152, 190}.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Vorhandensein von Kardiomyozyten-typischen Cx mithilfe von Genexpressionsanalysen und von IHC-Darstellungen bestätigt. HiPSC-CM exprimieren GJA1, GJA5 und GJA7 in signifikanter Menge (vgl. Diagramm 5). Unsere Ergebnisse deckten sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen^{152, 183}. Die Verteilung von Cx43, Cx40 und Cx45 zeigte sich perinukleär und in der Peripherie der hiPSC-CM (vgl. Abbildungen 9-13). Die Distribution in der Peripherie der Zellen könnte auf die transmembranöse Lokalisation der Cx hindeuten, welche durch Überlagerung

von dreidimensionaler Struktur in einer zweidimensionalen Abbildung auf diese Art und Weise zur Darstellung kommen könnte. Die perinukleäre Verteilung könnte auf den Ort der Proteinbiosynthese in den Zellen, oder auf eine nicht kanonische Lokalisation der Cx hindeuten. Die Faltung und posttranslationale Modifikation der Cx findet im endoplasmatischen Retikulum statt¹⁸⁵. Cx können aber auch außerhalb der Zellmembran vorkommen und sich an Zellstrukturen, wie den Mitochondrien oder dem Zellkern befinden. In diesen Bereichen sind sie hauptsächlich an der Regulierung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung beteiligt^{183, 191, 192}.

Die Verteilung der Cx43 in der Peripherie der hiPSC-CM zeigte sich in linearer Anordnung und orientierte sich häufig an der Lokalisation der Troponin T-Querstreifung, wobei es durch Überlagerungen der Signale zu einer orangenen Farbdarstellung kam (rotes Signal für Troponin T und grünes Signal für Cx43, vgl. Abbildung 9 und 10). In den zuvor beschriebenen Studien wurde gezeigt, dass Cx43 vorrangig vom Ventrikelmyokard in linearer Anordnung exprimiert wird, was sich mit unseren Darstellungen deckt^{57, 69, 183, 193}. Cx40 zeigte in den IHC-Darstellungen fast „spinnennetzartige“ Verzweigungen intrazellulär und war deutlich intensiver um den Zellkern angeordnet als Cx43 (vgl. Abbildung 11 und 12). Andere Studien beschrieben die Verteilung von Cx40 im His-Purkinje-System, welches sich netzartig im Myokard verteilt^{57, 63, 71}. Unsere Darstellungen ähneln diesen Beschreibungen. Die Verteilung von Cx45 war eher punktuell ohne ein reproduzierbares Muster, dabei zeigte sich auch keine bevorzugte intrazelluläre Lokalisation (vgl. Abbildung 13). Aus anderen Studien ist bekannt, dass Cx45 Kanäle mit niedriger Leitungsgeschwindigkeit, die sich im AV-Knoten kumulieren, bildet^{46, 61, 70}. In unseren Darstellungen zeigten sich keine eindeutigen Ansammlungen von Cx45-positiven Bereichen. Ein Grund dafür könnte sein, dass in unserer hiPSC-CM-Mischkultur die Verteilung der ventrikulären, atrialen und Erregungsleitungs-Myozyten noch nicht eindeutig beschrieben ist. Eine gemeinsame Darstellung aller drei Cx-Arten in einem Bild war methodenlimitierend nicht möglich. Weitere Rückschlüsse zur genaueren Lokalisation der Cx konnten deshalb nicht getroffen werden. Zusätzlich muss auch beachtet werden, dass durch die Vereinzelung der hiPSC-CM es bereits zu einer methodenbedingten Beschädigung der zellkontakt-dienlichen Strukturen wie etwa den Cx kommen könnte. Das Vorhandensein von Cx43, Cx40 und Cx45 konnte jedoch eindeutig nachgewiesen werden, wodurch hiPSC-CM auch in der Connexin-Forschung eine wichtige Rolle spielen könnten.

4.2 Subgruppenanalyse der kardialen Mischkultur

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die NCM-Arten in der kardialen Mischkultur mithilfe von Genexpressionsanalysen, IHC-Darstellungen und FACS-Untersuchungen weitergehend beschrieben. In verschiedenen Studien an adultem Herzgewebe wurden Gene beschrieben, welche als essentielle Faktoren bei der Genese von Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen oder Fettzellen identifiziert wurden. Als Transferleistung wurde im zweiten Teilabschnitt dieser Arbeit das Expressionsverhalten dieser Gene in der generierten hiPSC-CM-Zellkultur mittels verschiedener Methoden überprüft, wobei teilweise widersprüchliche Ergebnisse erzielt wurden, welche weiter diskutiert werden müssen^{28, 36, 37}.

4.2.1 Fibroblasten-assoziierte Gene

80 % der Zellen unserer kardialen Mischkultur stellten sich als hiPSC-CM dar. Zur Untersuchung der restlichen 20 % der Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene, bereits in tierexperimentellen und in-vivo-experimentellen Ansätzen beschriebenen NCM-Arten untersucht. Zu den wichtigsten NCM im Myokard zählen Fibroblasten, im Körper ubiquitär vorkommende Bindegewebszellen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Synthese der EZM. Kardiale Fibroblasten (CF) sind essentielle Zellen im kardialen Verband. Sie tragen zur Herzentwicklung, Herzstruktur, Zell-signalisierung und zur elektromechanischen Funktion bei gesundem und krankem Myokard bei⁷⁴⁻⁷⁶. Lange wurde angenommen, dass sie die zahlenmäßig am häufigsten vorkommenden NCM sind²⁷. Pinto et al. widerlegten diese Annahme durch ihre Beschreibung eines Endothelzell-Anteils der NCM von ungefähr 60%; CF waren hierbei anteilig unter 20% vertreten³⁴. Dennoch nehmen CF eine entscheidende Rolle im Myokard und in kardialen Kulturen ein¹⁹⁴. In dreidimensionalen Mikrogeweben verstärkt die Zugabe von CF zu hiPSC-CM-Kulturen die strukturelle, elektrische, mechanische und metabolische Reifung der hiPSC-CM^{152, 195}. Sie erhalten und gestalten die EZM und tragen so zur Integrität und Konnektivität der Zellen bei¹⁹⁶. Obwohl sie selbst nicht erregbar sind, modulieren CF die aktiven und passiven elektrischen Eigenschaften von CM¹⁹⁷⁻¹⁹⁹ und spielen ferner eine Rolle in der Arrhythmogenese¹⁵².

Im Myokard gibt es neben CF noch eine weitere Fibroblasten-Art: die Myofibroblasten. CF haben die Fähigkeit, sich nach Schädigung des Myokards in Myofibroblasten umzuwandeln²⁰⁰. Ihre Produkte tragen zur Myokardfibrose bei und sind somit an

Umbauprozessen des Myokards bei HI beteiligt^{200, 201}, weshalb Myofibroblasten nicht als Bestandteil des gesunden Herzgewebes angesehen werden²⁰². Die Expression des Alpha-Glattmuskel-Aktins (englisch: alpha-smooth-muscle-actin, SMA) ist ein wesentliches Erkennungsmerkmal, welches Myofibroblasten von CF und anderen Zellen des Myokards unterscheidet²⁰³.

In diversen Arbeiten an Säugetiermodellen wurden CF mit Hilfe eines Anti-Vimentin-AK nachgewiesen^{27, 65, 73, 204}. Im Rahmen dieser Arbeit ließen sich Anti-Vimentin-AK-positive Zellen, welche die hiPSC-CM umgeben und diese teilweise über eine Länge von 300 µm verbinden, nachweisen (vgl.^{27, 205}). Sie hatten keine eindeutige Zellform, sondern verteilten sich eher in den Zwischenräumen zwischen den hiPSC-CM und umgaben diese (vgl. Abbildung 14 und 15). Das Vorhandensein von Anti-Vimentin-AK-positiven Zellen kann somit analog zu den zuvor beschriebenen Arbeiten als Nachweis von CF gedeutet werden. Die Funktion dieser Zellen und ihr Beitrag zum Reifegrad von hiPSC-CM kann anhand der generierten Daten in unserer hiPSC-CM-Mischkultur jedoch nicht abschließend beurteilt werden und sollte Gegenstand weiterer Studienreihen sein.

4.2.2 Endothelzell-assoziierte Gene

Im Myokard gehören Endothelzellen neben CM und CF zu einer der drei Hauptzellarten und sind zahlenmäßig am häufigsten repräsentiert (rund 60% der NCM)³⁴. Endothelzellen sind spezialisierte Zellen im Körper, welche die Innenseite von Lymph- und Blutgefäßen auskleiden²⁰⁶. Im Herzen spielen sie eine entscheidende Rolle bei der normalen Herzfunktion, sind aber auch in Umbauprozessen bei der Entwicklung einer HI involviert^{207, 208}. Durch Sekretion von verschiedenen Second Messengern wie Stickstoffmonoxid, aber auch spezifischer endogener Proteine, wie Neuregulin-1, steuern sie diese Prozesse^{207, 209, 210}. In Co-Kulturen, welche neben hiPSC-CM und CF auch Endothelzellen enthalten und in dreidimensionalen Mikrogeweben differenziert werden, weisen die darin enthaltenen hiPSC-CM deutliche Reifungsmerkmale in Sarkomerlänge und -organisation, Kontraktionsabfolge, Elektrophysiologie und Strukturproteinen auf¹⁵². Mittlerweile gibt es Protokolle zur Co-Differenzierung von CM und Endothelzellen, die zur Generierung einer „realitätsnahen“ kardialen Kultur beitragen^{195, 211}. Zur Detektion von Endothelzellen können verschiedene Marker benutzt werden. CD31 (PECAM1) gilt als Kardinalgen zum Nachweis von Endothelzellen, wird aber auch als Markergen von Leukozyten

verwendet^{207, 212-214}. CD54 (ICAM1) wird ebenfalls hauptsächlich von Endothelzellen exprimiert. Hämatopoetische Zellen und Leukozyten weisen allerdings auch CD54-Expression auf^{214, 215}.

Das Vorhandensein von CD31 und CD54 wurde umfassend in unserer generierten hiPSC-CM-Kultur untersucht. Beide Gene ließen sich mit Hilfe von qPCR nachweisen und zeigten einen deutlichen Expressionsanstieg ab d10, dem Ende der Wnt-Inhibitionswoche (vgl. Diagramm 6). Mithilfe von FACS-Analysen konnte ebenfalls das Vorhandensein der Proteinprodukte beider Gene aufgezeigt werden. Die Verteilung der CD31-, CD54- und Troponin T-positiven Events an d33 wurde mit dem Verteilungsmuster an d0 (hiPSC-Status) verglichen. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg aller Genprodukte. Ausschließlich CD31-positive Events wurden in 1,87% der Gesamtmessungen erfasst, während für nur CD54-positive Events der Wert bei 4,67% lag (vgl. Tabelle 4 und 5). Diese Anteile zeigten sich jedoch deutlich niedriger als Vergleichsstudien anderer Arbeitsgruppen, in der bis zu 60% Endothelzellen detektiert wurden. In diesen Studien wurden jedoch humane und murine Myokardbiopsien untersucht³⁴. In einer Studie von Sattler et al. mit hiPSC-CM exprimierten unter 2% der hiPSC-CM CD31 und 25,5% CD54, wobei hier die gleichzeitige Expression mit Troponin T beschrieben wurde²¹⁶. Die dual positiven Event-Gates Troponin T/ CD31 oder Troponin T/ CD54 ergaben im Rahmen dieser Arbeit Anteile von 11,87% (CD31/Troponin T) beziehungsweise 1,03% (CD54/Troponin T) der hiPSC-CM (vgl. Tabelle 4 und 5). In den IHC-Darstellungen konnte CD54 erfolgreich visualisiert werden. Die CD54-positiven Signale umschrieben hierbei eigenständige, Troponin-negative Zellen und ließen sich somit klar von hiPSC-CM abgrenzen (vgl. Abbildung 16). CD31 ließ sich immunhistochemisch nicht nachweisen. Ursächlich hierfür könnten die Größenunterschiede beider Oberflächenmembran-Proteine sein^{214, 217}. Ob es sich hierbei um vollfunktionale und ausgereifte Endothelzellen handelte, war methodenbedingt nicht erfassbar und wurde aufgrund der hypothesengenerierenden Natur dieser Studienreihe nicht weiter untersucht.

4.2.3 Glatte Muskelzellen-assoziierte Gene

Im Myokard kommen neben Fibroblasten und Endothelzellen unter anderem auch glatte Muskelzellen vor^{28, 37}. Ob in der differenzierten hiPSC-CM-Zellkultur auch Expression von glatten Muskelzellen-assoziierten Genen stattfindet, sollte mithilfe von

qPCR- und IHC-Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden.

Die aktuelle Studienlage zeigt keine Gene, welche als Kardinalgene eine alleinige Expression in glatten Muskelzellen erfahren. Es erfolgte daher eine Literaturrecherche über Arbeiten, welche glatte Muskelzellen beschreiben, in dessen Rahmen gehäuft SMA beschrieben wurde²¹⁸⁻²²¹. SMA wird von ACTA2 kodiert und ist ein Schlüsselprotein im zellulären Kontraktilsystem verschiedener mesodermaler Zelltypen, einschließlich hepatischer Sternzellen, glatter Muskelzellen und CM²¹⁸. Es ist größtenteils Bestandteil von Zellen der glatten Gefäßmuskulatur und trägt zur Gefäßmotilität und -kontraktion bei²²¹. In hepatischen oder kardialen Nicht-Muskelzellen kann die Expression von SMA Myofibroblasten aktivieren^{203, 222}. Myofibroblasten wiederum können einerseits durch Sekretion der EZM die Wundheilung induzieren, die Entstehung von Narben und fibrokontraktiven Läsionen bewirken, andererseits aber auch kardiale Fibrose begünstigen^{203, 222, 223}. Ob nach kardialen Schaden ausschließlich die Aktivierung von ACTA2 und die konsekutive SMA-Expression die Umwandlung von CF zu Myofibroblasten induziert oder ob die Myofibroblastendifferenzierung hiervon weniger beeinflusst wird, ist weiterhin umstritten^{202, 219, 220, 224, 225}.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression des Gens ACTA2 in der hiPSC-CM-Mischkultur untersucht. Ab d10 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der ACTA2-Expressionslevel (vgl. Diagramm 7). Die FACS-Analysen zeigten 2,65% der Population als rein ACTA2-positive Events, während der Anteil an Troponin T/ ACTA2-positiven Events bei 28,9% lag (Tabelle 6). Ob aus den lediglich ACTA2-positiven Events Rückschlüsse auf glatte Muskelzellen und den Troponin T/ ACTA2-positiven Events Hinweise auf das Vorhandensein von Myofibroblasten in der hiPSC-CM-Mischkultur gezogen werden können, ist methodenbedingt nicht eindeutig zu beantworten. In den IHC-Darstellungen ließen sich isolierte ACTA2-positive Zellen sowie ACTA2/ Troponin T-positive Zellen darstellen (vgl. Abbildung 17 und 18). Ob es sich hierbei um voll funktionale und entdifferenzierte glatte Muskelzellen und Myofibroblasten handelt, muss mit weiteren Studienreihen aufgedeckt werden. Studien, die eine durch primär kardiomyozytäre Differenzierung hergestellte hiPSC-CM-Mischkultur auf diese zwei Zellarten untersuchen, sind in der Literatur noch nicht aufgeführt. Es sind jedoch bereits Arbeiten beschrieben, die unter anderem durch Kontrolle der SMA-positiven Zellen vaskularisiertes Myokard auf hiPSC-CM-Basis als

Regeneratgewebe herstellen wollen²²⁶. Weitere Studien sind auch hier notwendig, um die hiPSC-CM-Interaktion mit glatten Muskelzellen weiter aufzudecken.

4.2.4 Fettstoffwechsel-assoziierte Gene

Das Herz ist eines der stoffwechselintensivsten Gewebe im Körper und nutzt hauptsächlich Fettsäuren zur Energieproduktion²²⁷. Bei einem Missverhältnis zwischen Lipidaufnahme und Lipidverwertung kann es zu einer erhöhten intrazellulären Lipidakkumulation innerhalb der CM kommen, was zu Schädigung des Myokards führen kann²²⁸. Zur Einordnung der hiPSC-CM-Kultur in diesen Kontext wurden im Rahmen dieser Arbeit die Fettstoffwechsel-assoziierten Gene APOA1, FABP3 und CD36 untersucht.

APOA1 ist eine Hauptproteineinheit in HDL-Partikeln²²⁹. Im Allgemeinen gelten APOA1 und HDL als atheroprotektiv²²⁹. Epidemiologische Studien unterstreichen den prognostischen Wert von APOA1-AK für verschiedene Herz-Kreislauf-Erkrankungen, darunter Myokardinfarkt, akutes Koronarsyndrom und schwere Karotisstenose.²³⁰

CD36 wird in verschiedenen Zellen des Körpers exprimiert, darunter Endothelzellen, CM und Adipozyten und ist an Prozessen wie Immunregulation und Stoffwechselregulierung beteiligt²³¹⁻²³⁴. Im Myokard spielt es eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme langkettiger Fettsäuren, dem wichtigsten Stoffwechselsubstrat der Myozyten²³⁵. Ein CD36-Mangel lindert diabetische Kardiomyopathie und Atherosklerose, während eine Überexpression von CD36 ischämische Reperfusionsschäden beseitigt²³⁶⁻²³⁸.

Fettsäurebindende Proteine (englisch: fatty acid binding protein, FABP) sind lipidbindende Proteine und kommen besonders häufig in Geweben mit einem aktiven Fettsäuremetabolismus wie Herz, Nieren, Gehirn und Brustdrüsen vor²³⁹. Unter den neun bisher identifizierten, gewebespezifischen, zytoplasmatischen FABPs wird FABP3 überwiegend, aber nicht ausschließlich in CM exprimiert^{167, 240, 241}. Aktuelle Studien untersuchen ferner die Eignung von FABP3 als Biomarker bei akutem Myokardinfarkt²⁴².

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese drei Fettstoffwechsel-assoziierten Gene untersucht. Besonders ab d13, dem Beginn der Selektionswoche, zeigten sich die Expressionslevel der Gene interessanterweise deutlich erhöht (vgl. Diagramm 8). Das Kulturmedium der hiPSC-CM wird ab diesem Tag mit Laktat statt wie zuvor mit Glukose als Hauptnährstoff angereichert, was eine Umstellung des Metabolismus der

hiPSC-CM bewirkt haben könnte. CD36 konnte jedoch weder in qPCR- noch in FACS-Untersuchungen detektiert werden (vgl. Diagramm 8 und Tabelle 7). Auch die Versuche von IHC-Darstellungen von CD36 waren erfolglos. Andere Studien, welche hiPSC-CM-Kulturen auf diese drei Gene untersuchen, sind in der Literatur bis dato nicht hinterlegt, sodass hier keine Vergleiche gezogen werden können. Die somit im Rahmen dieser Arbeit erstmals beschriebene Expression von APOA1 und FABP3 in hiPSC-CM-Kulturen muss jedoch durch weitere Studien auf ihre Relevanz in den Zellkulturen weiter aufgedeckt werden. Rückschlüsse auf voll-funktionale Adipozyten lassen sich hieraus aktuell nicht ableiten.

4.3 Limitationen

Verschiedene Limitationen werden folgend aufgeführt, welche die Aussagekraft der Ergebnisse einschränken könnten und deshalb eine kritische Auseinandersetzung damit erfordern.

Zunächst einmal werden verschiedene Materiallimitationen, welche bereits im Rahmen der Diskussion beschrieben wurden, kurz zusammengefasst. Die hiPSC-CM sind im Vergleich zu adulten Zellen „unreif“. Viele Studien haben sich mit diesem Thema bereits auseinandergesetzt und verschiedene Methoden entwickelt, um die hiPSC-CM im Reifungsprozess zu unterstützen^{107, 109, 164}. In dieser Arbeit wurde keine Reifungsinduktion der hiPSC-CM durchgeführt, somit sind die Ergebnisse nur bedingt Aussage-relevant zum Beschreiben adulter CM. Es wurden zwei verschiedene Zellreihen benutzt. Um allgemein repräsentative Ergebnisse zu generieren, müssten jedoch noch weitere Zellreihen untersucht werden. Die Projektion der Zusammensetzung der hiPSC-CM und NCM innerhalb der Mischkultur auf in vivo Zellverteilungen im Myokard ist methodenbedingt natürlich nicht möglich, sondern kann nur indirekte Hinweise auf Zell-Zell-Interaktionen einer myokardial-differenzierten Mischkultur liefern. Inwiefern die embryonale Kardiomyogenese und die in vitro durchgeführte Kardiomyozyten-Differenzierung weiter miteinander korrelieren oder auch sich unterscheiden, ist Gegenstand der Forschung von anderen Arbeitsgruppen und sollte nicht im Rahmen dieser Arbeit aufgedeckt werden.

Weiterhin müssen Limitationen in Bezug auf die angewandten Methoden betrachtet werden. Die Qualität der Zellen, beziehungsweise des verwendeten Zellmaterials, könnte durch fehlerhafte Lagerung oder während des Transports zu Messgeräten verringert worden sein. Durch die Zell-Vereinzelung könnten untersuchte, zelluläre

Strukturen beschädigt worden sein, was die quantitative, qualitative und visuelle Beurteilung beeinflusst haben könnte. Ebenso könnte auch eine unzureichende Vereinzelung der Zellen zu eingeschränkt interpretierbaren Ergebnissen geführt haben. Die verwendeten AK-Konzentrationen für die FACS- und IHC-Messungen wurden vor den Experimenten in Titrationsmessungen bestimmt. Sie könnten jedoch von Zellreihe zu Zellreihe variieren und somit möglicherweise nicht immer optimal gewesen sein, was sich auf die Qualität der FACS-Messungen und IHC-Darstellungen ausgewirkt haben könnte. Aufgrund der beschränkten Auswahl der AK-Konjugate und der damit zusammenhängenden farblichen IHC-Darstellungen konnten nur gezielt Strukturen in einer Abbildung zusammengefasst werden. Eine Darstellung von mehr als drei Farben, also drei Strukturen, innerhalb einer Abbildung war methodenbedingt nicht möglich.

Da diese Arbeit sich als hypothesengenerierende Studie verstand, welche Ansätze für weiterführende Forschung mit hiPSC-CM generieren sollte, aber auch aus ökonomischen Gesichtspunkten, wurden viele Kardinalgene oder NCM-assoziierte Gene, nur einleitend mittels qPCR und/oder FACS oder IHC untersucht. Dass sich trotz vieler positiver Ergebnisse und erfolgtem Nachweis hieraus methodenbedingt keine Rückschlüsse auf das Vorhandensein von voll-funktionalen NCM-Arten in der Zellkultur herleiten können, wurde in den jeweiligen Abschnitten klar dargestellt und diskutiert. Eine Ansatzgenerierung zu weiteren Studien darf aus den Ergebnissen jedoch ebenso klar attestiert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die erfolgreiche Differenzierung von aus humanen, induzierten pluripotenten Stammzellen generierten Kardiomyozyten (hiPSC-CM) beschrieben. Die Expression Kardiomyozyten-typischer Strukturproteine, Ionenkanäle sowie Adhäsionsproteine von hiPSC-CM wurde bestätigt. Zwei verschiedene Differenzierungsprotokolle wurden auf ihre Effektivität in der Kardiomyozyten-Generierung verglichen. Beide Protokolle brachten Mischkulturen mit 70-80% Kardiomyozytenanteil hervor. Morphologisch zeigten die hiPSC-CM Unreifezeichen wie polymorphe Zellen, ungeordnetes Troponin T-Bandenmuster und vermehrte Mitosezeichen auf, welche durch verschiedene immunhistochemische Studienreihen beschrieben wurden.

Im weiteren Verlauf wurden die Nichtkardiomyozyten der Mischkultur genauer untersucht. Hierfür wurden im Vorfeld durch Literaturrecherche Gene definiert, welche als Kardinalgene für diese Zelltypen dienen. Waren solche nicht beschrieben, wurden Gene benutzt, welche mit diesen Zelltypen assoziiert waren und bereits durch andere Arbeitsgruppen in anderen Zellkulturen beschrieben wurden. Der Fokus lag dabei auf Fibroblasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Myofibroblasten und Fettstoffwechsel-assoziierten Zellen. Mithilfe von Genexpressionsanalysen, Durchflusszytometrie und immunhistochemischen Darstellungen wurden diese Gene untersucht. Während die quantitative Analyse teils widersprüchliche, teils sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen deckende Werte ergab, konnten Fibroblasten-, Endothelzellen- und glatte Muskelzellen-assoziierte Antigene immunhistochemisch visualisiert werden. Die Expression der Gene Apolipoprotein A1 und Fatty acid binding Protein 3 konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals innerhalb einer hiPSC-CM-Mischkultur beschrieben werden.

Die verschiedenen Limitationen, welche bei der Deutung der Ergebnisse mitberücksichtigt werden müssen, wurden hierbei unter Wahrung einer Good Scientific Practice ausgiebig dargelegt und diskutiert. Das Ziel einer hypothesengenerierenden Studie, welche die hiPSC-CM-Kultur weiter beschreibt, um idealerweise Ansätze zu weiterführenden Studien zu liefern, konnte jedoch erreicht werden. Es sollten daher auf diese Arbeit weitere Studien folgen, wie etwa zur weiterführenden Untersuchung der Zell-Zell-Kontakte zwischen hiPSC-CM und Nichtkardiomyozyten, zum Fettstoffwechsel-Metabolismus von hiPSC-CM, oder auch zu kardialen Fibroblasten und ihrer

Rolle in der elektromechanischen Koppelung von hiPSC-CM und der extrazellulären Matrix. Übergeordnetes Ziel muss es weiterhin bleiben, das Potenzial von hiPSC-CM in verschiedenen Forschungsbereichen wie Medikamentenentwicklung oder im Bereich der regenerativen Medizin weiter zu optimieren.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Herzstiftung D: Deutscher Herzbericht. 2020
2. Herzstiftung D: Deutscher Herzbericht. 256, 2018
3. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie — Herz- und Kreislaufforschung e.V. (DGK) ESoC, (ESC): 2021 ESC Pocket- Leitlinien Akute und chronische Herzinsuffizienz. *European Heart Journal*, Version 2021, 2021 doi/10.1093/eurheartj/ehab368
4. Lip GY, Gibbs CR, Beevers DG: ABC of heart failure: aetiology. *Bmj*, 320: 104-107, 2000 10.1136/bmj.320.7227.104
5. Page RL, 2nd, O'Bryant CL, Cheng D, Dow TJ, Ky B, Stein CM, et al.: Drugs That May Cause or Exacerbate Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 134: e32-69, 2016 10.1161/cir.0000000000000426
6. Group MHS: Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet*, 353: 2001-2007, 1999
7. Martin N, Manoharan K, Davies C, Lumbers RT: Beta-blockers and inhibitors of the renin-angiotensin aldosterone system for chronic heart failure with preserved ejection fraction. *Cochrane Database Syst Rev*, 5: Cd012721, 2021 10.1002/14651858.CD012721.pub3
8. Swindle JP, Chan WW, Waltman Johnson K, Becker L, Blauer-Peterson C, Altan A: Evaluation of mortality and readmissions following hospitalization with heart failure. *Curr Med Res Opin*, 32: 1745-1755, 2016 10.1080/03007995.2016.1205972
9. Störk S, Handrock R, Jacob J, Walker J, Calado F, Lahoz R, et al.: Epidemiology of heart failure in Germany: a retrospective database study. *Clin Res Cardiol*, 106: 913-922, 2017 10.1007/s00392-017-1137-7
10. Bundesamt S: Sterbefaelle Herz-Kreislauf-Erkrankungen insgesamt, Available at: (<https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html;jsessionid=53ACC0790335DD2E4C0A80FFC41514C0.live722>)
11. McDonald TF, Sachs HG, DeHaan RL: Development of sensitivity to tetrodotoxin in beating chick embryo hearts, single cells, and aggregates. *Science*, 176: 1248-1250, 1972 10.1126/science.176.4040.1248
12. Kasten FH: Rat myocardial cells in vitro: mitosis and differentiated properties. *In Vitro*, 8: 128-150, 1972 10.1007/bf02619489
13. Sperelakis N: Cultured heart cell reaggregate model for studying cardiac toxicology. *Environ Health Perspect*, 26: 243-267, 1978 10.1289/ehp.7826243
14. Goshima K, Tonomura Y: Synchronized beating of embryonic mouse myocardial cells mediated by FL cells in monolayer culture. *Exp Cell Res*, 56: 387-392, 1969 10.1016/0014-4827(69)90029-9
15. Harary I, Farley B: In vitro studies of single isolated beating heart cells. *Science*, 131: 1674-1675, 1960 10.1126/science.131.3414.1674
16. Harary I, Farley B: In vitro Organization of Single Beating Rat Heart Cells into Beating Fibers. *Science*, 132: 1839-1840, 1960 10.1126/science.132.3442.1839

17. Bester AJ, Gevers W: The synthesis of myofibrillar and soluble proteins in cell-free systems and in intact cultured muscle cells from newborn polymyopathic hamsters. *J Mol Cell Cardiol*, 7: 325-344, 1975 10.1016/0022-2828(75)90122-4
18. Weinberg M, Fell EH, Lynfield J: Diagnostic biopsy of the pericardium and myocardium. *AMA Arch Surg*, 76: 825-829, 1958 10.1001/archsurg.1958.01280230165025
19. Powell T, Twist VW: A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and a tolerance to calcium. *Biochem Biophys Res Commun*, 72: 327-333, 1976 10.1016/0006-291x(76)90997-9
20. Jacobson SL, Piper HM: Cell cultures of adult cardiomyocytes as models of the myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 18: 661-678, 1986 10.1016/s0022-2828(86)80939-7
21. Raffensperger J, Driscoll JF, Sutton GC, Weinberg M, Jr.: MYOCARDIAL BIOPSY. *Arch Surg*, 89: 1021-1023, 1964 10.1001/archsurg.1964.01320060089017
22. Shirey EK, Hawk WA, Mukerji D, Effler DB: Percutaneous myocardial biopsy of the left ventricle. Experience in 198 patients. *Circulation*, 46: 112-122, 1972 10.1161/01.cir.46.1.112
23. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147, 1998 10.1126/science.282.5391.1145
24. Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM: Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev*, 44: 41-50, 1993 10.1016/0925-4773(93)90015-p
25. Metzger JM, Lin WI, Johnston RA, Westfall MV, Samuelson LC: Myosin heavy chain expression in contracting myocytes isolated during embryonic stem cell cardiogenesis. *Circ Res*, 76: 710-719, 1995 10.1161/01.res.76.5.710
26. Bundesgesetzblatt: Gesetz zur Sicherstellung des Embryonenschutzes im Zusammenhang mit Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen (Stammzellgesetz – StZG). Teil I Nr.42., 2002
27. Camelliti P, Borg TK, Kohl P: Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*, 65: 40-51, 2005 10.1016/j.cardiores.2004.08.020
28. Vliegen HW, van der Laarse A, Cornelisse CJ, Eulderink F: Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur Heart J*, 12: 488-494, 1991 10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a059928
29. Shimada T, Kawazato H, Yasuda A, Ono N, Sueda K: Cytoarchitecture and intercalated disks of the working myocardium and the conduction system in the mammalian heart. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 280: 940-951, 2004 10.1002/ar.a.20109
30. Huxley AF: The activation of striated muscle and its mechanical response. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 178: 1-27, 1971 10.1098/rspb.1971.0049
31. Alexander DB, Goldberg GS: Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. *Curr Med Chem*, 10: 2045-2058, 2003 10.2174/0929867033456927
32. Nag AC, Cheng M, Fischman DA, Zak R: Long-term cell culture of adult mammalian cardiac myocytes: electron microscopic and immunofluorescent

- analyses of myofibrillar structure. *J Mol Cell Cardiol*, 15: 301-317, 1983
10.1016/0022-2828(83)91342-1
33. Nag AC: Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios*, 28: 41-61, 1980
34. Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D'Antoni ML, Debuque R, et al.: Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res*, 118: 400-409, 2016
10.1161/circresaha.115.307778
35. Valiente-Alandi I, Schafer AE, Blaxall BC: Extracellular matrix-mediated cellular communication in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 91: 228-237, 2016
10.1016/j.yjmcc.2016.01.011
36. Adler CP, Ringlage WP, Böhm N: [DNA content and cell number in heart and liver of children. Comparable biochemical, cytophotometric and histological investigations (author's transl)]. *Pathol Res Pract*, 172: 25-41, 1981
37. Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA: Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293: H1883-1891, 2007
10.1152/ajpheart.00514.2007
38. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, et al.: Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, 324: 98-102, 2009 10.1126/science.1164680
39. Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, Caron L, Zhu S, Shao Y, et al.: Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature*, 460: 113-117, 2009 10.1038/nature08191
40. Christia P, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Chen W, Dobaczewski M, Reddy A, et al.: Systematic characterization of myocardial inflammation, repair, and remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction. *J Histochem Cytochem*, 61: 555-570, 2013 10.1369/0022155413493912
41. Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, et al.: Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 13: 397-406, 2014 10.1074/mcp.M113.035600
42. Abdul-Ghani M, Suen C, Jiang B, Deng Y, Weldrick JJ, Putinski C, et al.: Cardiotrophin 1 stimulates beneficial myogenic and vascular remodeling of the heart. *Cell Res*, 27: 1195-1215, 2017 10.1038/cr.2017.87
43. Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, Holthoff K, et al.: Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *Embo j*, 22: 216-224, 2003 10.1093/emboj/cdg032
44. Forbes MS, Sperelakis N: Intercalated discs of mammalian heart: a review of structure and function. *Tissue Cell*, 17: 605-648, 1985 10.1016/0040-8166(85)90001-1
45. Dewey MM: The structure and function of the intercalated disc in vertebrate cardiac muscle. *Experientia Suppl*, 15: 10-28, 1969 10.1007/978-3-0348-6800-6_2
46. Totland MZ, Rasmussen NL, Knudsen LM, Leithe E: Regulation of gap junction intercellular communication by connexin ubiquitination: physiological and pathophysiological implications. *Cell Mol Life Sci*, 77: 573-591, 2020
10.1007/s00018-019-03285-0
47. Delmar M, Laird DW, Naus CC, Nielsen MS, Verselis VK, White TW: Connexins and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10, 2018
10.1101/cshperspect.a029348

48. Mesnil M, Aasen T, Boucher J, Chépiéd A, Cronier L, Defamie N, et al.: An update on minding the gap in cancer. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1860: 237-243, 2018 10.1016/j.bbamem.2017.06.015
49. Vinken M: Introduction: connexins, pannexins and their channels as gatekeepers of organ physiology. *Cell Mol Life Sci*, 72: 2775-2778, 2015 10.1007/s00018-015-1958-3
50. Bennett MV, Barrio LC, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Sáez JC: Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron*, 6: 305-320, 1991 10.1016/0896-6273(91)90241-q
51. Goodenough DA, Paul DL: Gap junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1: a002576, 2009 10.1101/cshperspect.a002576
52. Laird DW, Lampe PD: Cellular mechanisms of connexin-based inherited diseases. *Trends Cell Biol*, 32: 58-69, 2022 10.1016/j.tcb.2021.07.007
53. Beyer EC, Berthoud VM: Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1860: 5-8, 2018 10.1016/j.bbamem.2017.05.016
54. Beyer EC, Davis LM, Saffitz JE, Veenstra RD: Cardiac intercellular communication: consequences of connexin distribution and diversity. *Braz J Med Biol Res*, 28: 415-425, 1995
55. Severs NJ: Cardiac muscle cell interaction: from microanatomy to the molecular make-up of the gap junction. *Histol Histopathol*, 10: 481-501, 1995
56. Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA: Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol*, 105: 2621-2629, 1987 10.1083/jcb.105.6.2621
57. van der Velden HM, Jongsma HJ: Cardiac gap junctions and connexins: their role in atrial fibrillation and potential as therapeutic targets. *Cardiovasc Res*, 54: 270-279, 2002 10.1016/s0008-6363(01)00557-0
58. Kanaporis G, Mese G, Valiuniene L, White TW, Brink PR, Valiunas V: Gap junction channels exhibit connexin-specific permeability to cyclic nucleotides. *J Gen Physiol*, 131: 293-305, 2008 10.1085/jgp.200709934
59. Bukauskas FF, Verselis VK: Gap junction channel gating. *Biochim Biophys Acta*, 1662: 42-60, 2004 10.1016/j.bbamem.2004.01.008
60. Lo CW: Role of gap junctions in cardiac conduction and development: insights from the connexin knockout mice. *Circ Res*, 87: 346-348, 2000 10.1161/01.res.87.5.346
61. Kleber AG, Saffitz JE: Role of the intercalated disc in cardiac propagation and arrhythmogenesis. *Front Physiol*, 5: 404, 2014 10.3389/fphys.2014.00404
62. Himelman E, Lillo MA, Nouet J, Gonzalez JP, Zhao Q, Xie LH, et al.: Prevention of connexin-43 remodeling protects against Duchenne muscular dystrophy cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 130: 1713-1727, 2020 10.1172/jci128190
63. Gourdie RG, Severs NJ, Green CR, Rothery S, Germroth P, Thompson RP: The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin40 and connexin43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system. *J Cell Sci*, 105 (Pt 4): 985-991, 1993
64. Gourdie RG, Green CR, Severs NJ: Gap junction distribution in adult mammalian myocardium revealed by an anti-peptide antibody and laser scanning confocal microscopy. *J Cell Sci*, 99 (Pt 1): 41-55, 1991
65. Camelliti P, Green CR, LeGrice I, Kohl P: Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling. *Circ Res*, 94: 828-835, 2004 10.1161/01.Res.0000122382.19400.14

66. Yeager M: Structure of cardiac gap junction intercellular channels. *J Struct Biol*, 121: 231-245, 1998 10.1006/jsbi.1998.3972
67. Lagree V, Brunschwig K, Lopez P, Gilula NB, Richard G, Falk MM: Specific amino-acid residues in the N-terminus and TM3 implicated in channel function and oligomerization compatibility of connexin43. *J Cell Sci*, 116: 3189-3201, 2003 10.1242/jcs.00604
68. Segretain D, Falk MM: Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta*, 1662: 3-21, 2004 10.1016/j.bbamem.2004.01.007
69. Verheule S, van Kempen MJ, te Welscher PH, Kwak BR, Jongsma HJ: Characterization of gap junction channels in adult rabbit atrial and ventricular myocardium. *Circ Res*, 80: 673-681, 1997 10.1161/01.res.80.5.673
70. Coppén SR, Severs NJ, Gourdie RG: Connexin45 (alpha 6) expression delineates an extended conduction system in the embryonic and mature rodent heart. *Dev Genet*, 24: 82-90, 1999 10.1002/(sici)1520-6408(1999)24:1/2<82::Aid-dvg9>3.0.Co;2-1
71. Severs NJ, Dupont E, Thomas N, Kaba R, Rothery S, Jain R, et al.: Alterations in cardiac connexin expression in cardiomyopathies. *Adv Cardiol*, 42: 228-242, 2006 10.1159/000092572
72. Yamada KA, Rogers JG, Sundset R, Steinberg TH, Saffitz J: Up-regulation of connexin45 in heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 14: 1205-1212, 2003 10.1046/j.1540-8167.2003.03276.x
73. Camelliti P, Green CR, Kohl P: Structural and functional coupling of cardiac myocytes and fibroblasts. *Adv Cardiol*, 42: 132-149, 2006 10.1159/000092566
74. MacKenna D, Summerour SR, Villarreal FJ: Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc Res*, 46: 257-263, 2000 10.1016/s0008-6363(00)00030-4
75. Kamkin A, Kiseleva I, Isenberg G, Wagner KD, Günther J, Theres H, et al.: Cardiac fibroblasts and the mechano-electric feedback mechanism in healthy and diseased hearts. *Prog Biophys Mol Biol*, 82: 111-120, 2003 10.1016/s0079-6107(03)00009-9
76. Banerjee I, Yekkala K, Borg TK, Baudino TA: Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci*, 1080: 76-84, 2006 10.1196/annals.1380.007
77. Cyganek L, Tiburcy M, Sekeres K, Gerstenberg K, Bohnenberger H, Lenz C, et al.: Deep phenotyping of human induced pluripotent stem cell-derived atrial and ventricular cardiomyocytes. *JCI Insight*, 3, 2018 10.1172/jci.insight.99941
78. Van Linthout S, Frias M, Singh N, De Geest B: Therapeutic potential of HDL in cardioprotection and tissue repair. *Handb Exp Pharmacol*, 224: 527-565, 2015 10.1007/978-3-319-09665-0_17
79. Tsukahara R, Haniu H, Matsuda Y, Tsukahara T: Heart-type fatty-acid-binding protein (FABP3) is a lysophosphatidic acid-binding protein in human coronary artery endothelial cells. *FEBS Open Bio*, 4: 947-951, 2014 10.1016/j.fob.2014.10.014
80. Kleine AH, Glatz JF, Havenith MG, Van Nieuwenhoven FA, Van der Vusse GJ, Bosman F: Immunohistochemical detection of very recent myocardial infarctions in humans with antibodies against heart-type fatty acid-binding protein. *Cardiovasc Pathol*, 2: 63-69, 1993 10.1016/1054-8807(93)90014-s
81. Linssen MC, Vork MM, de Jong YF, Glatz JF, van der Vusse GJ: Fatty acid oxidation capacity and fatty acid-binding protein content of different cell types

- isolated from rat heart. *Mol Cell Biochem*, 98: 19-25, 1990
10.1007/bf00231363
82. Robers M, Loddenkötter B, Kresse H, Spener F: Effect of clofibric acid on the turnover of the fatty acid-binding protein identified in cultured endothelial cells from bovine aorta. *Lipids*, 28: 483-486, 1993 10.1007/bf02536078
83. DeFilippis RA, Chang H, Dumont N, Rabban JT, Chen YY, Fontenay GV, et al.: CD36 repression activates a multicellular stromal program shared by high mammographic density and tumor tissues. *Cancer Discov*, 2: 826-839, 2012
10.1158/2159-8290.Cd-12-0107
84. Gao H, Volat F, Sandhow L, Galitzky J, Nguyen T, Esteve D, et al.: CD36 Is a Marker of Human Adipocyte Progenitors with Pronounced Adipogenic and Triglyceride Accumulation Potential. *Stem Cells*, 35: 1799-1814, 2017
10.1002/stem.2635
85. Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676, 2006 10.1016/j.cell.2006.07.024
86. Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, Utikal J, Cowan C, Hochedlinger K: A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 3: 340-345, 2008 10.1016/j.stem.2008.08.003
87. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131: 861-872, 2007 10.1016/j.cell.2007.11.019
88. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al.: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318: 1917-1920, 2007 10.1126/science.1151526
89. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S: Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 322: 949-953, 2008 10.1126/science.1164270
90. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K: Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 322: 945-949, 2008
10.1126/science.1162494
91. Hayashi R, Ishikawa Y, Katori R, Sasamoto Y, Taniwaki Y, Takayanagi H, et al.: Coordinated generation of multiple ocular-like cell lineages and fabrication of functional corneal epithelial cell sheets from human iPS cells. *Nat Protoc*, 12: 683-696, 2017 10.1038/nprot.2017.007
92. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al.: Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451: 141-146, 2008 10.1038/nature06534
93. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, et al.: Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 321: 1218-1221, 2008
10.1126/science.1158799
94. White SM, Claycomb WC: Embryonic stem cells form an organized, functional cardiac conduction system in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288: H670-679, 2005 10.1152/ajpheart.00841.2004
95. van Kempen M, van Ginneken A, de Grijs I, Mutsaers N, Opthof T, Jongsma H, et al.: Expression of the electrophysiological system during murine embryonic stem cell cardiac differentiation. *Cell Physiol Biochem*, 13: 263-270, 2003
10.1159/000074541

96. Choi J, Lee S, Mallard W, Clement K, Tagliazucchi GM, Lim H, et al.: A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs. *Nat Biotechnol*, 33: 1173-1181, 2015 10.1038/nbt.3388
97. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, et al.: Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res*, 104: e30-41, 2009 10.1161/circresaha.108.192237
98. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, et al.: Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol*, 25: 1015-1024, 2007 10.1038/nbt1327
99. Pappas JJ, Yang PC: Human ESC vs. iPSC-pros and cons. *J Cardiovasc Transl Res*, 1: 96-99, 2008 10.1007/s12265-008-9032-2
100. Sun N, Yazawa M, Liu J, Han L, Sanchez-Freire V, Abilez OJ, et al.: Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med*, 4: 130ra147, 2012 10.1126/scitranslmed.3003552
101. Zwi L, Caspi O, Arbel G, Huber I, Gepstein A, Park IH, et al.: Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 120: 1513-1523, 2009 10.1161/circulationaha.109.868885
102. Ma J, Guo L, Fiene SJ, Anson BD, Thomson JA, Kamp TJ, et al.: High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301: H2006-2017, 2011 10.1152/ajpheart.00694.2011
103. Devalla HD, Schwach V, Ford JW, Milnes JT, El-Haou S, Jackson C, et al.: Atrial-like cardiomyocytes from human pluripotent stem cells are a robust preclinical model for assessing atrial-selective pharmacology. *EMBO Mol Med*, 7: 394-410, 2015 10.15252/emmm.201404757
104. Protze SI, Liu J, Nussinovitch U, Ohana L, Backx PH, Gepstein L, et al.: Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker. *Nat Biotechnol*, 35: 56-68, 2017 10.1038/nbt.3745
105. Okubo T, Iwanami A, Kohyama J, Itakura G, Kawabata S, Nishiyama Y, et al.: Pretreatment with a γ -Secretase Inhibitor Prevents Tumor-like Overgrowth in Human iPSC-Derived Transplants for Spinal Cord Injury. *Stem Cell Reports*, 7: 649-663, 2016 10.1016/j.stemcr.2016.08.015
106. Sougawa N, Miyagawa S, Fukushima S, Kawamura A, Yokoyama J, Ito E, et al.: Immunologic targeting of CD30 eliminates tumourigenic human pluripotent stem cells, allowing safer clinical application of hiPSC-based cell therapy. *Sci Rep*, 8: 3726, 2018 10.1038/s41598-018-21923-8
107. Karbassi E, Fenix A, Marchiano S, Muraoka N, Nakamura K, Yang X, et al.: Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine. *Nat Rev Cardiol*, 17: 341-359, 2020 10.1038/s41569-019-0331-x
108. Germanguz I, Sedan O, Zeevi-Levin N, Shtrichman R, Barak E, Ziskind A, et al.: Molecular characterization and functional properties of cardiomyocytes derived from human inducible pluripotent stem cells. *J Cell Mol Med*, 15: 38-51, 2011 10.1111/j.1582-4934.2009.00996.x
109. Kolanowski TJ, Antos CL, Guan K: Making human cardiomyocytes up to date: Derivation, maturation state and perspectives. *Int J Cardiol*, 241: 379-386, 2017 10.1016/j.ijcard.2017.03.099

110. Tiburcy M, Zimmermann WH: Modeling myocardial growth and hypertrophy in engineered heart muscle. *Trends Cardiovasc Med*, 24: 7-13, 2014
10.1016/j.tcm.2013.05.003
111. Ko KR, Tsai MC, Frampton JP: Fabrication of thin-layer matrigel-based constructs for three-dimensional cell culture. *Biotechnol Prog*. 2018/10/14 Ed., 2019 pp e2733 10.1002/btpr.2733
112. Cheng YT, Yeih DF, Liang SM, Chien CY, Yu YL, Ko BS, et al.: Rho-associated kinase inhibitors promote the cardiac differentiation of embryonic and induced pluripotent stem cells. *Int J Cardiol*, 201: 441-448, 2015
10.1016/j.ijcard.2015.08.118
113. Kurosawa H: Application of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor to human pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng*, 114: 577-581, 2012
10.1016/j.jbiosc.2012.07.013
114. Lyra-Leite DM, Gutiérrez-Gutiérrez Ó, Wang M, Zhou Y, Cyganek L, Burridge PW: A review of protocols for human iPSC culture, cardiac differentiation, subtype-specification, maturation, and direct reprogramming. *STAR Protoc*, 3: 101560, 2022 10.1016/j.xpro.2022.101560
115. Hudson J, Titmarsh D, Hidalgo A, Wolvetang E, Cooper-White J: Primitive cardiac cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 21: 1513-1523, 2012 10.1089/scd.2011.0254
116. Gerhard Gstraunthaler TL: Zell- und Gewebekultur
aufl. 7, 2013
117. Wang Q, Zheng YP, Guo X, Wang SZ: Progressive trypsin digestion and serum inhibition in articular cartilage monitored using high-frequency ultrasound in situ. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2008: 2169-2172, 2008
10.1109/iembs.2008.4649624
118. Jarvill-Taylor KJ, Minion FC: The effect of thiol-active compounds and sterols on the membrane-associated hemolysin of *Mycoplasma pulmonis*. *FEMS Microbiol Lett*, 128: 213-218, 1995 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07525.x
119. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354, 1985
10.1126/science.2999980
120. Qiagen: Buffer RW1, Available at:
<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/lab-essentials/buffers-reagents/buffer-rw1>.
121. Qiagen: Buffer RPE, Available at:
<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/lab-essentials/buffers-reagents/buffer-rpe?catno=1018013>.
122. Bachman J: Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol*, 530: 67-74, 2013 10.1016/b978-0-12-420037-1.00002-6
123. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, 10: 413-417, 1992
10.1038/nbt0492-413
124. Dragan AI, Pavlovic R, McGivney JB, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, et al.: SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. *J Fluoresc*, 22: 1189-1199, 2012 10.1007/s10895-012-1059-8
125. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ: GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*, 21: 389-395, 2005 10.1152/physiolgenomics.00025.2005

126. Hornbeck P: Enzyme-linked immunosorbent assays. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 2: Unit 2.1, 2001 10.1002/0471142735.im0201s01
127. Hornbeck PV: Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Curr Protoc Immunol*, 110: 2.1.1-2.1.23, 2015 10.1002/0471142735.im0201s110
128. Cuello AC, Priestley JV, Sofroniew MV: Immunocytochemistry and neurobiology. *Q J Exp Physiol*, 68: 545-578, 1983 10.1113/expphysiol.1983.sp002748
129. Cruise JM LR: Atlas of immunology. *Springer*: 856, 1999 <https://doi.org/10.1201/9781420039948>
130. Kramer DK: Immunhistochemie (IHC).
131. Kramer DK: Immunhistochemie, Available at: <https://www.antikoerper-online.de/resources/17/1216/immunhistochemie-ihc/>.
132. Renz H: *Praktische Labordiagnostik*, 2009
133. Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD: DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry*, 31: 3103-3112, 1992 10.1021/bi00127a010
134. Bernas T, Robinson JP, Asem EK, Rajwa B: Loss of image quality in photobleaching during microscopic imaging of fluorescent probes bound to chromatin. *J Biomed Opt*, 10: 064015, 2005 10.1117/1.2136313
135. Mittelbronn M, Dietz K, Simon P, Beschorner R, Schleich A, Nguyen TD, et al.: Albumin in immunohistochemistry: Foe and friend. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 14: 441-444, 2006 10.1097/01.pai.0000203040.79156.70
136. Peters DC, Dean PN, Merrill JT: Multi-parameter, computer controlled operation of a FACS II cell sorter. *Cytometry*, 2: 350-352, 1982 10.1002/cyto.990020513
137. Pourrier M, Fedida D: The Emergence of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes (hiPSC-CMs) as a Platform to Model Arrhythmogenic Diseases. *Int J Mol Sci*, 21, 2020 10.3390/ijms21020657
138. Musunuru K, Sheikh F, Gupta RM, Houser SR, Maher KO, Milan DJ, et al.: Induced Pluripotent Stem Cells for Cardiovascular Disease Modeling and Precision Medicine: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Genom Precis Med*, 11: e000043, 2018 10.1161/hcg.0000000000000043
139. Rojas SV, Kensah G, Rotaermel A, Baraki H, Kutschka I, Zweigerdt R, et al.: Transplantation of purified iPSC-derived cardiomyocytes in myocardial infarction. *PLoS One*, 12: e0173222, 2017 10.1371/journal.pone.0173222
140. Sharma A, Marceau C, Hamaguchi R, Burrridge PW, Rajarajan K, Churko JM, et al.: Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as an in vitro model for coxsackievirus B3-induced myocarditis and antiviral drug screening platform. *Circ Res*, 115: 556-566, 2014 10.1161/circresaha.115.303810
141. Okano H, Sipp D: New trends in cellular therapy. *Development*, 147, 2020 10.1242/dev.192567
142. Yamanaka S: Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. *Cell Stem Cell*, 27: 523-531, 2020 10.1016/j.stem.2020.09.014
143. Ito T, Kawai Y, Yasui Y, Iriguchi S, Minagawa A, Ishii T, et al.: The therapeutic potential of multiclonal tumoricidal T cells derived from tumor infiltrating lymphocyte-1derived iPS cells. *Commun Biol*, 4: 694, 2021 10.1038/s42003-021-02195-x
144. Okano H, Yamanaka S: iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease. *Mol Brain*, 7: 22, 2014 10.1186/1756-6606-7-22

145. Parrotta EI, Scalise S, Scaramuzzino L, Cuda G: Stem Cells: The Game Changers of Human Cardiac Disease Modelling and Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*, 20, 2019 10.3390/ijms20225760
146. Grskovic M, Javaherian A, Strulovici B, Daley GQ: Induced pluripotent stem cells--opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 10: 915-929, 2011 10.1038/nrd3577
147. Kim C, Wong J, Wen J, Wang S, Wang C, Spiering S, et al.: Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature*, 494: 105-110, 2013 10.1038/nature11799
148. Moretti A, Bellin M, Welling A, Jung CB, Lam JT, Bott-Flügel L, et al.: Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med*, 363: 1397-1409, 2010 10.1056/NEJMoa0908679
149. Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, Ang YS, Schaniel C, Lee DF, et al.: Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature*, 465: 808-812, 2010 10.1038/nature09005
150. Liu YW, Chen B, Yang X, Fugate JA, Kalucki FA, Futakuchi-Tsuchida A, et al.: Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nat Biotechnol*, 36: 597-605, 2018 10.1038/nbt.4162
151. Udo Kellner SOF, Christian Mawrin, Matthias Krams: *Kurzlehrbuch Pathologie*, Thieme, 2019 10.1055/b-007-167433
152. Giacomelli E, Meraviglia V, Campostrini G, Cochrane A, Cao X, van Helden RWJ, et al.: Human-iPSC-Derived Cardiac Stromal Cells Enhance Maturation in 3D Cardiac Microtissues and Reveal Non-cardiomyocyte Contributions to Heart Disease. *Cell Stem Cell*, 26: 862-879.e811, 2020 10.1016/j.stem.2020.05.004
153. Sun X, Nunes SS: Biowire platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Methods*, 101: 21-26, 2016 10.1016/j.ymeth.2015.11.005
154. Ronaldson-Bouchard K, Ma SP, Yeager K, Chen T, Song L, Sirabella D, et al.: Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. *Nature*, 556: 239-243, 2018 10.1038/s41586-018-0016-3
155. Yang X, Rodriguez M, Pabon L, Fischer KA, Reinecke H, Regnier M, et al.: Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol*, 72: 296-304, 2014 10.1016/j.yjmcc.2014.04.005
156. Yang X, Rodriguez ML, Leonard A, Sun L, Fischer KA, Wang Y, et al.: Fatty Acids Enhance the Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 13: 657-668, 2019 10.1016/j.stemcr.2019.08.013
157. Leri A, Kajstura J, Anversa P: Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev*, 85: 1373-1416, 2005 10.1152/physrev.00013.2005
158. Metzger JM, Samuelson LC, Rust EM, Westfall MV: Embryonic stem cell cardiogenesis applications for cardiovascular research. *Trends Cardiovasc Med*, 7: 63-68, 1997 10.1016/s1050-1738(96)00138-7
159. Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, et al.: Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell*, 12: 127-137, 2013 10.1016/j.stem.2012.09.013
160. Karakikes I, Ameen M, Termglinchan V, Wu JC: Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: insights into molecular, cellular, and

- functional phenotypes. *Circ Res*, 117: 80-88, 2015
10.1161/circresaha.117.305365
161. Keepers B, Liu J, Qian L: What's in a cardiomyocyte - And how do we make one through reprogramming? *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1867: 118464, 2020 10.1016/j.bbamcr.2019.03.011
162. Graham E, Bergmann O: Dating the Heart: Exploring Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Physiology (Bethesda)*, 32: 33-41, 2017 10.1152/physiol.00015.2016
163. Ahmed RE, Anzai T, Chanthra N, Uosaki H: A Brief Review of Current Maturation Methods for Human Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Cardiomyocytes. *Front Cell Dev Biol*, 8: 178, 2020 10.3389/fcell.2020.00178
164. Yang X, Pabon L, Murry CE: Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res*, 114: 511-523, 2014 10.1161/circresaha.114.300558
165. Burridge PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD, et al.: Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods*, 11: 855-860, 2014 10.1038/nmeth.2999
166. Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, et al.: Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*, 8: 162-175, 2013 10.1038/nprot.2012.150
167. Watanabe K, Wakabayashi H, Veerkamp JH, Ono T, Suzuki T: Immunohistochemical distribution of heart-type fatty acid-binding protein immunoreactivity in normal human tissues and in acute myocardial infarct. *J Pathol*, 170: 59-65, 1993 10.1002/path.1711700110
168. Kleinsorge M, Cyganek L: Subtype-Directed Differentiation of Human iPSCs into Atrial and Ventricular Cardiomyocytes. *STAR Protoc*, 1: 100026, 2020 10.1016/j.xpro.2020.100026
169. Joggerst SJ, Hatzopoulos AK: Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. *Expert Rev Mol Med*, 11: e20, 2009 10.1017/s1462399409001124
170. van den Berg CW, Okawa S, Chuva de Sousa Lopes SM, van Iperen L, Passier R, Braam SR, et al.: Transcriptome of human foetal heart compared with cardiomyocytes from pluripotent stem cells. *Development*, 142: 3231-3238, 2015 10.1242/dev.123810
171. Sacchetto C, Vitiello L, de Windt LJ, Rampazzo A, Calore M: Modeling Cardiovascular Diseases with hiPSC-Derived Cardiomyocytes in 2D and 3D Cultures. *Int J Mol Sci*, 21, 2020 10.3390/ijms21093404
172. Goldfracht I, Efraim Y, Shinnawi R, Kovalev E, Huber I, Gepstein A, et al.: Engineered heart tissue models from hiPSC-derived cardiomyocytes and cardiac ECM for disease modeling and drug testing applications. *Acta Biomater*, 92: 145-159, 2019 10.1016/j.actbio.2019.05.016
173. da Rocha AM, Campbell K, Mironov S, Jiang J, Mundada L, Guerrero-Serna G, et al.: hiPSC-CM Monolayer Maturation State Determines Drug Responsiveness in High Throughput Pro-Arrhythmia Screen. *Sci Rep*, 7: 13834, 2017 10.1038/s41598-017-13590-y
174. Scott CW, Peters MF, Dragan YP: Human induced pluripotent stem cells and their use in drug discovery for toxicity testing. *Toxicol Lett*, 219: 49-58, 2013 10.1016/j.toxlet.2013.02.020
175. Sharma A, Sances S, Workman MJ, Svendsen CN: Multi-lineage Human iPSC-Derived Platforms for Disease Modeling and Drug Discovery. *Cell Stem Cell*, 26: 309-329, 2020 10.1016/j.stem.2020.02.011

176. Sartiani L, Mannaioni G, Masi A, Novella Romanelli M, Cerbai E: The Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels: from Biophysics to Pharmacology of a Unique Family of Ion Channels. *Pharmacol Rev*, 69: 354-395, 2017 10.1124/pr.117.014035
177. Rivolta I, Binda A, Masi A, DiFrancesco JC: Cardiac and neuronal HCN channelopathies. *Pflugers Arch*, 472: 931-951, 2020 10.1007/s00424-020-02384-3
178. Yang L, Arbona RJR, Smith CS, Banks KM, Thomas VK, Palmer L, et al.: An evolutionarily conserved pacemaker role for HCN ion channels in smooth muscle. *J Physiol*, 601: 1225-1246, 2023 10.1113/jp283701
179. Spinelli V, Sartiani L, Mugelli A, Romanelli MN, Cerbai E: Hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-gated channels: pathophysiological, developmental, and pharmacological insights into their function in cellular excitability. *Can J Physiol Pharmacol*, 96: 977-984, 2018 10.1139/cjpp-2018-0115
180. Sartiani L, Romanelli MN, Mugelli A, Cerbai E: Updates on HCN Channels in the Heart: Function, Dysfunction and Pharmacology. *Curr Drug Targets*, 16: 868-876, 2015 10.2174/1389450116666150531152047
181. Zhao Z, Lan H, El-Battrawy I, Li X, Buljubasic F, Sattler K, et al.: Ion Channel Expression and Characterization in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells Int*, 2018: 6067096, 2018 10.1155/2018/6067096
182. Aasen T, Johnstone S, Vidal-Brime L, Lynn KS, Koval M: Connexins: Synthesis, Post-Translational Modifications, and Trafficking in Health and Disease. *Int J Mol Sci*, 19, 2018 10.3390/ijms19051296
183. Rodríguez-Sinovas A, Sánchez JA, Valls-Lacalle L, Consegal M, Ferreira-González I: Connexins in the Heart: Regulation, Function and Involvement in Cardiac Disease. *Int J Mol Sci*, 22, 2021 10.3390/ijms22094413
184. Boyett MR, Inada S, Yoo S, Li J, Liu J, Tellez J, et al.: Connexins in the sinoatrial and atrioventricular nodes. *Adv Cardiol*, 42: 175-197, 2006 10.1159/000092569
185. Epifantseva I, Shaw RM: Intracellular trafficking pathways of Cx43 gap junction channels. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1860: 40-47, 2018 10.1016/j.bbamem.2017.05.018
186. Bonacquisti EE, Nguyen J: Connexin 43 (Cx43) in cancer: Implications for therapeutic approaches via gap junctions. *Cancer Lett*, 442: 439-444, 2019 10.1016/j.canlet.2018.10.043
187. Marcu IC, Illaste A, Heuking P, Jaconi ME, Ullrich ND: Functional Characterization and Comparison of Intercellular Communication in Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells*, 33: 2208-2218, 2015 10.1002/stem.2009
188. Kiss E, Fischer C, Sauter JM, Sun J, Ullrich ND: The Structural and the Functional Aspects of Intercellular Communication in iPSC-Cardiomyocytes. *Int J Mol Sci*, 23, 2022 10.3390/ijms23084460
189. Montero-Calle P, Flandes-Iparraguirre M, Mountris K, A SdIN, Laita N, Rosales RM, et al.: Fabrication of human myocardium using multidimensional modelling of engineered tissues. *Biofabrication*, 14, 2022 10.1088/1758-5090/ac8cb3
190. Stroemlund LW, Jensen CF, Qvortrup K, Delmar M, Nielsen MS: Gap junctions - guards of excitability. *Biochem Soc Trans*, 43: 508-512, 2015 10.1042/bst20150059

191. Dang X, Doble BW, Kardami E: The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Mol Cell Biochem*, 242: 35-38, 2003
192. Boengler K, Dodoni G, Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, Ruiz-Meana M, Gres P, et al.: Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res*, 67: 234-244, 2005
10.1016/j.cardiores.2005.04.014
193. Viczenczova C, Kura B, Chaudagar KK, Szeiffova Bacova B, Egan Benova T, Barancik M, et al.: Myocardial connexin-43 is upregulated in response to acute cardiac injury in rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 95: 911-919, 2017
10.1139/cjpp-2016-0680
194. Furtado MB, Nim HT, Boyd SE, Rosenthal NA: View from the heart: cardiac fibroblasts in development, scarring and regeneration. *Development*, 143: 387-397, 2016 10.1242/dev.120576
195. Giacomelli E, Bellin M, Sala L, van Meer BJ, Tertoolen LG, Orlova VV, et al.: Three-dimensional cardiac microtissues composed of cardiomyocytes and endothelial cells co-differentiated from human pluripotent stem cells. *Development*, 144: 1008-1017, 2017 10.1242/dev.143438
196. Dostal D, Glaser S, Baudino TA: Cardiac fibroblast physiology and pathology. *Compr Physiol*, 5: 887-909, 2015 10.1002/cphy.c140053
197. Klesen A, Jakob D, Emig R, Kohl P, Ravens U, Peyronnet R: Cardiac fibroblasts : Active players in (atrial) electrophysiology? *Herzschrittmacherther Elektrophysiol*, 29: 62-69, 2018 10.1007/s00399-018-0553-3
198. Kofron CM, Kim TY, King ME, Xie A, Feng F, Park E, et al.: G(q)-activated fibroblasts induce cardiomyocyte action potential prolongation and automaticity in a three-dimensional microtissue environment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 313: H810-h827, 2017 10.1152/ajpheart.00181.2017
199. Chou PC, Liu CM, Weng CH, Yang KC, Cheng ML, Lin YC, et al.: Fibroblasts Drive Metabolic Reprogramming in Pacemaker Cardiomyocytes. *Circ Res*, 131: 6-20, 2022 10.1161/circresaha.121.320301
200. Souders CA, Bowers SL, Baudino TA: Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res*, 105: 1164-1176, 2009 10.1161/circresaha.109.209809
201. Tarbit E, Singh I, Peart JN, Rose'Meyer RB: Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells. *Heart Fail Rev*, 24: 1-15, 2019
10.1007/s10741-018-9720-1
202. Baum J, Duffy HS: Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol*, 57: 376-379, 2011 10.1097/FJC.0b013e3182116e39
203. Roy SG, Nozaki Y, Phan SH: Regulation of alpha-smooth muscle actin gene expression in myofibroblast differentiation from rat lung fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol*, 33: 723-734, 2001 10.1016/s1357-2725(01)00041-3
204. Camelliti P, McCulloch AD, Kohl P: Microstructured cocultures of cardiac myocytes and fibroblasts: a two-dimensional in vitro model of cardiac tissue. *Microsc Microanal*, 11: 249-259, 2005 10.1017/s1431927605050506
205. Gaudesius G, Miragoli M, Thomas SP, Rohr S: Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ Res*, 93: 421-428, 2003 10.1161/01.Res.0000089258.40661.0c
206. Lüllmann-Rauch: *Histologie*, Thieme, 2006
207. Segers VFM, Brutsaert DL, De Keulenaer GW: Cardiac Remodeling: Endothelial Cells Have More to Say Than Just NO. *Front Physiol*, 9: 382, 2018
10.3389/fphys.2018.00382
208. Wang Y, Wang C, Ma J: Role of cardiac endothelial cells-derived microRNAs in cardiac remodeling. *Discov Med*, 28: 95-105, 2019

209. Balligand JL, Feron O, Dessy C: eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev*, 89: 481-534, 2009 10.1152/physrev.00042.2007
210. Drawnel FM, Archer CR, Roderick HL: The role of the paracrine/autocrine mediator endothelin-1 in regulation of cardiac contractility and growth. *Br J Pharmacol*, 168: 296-317, 2013 10.1111/j.1476-5381.2012.02195.x
211. Giacomelli E, Bellin M, Orlova VV, Mummery CL: Co-Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells-Derived Cardiomyocytes and Endothelial Cells from Cardiac Mesoderm Provides a Three-Dimensional Model of Cardiac Microtissue. *Curr Protoc Hum Genet*, 95: 21.29.21-21.29.22, 2017 10.1002/cphg.46
212. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ: Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol*, 23: 253-259, 2016 10.1097/moh.0000000000000239
213. Marelli-Berg FM, Clement M, Mauro C, Caligiuri G: An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. *J Cell Sci*, 126: 2343-2352, 2013 10.1242/jcs.124099
214. Lawson C, Wolf S: ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep*, 61: 22-32, 2009 10.1016/s1734-1140(09)70004-0
215. Roebuck KA, Finnegan A: Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol*, 66: 876-888, 1999 10.1002/jlb.66.6.876
216. Sattler K, El-Battrawy I, Zhao Z, Schrottenberg C, Yücel G, Lan H, et al.: Serum of patients with acute myocardial infarction prevents inflammation in iPSC-cardiomyocytes. *Sci Rep*, 9: 5651, 2019 10.1038/s41598-019-42079-z
217. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, 2nd, Lyman S, Paddock C, et al.: PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*, 247: 1219-1222, 1990 10.1126/science.1690453
218. Jo S, Kim JW, Noh H, Kim H, Kim JH, Park HJ: Generation of an ACTA2-EGFP reporter human induced pluripotent stem cell line, KITi001-C-41, using CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination. *Stem Cell Res*, 56: 102524, 2021 10.1016/j.scr.2021.102524
219. Li Y, Li C, Liu Q, Wang L, Bao AX, Jung JP, et al.: Loss of Acta2 in cardiac fibroblasts does not prevent the myofibroblast differentiation or affect the cardiac repair after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 171: 117-132, 2022 10.1016/j.yjmcc.2022.08.003
220. Rockey DC, Du Q, Weymouth ND, Shi Z: Smooth Muscle α -Actin Deficiency Leads to Decreased Liver Fibrosis via Impaired Cytoskeletal Signaling in Hepatic Stellate Cells. *Am J Pathol*, 189: 2209-2220, 2019 10.1016/j.ajpath.2019.07.019
221. Yuan SM: α -Smooth Muscle Actin and ACTA2 Gene Expressions in Vasculopathies. *Braz J Cardiovasc Surg*, 30: 644-649, 2015 10.5935/1678-9741.20150081
222. Barbero-Becerra VJ, Giraudi PJ, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Tiribelli C, Rosso N: The interplay between hepatic stellate cells and hepatocytes in an in vitro model of NASH. *Toxicol In Vitro*, 29: 1753-1758, 2015 10.1016/j.tiv.2015.07.010
223. Wang J, Zohar R, McCulloch CA: Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res*, 312: 205-214, 2006 10.1016/j.yexcr.2005.11.004

224. Wang J, Chen H, Seth A, McCulloch CA: Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285: H1871-1881, 2003 10.1152/ajpheart.00387.2003
225. Tomasek JJ, Haaksma CJ, Schwartz RJ, Howard EW: Whole animal knockout of smooth muscle alpha-actin does not alter excisional wound healing or the fibroblast-to-myofibroblast transition. *Wound Repair Regen*, 21: 166-176, 2013 10.1111/wrr.12001
226. Kant RJ, Dwyer KD, Lee JH, Polucha C, Kobayashi M, Pyon S, et al.: Patterned Arteriole-Scale Vessels Enhance Engraftment, Perfusion, and Vessel Branching Hierarchy of Engineered Human Myocardium for Heart Regeneration. *Cells*, 12, 2023 10.3390/cells12131698
227. Kadkhodayan A, Coggan AR, Peterson LR: A "PET" area of interest: myocardial metabolism in human systolic heart failure. *Heart Fail Rev*, 18: 567-574, 2013 10.1007/s10741-012-9360-9
228. Da Dalt L, Cabodevilla AG, Goldberg IJ, Norata GD: Cardiac lipid metabolism, mitochondrial function, and heart failure. *Cardiovasc Res*, 119: 1905-1914, 2023 10.1093/cvr/cvad100
229. Karthikeyan G, Teo KK, Islam S, McQueen MJ, Pais P, Wang X, et al.: Lipid profile, plasma apolipoproteins, and risk of a first myocardial infarction among Asians: an analysis from the INTERHEART Study. *J Am Coll Cardiol*, 53: 244-253, 2009 10.1016/j.jacc.2008.09.041
230. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV: ApoA1 and ApoA1-specific self-antibodies in cardiovascular disease. *Lab Invest*, 96: 708-718, 2016 10.1038/labinvest.2016.56
231. Son NH, Basu D, Samovski D, Pietka TA, Peche VS, Willecke F, et al.: Endothelial cell CD36 optimizes tissue fatty acid uptake. *J Clin Invest*, 128: 4329-4342, 2018 10.1172/jci99315
232. Yu M, Du H, Wang B, Chen J, Lu F, Peng S, et al.: Exogenous H(2)S Induces Hrd1 S-sulfhydration and Prevents CD36 Translocation via VAMP3 Ubiquitylation in Diabetic Hearts. *Aging Dis*, 11: 286-300, 2020 10.14336/ad.2019.0530
233. Ladanyi A, Mukherjee A, Kenny HA, Johnson A, Mitra AK, Sundaresan S, et al.: Adipocyte-induced CD36 expression drives ovarian cancer progression and metastasis. *Oncogene*, 37: 2285-2301, 2018 10.1038/s41388-017-0093-z
234. Wang J, Li Y: CD36 tango in cancer: signaling pathways and functions. *Theranostics*, 9: 4893-4908, 2019 10.7150/thno.36037
235. Brinkmann JF, Abumrad NA, Ibrahim A, van der Vusse GJ, Glatz JF: New insights into long-chain fatty acid uptake by heart muscle: a crucial role for fatty acid translocase/CD36. *Biochem J*, 367: 561-570, 2002 10.1042/bj20020747
236. Dobrzyn P, Pyrkowska A, Duda MK, Bednarski T, Maczewski M, Langfort J, et al.: Expression of lipogenic genes is upregulated in the heart with exercise training-induced but not pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 304: E1348-1358, 2013 10.1152/ajpendo.00603.2012
237. Xu L, Chen W, Ma M, Chen A, Tang C, Zhang C, et al.: Microarray profiling analysis identifies the mechanism of miR-200b-3p/mRNA-CD36 affecting diabetic cardiomyopathy via peroxisome proliferator activated receptor- γ signaling pathway. *J Cell Biochem*, 120: 5193-5206, 2019 10.1002/jcb.27795

238. Kim TT, Dyck JR: The role of CD36 in the regulation of myocardial lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1861: 1450-1460, 2016
10.1016/j.bbaliip.2016.03.018
239. Glatz JF, van Nieuwenhoven FA, Luiken JJ, Schaap FG, van der Vusse GJ: Role of membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in cellular fatty acid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 57: 373-378, 1997 10.1016/s0952-3278(97)90413-0
240. Schaap FG, van der Vusse GJ, Glatz JF: Fatty acid-binding proteins in the heart. *Mol Cell Biochem*, 180: 43-51, 1998
241. Zschiesche W, Kleine AH, Spitzer E, Veerkamp JH, Glatz JF: Histochemical localization of heart-type fatty-acid binding protein in human and murine tissues. *Histochem Cell Biol*, 103: 147-156, 1995 10.1007/bf01454012
242. Goel H, Melot J, Krinock MD, Kumar A, Nadar SK, Lip GYH: Heart-type fatty acid-binding protein: an overlooked cardiac biomarker. *Ann Med*, 52: 444-461, 2020 10.1080/07853890.2020.1800075

7 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Angela Wendel (geb. Cyganok)

Geburtsdatum: 20.10.1991

Geburtsort: Jefremowka, Kasachstan

Familienstand: verheiratet

Vater: Igor Cyganok, Krankenpfleger

Mutter: Tamara Cyganok, Erzieherin

SCHULISCHER WERDEGANG

1998–2012 2 Jahre Grundschule in Kasachstan, Grundschule in Harzgerode, Hebel Gymnasium in Schwetzingen

19.06.2012 Abitur, Hebel Gymnasium Schwetzingen

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

23.10.2013 Beginn des Studiums Humanmedizin
Vorklinik an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen

21.09.2015 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)

2015–2020 Klinik an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Fakultät
Mannheim

11.10.2019 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)

18.06.2020 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)

8 DANKSAGUNG

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. med. M. Borggefe sowie seinem Nachfolger Prof. Dr. med. D. Dürschmied für die Möglichkeit meine Promotionsarbeit an der I. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim der medizinischen Fakultät Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. med. I. Akin danke ich für die Überlassung des spannenden Themas dieser Arbeit.

Besonderen Dank schulde ich Dr. med. G. Yücel für seine Hilfsbereitschaft, seine sachlichen Hinweise und Supervision.

Herrn Dr. rer. nat. S. Lang danke ich für die aufrichtige und umfassende Unterstützung in vielen Bereichen im Labor.

Ebenso danke ich Frau Stefanie Uhlig für die zahlreichen, hilfreichen Tipps für die Benutzung des FACS Canto II Geräts und ihre immer offene und hilfsbereite Art.

Außerdem danke ich meiner Mitdotorandin Linda Terkatz herzlichst für die motivierende Unterstützung und die unzähligen Stunden zusammen im Labor.

Inbesondere möchte ich meiner ganzen Familie danken. Meinen Eltern, die mich zu diesem zielstrebigen Menschen erzogen haben und mich immer unterstützt haben. Meiner Schwester, die immer für mich da ist. Ich möchte meinem Mann von ganzem Herzen danken, der mir immer den Rücken gestärkt und mich motiviert hat. Ich danke auch meinem Sohn, der in Bezug auf das Schreiben der Arbeit eher eine Limitation war, für mein Leben aber eine eindeutige Bereicherung ist.

Abschließend widme ich diese Arbeit meinem verstorbenen Großvater, der leider zu früh gegangen ist und so viele wichtige Dinge in meinem Leben nicht miterleben konnte.