

Aus der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Direktor: Prof. Dr. med. Ingo Kutschka

**Generierung und Charakterisierung funktioneller
Herzmuskelzellen aus pluripotenten Stammzellen der Ratte für
syngene myokardiale Restaurationsmodelle**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät der

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von George Awad

aus Homs, Syrien

Magdeburg 2017

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Autor: George Awad

Titel: Generierung und Charakterisierung funktionaler Herzmuskelzellen aus pluripotenten Stammzellen der Ratte für syngene myokardiale Restaurationsmodelle

Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, 2016, 86 Blatt, 20 Abbildungen, 18 Tabellen

Kurzreferat

Induziert pluripotente Stammzellen (iPSC) können prinzipiell zu jedem Zelltyp des Körpers differenziert werden und gelten somit als vielversprechende Zellquelle für die autologe Zelltherapie. Wegen der begrenzten regenerativen Kapazität des Herzmuskels sind iPSC-abgeleitete Kardiomyozyten insbesondere zur Restauration von Herzmuskelgewebe sehr aussichtsreich. Ein autologes oder allogenes Rattenmodell kann dazu dienen, Applikationsformen zu optimieren und immunologische Aspekte zu untersuchen, bevor Großtierexperimente oder klinische Studien folgen. Es wurde jedoch noch nicht über die Differenzierung funktioneller Herzmuskelzellen aus iPSC der Ratte berichtet. Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig die vergleichende Differenzierung von embryonalen Stammzellen (ESC) und iPSC der Ratte zu funktionellen Herzmuskelzellen. Mittels der Zugabe von Ascorbat-2-Phosphat konnte die Differenzierungseffizienz gesteigert werden und die Verwendung der Agarose Microwell-Methode erlaubte eine effiziente Hochskalierung des Differenzierungsprozesses. Die differenzierten Kardiomyozyten (KM) zeigten spontane rhythmische Kontraktionen, exprimierten Herzmuskel-spezifische Proteine, reagierten auf kardiokaraktive Substanzen und zeigten Aktionspotentiale unterschiedlicher Kardiomyozyten-Subtypen. Neben KM konnten auch Fibroblasten-ähnliche Zellen aus Ratten-iPSC differenziert werden, welche als Bindegewebszellen für die Herstellung von syngenem bioartifiziellem Herzmuskelkonstrukt dienen können. Diese Arbeit legt somit einen wichtigen Grundstein für ein standardisiertes syngenes Kleintiermodell, welches eine kardiale Zell- und Gewebetherapie ohne die Nachteile einer immunologischen Inkompatibilität ermöglicht.

Schlüsselwörter: induziert pluripotente Stammzellen, embryonale Stammzellen, syngenes Rattenmodell, kardiale Differenzierung

Abkürzungsverzeichnis

2i	Chir99021 + PD0325901
AA-2P	Ascorbat-2-Phosphat
AMW	Agarose Microwells
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AP	Aktionspotential
APh	Alkalische Phosphatase
BCT	Bioartificial cardiac tissue (Bioartifizielles Herzgewebe)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cTNT	Kardiales Troponin T
CVD	Cardiovascular disease (Kardiovaskuläre Erkrankung)
Cx	Connexin
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DCM	Dilated cardiomyopathy (Dilatative Kardiomyopathie)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
EB	Embryoid body (Embryonales Körperchen)
ESC	Embryonale Stammzellen
et al.	et alii, und andere
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FB	Fibroblasten
FCS	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
H ₂ O	Wasser
HD	Hanging drop (hängender Tropfen)
HTx	Herztransplantation
ICM	Ischemic cardiomyopathy (Ischämische Kardiomyopathie)

IgG	Immunglobuline der Klasse G
IgM	Immunglobuline der Klasse M
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iPSC	Induziert pluripotente Stammzellen
CHD	Coronary heart disease (Koronare Herzkrankheit)
KM	Kardiomyozyt
LIF	Leukemia inhibitory factor
LVAD	Left ventricular assist device (Linksventrikuläres Unterstützungssystem)
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MEA	Multielektrodenarray
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MI	Myokardinfarkt
MTE	Myokardiales tissue engineering
N2B27-Lif/2i	Expansionsmedium
NEAA	Nichtessentielle Aminosäuren
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PSC	Pluripotente Stammzellen
rDM	Ratten Differenzierungsmedium
rESC	Embryonale Stammzellen der Ratte
riPSC	Induzierte Pluripotente Stammzellen der Ratte
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rPSC	Pluripotente Stammzellen der Ratte
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SD	Standard deviation (Standardabweichung)

SEM	Standard error of mean (Standardfehler)
SSEA	Stage specific embryonic antigen
TE	Tissue engineering
TMRM	Tetramethylrhodamine-Methylester
VAD	Ventrikuläres Unterstützungssystem
WHO	World health organization (Weltgesundheitsorganisation)
γ MEF	Bestrahlte murine embryonale Fibroblasten

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Herzerkrankungen	8
1.2	Derzeitige Therapiemöglichkeiten	8
1.2.1	Medikamente und kardiale Resynchronisationstherapie	9
1.2.2	Invasive Behandlungen	9
1.2.3	Herztransplantation (HTx)	9
1.2.4	Herzunterstützungssysteme	11
1.3	Alternative Therapieformen im experimentellen Stadium	13
1.3.1	Adulte Stammzellen	14
1.3.2	Pluripotente Stammzellen	14
1.3.3	Embryonale Stammzellen	15
1.3.4	Induziert pluripotente Stammzellen	16
1.3.5	Die kardiale Differenzierung embryonaler Stammzellen und induziert pluripotenter Stammzellen <i>in vitro</i>	17
1.3.6	Strategien der myokardialen Zelltherapie	18
2	Zielsetzung	21
3	Materialien	23
3.1	Zusammensetzung der Zellkulturmedien	23
3.1.1	MEF-Medium	23
3.1.2	Expansionsmedium für Ratten PSC (N2B27-Lif/2i)	23
3.1.3	Ratten-PSC-Differenzierungsmedium (rDM)	23
3.2	Zelllinien	23
3.2.1	Murine embryonale Fibroblasten (MEF)	23
3.2.2	Embryonale Stammzellen der Ratte (rESC)	23
3.2.3	Induzierte pluripotente Stammzellen der Ratte (riPSC)	24
4	Methoden	25
4.1	Zellkultur	25
4.1.1	Allgemeine Bemerkungen	25
4.1.2	Zellzählung	25
4.1.3	Kultivierung muriner embryonaler Fibroblasten (MEF)	25
4.1.4	Pluripotente Stammzellen der Ratte (rPSC)	27
4.1.5	Ungerichtete Differenzierung von rPSC	28
4.1.6	Differenzierung von Fibroblasten-ähnlichen Zellen aus riPSC	30
4.2	Histologische und Durchflusszytometrische Untersuchungen	30
4.2.1	Histologische Einbettung von Gewebeproben und EBs	30
4.2.2	Kryoschnitte	31
4.2.3	Immunfluoreszenzfärbung	31
4.2.4	Alkalische Phosphatase-Färbung	32
4.2.5	Durchflusszytometrie	32
4.3	Funktionelle Charakterisierung der riPSC-abgeleiteten KM	32
4.4	Molekularbiologische Methoden	33
4.4.1	Isolation von Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) aus Zellen	33
4.4.2	Herstellung DNA-freier RNA und cDNA-Synthese	34
4.4.3	Mikrosatelliten-Genotypisierung	37
4.5	Statistische Analyse	37
5	Ergebnisse	38
5.1	Überprüfung der Identität der verwendeten Ratten PSC Linien	38

5.2 Etablierung der Expansionskultur der rPSC	38
5.2.1 Morphologie der rPSC in der klassischen Feeder-abhängige Kultur	38
5.2.2 Nachweis der Reaktion von alkalischer Phosphatase.....	39
5.2.3 Immunhistochemischer Nachweis der Expression von SSEA-1 und Oct4	39
5.2.4 Durchflusszytometrische Analyse	39
5.3 Etablierung der kardialen Differenzierung	40
5.3.1 Differenzierung mittels der Hanging Drop Methode	40
5.4 Optimierung der Expansionskultur und der kardialen Differenzierung sowie deren Hochskalierung	42
5.4.1 Etablierung einer Feeder-freien Expansionskultur	42
5.4.2 Kardiale Differenzierung mittels Agarose Mikrowells (AMW)	44
5.5 RT-PCR Analysen über den Verlauf der kardialen Differenzierung der rPSC	49
5.6 Weitere Experimente und Optimierungen	51
5.6.1 Einfrieren und Auftauen von PSC aus Feeder-freier Monolayerkultur.....	51
5.6.2 Einfluss von fötalem Kälberserum auf die kardiale Differenzierungseffizienz.....	52
5.6.3 Differenzierung und Charakterisierung von Fibroblasten-ähnlichen Zellen aus riPSC	53
6 Diskussion	55
6.1 Expansionskultur der rPSC.....	56
6.2 Etablierung und Optimierung der kardialen Differenzierung von Ratten PSC.....	58
6.3 Morphologische und elektrophysiologische Charakterisierung von Ratten PSC	59
6.4 Differenzierung von Fibroblasten-ähnlichen Zellen aus riPSC.....	60
7 Ausblick	61
8 Zusammenfassung	62
9 Literaturverzeichnis	63
10 Appendix	74
11 Danksagung	81
12 Ehrenerklärung	83
13 Lebenslauf	Error! Bookmark not defined.

1 Einleitung

1.1 Herzerkrankungen

Der Begriff "kardiovaskuläre Erkrankung" (cardiovascular disease, CVD) definiert pathologische Veränderungen des Kreislaufsystems, Hypertonie, Klappenfehler sowie ischämische Herzerkrankungen, welche durch koronare Herzkrankheiten (*coronary heart disease*, CHD) verursacht werden und welche zu einem Myokardinfarkt (*myocardial infarction*, MI) führen können. Wie dem Bericht der Weltgesundheitsorganisation (WHO) [1] zu entnehmen ist, repräsentieren CVDs die häufigste Todesursache weltweit. Im Jahr 2012 verstarben ca. 17,5 Millionen Menschen an dieser Gruppe von Erkrankungen, was prozentual 31% aller Todesfälle entspricht. Im Vergleich dazu betrug die Mortalität in Deutschland 2014 sogar ca. 39% und liegt damit deutlich über dem weltweiten Anteil [2].

Die wichtigsten Risikofaktoren für Herzerkrankungen sind Tabak- und Alkoholkonsum, eine ungesunde Ernährung und Bewegungsmangel. Vor allem die letzten beiden Faktoren sorgen dafür, dass besonders Menschen in Industrienationen betroffen sind. In der klinischen Praxis wird Herzversagen bzw. eine schlechte Herzfunktion nach der Ätiologie oft in eine ischämische oder nicht-ischämische Kardiomyopathie kategorisiert. Erstere entsteht durch die Verschlechterung der Herzfunktion nach einer CHD, und wird als ischämische Kardiomyopathie (*ischemic cardiomyopathy*, ICM) eingestuft [3]. Letztere ist bedingt durch andere Ursachen, wie z.B. Klappenvitien, arterielle Hypertonie oder angeborene Herzfehler, und führt zu einer ventrikulären Dilatation, welche folglich als dilatative Kardiomyopathie (*dilated cardiomyopathy*, DCM) bezeichnet wird.

Die Mangel durchblutung der Herzkranzgefäße (Koronararterien), die im Rahmen einer CHD charakteristisch ist, kann zu einem Myokardinfarkt und im weiteren Verlauf zu einer Myokardnekrose führen. Durch die Unterversorgung mit Sauerstoff sterben Herzmuskelzellen ab. Zusätzlich führt die spontane Bildung von Kollateralen zu einem Ischämie-Reperfusionsschaden, der zu einem weiteren Verlust von Kardiomyozyten durch oxidativen Stress und folgender Apoptose führt. Das abgestorbene Gewebe wird in der Folge durch Bindegewebe ersetzt. Durch diese sogenannte Fibrose und Narbenbildung kommt es zu einer weiteren Verschlechterung der Herzfunktion.

1.2 Derzeitige Therapiemöglichkeiten

Derzeit wird das Herzversagen, je nach Schweregrad, mit Medikamenten, einer kardialen Resynchronisationstherapie, einer interventionellen Revaskularisierung, einer mechanischen Herzunterstützung oder einer Herztransplantation (HTx) behandelt. Die jeweilige Behandlungsstrategie wird nach den Leitlinien des American College of Cardiology Foundation

(ACCF/AHA) festgelegt, die die Herzinsuffizienz in 4 Stufen einteilt : A. Patienten mit hohem Risiko für Herzversagen aber ohne strukturelle Herzkrankheit oder Symptome von Herzversagen B. Strukturelle Herzkrankheit, aber ohne Anzeichen oder Symptome von Herzversagen C. Strukturelle Herzerkrankung mit früheren oder aktuellen Symptomen D. Therapieresistentes Herzversagen, welches spezielle Interventionen erfordert [3].

1.2.1 Medikamente und kardiale Resynchronisationstherapie

Der pharmakologische Therapieansatz ist der erste Behandlungsschritt und wird bereits ab Stufe A nach ACCF/AHA angewendet. Zu den verwendeten Medikamenten zählen Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer (ACE-Hemmer), Statine, Betablocker und Diuretika. Eine neue vielversprechende Wirkstoffgruppe für herzinsuffiziente Patienten sind Neprilysinhibitoren, die derzeit in einer festen Kombination mit Angiotensin -Rezeptor-Antagonisten eingesetzt werden [4]. Um einen plötzlichen Tod bei den Patienten mit verminderter linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF) von 30% oder weniger zu vermeiden, ist die Implantation von Defibrillatoren (ICD) eine empfohlene Maßnahme [3]. Bei schlechter LVEF und Linksschenkelblock kann eine kardiale Resynchronisationstherapie mit einem sogenannten 3-Kammerschrittmacher sinnvoll sein.

1.2.2 Invasive Behandlungen

Bei fortgeschrittenen Koronarstenosen ist eine interventionelle Therapie oder ein operativer Eingriff erforderlich, um einen Myokardinfarkt zu verhindern und einem Fortschreiten der ICM vorzubeugen. Mit diesen Maßnahmen kann minderdurchblutetes Myokard, sog. "hibernating myocardium" wieder reaktiviert werden und so die Herzfunktion verbessert werden. Durch eine perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) können Koronararterien mit einem Ballonkatheter eröffnet werden. Mit Stents werden die Koronargefäße von innen geschient und so eine kontinuierliche Öffnung erreicht [5, 6]. Bei einer fortgeschrittenen CHD, bei der alle drei koronaren Hauptgefäße betroffen sind oder der Hauptstamm der linken Herzkranzarterie involviert ist, sollte eine Bypass-Operation durchgeführt werden. Dabei werden autologe Gefäße von einer anderen Körperstelle (*Arteria thoracica interna*, *Arteria radialis*, *Vena saphena magna*) entnommen, um die verschlossenen Stellen zu überbrücken [6, 7].

1.2.3 Herztransplantation (HTx)

„Das Herz und die Rose sind das einzig Unvergängliche“ (Paracelsus, 1493-1541). Mit diesem Zitat ist der Schweizer Arzt und Philosoph leider im Unrecht. Die eingeschränkte regenerative Kapazität der Herzmuskelzellen nach Infarkt führt zu einer chronischen Fehlfunktion des Herzens. Diese kann im Endstadium nur mit einer allogenen Transplantation eines humanen Spenderherzens oder mit

einem mechanischen Herzunterstützungssystem behandelt werden. Seitdem die erste Herztransplantation im Jahr 1967 durch Christiaan Barnard in Kapstadt, Südafrika durchgeführt wurde [8], hat die Anzahl von Herztransplantationen weltweit stetig zugenommen [9]. Der begrenzende Faktor ist die derzeitig mangelnde Verfügbarkeit von Spenderorganen, die aus unterschiedlichen Gründen stagniert bzw. tendenziell abnimmt. Komplikationen, wie sie in den Anfängen dieser Therapie auftraten, konnten im Laufe der vergangenen Jahrzehnte deutlich vermindert werden. Durch die Weiterentwicklung von Immunsuppression, Hygiene, Antibiotikatherapie und neuer Operationstechniken konnte eine deutliche Steigerung des Patientenüberlebens erzielt werden. Eine Langzeituntersuchung von Roussel *et al.* zeigte, dass ca. 75% der herztransplantierten Patienten die ersten fünf Jahre und mehr als 58% der Patienten 15 Jahre nach der Transplantation überlebten [10]. Lund *et al.* berichten in einer retrospektiven Studie, dass sich die Überlebensrate nach Herztransplantation über die letzten 35 Jahre kontinuierlich verbessert hat. Derzeitig beträgt die mittlere Überlebensrate rund 11 Jahre [9]. Der Bedarf an transplantierbaren Organen, insbesondere Herzen, ist in einer alternden Gesellschaft hoch und steigt stetig weiter an. Laut Eurotransplant standen im Einzugsgebiet (Deutschland, Österreich, Ungarn, Slowenien, Kroatien, Benelux) im Jahr 2015 insgesamt 1.170 Patienten auf der Warteliste für eine HTx, 790 von diesen Patienten stammten aus Deutschland [11]. In Abbildung 1.1 ist die Entwicklung der Patientenzahlen auf der Warteliste für eine Herztransplantation dargestellt. Die Patientenzahlen sind bis 2012 gestiegen, haben aber in den letzten 3 Jahren wieder abgenommen. Die alternative Therapie mit LVAD als Destination-Therapie erklärt vermutlich die Abnahme der Neuanmeldungen für eine Herztransplantation [12].

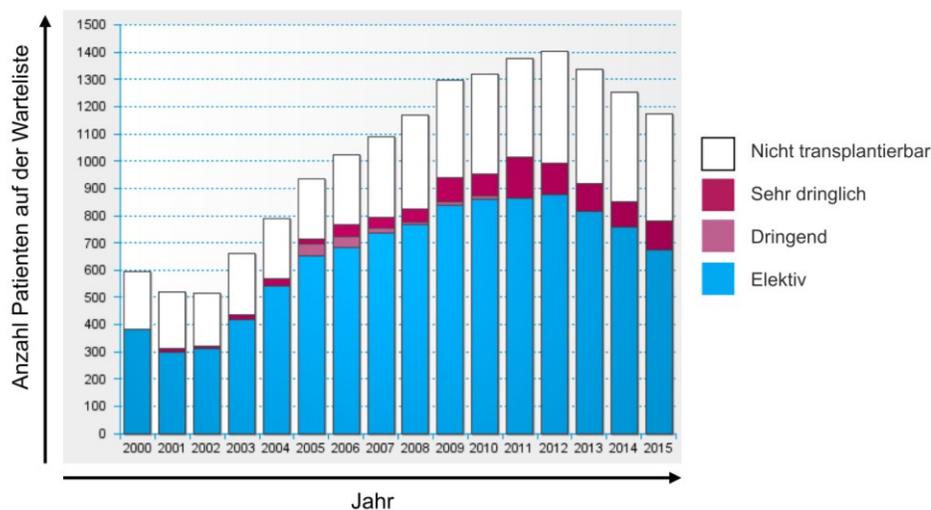


Abbildung 1.1: **Derzeitige Situation für Patienten auf der Warteliste für ein Spenderherz.** Warteliste für eine Herztransplantation im Eurotransplant-Einzugsgebiet aufgeschlüsselt nach Dringlichkeit am Ende des Jahres 2015 (modifiziert nach dem Eurotransplant Jahresbericht 2015).

Aufgrund der limitierten Anzahl an Spenderorganen konzentrieren sich Wissenschaftler auf die Etablierung alternativer Behandlungsmöglichkeiten.

1.2.4 Herzunterstützungssysteme

Die derzeit einzig klinisch erprobte und erfolgreich angewandte Alternative zur HTx sind ventrikuläre Unterstützungssysteme, sogenannte VADs (Ventricular Assist Devices). Aktuell bestehen diese Systeme aus einer kleinen Pumpe, die an die linke (und ggf. rechte Herzkammer) angeschlossen wird und einer Gefäßprothese, die mit der Aorta verbunden ist. Das Blut wird aus der linken Herzkammer abgesaugt und in die Aorta gepumpt. Damit wird die linke Herzkammer entlastet. Nur in seltenen Fällen ist eine dauerhafte Unterstützung der rechten Herzkammer mit einem zweiten Gerät erforderlich. Die Pumpe wird durch ein Kabel (Driveline), welches durch die Haut austritt, mit der externen Steuereinheit verbunden und mit Strom versorgt. Bereits 1966 wurde von Michael Ellis DeBakey das erste pneumatisch angetriebene pulsatile Kunstherz in Houston, Texas bei einer 37-jährigen Patientin implantiert. Da sich die Herzfunktion der Patientin verbesserte, konnte es nach 10 Tagen wieder explantiert werden [13, 14]. Seither gab es vielfältige Weiterentwicklungen auf diesem Gebiet. In Abbildung 1.2 ist die technische Entwicklung der Kunstherzen illustriert.

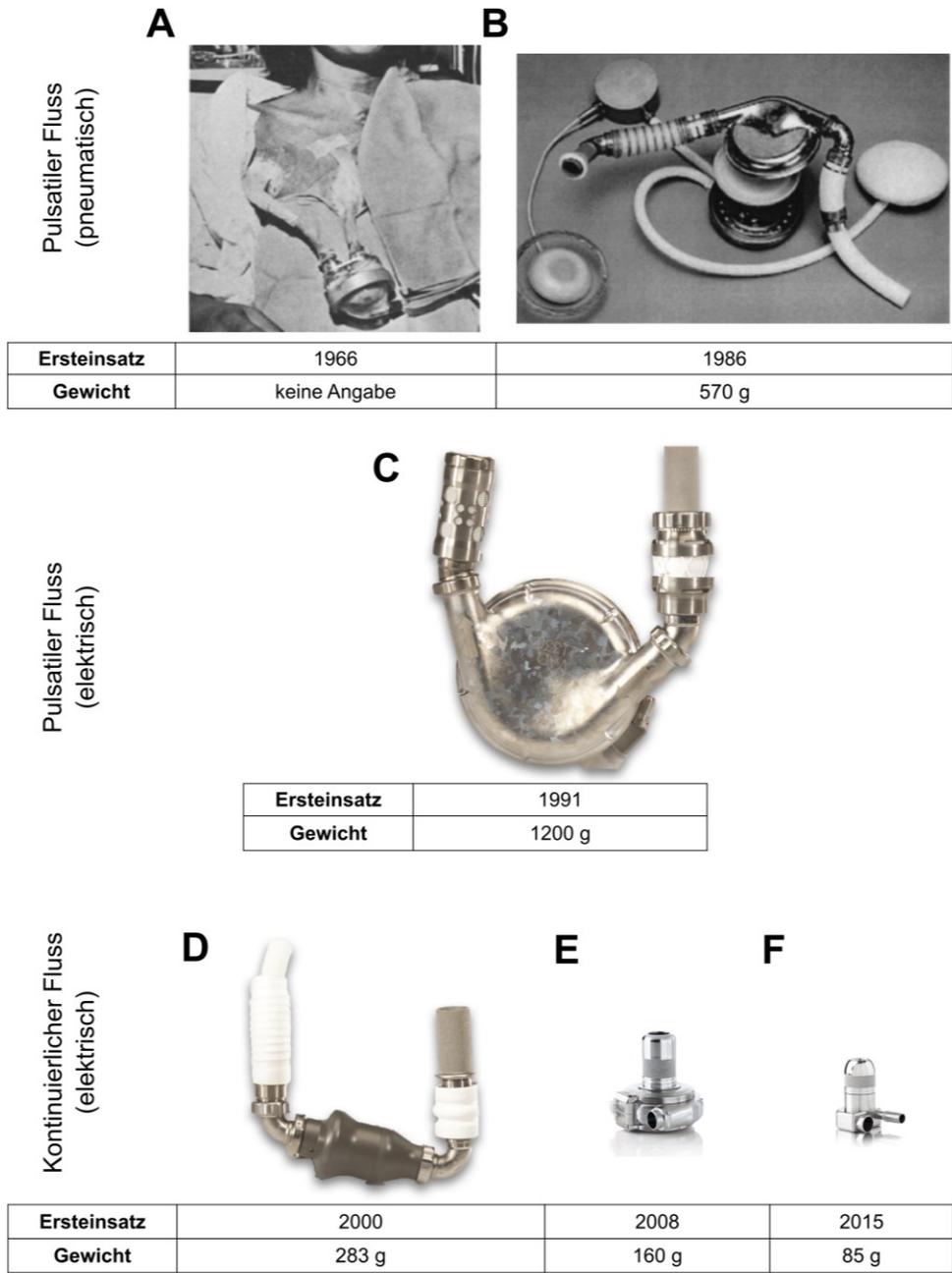


Abbildung 1.2: **Technische Entwicklungsstufen linksventrikulärer Unterstützungssysteme.** Exemplarische Geräte unterschiedlicher Hersteller. Die ersten VADs befanden sich außerhalb des Körpers und hatten einen pulsatilen Blutfluss **(A-C)** [13, 15-17]. Spätere Weiterentwicklungen basierten auf einem elektrischen Antrieb und kontinuierlichen Blutfluss und wurden im Laufe der Zeit weiter miniaturisiert **(D-F)**: Axiale Pumpe HeartMate II **(D)**, Zentrifugalpumpe HVAD **(E)**, Axiale Pumpe MVAD **(F)** [18, 19] (mit freundlicher Genehmigung der Firmen Thoratec and HeartWare: <https://www.thoratec.com/downloads/heartmate-ii-fact-sheet-b100-0812-final.pdf> & <https://www.heartware.com/resources>).

Je nach Funktionsart werden LVADs in zwei Gruppen unterteilt - pulsatile und nicht-pulsatile Unterstützungssysteme [20]. Die Behandlung mit einem "continuous flow" Unterstützungsgerät bei

Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz zeigte nach 2 Jahren eine signifikant höhere Überlebensrate als bei einer Behandlung mit einem pulsatilem Gerät [20]. Wie in einer internationalen multizentrischen Studie gezeigt werden konnte, beträgt die Überlebensrate nach LVAD-Implantation im ersten Jahr 84% und im zweiten Jahr 79% [21]. Diese Zahlen wurden auch im 7. jährlichen INTERMACS-Report nochmals bestätigt [12]. Diese Behandlungsmethode dient daher als Ultima Ratio bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz im Endstadium, die nicht für eine Transplantation geeignet sind [12, 22, 23]. Auch als vorübergehende Behandlung, z.B. bei einer Herzmuskelentzündung, oder zur Überbrückung bis zu einer Herztransplantation wird die LVAD-Therapie eingesetzt [12, 24].

Jedoch gibt es auch bei diesem Verfahren Komplikationen und Einschränkungen. Der größte Nachteil der VAD Therapie ist die Notwendigkeit einer permanenten Energieversorgung in Form externer Akkus. Diese sind mit einem Kabel, der sog. "Driveline", mit dem VAD verbunden, welche durch die Haut im Bauchbereich austritt. Auch die Notwendigkeit von Antikoagulantien, die zu einer Blutung und einem damit einhergehenden erhöhten Schlaganfall-Risiko führen können (häufigste Todesursache in den ersten 2 Jahren mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 20%) [12], ist ein weiterer Nachteil. Eine nicht regelmäßige Einnahme dieser Medikamente kann hingegen zu einer Thrombosebildung innerhalb der Pumpe führen. Auch besteht eine nicht zu unterschätzende Gefahr einer Driveline-Infektion. Die Häufigkeit einer Driveline Infektion liegt bei ca. 8% innerhalb von sieben Jahren Beobachtungszeitraum [12]. Des Weiteren können Komplikationen wie eine ventrikuläre Arrhythmie, Thrombosen, Hämolyse und technische Probleme am Kunstherz auftreten. [12, 25]. In dem aktuellen INTERMACS-Bericht wird gezeigt, dass mehr als 90% aller VAD Patienten in den ersten 36 Monaten aufgrund einer Komplikation rehospitalisiert werden [12].

1.3 Alternative Therapieformen im experimentellen Stadium

Zur Regeneration von infarziertem Herzmuskelgewebe werden derzeit verschiedenste Ansätze verfolgt. Eine Strategie ist die direkte *in vivo* Programmierung von Zellen des fibrotischen Infarktgewebes, meist Fibroblasten, hin zu funktionellen Kardiomyozyten [26]. Die Gefahr von ungewollten unspezifischen systemischen Nebeneffekten auf andere Gewebe stellt zurzeit eine große Herausforderung dieses Ansatzes dar, da als Vehikel für die Programmierungsfaktoren virale Vektoren verwendet werden. Durch die Verwendung von herzspezifischen niedermolekularen Substanzen zur Induktion von Kardiomyozyten könnte dieses Risiko eingedämmt werden, wie kürzlich beschrieben wurde [27]. Eine andere vielversprechende Strategie ist der Einsatz von nicht-kodierenden RNAs um die negativen Auswirkungen einer Ischämie-bedingten Remodellierung des Myokards zu verhindern, oder sogar darüber hinaus zu einer Regeneration des geschädigten

Myokards beizutragen [28, 29]. Eine mögliche Einschränkung dieser direkten *in vivo* Strategien ist sicherlich die Tatsache, dass in der ausgedünnten, narbigen Ventrikelwand bei ICM nur begrenztes Zellmaterial für die Transdifferenzierung zur Verfügung steht.

Eine weitere naheliegende Strategie ist die Restauration von verloren gegangenem Myokard mittels Zelltherapie. Der überwiegende Anteil der Zellen des menschlichen Körpers besteht aus gewebsspezifisch ausdifferenzierten Zellen, welche in ihrer Funktion determiniert sind. Demgegenüber sind Stammzellen undifferenzierte Zellen, welche die Fähigkeit haben sich unendlich zu vermehren und gewebsspezifisch differenzierte Tochterzellen zu produzieren [30]. In Bezug auf den Isolierungszeitpunkt der Stammzellen werden diese in embryonale, fötale und adulte Stammzellen eingeteilt [31].

1.3.1 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen befinden in allen Geweben des Organismus. Sie bilden die regenerative Ressource des Körpers. Die wohl bekanntesten Vertreter sind die hämatopoetischen Stammzellen (HSC) aus dem Knochenmark, welche in der Lage sind, alle Zellen des blutbildenden Systems bereitzustellen [32]. Dieser Stammzelltyp wird bereits seit Jahrzehnten im Rahmen der Leukämie-Therapie nach Chemotherapie und/oder Bestrahlung eingesetzt, um eine Wiederbesiedlung des Knochenmarks zu erreichen. Vor einigen Jahren wurden auch verschiedene Formen adulter Stammzellen für experimentelle Therapien des geschädigten Herzmuskels verwendet. Es wurde berichtet, dass die aus dem Knochenmark entstammenden Zellen (bone marrow derived cells, BMCs) ein hohes Potenzial für die myokardiale Reparatur aufweisen [33]. BMCs sind eine Mischung von verschiedenen Zelltypen. Insbesondere die hämatopoetischen Stammzellen (hematopoietic stem cells, HSCs) und die endothelialen Vorläuferzellen (endothelial progenitor cells, EPCs) im Knochenmark gelten als potenzielle Quelle für die Revaskularisierung der Infarktregion [33, 34]. Es ist jedoch sehr umstritten, ob eine Transdifferenzierung von HSCs und EPCs in KM möglich ist [35-38]. Wahrscheinlich sind die beschriebenen Funktionsverbesserungen vielmehr auf parakrine Effekte zurückzuführen. Vermutlich kommt es nach einer BMC-Transplantation zur verbesserten Neovaskularisierung durch Ausschüttung von proangiogenen Faktoren [39]. In weltweiten klinischen Studien, wurden BMCs zur Behandlung von Myokardinfarkten verwendet, allerdings ist die Datenlage aktuell uneinheitlich, und die Erfolgsrate ist Gegenstand kontroverser Debatten [40-44].

1.3.2 Pluripotente Stammzellen

Als pluripotent werden Zellen bezeichnet, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Derivate aller drei somatischen Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Endoderm) differenzieren können, Abbildung 1.3. Aufgrund dieser und ihrer zweiten Eigenschaft, ein nahezu unbegrenztes Potential zur Proliferation *in*

vitro zu besitzen, sind pluripotente Stammzellen (pluripotent stem cells, PSC) für die Forschung und die regenerative Medizin sehr vielversprechend [45]. Dies ist insbesondere für die klinische Anwendung von Bedeutung, da eine große Anzahl von Zellen für regenerative Therapien notwendig ist, um damit degenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Diabetes, koronare Herzkrankheiten und weitere zu behandeln. Zu den prominentesten pluripotenten Stammzellen in der Biomedizin gehören embryonale Stammzellen (embryonic stem cells, ESC) und induziert pluripotente Stammzellen (induced pluripotent stem cells, iPSC). Beide Stammzelltypen sind durch die Expression bestimmter Oberflächen-Marker (murin: SSEA1, SSEA3; human: SSEA3, SSEA4, Tra-1-60) und Pluripotenz-assoziiierter Transkriptionsfaktoren wie Oct3/4 und Nanog charakterisiert. Die klassische Kultivierung erfolgt je nach Spezies mit unterschiedlichen Medienzusätzen und teilweise in Ko-Kultur mit mitotisch inaktivierten murinen Fibroblasten [46-49].

1.3.3 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen sind pluripotente Zellen, die sich aus der inneren Zellmasse von Blastozysten aus *in vitro* Fertilisations (IVF)-Ansätzen isolieren lassen. Hierbei handelt es sich also um Zellen der frühen Embryonalentwicklung (Abbildung 1.3). Im Jahr 1981 konnte erstmals eine ESC-Linie aus murinen Blastozysten isoliert werden [46]. Erst etwa 16 Jahre später wurde von einer erfolgreichen Isolation humaner ESC berichtet [47]. Die Generierung Patienten-spezifischer ESC durch den somatischen Kerntransfer in entkernte humane Eizellen (SCNT), das sogenannte „therapeutische Klonen“ ist seit 2013 möglich [50]. Trotz vielversprechenden Anwendungsbereichen von humanen ESC in entwicklungsbiologischer Forschung und Medizin, gibt es in Deutschland rechtliche Einschränkungen aufgrund ethischer Bedenken, weil deren Gewinnung die Zerstörung von menschlichen lebensfähigen Embryonen voraussetzt [51]. Aufgrund des Embryonenschutzgesetzes ist hierzulande die Generierung von humanen ESC verboten, und die Verwendung von importierten hESC nur unter strengen Auflagen möglich [51]. Bei einer Verwendung von hESC für therapeutische Zwecke wäre eine immunsuppressive Therapie essenziell, da es sich - außer bei SCNT-Ansätzen - um eine allogene Transplantation handeln würde.

Nach der Etablierung von pluripotenten Stammzelllinien der Maus und des Menschen hat es relativ lange gedauert, bis die ersten ESC aus Ratten isoliert werden konnten. Mehrere Forschergruppen berichteten über pluripotente Stammzellen der Ratte, die aber aufgrund ihrer limitierten Eigenschaften im Bezug auf ihr *in vitro* Differenzierungspotential, Expression der üblichen Pluripotenzmarker und der fehlenden *in vivo* Teratombildung nur als ESC-ähnlich bezeichnet werden können [52-54]. Erst vor kurzem konnten die Kultivierungsmedien und weitere Voraussetzungen dahingehend optimiert werden, die Isolation und die stabile Expansion von Ratten ESC zu gewährleisten, die allen notwendigen Kriterien entsprechen [55-57]. Da Ratten im Vergleich zu Mäusen aufgrund ihrer Größe

und Physiologie eine höhere Relevanz als experimentelles Modellsystem für chirurgische Interventionen besitzen [58], kann diese Entdeckung als ein Meilenstein in der biomedizinischen PSC Forschung angesehen werden [52].

1.3.4 Induziert pluripotente Stammzellen

Auf der Grundlage von Erkenntnissen in der Charakterisierung von ESC konnte Shinya Yamanaka im Jahr 2006 erstmals zeigen, dass die Überexpression einer Kombination der Faktoren Oct3/4, SOX2, c-Myc und Klf4 die Pluripotenz von murinen embryonalen Hautfibroblasten induzieren kann [59]. Dieser Vorgang wird seither als „Reprogrammierung“ bezeichnet (Abbildung 1.3). Mit diesen Faktoren gelang es seinem Team ein Jahr später auch iPSC aus humanen Fibroblasten herzustellen [60]. Zeitgleich war auch das Team um den amerikanischen Biologen James A. Thomson mit der Reprogrammierung menschlicher Zellen mittels einer anderen Kombination von Transkriptionfaktoren erfolgreich [61]. Im Gegensatz zu den o.g. „Yamanaka-Faktoren“ wurden hier die Faktoren c-Myc und Klf4 mit NANOG und Lin28 eingesetzt, welche deshalb als „Thomson-Faktoren“ bezeichnet werden. Die iPSC besitzen sowohl morphologisch, als auch bezüglich ihres Differenzierungspotentials große Ähnlichkeit mit ESC. In der Tat ist der Hauptunterschied zwischen beiden Zelltypen ihr Ursprung. Wie zuvor erwähnt, werden die iPSC durch Induktion der Pluripotenz in somatischen Zellen erzeugt, während die ESCs aus der inneren Zellmasse von frühen Embryonen im Blastozystenstadium gewonnen werden. Im Vergleich zu ESC bieten iPSC einige Vorteile. Zum einen ist es sehr viel einfacher iPSC zu generieren als ESC, für deren Gewinnung eine spezielle Ausrüstung und große experimentelle Erfahrung erforderlich sind. Zum anderen kann eine Abstoßungsreaktion nach Transplantation vermieden werden, wenn die iPSC patientenspezifisch (autolog) erzeugt werden. Darüber hinaus besteht bei iPSC keine ethische Problematik, da für deren Herstellung keine potenziell lebensfähigen Embryonen zerstört werden müssen.

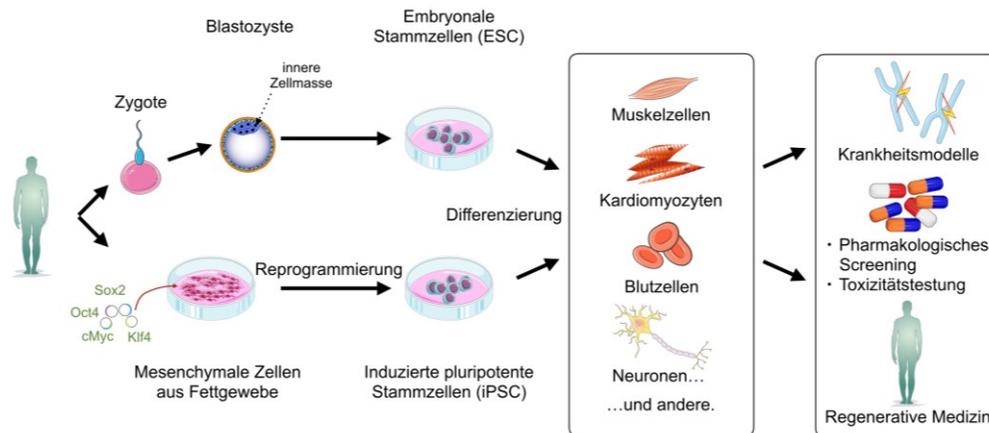


Abbildung 1.3: **Herstellungswiese und potentielle Anwendungsgebiete von embryonalen und induziert pluripotenten Stammzellen.** Bilder angepasst von Servier Medical Art (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

Ähnlich wie bei der Erstbeschreibung der Ratten-ESC führten die o.g. Verbesserungen der Kultivierungsbedingungen kurz darauf auch zur ersten erfolgreichen Generierung von Ratten-iPSC [62, 63].

1.3.5 Die kardiale Differenzierung embryonaler Stammzellen und induziert pluripotenter Stammzellen *in vitro*

Neben Zelltypen wie z.B. Neuronen, Hepatozyten und Blutzellen gelten Kardiomyozyten als äußerst interessante PSC-Derivate für die biomedizinische Forschung, da sie sich als Primärzellen schlecht isolieren lassen und in Kultur nicht proliferieren. Nachdem erstmals gezeigt werden konnte, dass murine und humane ESC *in vitro* zu funktionellen KM differenzieren [64, 65], folgten weitere Optimierungen zur Steigerung der Differenzierungseffizienz. Beispielsweise konnte 2003 erstmals gezeigt werden, dass Vitamin C als Zellkulturzusatz einen positiven Einfluss auf die kardiale Differenzierung von murinen ESC besitzt [66]. Weitere Verbesserungen der Kultivierungsbedingungen unter Verwendung von einfachen niedermolekularen Substanzen mit hoher Affinität zu bestimmten Signalproteinen haben dazu geführt, dass die Effizienz der kardialen Differenzierung, insbesondere von humanen PSC, deutlich gesteigert werden konnte. Ein stabiles Protokoll welches auf Basis der zeitlichen Modulation des Wnt-Signalswegs beruht, führte zu bis zu 98% reinen funktionalen humanen KM aus humanen ESC und iPSC [67]. Darüber hinaus können auch kardiale Vorläuferzellen effizient aus humanen PSC generiert und expandiert werden [68]. Allerdings gibt es zur Differenzierung von spontan kontrahierenden KM aus Ratten ESCs *in vitro* bisher nur einen Bericht [69]. Eingehende Studien über das myokardiale Differenzierungspotential von iPSC der Ratte sind in der Literatur bisher nicht beschrieben.

1.3.6 Strategien der myokardialen Zelltherapie

Neben der Verwendung für die Krankheitsmodellierung und für pharmakologische Testungen ist eine weitere mögliche Anwendung die Transplantation von ESC- oder iPSC-abgeleiteten KM zur myokardialen Restauration nach Herzinfarkt. Unterschiedliche Konzepte zur Applikation der Zellen sind im Folgenden zusammengefasst. Bezüglich der Invasivität der Behandlung und des Engraftments am Zielort, haben alle genannten Verfahren ihre Vor- und Nachteile. Da die Transplantation von adulten Stammzellen in klinischen Studien keinen zufriedenstellenden therapeutischen Effekt erzielen konnte [43], wird im Folgenden nur auf pluripotente Stammzellen eingegangen:

1.3.6.1 Einzelzell-Therapie

In ersten Tierversuchen mit dem Ziel der iPSC-basierten Myokardrekonstruktion wurden undifferenzierte iPSCs in das infarzierte Myokard (nach LAD-Ligatur) von immunkompetenten oder immundefizienten Mäusen appliziert [70]. Die Autoren berichteten, dass es bei den immundefizienten Mäusen zur Teratombildung kam, die immunkompetenten Mäuse jedoch nach 8 Wochen eine ausgeprägte Differenzierung in iPSC-abgeleitete KM, vaskuläre glatte Muskelzellen und Endothelzellen zeigten. Auch für ESC existieren Studien, die ähnliche Ergebnisse präsentieren [71, 72]. Diese Arbeiten wurden allerdings von anderen Wissenschaftlern in Zweifel gezogen, die ein ausgeprägtes onkogenes Potential von implantierten undifferenzierten PSC unabhängig vom Immunstatus des Empfängers beobachteten [73, 74]. Die direkte syngene Anwendung aufgereinigter mESC-abgeleiteter KM in infarzierte Mäuseherzen verhinderte zwar eine Verschlechterung der Herzfunktion [37], aber eine elektromechanische Integration konnte nicht nachgewiesen werden. Neben der geringen Überlebensrate injizierter Zellen in das Myokard (weniger als 40%), ging bereits die Mehrheit der Zellen innerhalb der ersten paar Stunden nach Verabreichung verloren [75]. Sowohl in xenogenen Ansätzen unter Verwendung spezieller transgener immunsupprimierter Tiermodelle, wie Nacktratten oder NOD-SCID Mäuse, als auch in Versuchen mit strenger pharmakologischer Immunsuppression (Cyclosporin A, Methylprednisolon, Abatacept (CTLA4-Ig), Tacrolimus u.a., allein oder in Kombinationen) kam es zu massivem Zellverlust nach Transplantation [75-77]. Neuere Studien zeigten, dass humane ESC-abgeleitete KM nach intramyokardialer Injektion in infarzierte Herzen von Kleintieren wie Ratten [78] oder Meerschweinchen [79] überlebten und elektrisch koppelten. Auch in diesen Fällen wurde eine verhältnismäßig große Zahl an humanen ESC-abgeleiteten KM injiziert, von denen nur ein Teil im Herzen verblieben und zur Regeneration beitrugen. Allerdings kam es nicht zu einer funktionellen Verbesserung der Herzleistung, sondern nur zu einer Stabilisierung der Herzfunktion im Verlauf. Nach Implantation von humanen ESC-

abgeleiteten Herzmuskelzellen in Schweinsaffen wurden relevante ventrikuläre Arrhythmien in allen behandelten Tieren beobachtet [80]. Die Autoren begründen dies mit der ähnlichen Herzfrequenz beider Spezies, wodurch Arrhythmien dominanter auftreten können. Dieser Effekt könnte noch durch das große Volumen des zellulären Implantats verstärkt werden, über welches eine kontinuierliche Reizweiterleitung gewährleistet werden muss. Eine andere Strategie für die Regeneration von infarzierten Herzen ist die Anwendung von *in vitro* vorgeformten Herzmuskelgewebe-Konstrukten, deren KM bereits ein funktionelles Synzytium ausgebildet haben. Dieser Ansatz wird als „myokardiales Tissue Engineering“ bezeichnet.

1.3.6.2 Myokardiales Tissue Engineering

Tissue Engineering (TE, engl. für Gewebezüchtung) bezeichnet die *in vitro* Herstellung von funktionellem Gewebe aus der Kombination von Zellen und extrazellulärer Matrix, um daraus geschädigte Teile von Organen zu ersetzen bzw. zu regenerieren. Auf dem Gebiet der Herzchirurgie wird myokardiales Tissue Engineering angewandt, um solides, kontraktiles Herzmuskelgewebe herzustellen [81-84]. Zur Transplantation geeignete Konstrukte sollten dreidimensional aufgebaut sein und über ausreichende aktive sowie passive Kraftentwicklung verfügen, damit sie dem hämodynamischen Druck innerhalb der Herzkammer Stand halten können. Als extrazelluläre Matrix wurden verschiedene Materialien verwendet. Diese bestanden entweder aus einer Mixtur verschiedener Matrixproteine (z.B. Fibrin & Matrigel) [85], oder waren ausschließlich Fibrin-basiert [86]. Es wurden dreidimensionale myokardiale Gewebekonstrukte aus humanem Kollagen, Hyaluronsäure und Alginat hergestellt, welche keine tierischen Komponenten mehr [84, 87]. Vollständig auf die Verwendung von zusätzlicher extrazellulärer Matrix verzichtet ein Ansatz, der sich die Eigenschaften von Poly(N-Iso-Propylacrylamid)(PIPAAm) beschichteten Zellkulturoberflächen zu Nutze macht. Bei Temperaturen von über 32°C ist diese Oberfläche hydrophob und erlaubt es Zellen, darauf zu wachsen. Sinken die Temperaturen auf unter 32°C wird die Oberfläche hydrophil, und der Zellrasen löst sich in seiner Gesamtheit vom Boden des Kulturgefäßes [88]. Eine Schichtung mehrerer Zellrasen aus murinen oder humanen PSC-abgeleiteten KM wurde in Transplantationsstudien verwendet [89, 90]. In einer proof-of-principle Studie mit primären KM aus der Ratte in einem syngenem System kam es nach epikardialer Transplantation zu einer deutlichen Verbesserung der Herzfunktion nach Infarkt [91]. Weitere Studien mit murinen und humanen PSC-abgeleiteten myokardialen Gewebekonstrukten zeigten, dass sich diese ebenfalls zur Funktionsverbesserung nach Myokardinfarkt verwenden lassen [92, 93]. Bei der Verwendung solider Gewebekonstrukte ist der Zellverlust durch Ausschwemmung deutlich reduziert. Allerdings war in allen Studien das Zellüberleben stark vermindert, da die Konstrukte vor Implantation keine funktionelle Vaskularisation besaßen. Darüber hinaus besitzen die Gewebekonstrukte eine

hohe metabolische Aktivität. Idealerweise sollten die Gewebekonstrukte vaskularisiert sein, um ausreichend Blut, Sauerstoff und Nährstoffen versorgt zu werden und um deren Metabolite zu entsorgen. Kleinere Konstrukte, wie z.B. multizelluläre KM-Sheets hingegen werden vermutlich recht schnell durch körpereigene Prozesse vaskularisiert [94].

Derzeitig haben alle vorgestellten Ansätze und verschiedenen Implantationsstrategien für die Zellbasierte Myokardrekonstruktion ihre Vor- und Nachteile. Allerdings erscheint die Verwendung von soliden Gewebekonstrukten die Kontrolle über die Positionierung und auch die Retention des Transplantats deutlich zu steigern. Nur ein Bruchteil der intramyokardial applizierten Zellen verbleiben im Myokard, das sie über das venöse System in die Lungenstrombahn ausgeschwemmt werden [95]. Auch epikardial transplantierte KM in Form von Gewebekonstrukte zeigen einen hohen KM-Verlust, vermutlich ischämisch bedingt durch mangelnde anfängliche Vaskularisation der verhältnismäßig großen Konstrukte [96]. Eine wichtige Rolle bezüglich Transplantatüberleben spielt die Abstoßungsreaktion zwischen Empfänger und Spendergewebe. Zwar werden immundefiziente Tiermodelle in den meisten xenogenen Transplantationsversuchen verwendet, allerdings verfügen diese Tiere über noch immunologisch aktive Zellen, die einen Einfluss auf das Transplantat überleben haben [97, 98]. Darüber hinaus, gibt es Hinweise, dass *in vitro* differenzierte PSC-KM auch im syngenem System zu einer Immunreaktion führen [99]. Daher sind entsprechend angelegte Studien notwendig, welche die Einflussgrößen auf das Zellüberleben beleuchten. Diese Studien sollten in einem klinisch relevanten Kontext stehen, also entweder im syngenem oder allogenen System erfolgen, und durch deren Umfang zu statistisch belastbaren Aussagen führen. Als ideales etabliertes und kostengünstiges Kleintiermodell kann seit neuestem auch die Ratte für solche Vorhaben herangezogen werden, da pluripotente Stammzellen (ESC und iPSC) seit kurzem verfügbar sind. Das Überleben und das therapeutische Potential von PSC-abgeleiteten KM könnte in diesem System optimiert werden, bevor sich der Fokus wieder auf die Anwendung in Großtiermodellen, wie z.B. nicht-humane Primaten richtet, deren Haltung erheblich teurer ist, und bei denen regulatorische Hürden Versuche an diesen Tieren deutlich erschweren. Daher ist die Charakterisierung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials von PSC der Ratte von größtem Interesse für die biomedizinische Forschung.

2 Zielsetzung

In der biomedizinischen Forschung wird derzeit große Hoffnung auf iPSC gesetzt, welche nicht nur als Modell für genetische Erkrankungen und pharmakologische Untersuchungen dienen könnten, sondern auch eine Grundlage für regenerative Therapien bilden. Die Myokardrekonstruktion mit autologen iPSC-abgeleiteten Herzmuskelzellen ist ein vielversprechender chirurgischer Ansatz, welcher vor der klinischen Translation am Tiermodell etabliert werden sollte. Bis heute fehlt ein geeignetes syngenes Kleintiermodell, an welchem sich chirurgische Interventionen am Herzen gut durchführen lassen ohne die Nachteile immunologischer Einschränkungen, welche bei allogenen und xenogenen Studien die Interpretation präklinischer Daten erschweren. Die Maus ist für eine reproduzierbare intramyokardiale Transplantation von solidem Gewebe zu klein. Seit Jahrzehnten ist die Ratte als eines der kleinsten Labor-Säugetiere gut etabliert, bei dem Herzinfarkte in reproduzierbarer Qualität durchgeführt werden können. Dementsprechend sind die Haltungs- und Vermehrungsbedingungen gut angepasst und es besteht ein detailliertes Wissen über deren Immunologie. Es existieren auch eine Reihe transgene und immundefiziente Rattenmodelle. Erst seit Neuestem gibt es jedoch pluripotente Stammzellen aus dieser Spezies. Bis heute existiert jedoch keine Studie über das kardiale Differenzierungspotential von Ratten iPSC.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit sollte ein Prozess zur effizienten kardialen Differenzierung von ESC und iPSC der Ratte etabliert werden. Hierfür sollten folgende Aufgabenstellungen bearbeitet werden:

- i. Etablierung einer robusten und skalierbaren Expansionskultur von rPSC
- ii. Charakterisierung der undifferenzierten rPSC über den Langzeitverlauf der Kultur
- iii. Etablierung und Optimierung eines skalierbaren kardialen Differenzierungsprotokolls für rPSC
- iv. Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der rPSC-abgeleiteten Herzmuskelzellen auf der Ebene von Genexpression, Proteinexpression und Elektrophysiologie

Dieses Projekt soll die Grundlage für die Produktion von dreidimensionalen myokardialen „all-rat“ Konstrukten bilden, die für zukünftige Transplantationsstudien in der Ratte verwendet werden können. Diese Arbeit soll einen Beitrag zur biologischen Herzmuskelrekonstruktion liefern, für deren klinische Translation noch einige Voraussetzungen erfüllt werden müssen.

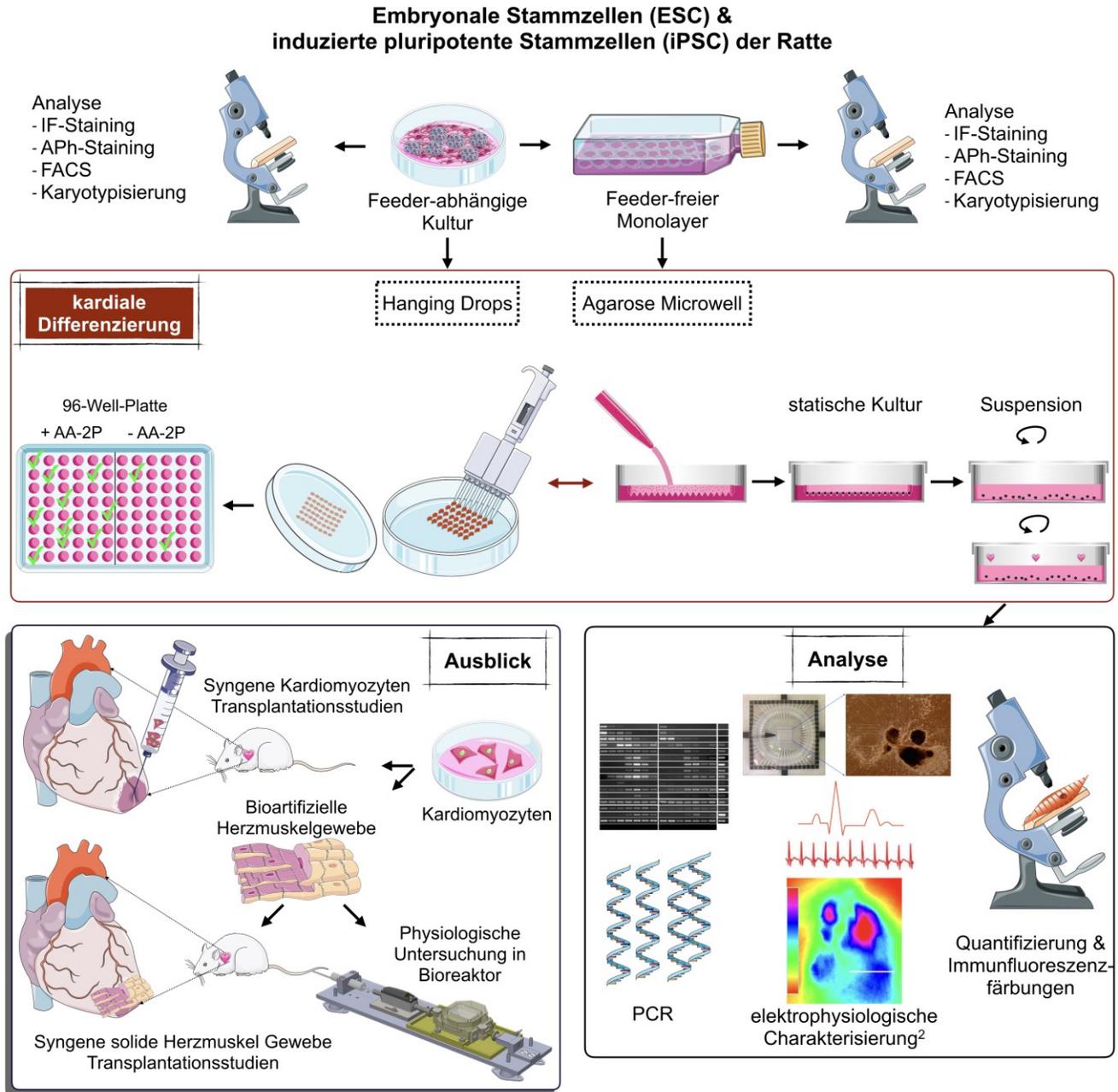


Abbildung 2.1: **Konzeptionelle Darstellung der Projekts.** IF-Staining: Immunfluoreszenz-Staining; APh Staining: Alkalische Phosphatase-Staining; FACS: Durchflusszytometrische Analyse. Bilder angepasst von Servier Medical Art (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>)

3 Materialien

Detaillierte Auflistungen der verwendeten Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien, spezieller Reagenzien, Medienzusätze, Antikörper, Färbepuffer und Details zu benutzter Software finden sich im Anhang.

3.1 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

3.1.1 MEF-Medium

Unbestrahlte und bestrahlte (30 Gy) murine embryonale Fibroblasten (MEF und γ MEF) wurden mit MEF-Medium, bestehend aus DMEM mit 10% fötalem Kälberserum (FBS), 1% L-Glutamin und 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAA), kultiviert.

3.1.2 Expansionsmedium für Ratten PSC (N2B27-Lif/2i)

Ratten PSC wurde in Ratten-Expansionsmedium kultiviert. Dieses bestand zu einem Teil aus DMEM/F12-N2 (DMEM/F12, ergänzt mit N2-Zusatz und 7,5% BSA) und zu einem Teil Neurobasal-B27 (Neurobasalmedium mit B27-Zusatz und 2 mM L-Glutamin) mit 100 μ M 2-Mercaptoethanol. Die Komponenten wurden gemischt und in 30 mL Aliquots bei -30°C gelagert. Vor Verwendung des Mediums wurde der Wachstumsfaktor LIF (Endkonzentration: 1000 U/mL) sowie der Glycogensynthase-Kinase 3 β -Inhibitor Chir99021 (Endkonzentration: 3 μ M) und der Mitogen-aktivierte Kinase Kinase-Inhibitor PD0325901 (Endkonzentration: 0,5 μ M) frisch hinzugefügt [55, 100].

3.1.3 Ratten-PSC-Differenzierungsmedium (rDM)

Zur Differenzierung von rESC und riPSC wurde serumhaltiges Ratten-PSC-Differenzierungsmedium (rDM) benutzt, welches sich aus IMDM + Glutamax mit 15% fötales Kälberserum (FCS), 1% NEAA, 100 μ M 2-Mercaptoethanol und 0,2 mM L-Glutamin zusammensetzte.

3.2 Zelllinien

3.2.1 Murine embryonale Fibroblasten (MEF)

Die MEF wurden aus E13 CRI:CD-1(ICR) Mausembryos (Charles River) isoliert.

3.2.2 Embryonale Stammzellen der Ratte (rESC)

Die rESC stammen aus Blastozysten der Dark Agouti Ratte. Es handelte sich um eine weibliche rESC-Linie, die von Prof. Austin Smith, Cambridge, UK, zur Verfügung gestellt wurde [101].

3.2.3 Induzierte pluripotente Stammzellen der Ratte (riPSC)

Die riPSC (Zelllinie T1/64) wurden aus mesenchymalen Stammzellen des Fettgewebes (rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, rADMSC) generiert, welche aus dem Fischer F344 Rattenstamm isoliert wurden. Für die Reprogrammierung wurden nicht-virale Vektoren, welche die Faktoren Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 enthalten, verwendet [63]. Es handelte sich um einen männlichen riPSC-Klon, der von Prof. Dr. Angelika Schnieke (TU München) zur Verfügung gestellt wurde.

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Allgemeine Bemerkungen

Alle Zell- und Gewebekulturen wurden in einem Zellkulturinkubator unter folgenden Bedingungen kultiviert: 37°C, 5% CO₂ und 80% Luftfeuchtigkeit. Suspensionskulturen wurden auf einem Orbitalshaker bei 60 rpm kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank mit Laminafluss durchgeführt. Alle verwendeten Materialien wurden zur Keimreduktion äußerlich mit 70%igem Ethanol behandelt.

4.1.2 Zellzählung

Zur Bestimmung von Zellkonzentrationen wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Nach der Zentrifugation der zu zählenden Zellen, wurde das Pellet je nach die Menge in einem entsprechenden Mediumvolumen resuspendiert. Dann wurden 10 µL der Suspension mit 90 µL Trypanblau (1:10) gemischt. Ein Tropfen der Zellsuspension wurde unter den Glasdeckel der Zählkammer gegeben. Unter einem inversen Mikroskop wurden die Zellen von toten Zellen mit Hilfe von Trypanblau unterschieden. Es wurden vier Großquadrate ausgezählt. Um die Zellzahl zu bestimmen wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{n}{Q \cdot V_K} \cdot \frac{V_G}{V_Z} = x$$

n : Anzahl der gezählten Zellen

Q : Anzahl der ausgezählten Großquadrate

V_G : eingesetztes Gesamtvolumen (Trypanblau + Zellsuspension) [mL]

V_Z : Volumen der eingesetzten Zellsuspension [mL]

V_K : Kammervolumen über einem Großquadrat (10⁻⁴ mL)

x : Zelldichte [Zellen/mL]

4.1.3 Kultivierung muriner embryonaler Fibroblasten (MEF)

4.1.3.1 Expansion, Bestrahlung und Einfrieren der MEF

Die in dieser Arbeit verwendeten MEF stammen aus CRI:CD-1(ICR) Mausembryonen (Charles River) an Tag 13 der Embryonalentwicklung. Zur Expansion wurden die MEF in adhärenter Kultur in Fibroblastenmedium kultiviert. Die Zellen wurden wöchentlich passagiert. Dazu wurden sie mit PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gespült, dann mit Trypsin-EDTA für ca. 5 min im Inkubator (37°) abgelöst. Die

Trypsinaktivität wurde mit fötalem Kälberserum (FCS, 15%iges Kulturmedium) gestoppt, dann wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Nach Zählung der Zellen wurden $1,5 \times 10^6$ auf jede neue Zellkulturschale (Fläche: 175 cm^2) ausplattiert (Abbildung 4.1 links). Zur mitotischen Inaktivierung wurden die MEFs in Passage 3-5 gesammelt und zentrifugiert. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/mL in 50 mL Zentrifugenröhren mit 30 Gy Gammastrahlung behandelt. Anschließend wurden die bestrahlten MEFs (jetzt Feederzellen) in verschiedenen Zellzahlen ($2,5/5/10 \times 10^6$) in kaltem Einfriermedium (90% Fibroblastenmedium, 10% Dimethylsulfoxid) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Zur Einhaltung eines konstanten Temperaturgradienten wurden die Kryoröhrchen beim Einfrieren in einem Einfriercontainer, der bei Lagerung in einem -80°C Gefrierschrank eine konstante Gefriertrate von $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ gewährleistet, aufbewahrt. Am Folgetag wurden sie zur Langzeitlagerung in eine -150°C Truhe überführt.

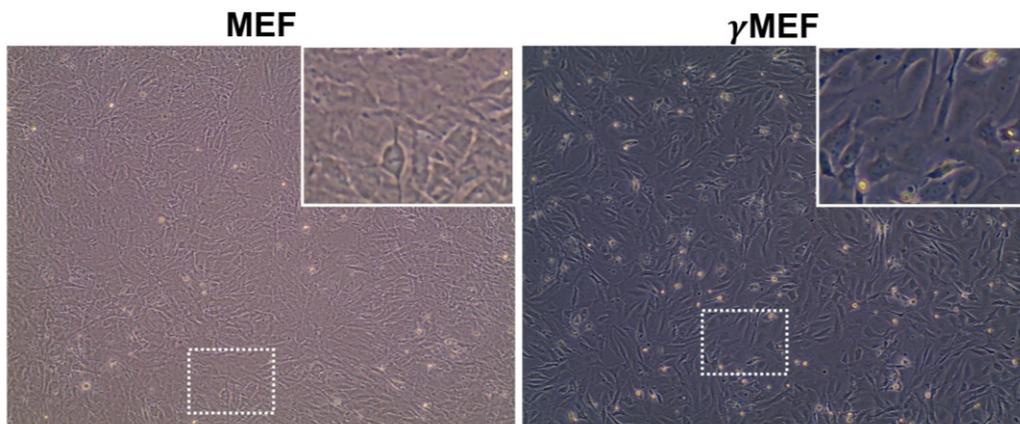


Abbildung 4.1: **Verwendete Feeder Zellen.** Morphologie der murinen embryonalen Fibroblasten (MEF, links) und der mitotisch inaktivierten MEF (rechts) nach Gammabestahlung mit 30 Gy.

4.1.3.2 Herstellung von Feederlayern aus mitotisch inaktivierten MEF

Die Zellkulturgefäße (6-Well Platten) wurden mit einem Monolayer aus mitotisch inaktivierten MEF (Feederlayer) beschichtet, um undifferenzierte pluripotente Stammzellen (PSC) in klassischer Feeder-abhängiger Kultur zu expandieren. Dazu wurden die Zellkulturgefäße für eine Stunde mit einer 0,1%igen Gelatinelösung (aus Schweinehaut) beschichtet. Dann wurde die Gelatine vollständig abgenommen und das Well mit PBS inkl. $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Im Anschluss wurden aufgetaute Feederzellen gezählt und in Fibroblastenmedium ausplattiert. Der Auftauprozess wurde wie folgt durchgeführt: Ein Kryoröhrchen wurde im Wasserbad (37°C) so lange geschwenkt, bis nur noch ein kleines Eisbröckchen übrig blieb. Die Zellsuspension wurde dann in ein mit 9 mL MEF-Medium vorbereitetes Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation (462 g , 5 min , 4°C) wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in $x \text{ mL}$ Medium resuspendiert ($x = \text{variabel}$, von Zellpellet

abhängig). Nach der Zellzählung wurden die Zellen in jedem 6-Well in einer Dichte zwischen $4\text{-}7 \times 10^5$ (je nach Anforderung) ausplattiert. Die Platten wurden in den CO_2 -Inkubator gestellt und zur gleichmäßigen Zellverteilung mehrfach horizontal und vertikal geschwenkt. Nach Anwachsen des Feederlayers wurden die Platten bis zu einer Woche zur Kultivierung von PSC verwendet (Abbildung 4.1 rechts).

4.1.4 Pluripotente Stammzellen der Ratte (rPSC)

4.1.4.1 Expansion und Subkultivierung

Die rESC und riPSC wurden mit N2B27-Lif/2i-Medium sowohl in einer klassischen Feederkultur als auch in einer feederfreien Kultur in Geltrex-beschichteten Zellkulturgefäßen expandiert.

Bei der klassischen Feederkultur wurden 6-Well Platten benutzt, auf welche 24 Stunden zuvor mitotisch inaktivierte MEFs ausgesät wurden (siehe 4.1.3). Kurz vor dem Passagieren wurde das Fibroblastenmedium abgenommen und der Feederlayer mit PBS inkl. $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Im Anschluss wurden 2 mL/Well N2B27-Lif/2i vorgelegt.

Durch Behandlung mit Accutase vereinzelte rPSC wurden auf die zuvor präparierten 6-Well Platten ausgesät (5×10^2 Zellen/ cm^2) und bildeten über einen Zeitraum von insgesamt vier Tagen Kolonien. Dabei wurde täglich nur ein Teil des Mediums gewechselt, da die Kolonien auf der Feederschicht leicht anhafteten und viele Zellen im Überstand schwammen. Die Kolonien wurden 96 Stunden nach dem Aussäen durch leichtes Klopfen an der Platte und vorsichtiges Waschen mit DMEM/F12 in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Kolonie-Suspension wurde im Anschluss bei $131 \times g$ und 21°C für 3 min. zentrifugiert, dann wurde der Überstand abgenommen und je nach Pelletgröße 500 bis 700 μL Accutase zugegeben. Um die Wirkung der Accutase zu verbessern, wurde das Röhrchen im Wasserbad bei 37°C für 3 min geschüttelt und danach zur Vereinzelung der verbliebenen Aggregate mehrmals trituriert. Die Enzymlösung wurde dann durch Zugabe von 7 mL DMEM/F12+Glutamax verdünnt, um die Reaktion zu beenden. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in N2B27-Lif/2i Medium resuspendiert, und die Zellen wie zuvor beschrieben gezählt. Im Anschluss wurden die Zellen entweder wieder auf eine Feederschicht ausplattiert oder für die feederfreie Monolayer-Kultur verwendet. Es wurden insgesamt 3 verschiedene Zelldichten getestet (2.500, 5.000 und 7.500 Zellen/ cm^2) und deren Verdopplungszeiten berechnet.

Die Zellen der klassischen Kultur wurden ebenfalls für die Etablierung der Differenzierung mit der Hanging Drop Methode verwendet (siehe 4.1.5). Hier wurde das Pellet allerdings nicht in N2B27-Lif/2i-Medium, sondern in Differenzierungsmedium (rDM) resuspendiert.

Für die feederfreie Kultivierung (Monolayer) wurden 3×10^5 riPSC bzw. 4×10^5 rESC in einer mit Geltrex beschichteten T25-Flasche, sowie 1×10^6 riPSC bzw. $1,2 \times 10^6$ rESC in einer mit Geltrex beschichteten T75-Flasche ausgesät. Der Mediumwechsel wurde täglich durchgeführt und die Zellen alle vier Tage

gesplittet. Direkt nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen und nach Zugabe von Accutase für 3 min bei 37°C inkubiert. Die Dissoziationsreaktion wurde wie oben beschrieben beendet. In einem 15 mL-Röhrchen wurden die rPSC gesammelt und bei $131 \times g$ und 21°C für 3 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellpellets mit einer variablen Menge Medium resuspendiert und gezählt. Die Zellen wurden entweder in N2B27-Lif/2i Medium auf Geltrex-beschichtete Kulturgefäße ausgesät oder in rDM für die Differenzierung verwendet (siehe 4.1.5).

4.1.4.2 Einfrieren und Auftauen

Die rPSC wurden bei -150°C gelagert. Das Einfriermedium bestand aus 90% kaltem N2B27-Lif/2i-Medium inklusive 10% DMSO. Zum Einfrieren der rPSC aus der klassischen Feeder-basierten Kultur wurden vollständige Kolonien nach vorsichtigem Waschen mit DMEM/F12 von einem 6er-Well in einem 15 mL-Zentrifugenröhrchen gesammelt und bei $131 g$ sowie 21°C für 3 min zentrifugiert. Das Kolonie-Pellet wurde in 500 μL kaltem N2B27-Lif/2i-Medium aufgenommen und in ein mit 500 μL N2B27-Lif/2i-Medium inklusive 20% DMSO vorbereitetes Kryoröhrchen gegeben. Die Komponenten wurden vorsichtig gemischt und wie in Abschnitt 4.1.3.1 beschrieben eingefroren. Wie zuvor beim Passagieren der PSC wurde auch für das Auftauen 24 Stunden zuvor für jedes Röhrchen ein 6er-Well mit Feedern vorbereitet. Das Kryoröhrchen wurde dann im warmen Wasserbad aufgetaut bis nur ein kleines Eisbröckchen übrig war. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt, welches mit 9 mL kaltem DMEM/F12 Medium vorbereitet wurde. Im Anschluss wurde es für 3 min bei $131 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes, wurde das Zellpellet in 1 mL N2B27-Lif/2i aufgenommen und in das vorbereitete Well gegeben. Das Einfrieren von Zellen einer feeder-freien Monolayer-Kultur wurde erstmalig durchgeführt. Wie auch beim Splitten wurden die Zellen der Monolayer-Kultur nach 4 Tagen abgelöst, in N2B27-Lif/2i-Medium aufgenommen und gezählt. Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen pro Kryoröhrchen in N2B27-Lif/2i inklusive 10% DMSO eingefroren. Beim Auftauen erfolgte das gleiche Protokoll wie bei der Kolonie-basierten Kultur. Der Inhalt eines jeden Kryoröhrchens wurde aufgetaut und in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Die aufgetauten Monolayerkulturen wurden dann über mehrere Passagen durchflusszytometrisch bzgl. Expression von Oct3/4 und kardialer Differenzierungseffizienz untersucht.

4.1.5 Ungerichtete Differenzierung von rPSC

4.1.5.1 Hanging Drop-Methode

Für die Etablierung der spontanen kardialen Differenzierung wurde die Hanging Drop-Methode [102] angewandt. Ausgangspunkt dieser Differenzierung war die feeder-abhängige Kolonie-Kultur. Die Kolonien wurden, wie beim Splitten, gesammelt und mit Accutase vereinzelt, um diese dann mit rDM aufzunehmen und zu zählen. Die Zellzahl wurde für jeden Tropfen auf 3.000 rPSC pro 33 μL rDM

eingestellt. Die ungerichtete Differenzierung startete mit der Produktion von Hanging Drops auf der Unterseite des Schalendeckels. Auf jeden Deckel einer sterilen 15 cm-Petrischale wurden mit einer elektronischen Mehrkanalpipette ca. 160 Tropfen gegeben. Anschließend wurde der Deckel mit einer zügigen Bewegung umgedreht und wieder auf die Schale gesetzt, welche zur Minimierung von Verdunstung 5 mL steriles H₂O enthielt (Feuchtkammer). Aufgrund der Schwerkraft bildeten sich nach zwei Tagen im Inkubator Aggregate im unteren Bereich des Tropfens, welche als „Embryoid Bodies“ (EBs) bezeichnet werden. Am zweiten Tag der Differenzierung wurden die EBs in 96-Well Platten überführt (1 Tropfen/EB pro Well), welche zuvor mit 1% Agarose/IMDM vorbereitet (40 µL/Well) und schließlich mit 100 mM Ascorbat-2-Phosphat (AA-2P) zu rDM (rDM+AA-2P) versetzt wurden. Ein halber Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage.

4.1.5.2 Agarose Mikrowell (AMW) Differenzierung

Zur Rationalisierung und Hochskalierung des Differenzierungsprotokolls wurden nicht zell-adhäsive Agarose Mikrowells (AMW) für die Aggregation von EBs verwendet [87]. Um AMWs herzustellen, wurde Agarose 1,5% in IMDM+Glutamax oder in DMEM in der Mikrowelle aufgekocht, steril filtriert und bei 60°C abgekühlt. Nach ca. einer Stunde wurden 2 mL Agarose/IMDM in jedes Well einer 12-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurde in jedes Well vorsichtig ein sterilisierter Silikonmaster mit der strukturierten Oberfläche nach unten platziert. Danach wurden die 12-Well-Platten für 30 min bei 4°C inkubiert, bis sich die Agarose/IMDM-Lösung verfestigt hatte. Anschließend wurde der Silikon Master wieder vorsichtig entfernt. Die so präparierten 12-Well-Platten wurden dann über Nacht mit rDM+AA-2P im Inkubator äquilibriert. Es wurden drei verschiedene Äquilibrierungsansätze getestet. Für die Äquilibrierung der AMWs, die mit Agarose/DMEM Medium hergestellt wurden, wurde DMEM verwendet und für die mit Agarose/IMDM hergestellten AMWs wurde entweder rDM oder konzentriertes rDM (mit der doppelten Menge FCS) genutzt. Am darauffolgenden Tag (Tag 0 der Differenzierung bzw. Tag 4 der Expansionskultur) wurden die Zellen der Monolayer-Kultur geerntet, in rDM aufgenommen und gezählt. Im Anschluss daran wurden die rPSC auf die vorbereiteten AMWs auf frischem rDM ausgesät. Die Zellen konnten sich in den Vertiefungen (Mikrowells) sammeln. Innerhalb von 48 Stunden wurden insgesamt 300 EBs pro AMW aggregiert, wobei je nach Dichte der eingesetzten Zellsuspension jeder EB aus entweder 2.000 oder 3.000 Zellen bestand. Am zweiten Tag der Differenzierung wurden alle AMWs vorsichtig geerntet, und die EBs aus zwei AMWs in eine 10 cm Suspensionschale in rDM+AA-2P Medium übertragen. Im Inkubator wurden die EBs auf einem Schüttler bei 60 rpm in Suspensionsschalen kultiviert. Im Anschluss erfolgte alle drei Tage ein Mediumwechsel mit rDM+AA-2P. Zwischen Tag 14 und Tag 16 wurden dann die kontrahierenden EBs gezählt. Von einer Differenzierung wurden an den Tagen d3, d5, d7, d14, d21, d28 EB-Pellets eingefroren, um diese für Expressionsanalysen zu verwenden.

4.1.5.3 Dissoziation von EBs zur Charakterisierung von einzelnen Kardiomyozyten (KM)

Für Immunfluoreszenzfärbungen und durchflusszytometrische Analysen wurden EBs vereinzelt. Dazu wurden die EBs zwischen Tag 14 und Tag 16 in 2 mL Reaktionsgefäßen gesammelt und mit einer niedrig-Kalziumlösung versetzt. Diese Lösung war zusammengesetzt aus: 120 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 5 mM Na-Pyruvat, 20 mM Glukose, 20 mM Taurin und 10 mM HEPES bei einem pH-Wert von 6,9 [103]. Die EBs wurden dann mit dieser Lösung für 5 min auf dem Thermomixer (37°C, 1.400 rpm) gewaschen und anschließend mit 500 x g für 1 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde Kollagenase B, 1 mg/mL (0,1%) gelöst in Niedrig-Ca²⁺ Lösung (inkl. 30 µM CaCl₂) zu dem Pellet gegeben und bei 37°C für etwa 90 min auf dem Thermomixer (1.400 rpm) geschüttelt. Während dieses Vorgangs wurde die Suspension alle 20 min trituriert. Nach Ablauf der 90 min war die Lösung trüb und keine EBs mehr zu erkennen. Daraufhin wurde die Suspension in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und mit DMEM/F12 versetzt, um durch Verdünnung die Aktivität der Kollagenase B zu verringern. Anschließend wurde die Lösung mit 500 x g für 7 min zentrifugiert und das Zellpellet in Medium aufgenommen und gezählt

Nach der Dissoziation der EBs wurden die Zellen in rDM auf Fibronectin-beschichtete Glasboden-Petrischalen (Fluorodish) für die Bestimmung der intrazellulären Kalzium-Oszillation und Immunfluoreszenzanfärbung ausplattiert bzw. für den durchflusszytometrischen Nachweis von kardialen Troponin T (cTNT) verwendet.

4.1.6 Differenzierung von Fibroblasten-ähnlichen Zellen aus riPSC

Für die Differenzierung von Fibroblasten-ähnlichen Zellen aus riPSC wurden undifferenzierte Kolonien aus der Feeder-abhängigen Kultur direkt in Suspension auf 6-Well Platten in rDM überführt. Über einen Zeitraum von 7 Tagen wuchsen Fibroblasten-ähnliche Zellen aus den Kolonien heraus. Diese konnten durch Behandlung mit Trypsin-EDTA vereinzelt werden wie für murine embryonale Fibroblasten beschrieben. Anschließend wurden diese Zellen wie für Fibroblasten beschrieben (Abschnitt 4.1.3.1) in MEF-Medium expandiert und kryokonserviert.

4.2 Histologische und Durchflusszytometrische Untersuchungen

4.2.1 Histologische Einbettung von Gewebeproben und EBs

Nach Entnahme und vertikalem Schnitt eines frischen Rattenherzes, wurde das Gewebe in ein Einbetttschälchen (Cryomold) mit Cryo-Einbettmedium (Tissue-Tek) eingebettet. Das Präparat wurde dann langsam in einen, mit 2-Methylbutan (Isopentan) gefüllten Becher gegeben, welcher bereits in einem Dewargefäß mit Flüssigstickstoff vorgekühlt war. Mit dem gleichen Prinzip wurden die EBs am Tag 14 der Differenzierung gesammelt und eingefroren. Anschließend wurden die Präparate bei

-80°C gelagert.

4.2.2 Kryoschnitte

Sowohl die rESC-EBs als auch die iPSC-EBs wurden zur weiteren Untersuchung am Kryostat verarbeitet. Es wurden 10 µm dicke Kryoschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Im Anschluss wurden die Schnitte über Nacht luftgetrocknet und dann bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.3 Immunfluoreszenzfärbung

Mittels der Immunfluoreszenz konnte das Vorhandensein einzelner Proteine sowie deren Lokalisation in den Zellkulturen oder Gewebeschnitten nachgewiesen werden. Dadurch wurde sowohl die Pluripotenz der rPSC als auch die der kardialen Marker in den rPSC-abgeleiteten KM überprüft. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindo (DAPI) gegengefärbt. Als Negativ-Kontrolle wurde bei jeder Färbung eine Isotyp-Kontrollfärbung mitgeführt, um unspezifische Antikörperreaktionen und damit falsch positive Signale auszuschließen. Als Positivkontrolle für die reifen KM wurden Kryo-Gewebeschnitte von Rattenherzen (Stamm: Wistar) verwendet.

Die Zellen wurden insgesamt dreimal mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und dann mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 10 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals sorgfältig mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen. Um unspezifische Anfärbungen zu minimieren, wurden die Präparate mit 5% des Serums der Spezies, in dem der sekundären Antikörper hergestellt wurde, in PBS bei Raumtemperatur blockiert. Das in diesem Puffer enthaltene Triton X-100 (0,5%) diente zur gleichzeitigen Permeabilisierung der Zellmembran. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (siehe Anhang) erfolgte in PBS mit 1% bovinem Serumalbumin und 0,5% Triton X-100 bei leichtem Schütteln für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C.

Nach dreimaligem waschen mit PBS wurde der in gleichem Färbepuffer verdünnte Sekundärantikörper (siehe Anhang) zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Präparate nochmals mit PBS gewaschen und Zellkerne mit DAPI für 10 min gegengefärbt. Nachdem die Zellen wiederholt mit PBS gewaschen wurden, konnten sie mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Evos FL Auto analysiert werden oder sie wurden bis zur Analyse bei 4°C gelagert. Nach dem gleichen Protokoll wurden die vereinzelt EBs zwischen Tag 14 und Tag 16 der Differenzierung gegen kardiale Marker gefärbt. Die Gewebeschnitte wurden zuerst mit einem Fettstift umrandet und dann für 10 min getrocknet. Anschließend wurde nach demselben Protokoll gefärbt. Am Ende wurden die Objektträger luftblasenfrei mit Eindeckmedium und einem Deckglas versehen und für einige Stunden getrocknet. Als Negativ-Kontrolle wurde eine Isotyp-Kontrolle verwendet.

4.2.4 Alkalische Phosphatase-Färbung

Im Allgemeinen zeigen pluripotente Stammzellen eine erhöhte Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase (APh) in der Plasmamembran. Die rPSC wurden mit 4% PFA für 90 s fixiert. Nachdem das Fixiermittel abgesaugt wurde, wurden Zellen mit Spülpuffer (TBS + 0,05% Triton X-100) behandelt. Es wurde das „Alkaline Phosphatase Detection Kit“ der Firma Merck/Millipore nach Herstellerangaben verwendet. Durch eine Ausfällungsreaktion kommt es zu einer Violettfärbung von APh-positiven Zellen.

4.2.5 Durchflusszytometrie

Einzelzellsuspensionen von undifferenzierten rESC und riPSC sowie vereinzelter EB wurden unter Verwendung eines Durchflusszytometers (FACS Canto II) analysiert und die Daten mithilfe der FlowJo Software (Tree Star, Inc.) ausgewertet. Zur Vorbereitung der Analyse wurden die nachfolgend beschriebenen Schritte durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur für 10 min fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und bei 200 x g bei Raumtemperatur für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 mL eiskaltem 90%igem Methanol für 15 min bei 4°C inkubiert. Um das Methanol zu entfernen, wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und bei 200 x g für 3 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurden die fixierten Zellen mit FlowBuffer-2 (PBS, 0,5% BSA, 1% Triton X-100) für 20 min inkubiert. Über Nacht wurde dann der primäre AK bei 4°C auf den Zellen belassen. Am darauffolgenden Tag wurde mit Flow Buffer-2 gewaschen und der Sekundärantikörper im gleichen Puffer verdünnt für eine Stunde inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet mit FlowBuffer1 (PBS, 0,5% BSA) resuspendiert und mit PBS gewaschen. Schließlich waren die Zellen für die Analyse mit dem Durchflusszytometer bereit. Isotyp-Kontrollfärbungen wurden immer parallel durchgeführt. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden von Frau Marion Möckel durchgeführt.

4.3 Funktionelle Charakterisierung der riPSC-abgeleiteten KM

Die PSC-abgeleiteten KM wurden elektrophysiologisch charakterisiert. Hierfür wurden die kontrahierenden EBs am Tag 16 der Differenzierung auf Multi-Elektroden-Arrays (MEA, MultiChannel Systems, Reutlingen) ausplattiert, welche zuvor mit Fibronectin (25 µg/ml) beschichtet wurden. Die MEA-Chips beinhalteten 64 Titannitrid-Elektroden mit einem Durchmesser von jeweils 30 µm angeordnet in einem Gitter von 8x8 Elektroden mit einem Abstand von 200 µm zwischen einzelnen Elektroden. Diese erlauben eine Detektion von Feldpotentialen, wie sie bei elektrisch aktiven Zellen, wie Neuronen oder KM, in unmittelbarer Nähe auftreten. Standardmäßig wurden die Messungen bei 37°C in Differenzierungsmedium durchgeführt. Zur β -adrenergen Stimulation erfolgte die Zugabe von

10 μM Isoproterenol. Die physiologische Reaktion auf die Zugabe von 30 μM Quinidin und 1 mM Lidocain wurde auch untersucht. Die Auswertung erfolgte anschließend mit der Software MC Rack (Multichannel Systems, Reutlingen) und GraphPad Prism.

Aktionspotentiale (APs) der einzelnen KM wurden nach der Vereinzelung der EBs mittels der Patch-Clamp-Methode von Dr. Thomas Munsch vom Institut für Physiologie gemessen.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Isolation von Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) aus Zellen

Alle Schritte der Isolierung und Fällung von RNA wurden unter einem Chemikalien-Abzug durchgeführt und zuvor alle Oberflächen zur Reduktion von RNasen mit RNase Away gereinigt. Die verwendeten Filter-Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße waren laut Hersteller RNase-frei. Die Proben wurden während des Prozesses ständig auf Eis gelagert und die Zentrifugationsschritte durchweg bei 4°C durchgeführt. Alle Zellpellets wurden in 1,5 mL Reagenzgefäßen bei -80°C aufbewahrt und direkt nach dem Auftauen für die Isolation von RNA verwendet. Die Proben bestanden aus jeweils ca. 600 EBs verschiedener Differenzierungszeitpunkte von rESC- und riPSC-Differenzierungen. Als entsprechende Positivkontrolle für die kardiale Genexpression wurde RNA aus adultem Rattenherz isoliert.

Zu dem Zellpellet/Gewebestück wurde zunächst 1 mL TRIZOL-Reagenz gegeben, gemischt und die Lösung anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 μL Chloroform hinzugefügt und das Röhrchen für 15 s geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 3 min bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgefäß bei 12.000 x g für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Phase im oberen Bereich des Reaktionsgefäßes enthielt die RNA und wurde in ein neues, RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Danach erfolgte die Zugabe von 1 μL RNase-freiem Glykogen. Anschließend wurden 500 μL eiskaltes Isopropanol hinzugegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 min bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum sorgfältig entfernt und das Pellet in 1 mL 80%igem eiskaltem (-20°C) Ethanol gewaschen. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß für 5 min bei 7.500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum vollständig entfernt und das Pellet 5 bis 10 min getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das RNA-Pellet bei 60°C in 11 μL RNase-freiem Wasser gelöst. Im Falle eines sehr großen Pellets wurde das Volumen des Wassers so angepasst, dass die Konzentration gemessen werden konnte. Die Konzentration wurde in einem Nano-Volumen-Photometer quantifiziert, und gleichzeitig die Reinheit der RNA überprüft.

Zum Entfernen von Kontaminationen, wie Phenol und Salzen, wurde zuerst ein Probevolumen mit RNase-freiem Wasser auf 450 μL aufgefüllt. Danach wurden 50 μL 3 M Natriumacetat-Lösung (pH

5,2) sowie 1 mL 96%iges Ethanol zu den Proben gegeben und gut vermischt. Im Anschluss erfolgte die Fällung bei -80°C für mindestens 30 min. Die Proben wurden dann bei $12.000 \times g$ für 20 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Danach wurden die Proben zweimal mit eiskaltem 75%igem Ethanol gewaschen und erneut bei $7.500 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand wiederum vollständig entfernt und das Pellet für 5 bis 10 min luftgetrocknet. Nach der Zugabe von $11 \mu\text{L}$ (oder mehr, je nach Größe des Pellets) RNase-freiem Wasser, wurde dies für 10 min bei 60°C gelöst. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde erneut gemessen, bevor die Proben entweder bei -80°C gelagert oder direkt zur cDNA-Synthese verwendet wurden.

4.4.2 Herstellung DNA-freier RNA und cDNA-Synthese

Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurde vor der cDNA-Synthese ein DNase-Verdau durchgeführt. Es wurden $1 \mu\text{g}$ RNA eingesetzt und in ein PCR-Röhrchen überführt. Hinzugefügt wurde dann in folgender Reihenfolge:

1. $x \mu\text{L}$ RNase-freies Wasser (auf ein Endvolumen von $10 \mu\text{L}$ summiert),
2. $1 \mu\text{L}$ 10x Reaktionspuffer
3. $1 \mu\text{L}$ RNase-freier DNase I und
4. $1 \mu\text{g}$ RNA

Anschließend wurde alles vorsichtig gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde $1 \mu\text{L}$ EDTA (50 mM) zugegeben und die Lösung bei 65°C für 10 min inkubiert, um die DNase I zu inaktivieren. Die DNA-freie RNA wurde dann direkt für die Synthese von einzelsträngiger komplementärer DNA (cDNA) verwendet (Reverse Transkription). Für diesen Prozess wurde das „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit“ benutzt. Als Negativ-Kontrolle diente eine Reverse-Transkriptase-Minus-Probe (RT-). Diese Kontrolle ermöglichte den Ausschluss einer Kontamination der Proben durch genomische DNA.

Die Synthese von cDNA wurde entsprechend der Herstelleranleitung durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Halbierung der DNA-freien RNA-Proben ($5 \mu\text{L}$ pro Probe). Zu den Proben wurde dann $1 \mu\text{L}$ Random Hexamer Primer und $6 \mu\text{L}$ RNase-freies Wasser gegeben, gemischt und bei 65°C für 5 min inkubiert. In folgender Reihenfolge wurde zur Lösung gegeben:

Tabelle 4.1: Pipettierschema reverse Transkription

Komponente	RT+	RT-
5x Reaktionspuffer	$4 \mu\text{L}$	$4 \mu\text{L}$
Ribolock RNase Inhibitor (20 U/ μL)	$1 \mu\text{L}$	$1 \mu\text{L}$
10 mM dNTP Mix	$2 \mu\text{L}$	$2 \mu\text{L}$

RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/ μ L)	1 μ L	
Wasser, Rnase-frei		1 μ L
Endvolumen	20 μ L	20 μ L

Dieser Ansatz wurde gut gemischt und für 5 min bei 25°C und sofort danach für 60 min bei 42°C inkubiert. Durch Erhitzung auf 70°C für 5 min wurde die Reaktion durch Inaktivierung des Enzyms beendet. Zum Schluss wurde die cDNA 1:5 mit Rnase-freiem Wasser verdünnt und bei -80°C gelagert, um diese direkt nach dem Auftauen für die RT-PCR zu verwenden.

5.4.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Analyse genomischer DNA der Zellen wurde das PCR Verfahren angewendet. Dabei wurden viele identische Kopien von der Matrizen-DNA angefertigt, indem immer zwei komplementäre Oligonukleotidprimer verwendet wurden, die jeweils eine Basenfolge besitzen, welche an einem der jeweiligen Enden der gewünschten DNA Sequenz (3'- und 5'-Ende) binden können. Dadurch startet die selektive Amplifikation. In einem Thermocycler lief die PCR in mehreren Schritten. Bei 95°C für 1 min wurde in der Denaturierungsphase der DNA-Doppelstrang aufgespalten. Dann erfolgte die Primerbindung, bei einer optimierten Bindungstemperatur (zwischen 50°C und 70°C für 30 sec), wobei jeweils ein Primer an einen der beiden DNA-Einzelstränge anlagert. Im nächsten Schritt bindet die thermostabile DNA-Polymerase und die gewünschte DNA-Sequenz wird von 5'- in 3'-Richtung synthetisiert (bei 72°C für 60 sec). Nach mehrfacher Wiederholung dieses PCR-Zyklus (30-40 Mal) oder der sog. Vervielfältigung, erfolgt eine finale Verlängerungsphase für 5 min bei 72°C, danach kühlt der Thermocycler auf 4°C ab und beendet damit die PCR.

Für die Reaktion wurde der 2x DreamTaq Green PCR Mastermix verwendet, welcher neben der DreamTaq DNA-Polymerase auch dNTPs (jedes 0,4 mM), Taq DNA-Polymerase-Puffer und MgCl₂ (4 mM) in einem optimierten Verhältnis enthielt.

Tabelle 4.2: Zusammensetzung der PCR-Reaktion

Komponente	Volumen
DreamTaq Green PCR Master Mix 2x	12,5 μ L
Forward Primer	1,0 μ L
Reverse Primer	1,0 μ L
cDNA Template	4,0 μ L
Wasser, RNase-frei-	6,5 μ L
Gesamtvolumen	25,0 μ L

Ein Mastermix wurde von diesen Komponenten angesetzt und in Abhängigkeit von der Anzahl der Reaktionen (21 μ L/Reaktion) auf mehrere PCR-Röhrchen verteilt. Hinzu wurden dann 4 μ L der

Template-DNA gegeben. Nach Mischung und Zentrifugation dieses Ansatzes wurde das vorgeschriebene PCR Programm (wie in Tab. 4-1 dargestellt) im Thermocycler gestartet. Zum Schluss wurden die Produkte der PCR entweder für die Agarose-Gelelektrophorese verwendet oder bei -20°C eingelagert.

Tabelle 4.3: PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1- Initiale Denaturierung	95°C	1 min	1
2- Denaturierung	95°C	30 sec	30-40x
3- Primerbindung	Je nach Primer	30 sec	
4- Elongation	72°C	1 min	
5- Abschließende Elongation	72°C	5 min	1
6- Ende	4°C	∞	1

Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Primer und Primerbindungstemperaturen findet sich im Anhang.

5.4.4 Agarose Gelelektrophorese

Zur Identifizierung der DNA-Fragmente wurde die Gelelektrophorese angewandt. Aufgrund der DNA-Phosphatgruppe, hat die DNA eine negative Ladung. Durch das Anlegen einer Gleichspannung wandert die DNA in dem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Größe des jeweiligen DNA-Fragments bestimmt dessen Wanderungsgeschwindigkeit, was zu einer Auftrennung der Fragmente im Gel führt.

In dieser Arbeit wurden 1,5%ige und 2%ige (w/v) Agarose-Gele verwendet. Um diese herzustellen wurden 1,5 bzw. 2 g Agarose in 100 mL 1x TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer unter Aufkochen gelöst. Danach wurde Ethidiumbromid, ein in Nukleinsäuren interkalierender Farbstoff, in einer Endkonzentration von 1 mg/L zugegeben und gut gemischt. Dieser Farbstoff dient zur Visualisierung von DNA unter UV-Licht, da er unter diesen Bedingungen fluoresziert. Das Gel wurde in eine Gelgießvorrichtung gegossen und ein Spacer für die Generierung von Ladetaschen eingesetzt. Sofort nach Erstarren des Gels wurde es in eine Elektrophorese-Kammer gelegt, die zuvor mit ausreichend 1x TAE Puffer vorbereitet wurde. Erst im Anschluss daran wurde der Spacer entfernt. Es folgte die Auftragung der PCR-Produkte in die Taschen des Gels. Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe erfolgte bei einer Spannung von 130 V sowie einer Dauer von 60 min. Schließlich konnte mit Hilfe von UV-Licht (300 nm) das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Bei jedem Lauf diente ein mitaufgetragener Größen-Marker zur Abschätzung der Fragmentlänge.

4.4.3 Mikrosatelliten-Genotypisierung

Zur Verifizierung der Identität der verwendeten Ratten PSC wurde eine Mikrosatelliten Genotypisierung durchgeführt. Hierfür wurde genomische DNA mittels der QuickExtract DNA Extraktionslösung (Epicentre) aus undifferenzierten rESC und riPSC isoliert. Primer-Sequenzen und speziesspezifische Fragmentlängenpolymorphismen sind im Materialteil im Anhang aufgeführt. Je 200 ng genomische DNA wurden für die PCR-Reaktion eingesetzt und über Gelelektrophorese aufgetrennt und dokumentiert.

4.5 Statistische Analyse

Die GraphPad Prism Software (Version 7 for Mac OS X) wurde für statistische Analysen verwendet. Alle Werte sind Mittelwerte mit Standardfehlern des Mittelwerts (SEM). Wenn nicht anderweitig angezeigt, wurde der Student t-Test für statistische Analysen verwendet. Ein P-Wert von $<0,05$ wurde als signifikant angenommen.

5 Ergebnisse

Die Ratten ES-Zelllinie (rESC) wurde von Prof. Austin Smith, Cambridge Stem Cell Institute und die iPSC-Zelllinie (riPSC) von Prof. Angelika Schnieke, Technische Universität München zur Verfügung gestellt [63, 101]. Auf Grundlage dieser Zellen wurde die Kultivierung der undifferenzierten rPSC etabliert und die Expression der Pluripotenzmarker im Verlauf der Kultur geprüft. Dies ermöglichte schließlich die Etablierung der angestrebten kardialen Differenzierung sowie deren Hochskalierung.

5.1 Überprüfung der Identität der verwendeten Ratten PSC Linien

Da die beiden untersuchten rPSC-Linien von Kollegen aus unterschiedlichen Forschungseinrichtungen stammen, wurde eine Mikrosatelliten-Genotypisierung durchgeführt, um die stamm-spezifische Identität zu überprüfen. Unterschiedliche Rattenstämme können durch sogenannte Mikrosatellitenpolymorphismen identifiziert werden. Die untersuchten rPSC-Linien zeigten das erwartete Bandenmuster und konnten somit eindeutig den Rattenstämmen Dark Agouti für rESC und Fischer344 für riPSC zugeordnet werden (Abbildung 5.1).

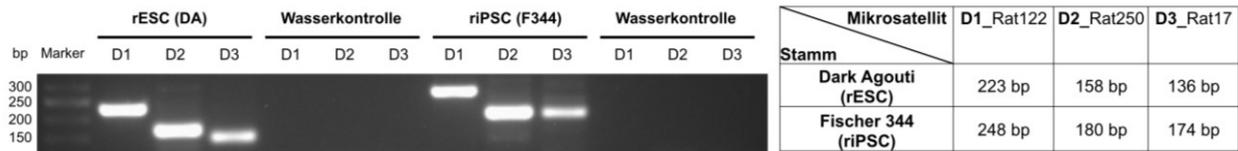


Abbildung 5.1: **PCR-Genotypisierung der rPSC basierend auf Mikrosatellitenpolymorphismen.** Beide rPSC-Linien zeigten die erwarteten Rattenstamm-spezifischen Amplifikationsmuster, welche rechts tabellarisch dargestellt sind. D1-D3: Mikrosatelliten, bp: Basenpaare.

5.2 Etablierung der Expansionskultur der rPSC

5.2.1 Morphologie der rPSC in der klassischen Feeder-abhängige Kultur

Die undifferenzierten rESC sowie riPSC ließen sich effektiv in der klassischen Feeder-Kultur in serum-freiem N2B27-Lif/2i-Medium expandieren. Beide Zelltypen zeigten eine sehr ähnliche Morphologie (Abbildung 5.2 A). Nach der Aussaat von Einzelzellen auf konfluenten Feeder-Layern wuchsen die Zellen als dreidimensionale, kugelartige multizelluläre Kolonien, zum Teil schwimmend oder schwach adhärent. An Tag 4 nach der einzelligen Aussaat waren die Kolonien groß genug, um sie weiter zu passagieren. Die errechnete Verdopplungszeit zeigte keinen signifikanten Unterschied im Proliferationsverhalten zwischen der Kontroll-Zelllinie (rESC) und den riPSC ($25,3 \pm 0,80$ h, $n = 20$ vs. $25,5 \pm 1,3$ h, $n = 20$; Abbildung 5.2 B).

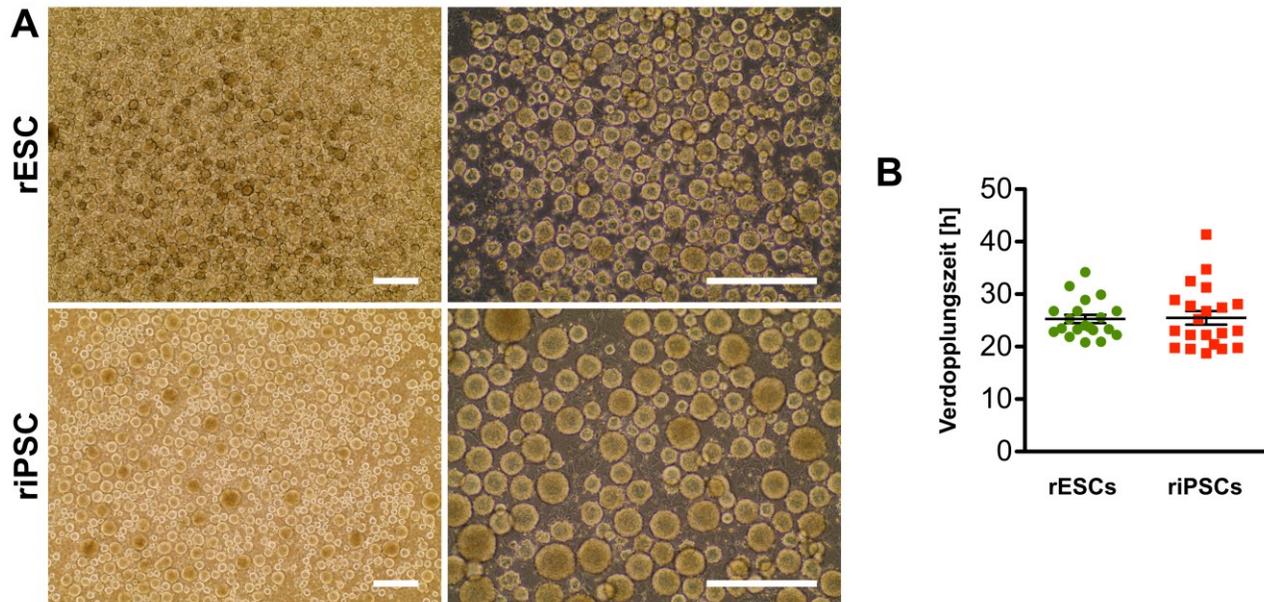


Abbildung 5.2: **Klassische Feeder-abhängige Expansionskultur undifferenzierter rESC und riPSC.** (A) rESC und riPSC als kugelförmige, teilweise schwimmende Kolonien in der klassischen feeder-basierten Kultur auf mitotisch inaktivierten MEFs in N2B27-Lif/2i-Medium an Tag 4 direkt vor dem Splitten. Alle Maßstabsbalken: 500 μm . (B) Keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten (Verdopplungszeit in Stunden) der rESC und riPSC-Expansion. Mittelwert \pm SEM, $n = 20-21$, t-test, $p = 0,897$.

5.2.2 Nachweis der Reaktion von alkalischer Phosphatase

Um die Pluripotenz der Zellen zu prüfen, wurde als erster Test die alkalische Phosphatase (APh)-Färbung durchgeführt. Die alkalische Phosphatase ist ein membranständiges Hydrolase-Enzym, welches unter alkalischen Bedingungen die Dephosphorylierung von Proteinen und Nukleinsäuren katalysiert. Bei der Nachweisreaktion wird ein farbloses Substrat zu einem unlöslichen violetten Präzipitat umgesetzt. Nachdem die rPSC mit APh gefärbt wurden, erschienen die undifferenzierten Zellen violett, während die differenzierten Zellen und die mitotisch inaktivierten MEF ungefärbt blieben. Die Ergebnisse für beide PSC-Typen sind in Abbildung 5.3 A&B dargestellt.

5.2.3 Immunhistochemischer Nachweis der Expression von SSEA-1 und Oct4

Immunfluoreszenzfärbungen gegen Pluripotenz-assoziierte Marker waren für beide Zelltypen positiv. Der Transkriptionsfaktor Oct3/4 (octamer-binding transcription factor 3/4) wurde in den Zellkernen der PSC nachgewiesen, das Oberflächen-Antigen SSEA-1 (stage specific embryonic antigen-1) auf der Zellmembran. (Abbildung 5.3 A&B).

5.2.4 Durchflusszytometrische Analyse

Regelmäßige durchflusszytometrische Analysen wurden auf Oct3/4-Expression durchgeführt, um die Stabilität des pluripotenten Status der rPSC über mehrere Passagen in Feeder-basierter Kultur zu

überprüfen. Diese Analysen zeigten, dass die Expression von Oct3/4 nahezu 100% war und über den Verlauf der Kultur stabil blieb (Abbildung 5.3 C).

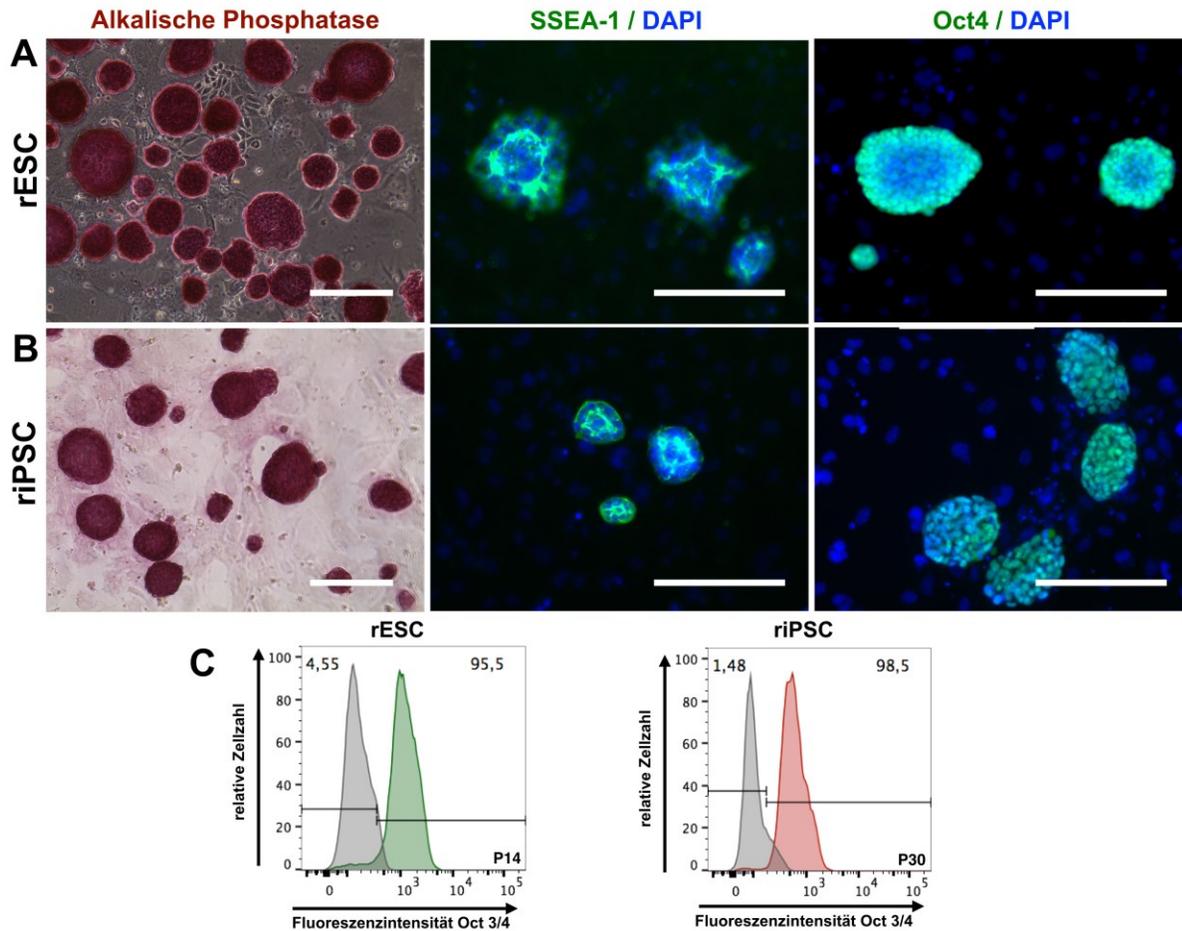


Abbildung 5.3: **Nachweis der Expression von Pluripotenzenmarkern bei rESC und iPSC kultiviert auf Feedern.** Die Expression von alkalischer Phosphatase (violett), SSEA-1 und Oct-4 (beide grün) in rESC (A) und riPSC (B), Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Alle Maßstabsbalken: 500 μ m. (C) Durchflusszytometrische Analyse auf Oct 3/4 in undifferenzierten rESC (grün) und riPSC (rot). In grau ist die Isotypkontrolle (Maus IgG2b) dargestellt. Zahlen im Histogramm bezeichnen den prozentualen Anteil negativer (links) bzw. positiver (rechts) Zellen, P: Anzahl Passagen auf Feederzellen.

5.3 Etablierung der kardialen Differenzierung

Die Induktion der spontanen kardialen Differenzierung erfolgte durch die erzwungene Aggregation von vereinzelt PSC zu sogenannten „Embryoid Bodies“ (EBs) mit der gleichzeitigen Umstellung von serumfreiem Expansionsmedium auf serumhaltiges Differenzierungsmedium. Der gewünschte Zelltyp konnte dann durch Verwendung einer vorher getesteten fötalen Rinderserum-Charge (siehe Abschnitt 5.6.2) sowie der Veränderung der Zellzahl pro Aggregat optimiert werden.

5.3.1 Differenzierung mittels der Hanging Drop Methode

Für die Etablierung der kardialen Differenzierung wurde die Hanging Drop Methode angewendet. Pro

EB wurden dazu, wie in Cao et al. für rESC beschrieben, jeweils 3.000 Zellen eingesetzt[69]. Da aus Experimenten mit murinen ES-Zellen eine Verbesserung der kardialen Differenzierung durch die Zugabe von Ascorbat-2-Phosphat (AA-2P) bekannt war [66, 84], wurde zunächst getestet, ob sich diese Beobachtung auch auf Ratten PSC übertragen ließ. Dazu wurden die EBs am Tag 2 auf Agarose/IMDM-beschichtete 96-Well-Platten überführt und in 2 Gruppen eingeteilt (mit und ohne AA-2P). An Tag 7 konnten mikroskopisch die ersten spontan kontrahierenden EBs beobachtet werden. Es wurde davon ausgegangen, dass diese EBs funktionelle KM enthielten. Der Anteil kontrahierender EBs wurde an Tag 8, 10, 12 und 14 bestimmt (mit $n = 4-10$ biologischen Wiederholungen, (Abbildung 5.4 C). Die Zugabe von $100 \mu\text{M}$ AA-2P zum Differenzierungsmedium hatte einen deutlichen Effekt auf die Effizienz der kardialen Differenzierung mit $33,1 \pm 5,2\%$ ($n = 12$) kontrahierenden EBs bei rESC und $49,3 \pm 4\%$ bei riPSC ($n = 5$) an Tag 14. Verglichen mit den jeweiligen Kontrollen ergab sich eine $3,6 \pm 0,5$ -fache, bzw. $17,6 \pm 3,1$ -fache Steigerung des Anteils kontrahierender EBs (Abbildung 5.4 D). Die Beobachtung der AA-2P-vermittelten Steigerung der kardialen Differenzierung für murine PSC konnte somit auch für Ratten PSC bestätigt werden.

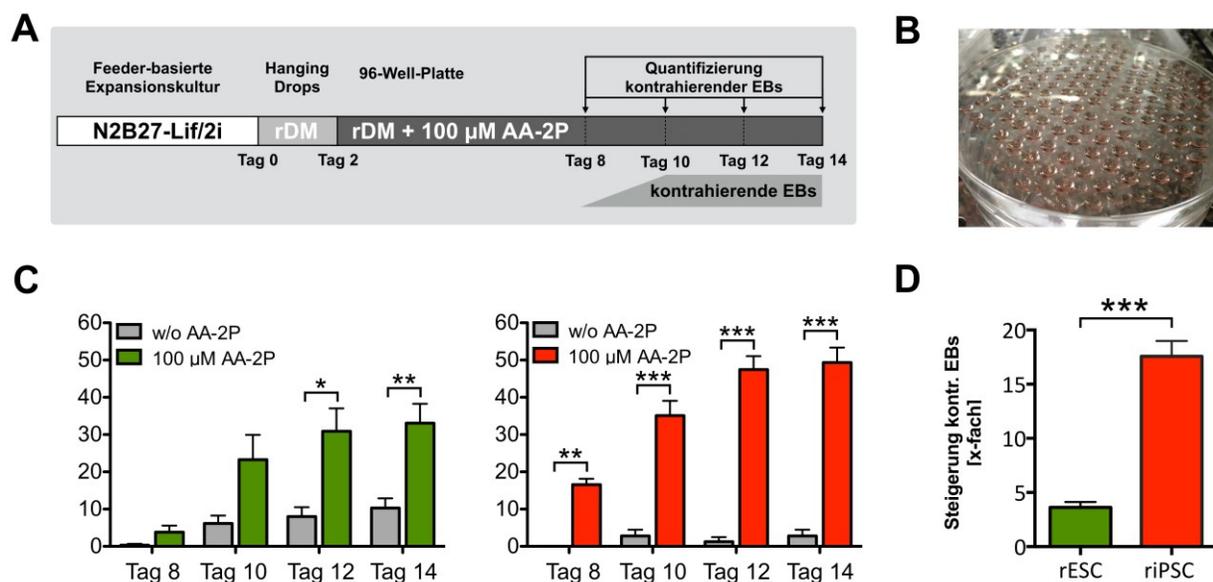


Abbildung 5.4: **Ascorbat-2-Phosphat verbessert die kardiale Differenzierung bei Ratten ESC und iPSC.** (A) Protokoll für rPSC-Differenzierung mittels Hanging Drops. Die Differenzierung startete mit der Herstellung von hängenden Tropfen sog. Hanging Drops (HD) mit 3×10^3 undifferenzierten Ratten-PSC pro Tröpfchen in Serum-basierendem Differenzierungsmedium (rDM). Nach 2 Tagen wurden die entstandenen Embryoid Bodies (EBs) einzeln auf 96-Well-Platten überführt, welche mit 1% Agarose/IMDM beschichten waren, mit oder ohne Zugabe von $100 \mu\text{M}$ L-Ascorbat-2-phosphat (AA-2P). Spontan kontrahierende EBs wurden an Tag 8, 10, 12 und 14 quantifiziert. (B) Stapel mit Hanging Drop-Platten (ca. 144 Tropfen je Schale). (C) Quantifizierung der Effizienz der kardialen Differenzierung bei rPSC-EBs ohne und mit AA-2P ($n = 4-10$ unabhängige Versuche mit 48 EBs pro biologischer Wiederholung). (D) Steigerung der Zahl der kontrahierenden EBs an Tag 14 nach der Zugabe von AA-2P Mittelwert \pm SEM ($n = 5-10$ unabhängige Experimente, Anteil kontrahierender EBs mit AA-2P pro Mittelwert der kontrahierenden EBs ohne AA-2P. Ungepaarter t-Test, * $p < 0,05$).

5.4 Optimierung der Expansionskultur und der kardialen Differenzierung sowie deren Hochskalierung

Da für das geplante Anwendungsgebiet des myokardialen Tissue Engineerings und der myokardialen Transplantation eine große Anzahl PSC-abgeleiteter KM zur Verfügung gestellt werden müssen, wurden zwei grundlegende Maßnahmen ergriffen, um die Expansions- und Differenzierungsbedingungen besser skalierbar zu gestalten: (i) Etablierung einer Feeder-freien Expansionskultur (Monolayer), (ii) Rationalisierung der EB-Formation (Agarose Mikrowells)

5.4.1 Etablierung einer Feeder-freien Expansionskultur

5.4.1.1 Morphologie und Wachstumsverhalten der rPSC in der Feeder-freien Monolayer-Kultur

Die rPSC wurden in Geltrex beschichtete Flaschen erfolgreich in N2B27-Lif/2i-Medium kultiviert und wuchsen als adhärenente Zellen, die ein für PSC charakteristisches geringes Kern/Zytoplasma-Verhältnis aufwiesen (Abbildung 5.5 A). Hier wurde durch die Errechnung der Verdopplungszeit belegt, dass die rESC Monolayer langsamer proliferierten als die riPSC. ($27,7 \pm 0,7$ h; $n = 21$ vs. $24,7 \pm 0,5$ h; $n = 21$), siehe Abbildung 5.5 B.

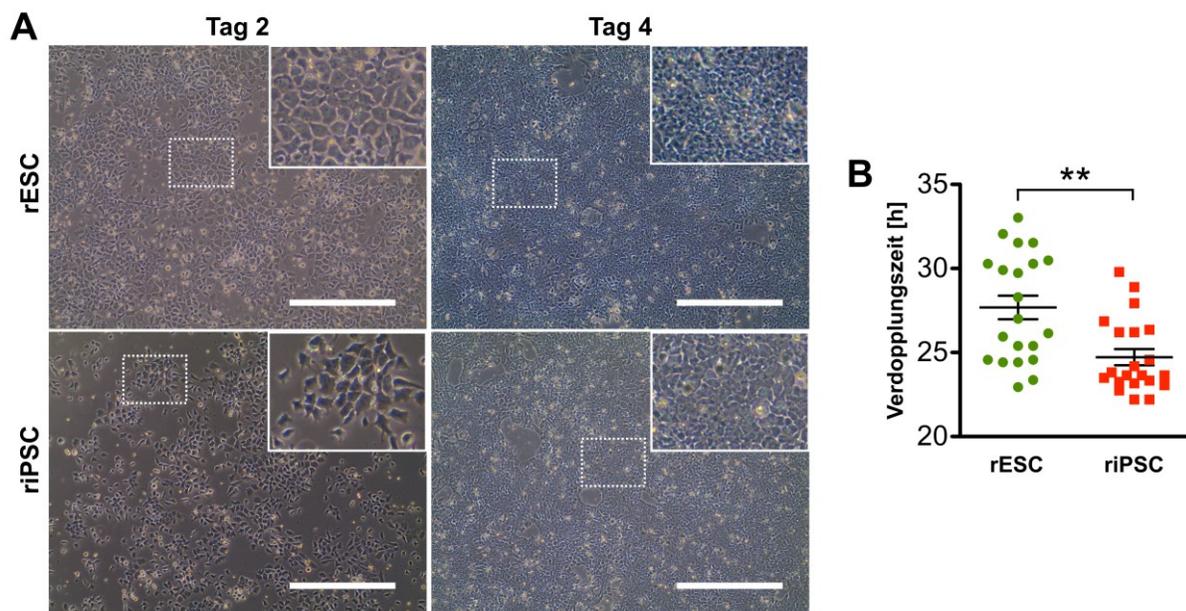


Abbildung 5.5: **Feeder-freie Monolayer-Kultur undifferenzierter rESC und riPSC.** (A) Expansion der rESC und riPSC als Einzelzellen in einer feeder-freien Monolayer-Kultur auf 0,25% Geltrex in N2B27-Lif/2i-Medium an Tag 2 (links) und Tag 4 direkt vor dem Splitten (rechts). Alle Maßstabsbalken: 500 µm. (B) Es konnte ein signifikanter Unterschied im Proliferationsverhalten (Verdopplungszeit in Stunden) zwischen rESC und riPSC festgestellt werden. Mittelwert \pm SEM, $n = 21$, t-test, $**p < 0.0012$

5.4.1.2 Überprüfung der Expression von Pluripotenzmarkern

Wie auch bei der Feeder-Kultur wurden die rPSC in der Feeder-freien Monolayer-Kultur auf klassische Pluripotenzmarker untersucht. Wie in Abbildung 5.6 dargestellt, waren sowohl rESC als auch riPSC positiv für APH-Aktivität. Bei der Immunfluoreszenzfärbung exprimierten beide Zelltypen die Pluripotenzmarker SSEA-1 (membranständig) und Oct3/4 (kernlokalisiert). Die durchflusszytometrische Analyse bis Passage 9 bei rESC und Passage 18 bei riPSC zeigte eine stabile Expression von Oct3/4 (Abbildung 5.6 B). Die Expression der Pluripotenzmarkergene Oct3/4, Nanog und Rex1 konnte auch auf transkriptioneller Ebene mit Hilfe der RT-PCR belegt werden (Abbildung 5.6 C).

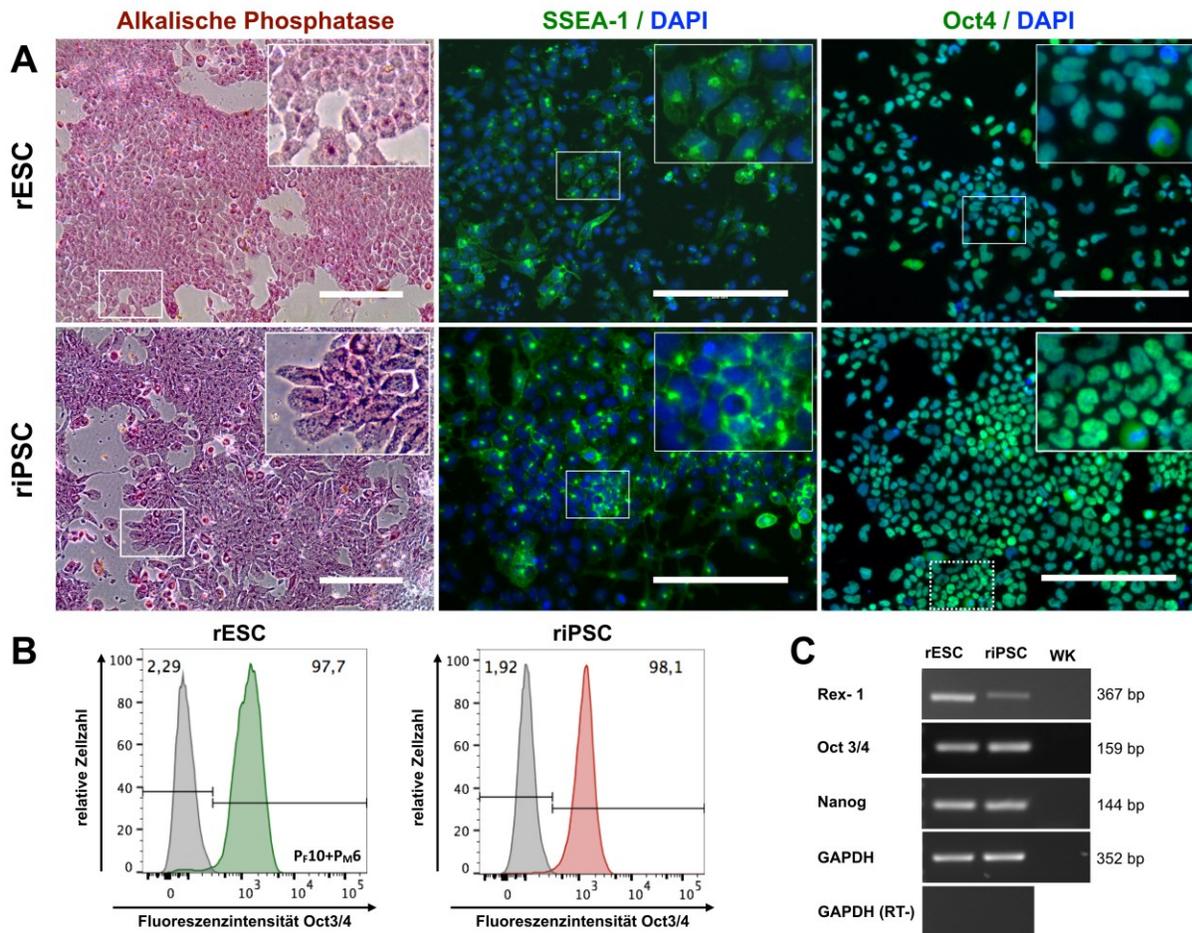


Abbildung 5.6: **Expressionsmuster von Pluripotenzmarkern in rES- und iPSC-Zellen kultiviert in feeder-freiem Monolayer.** (A) Expression von alkalischer Phosphatase (violett), SSEA-1 und Oct3/4 (grün) in rESC und riPSC, Darstellung der Zellkerne mittels DAPI (blau). Alle Maßstabsbalken: 200 μ m. (B) Durchflusszytometrische Analysen von rESC und riPSC nach mehreren Passagen in feeder-freier Monolayer Kultur zeigten die Expression von Oct3/4. P_F: Passagenzahl auf Feedern, P_M: Passage in Monolayer-Kultur. Isotypkontrolle: IgG2b (Grau). (C) Nachweis von Pluripotenzmarkergenen in undifferenzierten rESC und riPSC mittels semiquantitativer RT-PCR. WK: Wasserkontrolle.

5.4.1.3 *Untersuchung des Karyotyps*

Im Vergleich zur Feeder-basierten Expansionskultur erwies sich die Monolayer-Kultur als deutlich kosten- und zeitsparender. Allerdings wurde beobachtet, dass sich die Zellen über eine längere Kultivierungsdauer karyotypisch veränderten. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Marianne Volleths (Institut für Humangenetik, OvGU) wurde beobachtet, dass es vor allem bei den riPSC Zelltypen nach 18 Passagen in Monolayerkultur vermehrt zu Polyploidien kam. Ausführlichere Untersuchungen wurden an dieser Stelle nicht unternommen.

5.4.2 **Kardiale Differenzierung mittels Agarose Mikrowells (AMW)**

Auch wenn der klassische Differenzierungsansatz mittels Hanging Drops zu gut reproduzierbaren Ergebnissen führte, ist dieser sehr arbeits- und zeitaufwendig. Der Vorteil ist, dass man Aggregate von gleichmäßiger Größe herstellen kann. Die Technik mit Agarose Mikrowells (AMW), welche vor kurzem etabliert wurde, erlaubt es kostengünstig 300 homogene Aggregate in einem Schritt herzustellen [87]. Der Ascorbat-Ansatz wurde für alle weiteren Experimente auf die AMW-Methode angewendet (Abbildung 5.7). Die Ergebnisse der Aggregation in AMWS und der EB Entwicklung über den Verlauf von 14 Tagen sind in Abbildung 5.7 C exemplarisch anhand von iPSC dargestellt.

5.4.2.1 *Optimierung der kardialen Differenzierung und deren Hochskalierung*

Um die Ausbeute an KM pro eingesetzter Stammzelle weiter zu erhöhen, wurden die Aggregate mit zwei verschiedenen Zellzahlen (2.000 und 3.000 undifferenzierte rESC/iPSC pro Aggregat) angesetzt. Der Anteil kontrahierender EBs wurde zwischen Tag 14 und 16 mikroskopisch ausgewertet. Im Ergebnis konnte sowohl bei rESC als auch bei riPSC kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Ansätzen erkannt werden, was die Entstehung spontan kontrahierender EBs betraf (Abbildung 5.7 D). Jedoch zeigte die durchflusszytometrische Analyse, dass die riPSC-EBs einen höheren Anteil Troponin T-positiver Zellen enthielten (Abbildung 5.7 E). Auch führte die Zellzahl von 2.000 iPS-Zellen pro EB tendenziell zu einer höheren KM Zahl, als eine Zellzahl von 3.000 pro EB. Bei ES-Zellen konnte jedoch kein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 5.7 F).

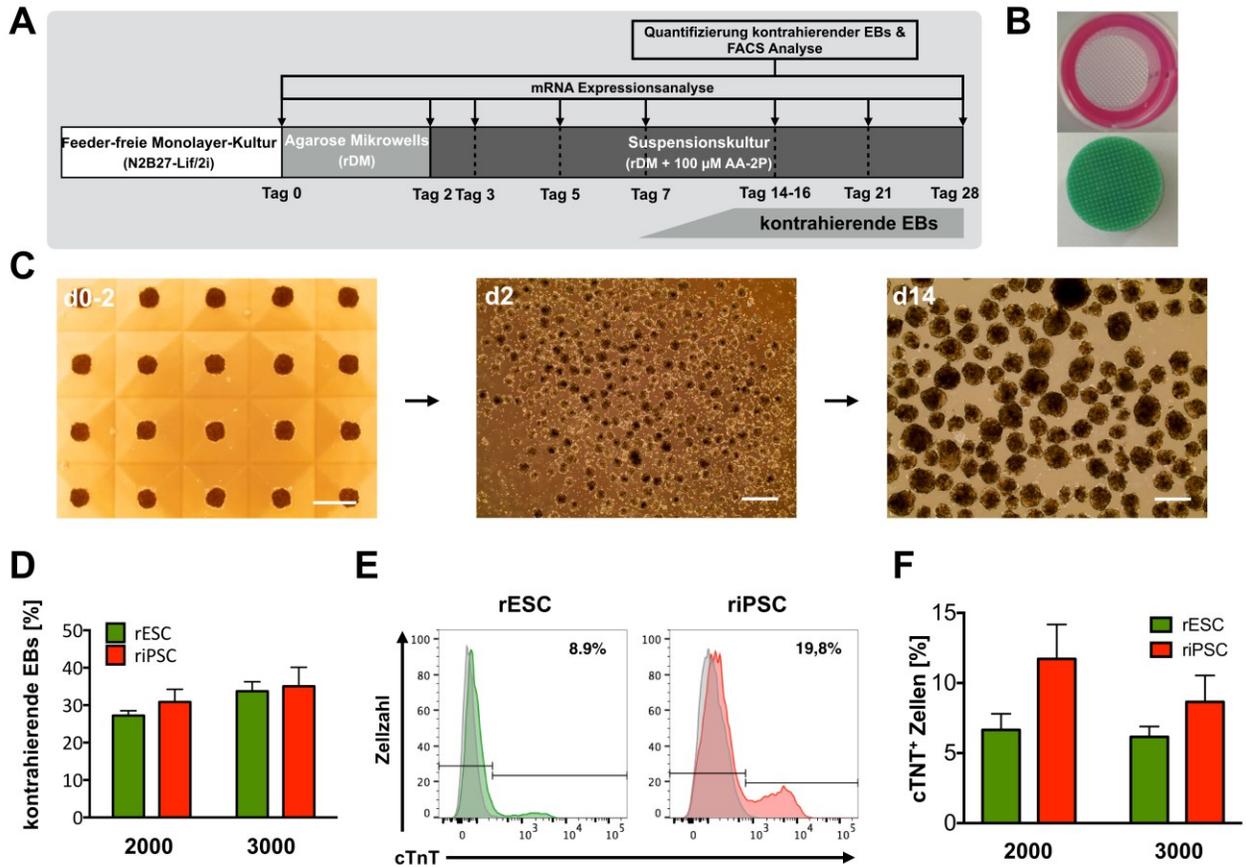


Abbildung 5.7: **Etablierung der kardialen Differenzierung von rPSC mittels Agarose-Mikrowell-Differenzierung (AMW).** (A) Protokoll für rPSC-Differenzierung mittels AMW. Die Differenzierung startete mit der Herstellung von Aggregaten auf AMW mit 3×10^3 oder 2×10^3 undifferenzierten Ratten-PSC pro Aggregat. 300 Aggregate in einem AMW in 1,5 mL serum-basiertem Differenzierungsmedium (rDM). Nach 2 Tagen wurden die entstandenen Embryoid Bodies (EBs) auf eine 10 cm Suspensions-Zellkulturschale überführt, mit Zugabe von 100 μ M Ascorbat-2-phosphat (AA-2P). Erste spontan kontrahierende EBs wurden ab Tag 7 beobachtet. (B) Darstellung eines wiederverwendbaren Silikon-Masters und das daraus generierte Agarose-Well. (C) riPSC-EBs nach 48 h auf AMW (links), nach Überführung in Suspensionkultur (Tag 2, mitte) und an Tag 14 (rechts). Maßstabsbalken: 500 μ m. (D) Vergleich der Zahl der kontrahierenden EBs zwischen Tag 14 und 16 mit jeweils zwei unterschiedlichen Ausgangszellzahlen pro EB (2.000 vs. 3.000 rESC und riPSC). (E) Exemplarische Durchflusszytometrie-Analyse auf kardiales Troponin T innerhalb Tag 14-16: EBs, welche aus rESC (links, grün) und iPSC (rechts, rot) stammen. Isotype Kontrolle (Maus IgG1, grau). (G) Quantifizierung des Anteils Troponin T-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie.

5.4.2.2 Morphometrie der Ratten EBs aus AMW

EBs von rESC und riPSC wurden mikroskopisch bezgl. ihrer Größenentwicklung longitudinal beurteilt. In Abbildung 5.8 A ist die gleichmäßige Aggregation der EBs in dreidimensionaler Form an Tag 2 in AMW für beide getesteten Zellzahlen und Ratten PSC-Typen dargestellt. Eine Quantifizierung der EB-Größen der vier Ansätze ist in Abbildung 5.8 B dargestellt. Für beide getesteten Zellzahlen sind die Größenunterschiede zwischen den rESC und riPSC-abgeleiteten EBs nach 14 Tagen eindeutig in mikroskopischen Aufnahmen zu erkennen (Abbildung 5.8 C). Der Größenunterschied zwischen beiden EB-Typen war maßgeblich im unterschiedlichen morphologischen Erscheinungsbild begründet.

Die rESC-abgeleiteten EBs wiesen häufig blasenartige, zystische Strukturen auf, wobei die EBs von riPSC eine deutlich kompaktere Struktur aufwiesen. Die Quantifizierung der 2-dimensionalen Projektionsfläche zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen rESC und riPSC EBs (Abbildung 5.8 D).

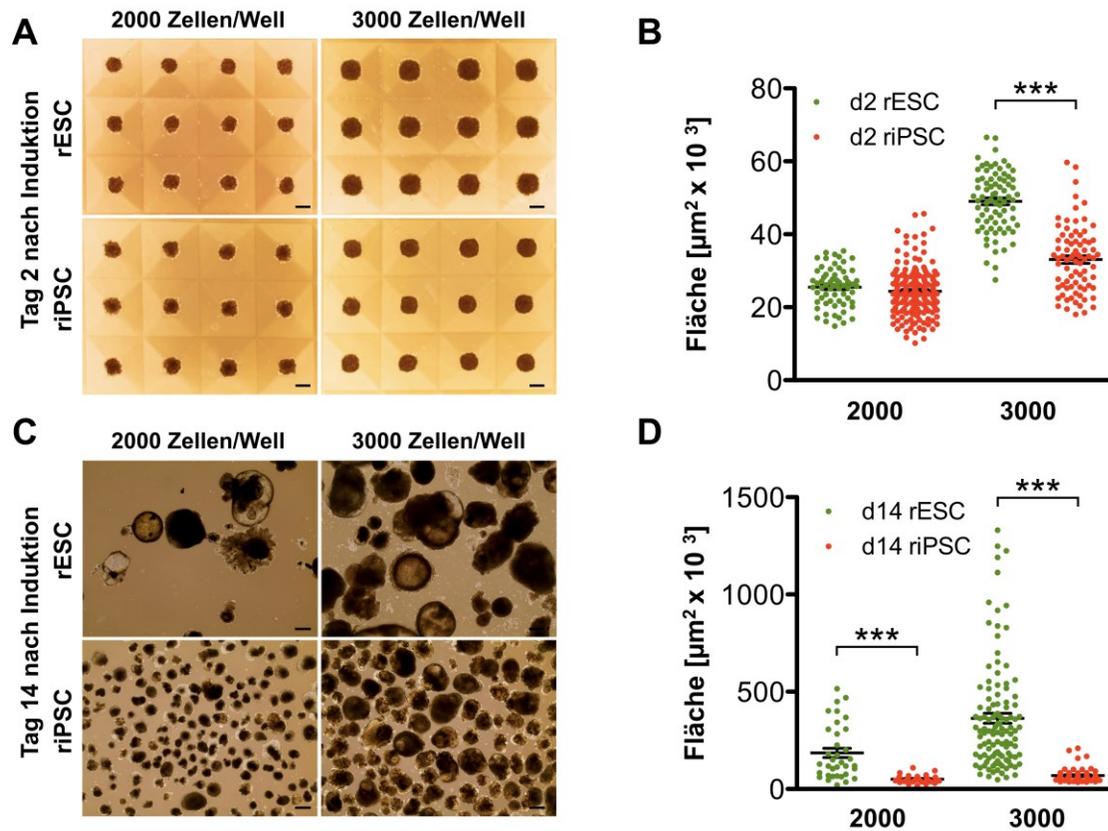


Abbildung 5.8: **EB-Größenbestimmung.** (A) rPSC-EBs mit verschiedenen Ausgangs-Zellzahlen an Tag 2 auf AMW direkt vor der Ernte. Maßstabsbalken: 200 μm ., (B) Bestimmung der EB-Größe an Tag 2, (C) rPSC-EBs am Tag 14 der Differenzierung in Suspension. Im Vergleich zu riPSC-EBs zeigen rESC-EBs vermehrt zystische Strukturen, Maßstabsbalken: 300 μm (D) Bestimmung der EB-Größe an Tag 14.

5.4.2.3 Charakterisierung der KM mittels Immunfluoreszenzfärbungen

Zum Nachweis von KM innerhalb der EBs wurden Aggregate beider Zelllinien eingefroren, mit einem Kryostat geschnitten und mittels spezifischer Antikörper auf Herzmuskel-spezifische Proteine gefärbt. In Abbildung 5.9 sind die Ergebnisse dieser immunhistologischen Untersuchungen zusammengefasst. Kardiomyozyten aus beiden untersuchten Zelltypen zeigten in der Färbung auf sarkomerisches alpha-Actinin die für die quergestreifte Muskulatur typische Bänderung. Das Gap Junction-Protein Connexin43 (grün) wurde in typischen punktuellen Regionen sowohl zwischen den KM als auch im perinukleären Bereich nachgewiesen. Auch die Proteine Titin und das kardiale Troponin T bestätigten deutlich die sarkomerische Querstreifung und damit den myokardialen Phänotyp der untersuchten

Ratten PSC-Derivate.

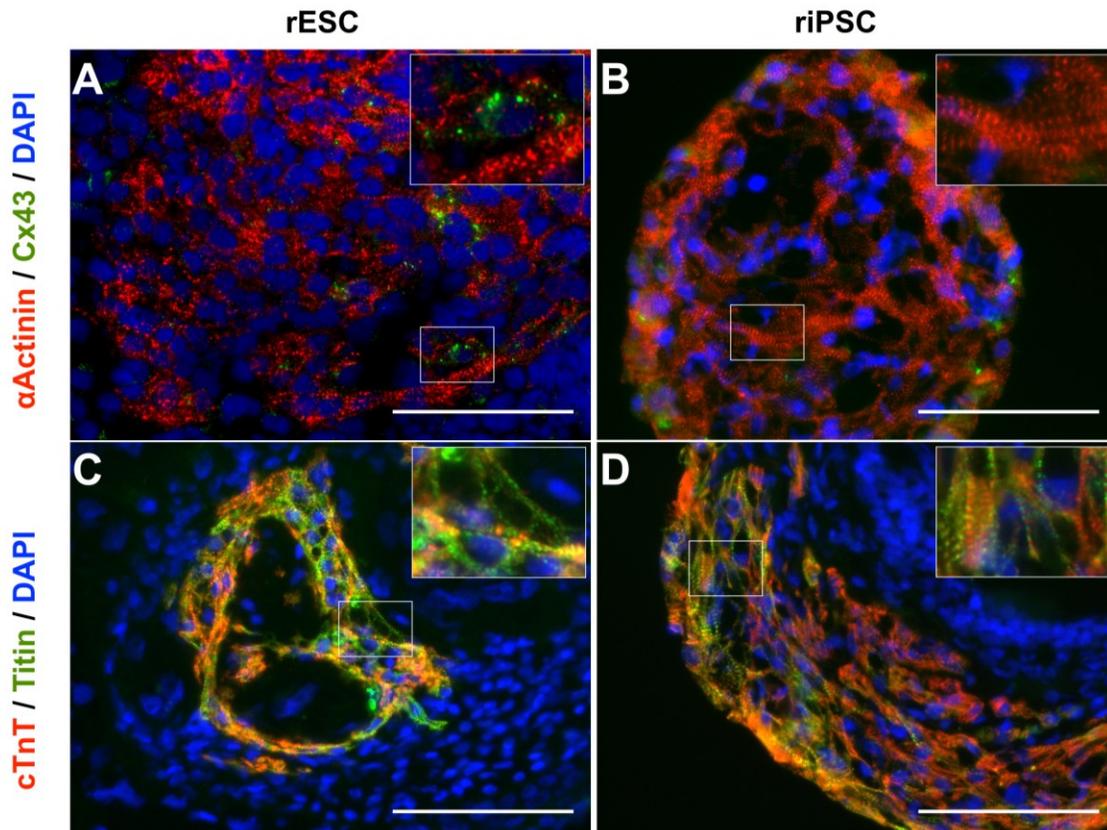


Abbildung 5.9: **Nachweis von PSC-abgeleiteten KM in 10 µm EB-Kryoschnitten.** (A,B) Sarkomerisches α -Actinin (rot) und Gap Junction Protein Connexin 43 (grün). (C,D) Kardiales Troponin T (rot) und Titin (grün). Maßstabsbalken: 100 µm.

Die EBs von rESC und riPSC wurden mit Kollagenase B vereinzelt und auf Fibronectin-beschichtete Kulturschalen ausgesät, um die Struktur einzelner Kardiomyozyten zu untersuchen. Nach Anwachsen der vereinzelteten Zellen wurden auch hier die zuvor beschriebenen kardialen Marker nachgewiesen (Abbildung 5.10). Bei beiden Färbungen diente ein Herzschnitt als Positivkontrolle sowie die Isotypkontrolle und die Sekundär-Antikörperkontrolle als Negativkontrollen (nicht gezeigt).

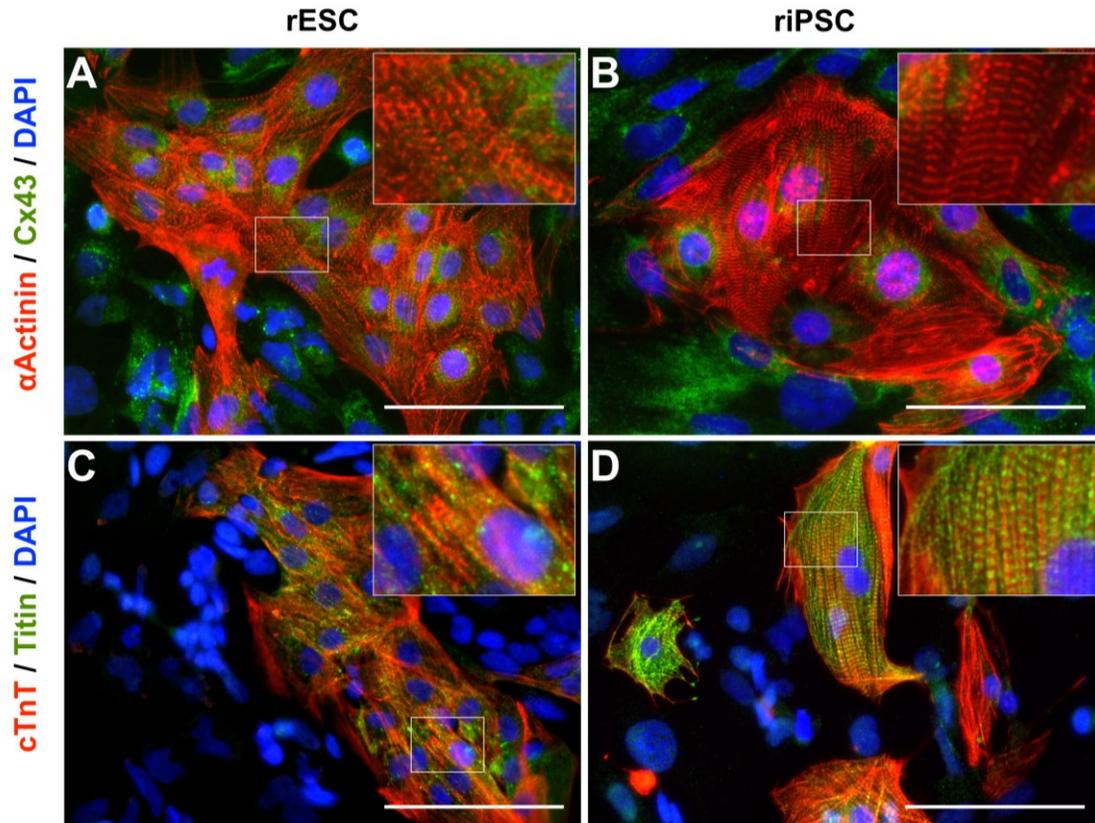


Abbildung 5.10: **Morphologische Charakterisierung von einzelligen PSC-abgeleiteten KMs nach Dissoziation aus EBs.** (A, B) Sarkomerisches α -Actinin (rot) und Gap Junction Protein Connexin 43 (grün). (C, D) Kardiales Troponin T (rot) und Titin (grün). Maßstabsbalken: 100 μ m.

5.4.2.4 Elektrophysiologische Analysen der riPSC-abgeleiteten KM

Da die hergestellten KM physiologische Eigenschaften ähnlich dem normalen Herzmuskelgewebe haben sollten, wurden mittels Multielektroden-Arrays extrazelluläre Feldpotentiale abgeleitet (Abbildung 5.11 A). Die KM reagierten auf kardioaktive Substanzen in physiologischer Weise (Abbildung 5.11 B). Beta-adrenerge Stimulation mit Isoprenalin führte zu einem Anstieg der Kontraktionsfrequenz. Dieser Effekt konnte mit dem Isoprenalin-Antagonisten Carbachol aufgehoben werden. Die Zellen reagierten auch physiologisch auf Quinidin und Lidocain. Lidocain als Blocker der Natrium-Kanäle führte zur Verlangsamung des schnellen Feldpotentials, während die Zugabe von Quinidin als Kalium-Kanal-Blocker in einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer resultierte. Die Messung der Aktionspotentiale der einzelnen KM nach Vereinzeln der EBs mittels der Patch-Clamp-Technik zeigte mehrere unterschiedliche Aktionspotential-Formen. Wie in Abbildung 5.11 C dargestellt, wurden Schrittmacher-ähnliche, Vorhof-ähnliche und Kammer-ähnliche Aktionspotentiale detektiert.

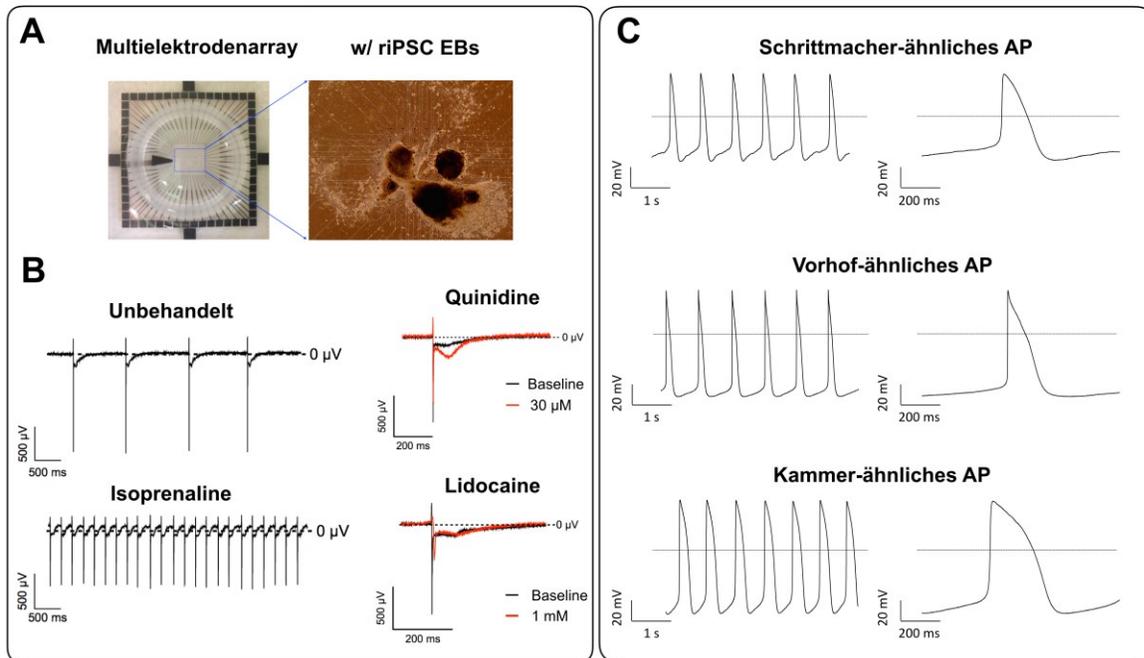


Abbildung 5.11: **Elektrophysiologische Analysen von rIPSC abgeleiteten KM.** (A) Aus rIPSC-gewonnene EBs wurden auf dem MEA-System an Tag 14 der Differenzierung ausgesät. (B) Feldpotential-Aufnahmen von EBs an Tag 16 der Differenzierung. Physiologische Reaktion auf Zusetzen von 10 μM Isoprenalin, 30 μM Quinidine bzw. 1 mM Lidocain. (C) In Patch-Clamp Ableitungen, durchgeführt von Dr. rer. nat. Thomas Munsch (Institut für Physiologie, Medizinische Fakultät Magdeburg), zeigten die rIPSC abgeleiteten KM Aktionspotentiale, deren Morphologie Schrittmacher-, Atrium- und Ventrikelzellen ähnelte..

5.5 RT-PCR Analysen über den Verlauf der kardialen Differenzierung der rPSC

Um den Verlauf der kardialen Differenzierung von undifferenzierten rESC und rIPSC bis hin zu funktionellen KM zu charakterisieren, wurde die Expression typischer Pluripotenzmarker sowie kardialer Gene mittels der semi-quantitativen Reverse Transkriptase (RT) PCR-Analyse untersucht. Als interne Referenz wurde die Expression des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Für ein vergleichbares Ergebnis wurde aus rESC und rIPSC Differenzierungen die Gesamt-RNA an den Tagen d0, d3, d5, d7, d14, d21, und d28 isoliert und zu komplementärer DNA (cDNA) umgeschrieben. Das Ergebnis der Genexpressions-Analyse ist in Abbildung 5.12 zusammengestellt. Hier diente eine adulte Rattenherz-Probe als Positivkontrolle. Wie man in der Abbildung erkennen kann, wurde das Haushaltsgen in allen Proben nahezu identisch exprimiert. Aus diesem Grund war eine Vergleichbarkeit der einzelnen Proben gegeben. Die Pluripotenzmarker (Nanog, Oct3/4 und Rex-1) wurden an Tag 0 alle stark exprimiert und nahmen im Verlauf der Differenzierung rapide ab. Der mesendodermale Marker (Brachyury/T) war zu Beginn in undifferenzierten rIPSC nicht detektierbar, trat aber ab Tag 3 auf und nahm bis Tag 7 zu, um danach langsam wieder abzunehmen. Im Gegensatz dazu war er in rESC bereits ab Tag 0 bzw. im undifferenzierten Stadium vorhanden. Die Gap-Junction Proteinmarker (Cx43 und Cx45) waren

bereits im undifferenzierten Zustand (Tag 0) vorhanden und im Verlauf der Differenzierung gleichmäßig exprimiert. Das Gap-Junction Protein Cx40 zeigte eine regulierte Expression über den Verlauf der Differenzierung mit einem Peak an Tag 14. Das GATA-Bindungsprotein 4 (GATA4) sowie der Transkriptionsfaktor Nkx2.5, waren als Marker für das kardiale Mesoderm ab Tag 3 nachweisbar und stiegen bis Tag 7 an, um dann langsam wieder abzufallen. Darüber hinaus diente das atriale natriuretische Peptid (ANP), die atriale Isoform des Myosin-leichte-Kette-2 (MLC2a), die ventrikuläre Isoform des Myosin-leichte-Kette-2 (MLC2v), das alpha-Myosin schwere Kette (α -MHC) und β -MHC sowie das kardiale Troponin T als Marker zum Nachweis von KM. Dabei trat ANP ab Tag 5 auf und nahm in den rESC sowie in den riPSC zu. Die Expression von MLC2v war ab Tag 3 detektierbar mit steigender Intensität bis Tag 14. Mlc2a zeigte an Tag 5 ein deutliches Signal bei den rESC, allerdings wurde es bei riPSC zwischen Tag 7 und Tag 14 nur sehr schwach exprimiert. Ab Tag 7 wurde auch α -MHC kräftig exprimiert und nahm anschließend wieder ab. Hingegen war β -MHC schon an Tag 3 detektierbar, nahm im weiteren Verlauf zu und erreichte seinen Peak an Tag 14 bei rESC und Tag 7 bei riPSC bevor er dann wieder abfiel. Kardiales Troponin T wurde interessanterweise in undifferenzierten Zellen detektiert. Es wurde ab Tag 14 dominanter, bevor es langsam wieder abfiel.

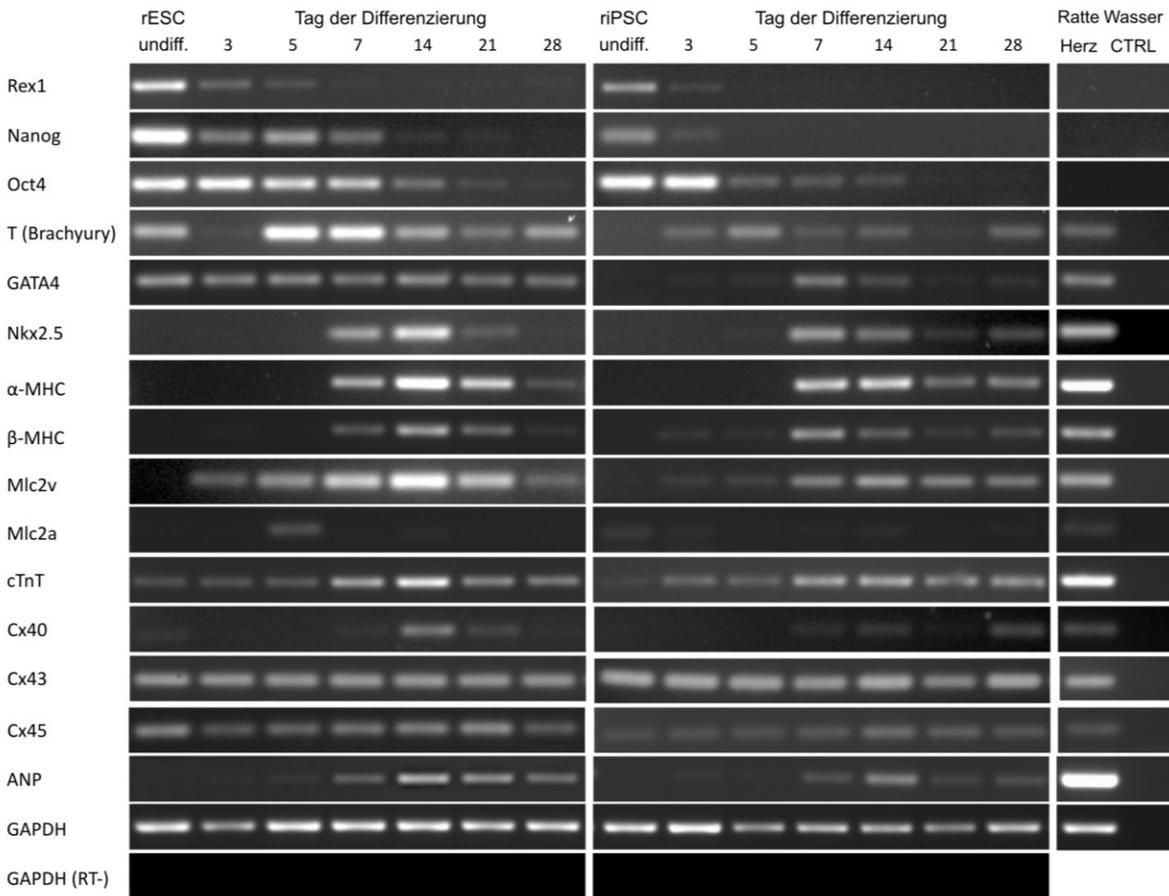


Abbildung 5.12: **Vergleichende Marker-Expressionsanalyse im Laufe der Differenzierung von rESC und riPSC-EBs mittels semi-quantitativer RT-PCR.** Endogene Pluripotenz-assoziierte Transkriptionsfaktoren Rex-1, Nanog und Oct3/4 werden im Verlauf herunterreguliert, während die mesodermalen Marker (Brachyury/T), die kardialen Vorläufer Marker (Nkx2.5, GATA4) und kardialen Marker (α -MHC, β -MHC, MLC2v, Mlc2a, cTnT, ANP) in unterschiedlichem Maß herauf reguliert werden. Gap-Junction Proteine (Cx43, Cx45) sind sowohl in der undifferenzierten Phase als auch in reifen KM nachzuweisen, während Cx40 im Verlauf der Differenzierung reguliert wird. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) wurde als interne Kontrolle mitgeführt, Wasser und Reverse-Transkriptase-minus (RT-) sind die Negativkontrollen.

5.6 Weitere Experimente und Optimierungen

5.6.1 Einfrieren und Auftauen von PSC aus Feeder-freier Monolayerkultur

Da in allen vorhergehenden Experimenten Feeder-freie Kulturen aus der parallel laufenden Feeder-basierten Kultur gewonnen wurden, wurde zur weiteren Rationalisierung der Kulturbedingungen in diesem Experiment erstmalig getestet, ob Zellen einer riPSC Monolayerkultur kryokonserviert und nach dem Auftauen wieder kardial differenziert werden können. Es ist gelungen, Zellen unter gleichen Kulturbedingungen zu expandieren. Dabei war die errechnete Verdopplungszeit vergleichbar mit der normalen Monolayer-Kultur ($24,6 \pm 0,33$ h, $n = 30$ bzw. $24,3 \pm 0,33$ h, $n = 33$; Abbildung 5.13 A).

Mittels der durchflusszytometrischen Analyse auf Oct3/4 konnte verdeutlicht werden, dass die Pluripotenzmarkerexpression der Zellen im aufgetauten Monolayer erhalten blieb und auch über mehrere Passagen stabil war. Abbildung 5.13 B zeigt die Oct3/4 Werte der normalen Monolayer und der aufgetauten Monolayer, welche nahezu identisch waren. Im nächsten Schritt konnten auch spontan kontrahierende EBs von den aufgetauten Monolayer-Kulturen produziert werden. Die Auswertung der kardialen Differenzierungseffizienz erfolgte durch Auszählung der kontrahierenden EBs zwischen Tag 14 und Tag 16. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Effizienz der kardialen Differenzierungen zwischen den normalen riPSC Monolayern und nach Kryokonservierung (Abbildung 5.13 C).

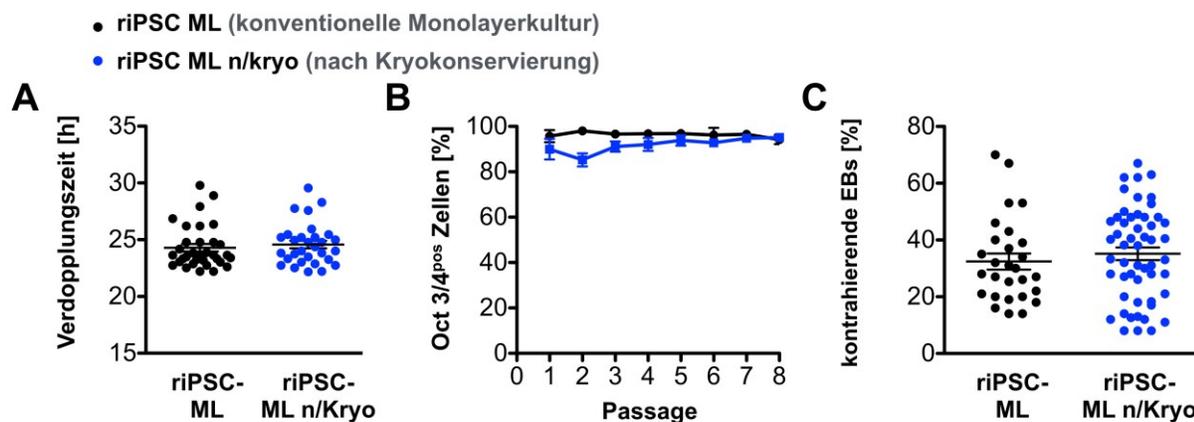


Abbildung 5.13: **riPSC-Monolayer versus riPSC Monolayer-Kultur nach Kryokonservierung.** (A) Keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten (Verdopplungszeit). Mittelwert \pm SEM, $n = 30-33$, t-test, $p = 0,540$. (B) Ähnliche Oct3/4 Expression in durchflusszytometrischen Analyse von Passage 1 bis 8 der beiden Monolayer Kulturen. (C) Keine signifikanten Unterschiede in der Effizienz der kardialen Differenzierung zwischen Tag 14 und 16 von normalen riPSC Monolayer-Kulturen und aufgetauten riPSC Monolayern. Mittelwert \pm SEM, $n = 28-53$, t-test, $p = 0,461$.

5.6.2 Einfluss von fötalem Kälberserum auf die kardiale Differenzierungseffizienz

Da das Differenzierungsmedium zu 15% aus fötalem Kälberserum (FCS) besteht, welches ein undefinierter tierischer Zusatz ist, der Schwankungen in der Zusammensetzung unterliegen kann, wurden mehrere FCS-Chargen unterschiedlicher Hersteller bezüglich der kardialen Differenzierungseffizienz verglichen. Dafür wurde die Hanging Drop Methode mit anschließender Kultivierung auf 96-Well Platten verwendet. Die Auswertung erfolgte anhand der Zählung der kontrahierenden EBs an Tag 8, 10, 12 und 14. Die Ergebnisse, welche in Abbildung 5.14 dargestellt sind, zeigen, dass FCS einen Einfluss auf die kardiale Differenzierungseffizienz ausübt. Für alle weiteren Versuche wurde das FCS 3 verwendet, welches bei riPSC die beste Differenzierungseffizienz zeigte.

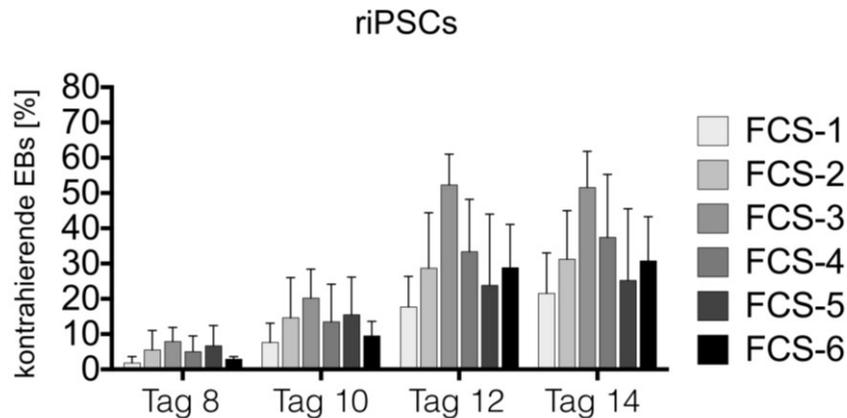


Abbildung 5.14: **Die Verwendung verschiedener fötaler Kälberseren (FCS) im Differenzierungsmedium beeinflusst die kardiale Differenzierung der riPSCs.** Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM, $n = 3$ unabhängige Experimente, ca. 48 EBs pro biologischer Wiederholung.

5.6.3 Differenzierung und Charakterisierung von Fibroblasten-ähnlichen Zellen aus riPSC

5.6.3.1 Differenzierung von Fibroblasten-ähnlichen Zellen aus riPSC

Durch einen speziellen Differenzierungsansatz ist es gelungen, Fibroblasten-ähnliche Zellen aus riPSC herzustellen (riPSC-FB). Dazu wurden die gewonnenen Zellen zunächst vermehrt und zur späteren Verarbeitung eingefroren. Es war problemlos möglich, die Zellen nach dem Einfrieren wieder in Kultur zu nehmen.

5.6.3.2 Analyse der riPSC-abgeleiteten Fibroblasten-ähnlichen Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbungen.

Aufgetaute riPSC-FB wurden gegen entsprechende Bindegewebsmarker (Prolyl-4-Hydroxylase und Laminin) gefärbt. Diese zeigten eine ähnlich strukturierte Anfärbung der Epitope wie die als Positivkontrolle mitgeführten Hautfibroblasten einer adulten Ratte (rFB) (siehe Abbildung 5.15 A).

5.6.3.3 RT-PCR Analysen der riPSC-abgeleiteten Fibroblasten-ähnlichen Zellen.

RNA wurde von beiden Fibroblasten-Typen (riPSC-FB und adulte Hautfibroblasten) isoliert und in cDNA umgeschrieben. Danach erfolgte die Genexpressionsuntersuchung mittels RT-PCR. Nach einem positiven und vergleichbaren Ergebnis der Expression des Haushaltsgens GAPDH für alle getesteten Zelltypen, wurde die RT-PCR gegen die Fibroblastenmarker (Kollagen Typ I, Kollagen Typ III und Prolyl-4-Hydroxylase) durchgeführt (Abbildung 5.15 B). Die Expression dieser Marker war in beiden getesteten Fibroblasten-Typen vergleichbar. Der Fibroblastenmarker Prolyl-4-Hydroxylase wurde auch in undifferenzierten iPSC nachgewiesen, die ursprünglich als zelluläre/biologische Negativkontrolle mitgeführt wurden. Als technische Negativkontrolle wurde Wasser verwendet.

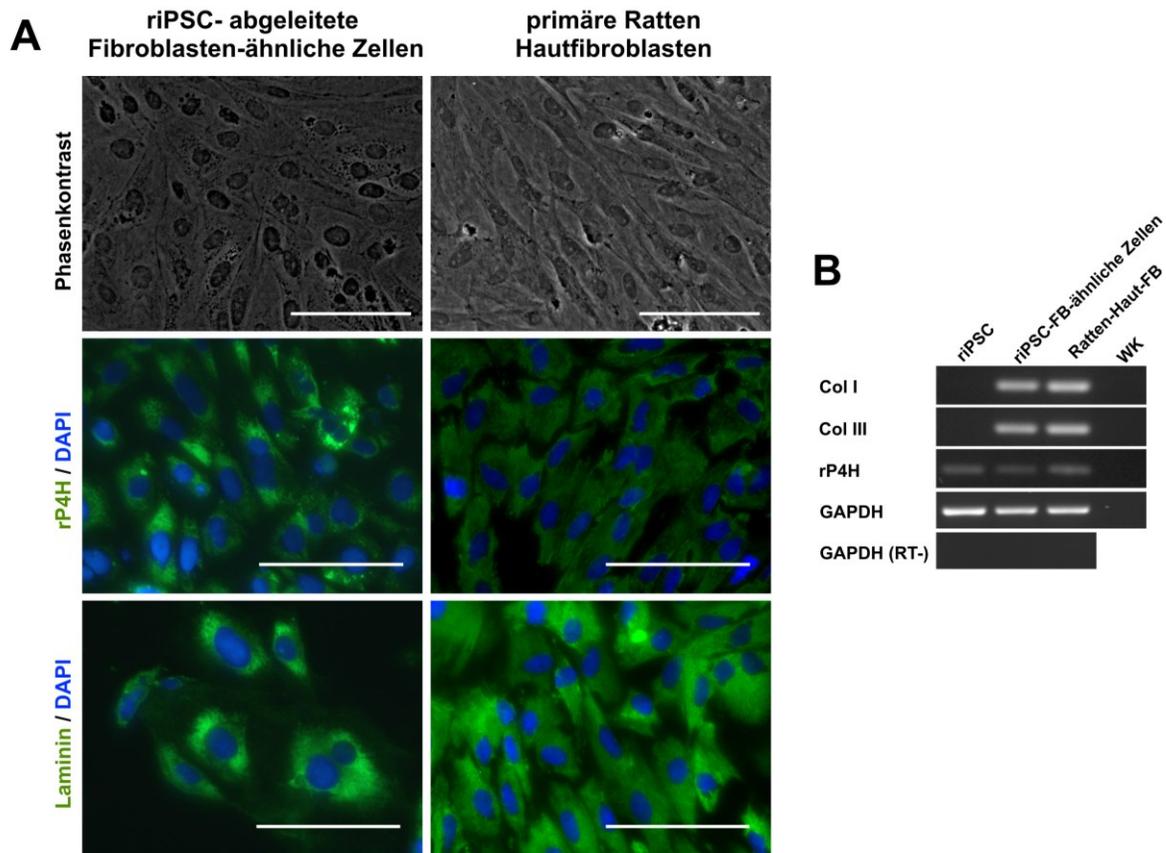


Abbildung 5.15. **Ratten-iPSC können in Fibroblasten-ähnliche Zellen differenziert werden und exprimieren typische Marker des Bindegewebes.** (A) Oben: riPSC-abgeleitete Fibroblasten-ähnliche Zellen zeigten im Phasenkontrast eine ähnliche Morphologie wie primäre Hautfibroblasten der Ratte. Mitte: Immunhistochemische Färbung für Ratten-Prolyl-4-Hydroxylase (rP4H)-Färbung und Unten: Laminin (beide grün). Die Zellkerne erscheinen blau. Maßstabsbalken: 100 μ m. (B) mRNA-Expressionsanalyse mittels RT-PCR. Col I: Kollagen Typ I, Col III: Kollagen Typ III, rP4H: Ratten-Prolyl-4-Hydroxylase, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. RT-: Reverse Transkriptase minus Kontrolle, WK: Wasserkontrolle.

6 Diskussion

Die Beschreibung der Induktion der Pluripotenz in murinen und humanen primären Hautfibroblasten durch den Prozess der nukleären Reprogrammierung durch Takahashi und Yamanaka [59, 60] eröffnet neue Möglichkeiten für die Entwicklung autologer Therapieoptionen für unterschiedlichste Krankheitsbilder. Die resultierenden induzierten pluripotenten Stammzellen gelten aufgrund ihrer Fähigkeit sich in alle Zelltypen eines Organismus zu entwickeln [104, 105], als vielversprechende Quelle sowohl für wissenschaftliche Studien als auch für rekonstruktive Therapieformen. Diese neue Zellquelle bietet vergleichbare Eigenschaften wie die embryonalen Stammzellen, welche bereits 1981 für die Maus [46, 106] und 1998 für den Menschen [47] beschrieben wurden. Aufgrund des hohen Aufwands für die Herstellung von ESC, sowie der ethischen und rechtlichen Einschränkungen bei der Verwendung von ESC humanen Ursprungs [51], bilden diese Zellen nicht die optimale Ressource für Experimente mit pluripotenten Zellen. Induziert pluripotente Stammzellen sind ethisch weniger bedenklich und können verhältnismäßig einfach aus leicht zugänglichen Primärzellen hergestellt werden. Somit weisen sie entscheidende Vorteile gegenüber ESC auf. Zum einen ist der xenogene, bzw. im besten Falle allogene Ursprung von ESC-Derivaten in bisherigen Transplantationsstudien zur Rekonstruktion ischämischen Myokards von Nachteil, da das Immunsystem des Empfängers zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen stark supprimiert werden muss. Zum anderen sind die gerade aus xenogenen Ansätzen gewonnenen Erkenntnisse häufig nur wenig belastbar, da sich die Physiologie zwischen Transplantat und Empfänger teils erheblich voneinander unterscheidet. In mehreren Studien kam es zwar zu einem Engraftment der transplantierten Zellen und auch eine funktionelle Integration wurde beschrieben. Jedoch war der therapeutische Effekt meist nicht zufriedenstellend, da es nicht zu einer Wiederherstellung der Herzfunktion kam, sondern lediglich eine weitere Verschlechterung verhindert wurde [79, 80, 107]. Der anvisierte klinische Einsatz von PSC-abgeleiteten Zellerivaten kann durch die Technologie der Reprogrammierung zu einem autologen Ansatz führen. Das würde bedeuten, dass der Transplantatempfänger gleichzeitig auch der Spender ist und eine pharmakologische Immunsuppression nicht mehr, oder nur zur Abmilderung der initialen Entzündungsreaktion notwendig ist. Auch denkbar sind sogenannte Zell-, oder Gewebebanken, welche eine große Anzahl an iPSC, bzw. deren Gewebederivaten vorhalten, deren HLA-Profil ein breites Spektrum der Bevölkerung abdeckt. Somit wären allogene Transplantate verfügbar, die eine geringe Immunantwort bei dem Empfänger hervorrufen würden, was eine entsprechend niedrig dosierte Immunsuppression notwendig machen würde. Neben diesen immunologischen Fragestellungen ist auch noch nicht eindeutig geklärt, welche Applikationsform der iPSC-abgeleiteten KM zu den besten Ergebnissen führt. Studien zur Biodistribution von PSC-abgeleiteten einzelligen Transplantaten haben gezeigt, dass es hierbei zu einem erheblichen

Zellverlust kurz nach Transplantation kommt, der neben der verminderten Zellviabilität auch durch den venösen Abfluss der intrakoronar, bzw. intramyokardial applizierten Zellen zu erklären war [95]. Um diese Aspekte effizient in einem klinisch relevanten System zu untersuchen sind folgende Bedingungen notwendig: 1. Ein autologes, oder zumindest allogenes Tiermodell muss verfügbar sein, das groß genug ist, um reproduzierbar ischämisch-bedingte Myokardinfarkte (z.B. durch Ligatur der LAD) vorzunehmen. 2. Vorzugsweise sollte es sich hierbei um ein etabliertes Kleintiermodell handeln. Das würde den Aufwand und die Kosten gering halten und somit umfangreichere Studien zu gezielten Fragestellungen ermöglichen, als es mit Großtiermodellen der Fall wäre. Die Maus galt bislang als einziges Kleintier, von dem reproduzierbar sowohl ESC, als auch iPSC gewonnen wurden [46, 59, 106]. Jedoch ist sie aufgrund ihrer Größe als robustes herzchirurgisches Modell unvorteilhaft. Im Gegensatz dazu gilt die Ratte als wesentlich besser geeignetes System, das bereits für syngene Myokard-Rekonstruktionsmodelle unter Verwendung von primären KM verwendet wurde [108] [109]. Allerdings war es bis vor kurzem aus dieser Spezies weder möglich ESC zu isolieren noch iPSC zu generieren. Die ersten Berichte über die Isolation von ESC wurden im Jahr 2008 veröffentlicht [55, 56]. Kurz darauf folgte der erste Bericht über die erfolgreiche Reprogrammierung von somatischen Rattenzellen zu keimbahnkompetenten iPSC [62]. Angesichts der o.g. Vorteile dieses Systems für die herzchirurgische Forschung überrascht es, dass es bisher nur eine Studie gibt, welche die erfolgreiche Differenzierung von Ratten ESC in KM beschreibt [69]. Die weitaus interessanteren Ratten-iPSC wurden bisher noch gar nicht eingehend auf ihr kardiales Differenzierungspotential hin untersucht. Daher diene die hier vorgelegte Studie dem Vergleich der Differenzierung zwischen diesen beiden pluripotenten Zelltypen der Ratte. Darüber hinaus lag der Fokus auf der Vereinfachung und der Hochskalierung der Kultur von undifferenzierten Ratten PSC und der Optimierung der kardialen Differenzierungseffizienz. Zusammen genommen sollte so eine Grundlage für zukünftige syngene oder auch allogene Myokardrekonstruktionsstudien geschaffen werden.

6.1 Expansionskultur der rPSC

Die Zusammensetzung des Kulturmediums ist ein entscheidender Faktor für die robuste Expansion von PSC der Ratte. Zusammen mit dem N2B27 Medium, welches erstmals von Ying und Smith beschrieben wurde [100], dienen drei Inhibitoren der Erhaltung der Pluripotenz der Ratten Stammzellen: 1. Leukemia inhibitory factor (LIF), welcher bereits als wichtiger Zusatz zur Beibehaltung der Pluripotenz in murinen Zellen bekannt war [110] 2. Der mitogen-activated protein kinase (MEK) Inhibitor PD0325901 und 3. der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) Inhibitor CHIR99021 [55]. Kulturmedien, die auf diesen drei Inhibitoren basieren, werden als LIF/2i Medien zusammengefasst und von der Mehrheit der Arbeitsgruppen verwendet, die mit Ratten PSC arbeiten

[56, 63, 101]. Ansätze, die auf LIF verzichten, werden als MEF/2i-Bedingungen bezeichnet und finden ebenfalls bei der Expansion von Ratten PSC Verwendung. Hierbei wird das LIF von den als Feederzellen verwendeten mitotisch inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) in das Medium abgegeben [111]. In der vorliegenden Studie führte die Verwendung des N2B27-LIF/2i Mediums sowohl für die Feeder-abhängige Kultur als auch für die Feeder-freie Monolayer-Kultur dazu, dass die pluripotenten Marker SSEA-1 und Oct 3/4 stabil exprimiert wurden. Es wurden karyotypischen Abnormalitäten in Form von Translokationen, Chromosomen-Duplikationen, bis hin zu Polyploidien (4n) beobachtet. Diese akkumulierten im Laufe der Monolayer-Kultur. Die Feeder-basierte Kolonie-Expansion konnte jedoch das Auftreten dieses Phänomens verlangsamen. Diese genetische Instabilität ist auch bei Feeder-freien Kulturen humaner und muriner PSC beschrieben worden [112, 113]. Das Auftreten dieser Abnormalitäten könnte durch das Fehlen von Serum im Kulturmedium verstärkt werden. Ludwig et al. führten die beobachteten Trisomien in humanen ESC auf die Feeder-freien und Serum-freien Isolations- und Kultivierungsbedingungen zurück [114]. Ein Bezug zwischen der Generierung der verwendeten Ratten PSC und chromosomalen Auffälligkeiten kann nicht ausgeschlossen werden. Diese traten tendenziell häufiger in riPSC auf als in rESC, wobei auch für letztere genetische Aberrationen dokumentiert wurden [115]. Es finden sich mehrere Hinweise darauf, dass insbesondere der Reprogrammierungsprozess Auswirkungen auf die genetische Stabilität der resultierenden iPSC Zellen hat [116-118]. Da in der vorgelegten Arbeit jedoch nur ein Klon des jeweiligen Stammzelltyps untersucht wurde, bedarf es der Analyse weiterer Zelllinien, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Ratten PSC Typ und dem Auftreten genetischer Abnormalitäten zu belegen.

Ein weiterer Aspekt, der in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, betraf die Verdopplungszeit der beiden PSC Typen unter den beiden Kulturbedingungen. Diese war für beide PSC-Typen sowohl auf Feedern, als auch in der Feeder-freien Monolayer-Kultur vergleichbar. Die verfügbaren Verdopplungszeiten aus der Literatur konnten für die riPSC bestätigt werden [63]. Verglichen mit den Literaturangaben für rESC unter MEF/2i-Bedingungen kam es zu einer Verlangsamung der Generationszeit um ca. 40% [69]. Ob diese Diskrepanz Klon-abhängig ist, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

Die o.g. ungewollten chromosomalen Abberationen durch die Feeder-freie Kultur stellen eine nicht zu unterschätzende Herausforderung dar. Bevor weiterführende Experimente mit diesen PSC *in vivo* vorgenommen werden, muss das Problem der chromosomalen Abberation gelöst werden. Dennoch dienen die hier vorgelegten Ergebnisse als wertvolle Grundlage für eine kosten- und zeiteffiziente Vermehrung von undifferenzierten PSC der Ratte. Diese können im Anschluss in die gewünschten Zelltypen differenziert werden. In diesem Zusammenhang wäre eine Implementierung von Bioreaktor-Systemen zur Massensuspensionskultur der nächste logische Schritt, wie sie z.B. 11Olmer et al. für

die Expansion von hPSC beschrieben hat [119]. Insbesondere für Optimierungsversuche von Differenzierungsansätzen ist die Menge an qualitativ hochwertigen Ausgangs-PSC von enormer Wichtigkeit, um statistisch aussagekräftige Ergebnisse in einem breiten Ansatz zu erhalten.

6.2 Etablierung und Optimierung der kardialen Differenzierung von Ratten PSC

Die effiziente Herstellung und Charakterisierung von murinen und humanen PSC-abgeleiteten KM ist durch mehrere Studien belegt [66, 67, 84, 87, 120-122]. Insbesondere die kardiale Differenzierung von humanen PSC konnte durch schrittweise Modulation entwicklungsbiologisch relevanter Signaltransduktionswege mit Hilfe niedermolekularer Substanzen (small molecules) oder Wachstumsfaktoren dahingehend optimiert werden, dass hochreine Kardiomyozytenpopulationen gewonnen werden können [67, 121, 123]. Bis heute sind jedoch keine detaillierten und quantitativen Studien im Bezug auf die kardiale Differenzierungseffizienz von riPSC bekannt, obwohl dieser PSC-Typ für kardiochirurgische Transplantationsstudien und weitere präklinische Rekonstruktionsmodelle durchaus wichtig ist. Da Cao et al. bisher als einzige die Differenzierung von funktionellen KM aus rESC berichteten [69], beziehen sich die meisten Vergleiche der hier erzielten Ergebnisse auf diese Studie.

In der vorgelegten Arbeit wurde versucht, den Anteil von riPSC-abgeleiteten KM in Serum-abhängigen spontanen Differenzierungen zu erhöhen. Die verwendeten rESC und riPSC bildeten problemlos mit Hilfe der Hanging-Drop Methode und gleichzeitigem Wechsel zu Serum-haltigem Differenzierungsmedium EBs. Im Gegensatz hierzu beobachteten Cao et al. ein Absterben von ESC bei der Initiierung der Differenzierung unter serum-basierten Bedingungen [69]. In dieser Studie bildeten sich EB-ähnliche Aggregate nur in Expansionsmedium. In der Folge wurde das Expansionsmedium stufenweise durch Serum-haltiges Differenzierungsmedium über mehrere Verdünnungsschritte ersetzt. In unserer Studie stellte sich die Auswahl des optimalen fötalen Kälberserums und die Verwendung von Ascorbat als essentiell für die erfolgreiche kardiale Differenzierung heraus. Die unterstützende Wirkung von Ascorbat wurde schon mehrfach für die Differenzierung von murinen PSC beschrieben [66, 84, 124, 125] und konnte hier erstmalig erfolgreich auf die Differenzierung von Ratten PSC angewandt werden. Obwohl der Effekt mit einer etwa 18-fachen Steigerung an spontan kontrahierenden EBs deutlich stärker bei den riPSC zu beobachten war, konnte die kardiale Differenzierung der rESC durch die Behandlung mit Ascorbat ebenfalls signifikant verbessert werden (ca. 4-fach). Der Anteil an kontrahierenden EBs aus rESC entsprach den von Cao et al. [69] für den gleichen Zelltyp beschriebenen Werten.

Für die Hochskalierung von KM wurde die zuvor etablierte Monolayer-Kultur verwendet, mit der ausreichende Mengen an undifferenzierten Ratten PSC (rESC und riPSC) produziert wurden. und für

Anschließend wurden sogenannte Agarose Microwells (AMW) für die EB Formation verwendet. Hierbei wurden Einzelzellsuspensionen auf eine, mit kleinen Vertiefungen versehene, Agaroseschicht aufgebracht. Dieser Ansatz erlaubt es, in einem Schritt simultan 300 EBs herzustellen. Diese Methode führt im Vergleich zur Hanging Drop Methode zu einer enormen Zeit- und Materialersparnis. Um den Effekt der eingesetzten Zellmenge auf die KM Differenzierungseffizienz zu untersuchen, wurden für jeden Zelltyp 2000, bzw. 3000 Zellen pro Aggregat verwendet. Die höhere Zellzahl führte zwar zu einer deutlich gesteigerten Anzahl an kontrahierenden EBs, jedoch war der KM-Anteil in den Differenzierungen mit der niedrigeren Ausgangszellzahl tendenziell höher. Mit einem KM-Anteil von knapp 20% lag die Effizienz um das dreifache höher, als von Cao et al. für rESC berichtet [69]. Anzumerken ist jedoch, dass bei der AMW-Methode der höchste Wert an kontrahierenden EBs um ca. 15% niedriger lag als bei der Hanging Drop Methode. Die vereinfachte und hochskalierte Kultur durch Feeder-freie Monolayer und die zeitsparende Initiierung der Differenzierung kompensieren jedoch diesen Verlust der Differenzierung. Ein weiterer Vorteil dieser Methode bestand darin, dass die Monolayer in junger Passage massenhaft expandiert und eingefroren werden konnten. So konnte man darauf verzichten, den Monolayer immer wieder neu aus der Kolonie-Expansion zu etablieren. Diese Herangehensweise hatte weder negative Auswirkungen auf die Expansion und die Pluripotenz, noch auf die kardiale Differenzierungseffizienz von riPSC und wurde in der Literatur noch nicht beschrieben.

6.3 Morphologische und elektrophysiologische Charakterisierung von Ratten PSC

Die Differenzierung beider Ratten PSC-Typen führte zur Generierung von KM, was sich durch die spontane Kontraktion der EBs in Suspensionskultur zeigte. Die Charakterisierung der KM auf die Expression von KM-assoziierten Genen erfolgte entweder innerhalb der EBs oder in Form von dissoziierten EBs in Monolayer Kultur. In Immunfluoreszenzanalysen konnten für alle Ansätze KM identifiziert werden, deren kontraktile Apparat eindeutig durch Sarkomere gekennzeichnet war. Darüber hinaus konnte die elektromechanische Kopplung zwischen einzelnen KM durch den Nachweis des Gap Junction-Proteins Connexin 43 belegt werden. Die Expression weiterer kardialer Markergene konnte mittels semi-quantitativer RT-PCR nachgewiesen werden. Die Funktionalität und Reife der aus riPSC generierten KM wurde mit Hilfe von elektrophysiologischen Untersuchungen bestimmt. Feldpotentialmessungen ausplattierter EBs wiesen das Vorhandensein von β -adenergen Rezeptoren und funktionellen Kalium- und Natriumkanälen an Tag 16 der Differenzierung nach. Aktionspotentialmessungen an vereinzelt riPSC-abgeleiteten KM bestätigten an Tag 21 das Vorhandensein von Schrittmacher-ähnlichen KM, sowie Atrium-ähnlichen und Ventrikel-ähnlichen KM. Zusammengefasst belegen diese Befunde die Funktionalität der aus rPSC abgeleiteten

Kardiomyozyten und unterstreichen deren Potential zur Verwendung in syngenem oder allogenen Transplantationsstudien zur Rekonstruktion von infarziertem Myokard.

6.4 Differenzierung von Fibroblasten-ähnlichen Zellen aus riPSC

Fibroblasten sind für das myokardiale Tissue Engineering unerlässlich, da sie den dreidimensionalen Gewebekonstrukten durch die Produktion von extrazellulärer Matrix Stabilität verleihen. Sie reagieren auf chemische und mechanische Reize mit einer Remodellierung der extrazellulären Matrix, was zu einer gewissen Adaptivität (z.B. passive und aktive Kraftentwicklung) führt [84]. In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, Zellen aus riPSC zu differenzieren, die durch ihr Wachstumsverhalten, ihre Morphologie und der Expression von entsprechenden Markern primären Hautfibroblasten der Ratte stark ähneln. Zusammen mit den PSC-abgeleiteten KM könnten diese Fibroblasten-ähnlichen Zellen zukünftig verwendet werden, bioartifizielle Herzmuskelkonstrukte aus einer Zellquelle herzustellen, um deren therapeutisches Potential in o.g. *in vivo* Studien zu untersuchen.

Mit den hier beschriebenen Ergebnissen im Bezug auf die Vereinfachung der Expansion, und der kardialen Differenzierung von PSC der Ratte und dem Nachweis der Funktionalität der PSC-abgeleiteten KM ist ein Großteil der Zielsetzungen für dieses Projekt erreicht worden. Es muss jedoch festgehalten werden, dass die besonders bei riPSC beobachteten genetischen Auffälligkeiten in Form von chromosomalen Veränderungen eine Herausforderung für die weitere Verwendung dieses Zelltyps *in vivo* darstellen. PSC der Ratte stellen einen zur Zeit noch relativ wenig untersuchten Stammzelltyp dar. Vor dem Hintergrund der stetigen Zunahme des Erkenntnisgewinns im Bezug auf die Expansion von PSC anderer Spezies im Laufe der vergangenen Jahre, ist davon auszugehen, dass dieses Problem durch weitere Optimierungen der Kulturbedingungen zeitnah bewältigt werden wird. Des Weiteren sind für Transplantationsversuche aufgereinigte KM-Populationen notwendig, um deren therapeutische Wirkung zu untersuchen. Hierfür wäre die Vermittlung einer KM-spezifischen Antibiotikaresistenz in PSC durch gentechnologische Maßnahmen [84], oder eine Anreicherung von KM durch metabolische Selektion auf Basis von Laktat hilfreich, wie sie schon für humane PSC-abgeleitete KM beschrieben wurde [126].

7 Ausblick

Die Verwendung von PSC-abgeleiteten KM zur Rekonstruktion von ischämischem Myokard erscheint eine greifbare Alternative zu bisherigen "ultima ratio" Optionen wie der Herztransplantation oder der Anwendung von mechanischen Unterstützungssystemen. Jedoch zeigen erste *in vivo* Experimente in Klein- und Großtier, dass noch einige Herausforderungen auf dem Weg zur klinischen Translation zu bewältigen sind. Hierzu gehört die Identifikation der am besten geeigneten Applikationsmethode der PSC-abgeleiteten KM, als auch Verfahren zur Reduktion einer immunologischen Abstoßungsreaktion. Diese Aspekte können am besten in einem klinisch relevanten Kleintiermodell untersucht werden. Die in der hier vorgelegten Arbeit gezeigte Differenzierung von riPSC zu funktionellen Herzmuskelzellen und Fibroblasten-artigen Zellen ist ein vielversprechender Fortschritt auf dem Weg zur Etablierung eines syngenem oder allogenen Rattenmodells für die Myokardrestauration. Sie schafft somit die Grundlage für die Gewinnung aussagekräftiger Erkenntnisse zur Optimierung der therapeutischen Wirksamkeit dieser Zellen. Eine Transplantatabstoßung aufgrund spezie-basierter immunologischer Interaktion kann in einem syngenem Modell ausgeschlossen werden.

In weiterführenden *in vitro* Experimenten müssen die PSC-abgeleiteten Kardiomyozyten aufgereinigt werden, um unerwünschte undifferenzierte Zellen zu entfernen. Dafür sind in der Arbeitsgruppe bereits selektierbare riPSC-Klone hergestellt worden, deren KM sich über eine herzmuskelspezifische Antibiotikaresistenz nach Differenzierung aufreinigen lassen [84, 127]. Der nächste Schritt wäre die Herstellung von bioartifiziellem Herzgewebe aus riPSC-KM und –Fibroblasten. Das riPSC-basierte Gewebe muss physiologisch charakterisiert werden wie für murine und humane bioartifizielle Myokardkonstrukte beschrieben [84]. Dafür steht ein Bioreaktor zur Verfügung, der die mechanische Konditionierung, Kraftmessung und mikroskopische Überwachung der Gewebebildung erlaubt [128]. Schließlich wird sich dann im syngenem/allogenen Ratten-Infarktmodell die Transplantation von Einzelzellen gegenüber solidem Herzmuskelgewebe im Hinblick auf Optimierung des Überlebens und der elektromechanischen Integration untersuchen lassen. Großtierversuche mit iPS-Zellderivaten sind unserer Ansicht nach erst sinnvoll, wenn im syngenem/allogenen Kleintiermodell die o.g. Aspekte hinreichend evaluiert worden sind.

8 Zusammenfassung

Dem kontinuierlich steigenden Bedarf an Spenderherzen steht eine sinkende Organspendebereitschaft der Bevölkerung entgegen. Eine vielversprechende alternative Therapieoption für die autologe Myokard-Restauration stellen aus pluripotenten Stammzellen (PSC) abgeleitete Kardiomyozyten (KM) dar. Vor der Anwendung im Menschen muss die Effektivität dieser neuen Strategie jedoch unter anderem in einem syngenem Kleintiermodell optimiert werden. Die Laborratte als Modellsystem bietet sich dazu an, weil reproduzierbare kardiochirurgische Verfahren an Ratten gut etabliert sind und deren Haltung kostengünstig möglich ist. Induziert pluripotente Stammzellen der Ratte (riPSC) wurden jedoch bisher noch nicht bezüglich ihres kardialen Differenzierungspotentials untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Feeder-freie Kultur undifferenzierter rESC und riPSC mit dem Ziel einer robusten Skalierbarkeit des Expansionsprozesses optimiert. Für die kardiale Differenzierung wurde das Agarose-Microwell-Verfahren mit anschließender Suspensionskultur etabliert, welches ebenfalls problemlos eine Massenkultur erlauben sollte. Die Zugabe von Ascorbat-2-Phosphat (AA-2P) führte zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl kontrahierender EBs (durchschnittlich 3.6-fach bei rESC und 17.6-fach bei riPSC). Das optimierte kardiale Differenzierungsprotokoll lieferte bis zu 8,9% Troponin T-positive rESC-abgeleitete KM und sogar bis zu 19,8% riPSC-abgeleitete KM an Tag 14 der Differenzierung. Die aus beiden rPSC Zelllinien hergestellten KM exprimierten typische kardiale Marker. Elektrophysiologische Analysen erlaubten die Messung extrazellulärer Feldpotentiale von kontraktilem KM, welche eine physiologische Frequenzerhöhung nach β -adrenerger Stimulation zeigten. Mittels der Patch-Clamp-Technik an einzelnen iPSC-abgeleiteten KM, konnten verschiedene Aktionspotentiale nachgewiesen werden, welche Vorhof-, Kammer- und Schrittmacher-Subtypen ähnelten. Darüber hinaus wurden auch riPSC-abgeleitete Fibroblasten-ähnliche Zellen differenziert, welche morphologisch primären Hautfibroblasten ähnelten und typische Fibroblastenmarker exprimierten. Letztere sind notwendig, um die iPSC-abgeleiteten KM für die zukünftig geplante Herstellung von bioartificialen Herzmuskelkonstrukten zu verwenden.

Diese Arbeit zeigt die skalierbare Expansion und kardiale Differenzierung von iPSC der Ratte. Die erhaltenen KM wurden erstmals ausführlich strukturell und physiologisch charakterisiert. Die Verwendung von Ratten-iPSC-abgeleiteten KM im syngenem Myokard-Restaurationsmodell könnte dann zum besseren Verständnis der Mechanismen des Überlebens und der Integration der Zellen im Empfängermyokard beitragen, ohne immunologische oder physiologische Einschränkungen wie sie bei xenogenen Modellen vorliegen. Somit legt diese Arbeit einen wichtigen Grundstein für die Entwicklung einer patienten-spezifischen Myokard-Rekonstruktions-Strategie.

9 Literaturverzeichnis

1. World Health Statistic (2016): World Health Statistics. 1–136 (2016).
2. Statistisches Bundesamt: Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2014. 1–51 (2015).
3. Yancy, C.W., Jessup, M., Bozkurt, B., Butler, J., Casey, D.E., Drazner, M.H., Fonarow, G.C., Geraci, S.A., Horwich, T., Januzzi, J.L., Johnson, M.R., Kasper, E.K., Levy, W.C., Masoudi, F.A., McBride, P.E., McMurray, J.J.V., Mitchell, J.E., Peterson, P.N., Riegel, B., Sam, F., Stevenson, L.W., Tang, W.H.W., Tsai, E.J., Wilkoff, B.L.: 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, e147–e239 (2013).
4. McMurray, J.J.V., Packer, M., Desai, A.S., Gong, J., Lefkowitz, M.P., Rizkala, A.R., Rouleau, J.L., Shi, V.C., Solomon, S.D., Swedberg, K., Zile, M.R.: Angiotensin–Neprilysin Inhibition versus Enalapril in Heart Failure. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1409077>. 371, 993–1004 (2014).
5. Jneid, H., Anderson, J.L., Wright, R.S., Adams, C.D., Bridges, C.R., Casey, D.E., Ettinger, S.M., Fesmire, F.M., Ganiats, T.G., Lincoff, A.M., Peterson, E.D., Philippides, G.J., Theroux, P., Wenger, N.K., Zidar, J.P.: 2012 ACCF/AHA Focused Update of the Guideline for the Management of Patients With Unstable Angina/Non–ST-Elevation Myocardial Infarction (Updating the 2007 Guideline and Replacing the 2011 Focused Update). *J. Am. Coll. Cardiol.* 60, 645–681 (2012).
6. Amsterdam, E.A., Wenger, N.K., Brindis, R.G., Casey, D.E., Ganiats, T.G., Holmes, D.R., Jaffe, A.S., Jneid, H., Kelly, R.F., Kontos, M.C., Levine, G.N., Liebson, P.R., Mukherjee, D., Peterson, E.D., Sabatine, M.S., Smalling, R.W., Zieman, S.J.: 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Non–ST-Elevation Acute Coronary Syndromes: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64, e139–e228 (2014).
7. Fremes, S., Goldman, B.S.: 2015 STS Guidelines on Arterial conduits for Coronary Artery Bypass Grafting. 1–22 (2015).
8. Barnard, C.N.: The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S. Afr. Med. J.* 41, 1271–1274 (1967).
9. Lund, L.H., Edwards, L.B., Kucheryavaya, A.Y., Benden, C., Dipchand, A.I., Goldfarb, S., Levvey, B.J., Meiser, B., Rossano, J.W., Yusen, R.D., Stehlik, J.: The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation_ Thirty-second Official Adult Heart Transplantation Report—2015; Focus Theme_ Early Graft Failure. *Journal of Heart and Lung Transplantation.* 34, 1244–1254 (2015).
10. Roussel, J.C., Baron, O., Périgaud, C., Bizouarn, P., Pattier, S., Habash, O., Mugniot, A., Petit, T., Michaud, J.L., Heymann, M.F., Treilhaud, M., Trochu, J.N., Gueffet, J.P., Lamirault, G., Dubeau, D., Despins, P.: Outcome of Heart Transplants 15 to 20 Years Ago: Graft Survival, Post-transplant Morbidity, and Risk Factors for Mortality. *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 27, 486–493 (2008).

11. Eurotransplant International Foundation, 2016: Annual Report 2015. 1–164 (2016).
12. Kirklin, J.K., Naftel, D.C., Pagani, F.D., Kormos, R.L., Stevenson, L.W., Blume, E.D., Myers, S.L., Miller, M.A., Baldwin, J.T., Young, J.B.: Seventh INTERMACS annual report: 15,000 patients and counting. *J. Heart Lung Transplant.* 34, 1495–1504 (2015).
13. DeBakey, M.E.: Left ventricular bypass pump for cardiac assistance. Clinical experience. *American Journal of Cardiology.* 27, 3–11 (1971).
14. Kirklin, J.K., Naftel, D.C.: Mechanical Circulatory Support Registering a Therapy in Evolution. *Circulation: Heart Failure.* 1, 200–205 (2008).
15. Frazier, O.H., Rose, E.A., McCarthy, P., Burton, N.A., Tector, A., Levin, H., Kayne, H.L., Poirier, V.L., Dasse, K.A.: Improved mortality and rehabilitation of transplant candidates treated with a long-term implantable left ventricular assist system. *Annals of Surgery.* 222, 327–36– discussion 336–8 (1995).
16. Frazier, O.H.: First use of an untethered, vented electric left ventricular assist device for long-term support. *Circulation.* 89, 2908–2914 (1994).
17. Frazier, O.H., Rose, E.A., Oz, M.C., Dembitsky, W., McCarthy, P., Radovancevic, B., Poirier, V.L., Dasse, K.A.: Multicenter clinical evaluation of the HeartMate vented electric left ventricular assist system in patients awaiting heart transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 122, 1186–1195 (2001).
18. Griffith, B.P., Kormos, R.L., Borovetz, H.S., Litwak, K., Antaki, J.F., Poirier, V.L., Butler, K.C.: HeartMate II left ventricular assist system: from concept to first clinical use. *Ann. Thorac. Surg.* 71, S116–S120 (2001).
19. LaRose, J.A., Tamez, D., Ashenuga, M., Reyes, C.: Design Concepts and Principle of Operation of the HeartWare Ventricular Assist System. *ASAIO Journal.* 1–5 (2010).
20. Slaughter, M.S., Rogers, J.G., Milano, C.A., Russell, S.D., Conte, J.V., Feldman, D., Sun, B., Tatooles, A.J., Delgado, R.M.I., Long, J.W., Wozniak, T.C., Ghumman, W., Farrar, D.J., Frazier, O.H.: Advanced Heart Failure Treated with Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0909938>. (2009).
21. Strueber, M., O'Driscoll, G., Jansz, P., Khaghani, A., Levy, W.C., Wieselthaler, G.M., HeartWare Investigators: Multicenter evaluation of an intrapericardial left ventricular assist system. *J. Am. Coll. Cardiol.* 57, 1375–1382 (2011).
22. Rose, E.A., Gelijns, A.C., Moskowitz, A.J., Heitjan, D.F., Stevenson, L.W., Dembitsky, W., Long, J.W., Ascheim, D.D., Tierney, A.R., Levitan, R.G., Watson, J.T., Meier, P., Ronan, N.S., Shapiro, P.A., Lazar, R.M., Miller, L.W., Gupta, L., Frazier, O.H., Desvigne-Nickens, P., Oz, M.C., Poirier, V.L., Randomized Evaluation of Mechanical Assistance for the Treatment of Congestive Heart Failure (REMATCH) Study Group: Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure. *N. Engl. J. Med.* 345, 1435–1443 (2001).
23. Park, S.J., Milano, C.A., Tatooles, A.J., Rogers, J.G., Adamson, R.M., Steidley, D.E., Ewald, G.A., Sundaeswaran, K.S., Farrar, D.J., Slaughter, M.S., HeartMate II Clinical Investigators: Outcomes in advanced heart failure patients with left ventricular assist devices for destination therapy. *Circulation: Heart Failure.* 5, 241–248 (2012).

24. Aaronson, K.D., Slaughter, M.S., Miller, L.W., McGee, E.C., Cotts, W.G., Acker, M.A., Jessup, M.L., Gregoric, I.D., Loyalka, P., Frazier, O.H., Jeevanandam, V., Anderson, A.S., Kormos, R.L., Teuteberg, J.J., Levy, W.C., Naftel, D.C., Bittman, R.M., Pagani, F.D., Hathaway, D.R., Boyce, S.W.: Use of an Intrapericardial, Continuous Flow, Centrifugal Pump in Patients Awaiting Heart Transplantation. *Circulation*. 125, Circulation AHA .111.058412–3200 (2012).
25. Potapov, E.V., Stepanenko, A., Krabatsch, T., Hetzer, R.: Managing long-term complications of left ventricular assist device therapy. *Current Opinion in Cardiology*. 26, 237–244 (2011).
26. Qian, L., Huang, Y., Spencer, C.I., Foley, A., Vedantham, V., Liu, L., Conway, S.J., Fu, J.-D., Srivastava, D.: In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*. 485, 593–598 (2012).
27. Fu, Y., Huang, C., Xu, X., Gu, H., Ye, Y., Jiang, C., Qiu, Z., Xie, X.: Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails. *Cell Res*. 25, 1013–1024 (2015).
28. Ucar, A., Gupta, S.K., Fiedler, J., Erikci, E., Kardasinski, M., Batkai, S., Dangwal, S., Kumarswamy, R., Bang, C., Holzmann, A., Remke, J., Caprio, M., Jentsch, C., Engelhardt, S., Geisendorf, S., Glas, C., Hofmann, T.G., Nessling, M., Richter, K., Schiffer, M., Carrier, L., Napp, L.C., Bauersachs, J., Chowdhury, K., Thum, T.: The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy. *Nat Comms*. 3, 1078 (2012).
29. Jayawardena, T.M., Finch, E.A., Zhang, L., Zhang, H., Hodgkinson, C.P., Pratt, R.E., Rosenberg, P.B., Mirotsov, M., Dzau, V.J.: MicroRNA Induced Cardiac Reprogramming In Vivo Novelty and Significance. *Circ Res*. 116, 418–424 (2015).
30. Moore, K., Persaud, T.V.N., Torchia, M.G., Viebahn, C.: Embryologie. “Elsevier, Urban&Fischer Verlag” (2013).
31. Wobus, A.M.: Potential of embryonic stem cells. *Molecular Aspects of Medicine*. 22, 149–164 (2001).
32. Bryder, D., Rossi, D.J., Weissman, I.L.: Hematopoietic Stem Cells. *The American Journal of Pathology*. 169, 338–346 (2006).
33. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S.M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., Leri, A., Anversa, P.: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 410, 701–705 (2001).
34. Szmitko, P.E., Fedak, P.W.M., Weisel, R.D., Stewart, D.J., Kutryk, M.J.B., Verma, S.: Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation*. 107, 3093–3100 (2003).
35. Nygren, J.M., Jovinge, S., Breitbach, M., Säwén, P., Röhl, W., Hescheler, J., Taneera, J., Fleischmann, B.K., Jacobsen, S.E.W.: Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nature Medicine*. 10, 494–501 (2004).
36. Murry, C.E., Soonpaa, M.H., Reinecke, H., Nakajima, H., Nakajima, H.O., Rubart, M., Pasumarthi, K.B.S., Virag, J.I., Bartelmez, S.H., Poppa, V., Bradford, G., Dowell, J.D., Williams, D.A., Field, L.J.: Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac

- myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 428, 664–668 (2004).
37. Kolossov, E., Bostani, T., Roell, W., Breitbart, M., Pillekamp, F., Nygren, J.M., Sasse, P., Rubenchik, O., Fries, J.W.U., Wenzel, D., Geisen, C., Xia, Y., Lu, Z., Duan, Y., Kettenhofen, R., Jovinge, S., Bloch, W., Bohlen, H., Welz, A., Hescheler, J., Jacobsen, S.E., Fleischmann, B.K.: Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med*. 203, 2315–2327 (2006).
 38. Gruh, I., Beilner, J., Blomer, U., Schmiedl, A., Schmidt-Richter, I., Kruse, M.-L., Haverich, A., Martin, U.: No Evidence of Transdifferentiation of Human Endothelial Progenitor Cells Into Cardiomyocytes After Coculture With Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Circulation*. 113, 1326–1334 (2006).
 39. Madonna, R., van Laake, L.W., Davidson, S.M., Engel, F.B., Hausenloy, D.J., Lecour, S., Leor, J., Perrino, C., Schulz, R., Ytrehus, K., Landmesser, U., Mummery, C.L., Janssens, S., Willerson, J., Eschenhagen, T., Ferdinandy, P., Sluijter, J.P.G.: Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group Cellular Biology of the Heart: cell-based therapies for myocardial repair and regeneration in ischemic heart disease and heart failure. *European Heart Journal*. 37, ehv113–1798 (2016).
 40. Janssens, S., Dubois, C., Bogaert, J., Theunissen, K., Deroose, C., Desmet, W., Kalantzi, M., Herbots, L., Sinnaeve, P., Dens, J., Maertens, J., Rademakers, F., Dymarkowski, S., Gheysens, O., Van Cleemput, J., Bormans, G., Nuyts, J., Belmans, A., Mortelmans, L., Boogaerts, M., Van de Werf, F.: Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *The Lancet*. 367, 113–121 (2006).
 41. Martin-Rendon, E., Brunskill, S.J., Hyde, C.J., Stanworth, S.J., Mathur, A., Watt, S.M.: Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *European Heart Journal*. 29, 1807–1818 (2008).
 42. van Berlo, J.H., Kanisicak, O., Maillet, M., Vagnozzi, R.J., Karch, J., Lin, S.-C.J., Middleton, R.C., Marbán, E., Molkentin, J.D.: c-kit+ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature*. 509, 337–341 (2014).
 43. Nowbar, A.N., Mielewicz, M., Karavassilis, M., Dehbi, H.-M., Shun-Shin, M.J., Jones, S., Howard, J.P., Cole, G.D., Francis, D.P.: Discrepancies in autologous bone marrow stem cell trials and enhancement of ejection fraction (DAMASCENE): weighted regression and meta-analysis. *BMJ*. 348, g2688–g2688 (2014).
 44. Fisher, S.A., Zhang, H., Doree, C., Mathur, A., Martin-Rendon, E.: Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev*. CD006536 (2015).
 45. Yamanaka, S.: Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell*. 10, 678–684 (2012).
 46. Evans, M.J., Kaufman, M.H.: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. (1981).
 47. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282, 1145–1147 (1998).

48. Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.-P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., Thomson, J.A.: Clonally Derived Human Embryonic Stem Cell Lines Maintain Pluripotency and Proliferative Potential for Prolonged Periods of Culture. *Developmental Biology*. 227, 271–278 (2000).
49. Williams, R.L., Hilton, D.J., Nicolai, N.A.: potential of embryonic stem cells. *Nature*. (1988).
50. Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.-S., Sritanandomchai, H., Masterson, K., Larson, J., Eaton, D., Sadler-Fredd, K., Battaglia, D., Lee, D., Wu, D., Jensen, J., Patton, P., Gokhale, S., Stouffer, R.L., Wolf, D., Mitalipov, S.: Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*. 153, 1228–1238 (2013).
51. ESchG: Gesetz zum Schutz von Embryonen (Embryonenschutzgesetz - ESchG). 1–5 (2016).
52. Iannaccone, P.M., Taborn, G.U., Garton, R.L., Caplice, M.D., Brenin, D.R.: Pluripotent Embryonic Stem Cells from the Rat Are Capable of Producing Chimeras. *Developmental Biology*. 163, 288–292 (1994).
53. Ouhibi, N., Sullivan, N.F., English, J., Colledge, W.H., Evans, M.J., Clarke, N.J.: Initial culture behaviour of rat blastocysts on selected feeder cell lines. *Molecular Reproduction and Development*. 40, 311–324 (1995).
54. Vassilieva, S., Guan, K., Pich, U., Wobus, A.M.: Establishment of SSEA-1- and Oct-4-Expressing Rat Embryonic Stem-like Cell Lines and Effects of Cytokines of the IL-6 Family on Clonal Growth. *Experimental Cell Research*. 258, 361–373 (2000).
55. Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., McLay, R., Hall, J., Ying, Q.-L., Smith, A.: Capture of Authentic Embryonic Stem Cells from Rat Blastocysts. *Cell*. 135, 1287–1298 (2008).
56. Li, P., Tong, C., Mehrian-Shai, R., Jia, L., Wu, N., Yan, Y., Maxson, R.E., Schulze, E.N., Song, H., Hsieh, C.-L., Pera, M.F., Ying, Q.-L.: Germline Competent Embryonic Stem Cells Derived from Rat Blastocysts. *Cell*. 135, 1299–1310 (2008).
57. Ueda, S., Kawamata, M., Teratani, T., Shimizu, T., Tamai, Y., Ogawa, H., Hayashi, K., Tsuda, H., Ochiya, T.: Establishment of Rat Embryonic Stem Cells and Making of Chimera Rats. *PLoS ONE*. 3, e2800 (2008).
58. Kwitek, A.E., Tonellato, P.J., Chen, D., Gullings-Handley, J., Cheng, Y.S., Twigger, S., Scheetz, T.E., Casavant, T.L., Stoll, M., Nobrega, M.A., Shiozawa, M., Soares, M.B., Sheffield, V.C., Jacob, H.J.: Automated construction of high-density comparative maps between rat, human, and mouse. *Genome Res*. 11, 1935–1943 (2001).
59. Takahashi, K., Yamanaka, S.: Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 126, 663–676 (2006).
60. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S.: Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 131, 861–872 (2007).
61. Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A.: Induced Pluripotent Stem

- Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*. 318, 1917–1920 (2007).
62. Liao, J., Cui, C., Chen, S., Ren, J., Chen, J., Gao, Y., Li, H., Jia, N., Cheng, L., Xiao, H., Xiao, L.: Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines from Adult Rat Cells. *Stem Cell*. 4, 11–15 (2009).
63. Merkl, C., Saalfrank, A., Riesen, N., Kühn, R., Pertek, A., Eser, S., Hardt, M.S., Kind, A., Saur, D., Würst, W., Iglesias, A., Schnieke, A.: Efficient generation of rat induced pluripotent stem cells using a non-viral inducible vector. *PLoS ONE*. 8, e55170 (2013).
64. Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W.: The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. (1985).
65. Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J., Gepstein, L.: Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 108, 407–414 (2001).
66. Takahashi, T., Lord, B., Schulze, P.C., Fryer, R.M., Sarang, S.S., Gullans, S.R., Lee, R.T.: Ascorbic Acid Enhances Differentiation of Embryonic Stem Cells Into Cardiac Myocytes. *Circulation*. 107, 1912–1916 (2003).
67. Lian, X., Hsiao, C., Wilson, G., Zhu, K., Hazeltine, L.B., Azarin, S.M., Raval, K.K., Zhang, J., Kamp, T.J., Palecek, S.P.: Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E1848–57 (2012).
68. Birket, M.J., Ribeiro, M.C., Kosmidis, G., Ward, D., Leitoguinho, A.R., van de Pol, V., Dambrot, C., Devalla, H.D., Davis, R.P., Mastroberardino, P.G., Atsma, D.E., Passier, R., Mummery, C.L.: Contractile Defect Caused by Mutation in MYBPC3 Revealed under Conditions Optimized for Human PSC-Cardiomyocyte Function. *Cell Reports*. 13, 733–745 (2015).
69. Cao, N., Liao, J., Liu, Z., Zhu, W., Wang, J., Liu, L., Yu, L., Xu, P., Cui, C., Xiao, L., Yang, H.-T.: In vitro differentiation of rat embryonic stem cells into functional cardiomyocytes. *Nature Publishing Group*. 21, 1316–1331 (2011).
70. Nelson, T.J., Martinez-Fernandez, A., Yamada, S., Perez-Terzic, C., Ikeda, Y., Terzic, A.: Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 120, 408–416 (2009).
71. Min, J.-Y., Yang, Y., Converso, K.L., Liu, L., Huang, Q., Morgan, J.P., Xiao, Y.-F.: Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *Journal of Applied Physiology*. 92, 288–296 (2002).
72. Singla, D.K., Sobel, B.E.: Enhancement by growth factors of cardiac myocyte differentiation from embryonic stem cells: A promising foundation for cardiac regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 335, 637–642 (2005).
73. Ahmed, R.P., Ashraf, M., Buccini, S., Shujia, J., Haider, H.K.: Cardiac tumorigenic potential of induced pluripotent stem cells in an immunocompetent host with myocardial infarction. *Regenerative Medicine*. 6, 171–178 (2011).

74. Zhang, Y., Wang, D., Chen, M., Yang, B., Zhang, F., Cao, K.: Intramyocardial Transplantation of Undifferentiated Rat Induced Pluripotent Stem Cells Causes Tumorigenesis in the Heart. *PLoS ONE*. 6, e19012 (2011).
75. Qiao, H., Surti, S., Choi, S.R., Raju, K., Zhang, H., Ponde, D.E., Kung, H.F., Karp, J., Zhou, R.: Death and Proliferation Time Course of Stem Cells Transplanted in the Myocardium. *Mol Imaging Biol*. 11, 408–414 (2009).
76. Zhang, M., Methot, D., Poppa, V., Fujio, Y., Walsh, K., Murry, C.E.: Cardiomyocyte Grafting for Cardiac Repair: Graft Cell Death and Anti-Death Strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 33, 907–921 (2001).
77. Laflamme, M.A., Gold, J., Xu, C., Hassanipour, M., Rosler, E., Police, S., Muskheli, V., Murry, C.E.: Formation of Human Myocardium in the Rat Heart from Human Embryonic Stem Cells. *The American Journal of Pathology*. 167, 663–671 (2005).
78. Gerbin, K.A., Yang, X., Murry, C.E., Coulombe, K.L.K.: Enhanced Electrical Integration of Engineered Human Myocardium via Intramyocardial versus Epicardial Delivery in Infarcted Rat Hearts. *PLoS ONE*. 10, e0131446 (2015).
79. Shiba, Y., Fernandes, S., Zhu, W.-Z., Filice, D., Muskheli, V., Kim, J., Palpant, N.J., Gantz, J., Moyes, K.W., Reinecke, H., Van Biber, B., Dardas, T., Mignone, J.L., Izawa, A., Hanna, R., Viswanathan, M., Gold, J.D., Kotlikoff, M.I., Sarvazyan, N., Kay, M.W., Murry, C.E., Laflamme, M.A.: Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature*. 489, 322–325 (2012).
80. Chong, J.J.H., Yang, X., Don, C.W., Minami, E., Liu, Y.-W., Weyers, J.J., Mahoney, W.M., Van Biber, B., Cook, S.M., Palpant, N.J., Gantz, J.A., Fugate, J.A., Muskheli, V., Gough, G.M., Vogel, K.W., Astley, C.A., Hotchkiss, C.E., Baldessari, A., Pabon, L., Reinecke, H., Gill, E.A., Nelson, V., Kiem, H.-P., Laflamme, M.A., Murry, C.E.: Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*. 510, 273–277 (2014).
81. Eschenhagen, T., Fink, C., Remmers, U., Scholz, H., Wattchow, J., Weil, J., Zimmermann, W., Dohmen, H.H., Schäfer, H., Bishopric, N., Wakatsuki, T., Elson, E.L.: Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J*. 11, 683–694 (1997).
82. Zimmermann, W.H., Melnychenko, I., Wasmeier, G., Didié, M., Naito, H., Nixdorff, U., Hess, A., Budinsky, L., Brune, K., Michaelis, B., Dhein, S., Schwoerer, A., Ehmke, H., Eschenhagen, T.: Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nature Medicine*. 12, 452–458 (2006).
83. Tulloch, N.L., Muskheli, V., Razumova, M.V., Korte, F.S., Regnier, M., Hauch, K.D., Pabon, L., Reinecke, H., Murry, C.E.: Growth of Engineered Human Myocardium With Mechanical Loading and Vascular Coculture Novelty and Significance. *Circ Res*. 109, 47–59 (2011).
84. Kensah, G., Roa Lara, A., Dahlmann, J., Zweigerdt, R., Schwanke, K., Hegermann, J., Skvorc, D., Gawol, A., Azizian, A., Wagner, S., Maier, L.S., Krause, A., Dräger, G., Ochs, M., Haverich, A., Gruh, I., Martin, U.: Murine and human pluripotent stem cell-derived cardiac bodies form contractile myocardial tissue in vitro. *European Heart Journal*. 34, 1134–1146 (2013).
85. Schaaf, S., Shibamiya, A., Mewe, M., Eder, A., Stöhr, A., Hirt, M.N., Rau, T., Zimmermann,

- W.H., Conradi, L., Eschenhagen, T., Hansen, A.: Human engineered heart tissue as a versatile tool in basic research and preclinical toxicology. *PLoS ONE*. 6, e26397 (2011).
86. Liao, B., Christoforou, N., Leong, K.W., Bursac, N.: Pluripotent stem cell-derived cardiac tissue patch with advanced structure and function. *Biomaterials*. 32, 9180–9187 (2011).
87. Dahlmann, J., Kensah, G., Kempf, H., Skvorc, D., Gawol, A., Elliott, D.A., Dräger, G., Zweigerdt, R., Martin, U., Gruh, I.: The use of agarose microwells for scalable embryoid body formation and cardiac differentiation of human and murine pluripotent stem cells. *Biomaterials*. 34, 2463–2471 (2013).
88. Simizu, S., Ishida, K., Wierzba, M.K., Sato, T.-A., Osada, H.: Expression of heparanase in human tumor cell lines and human head and neck tumors. *Cancer Letters*. 193, 83–89 (2003).
89. Matsuura, K., Masuda, S., Haraguchi, Y., Yasuda, N., Shimizu, T., Hagiwara, N., Zandstra, P.W., Okano, T.: Creation of mouse embryonic stem cell-derived cardiac cell sheets. *Biomaterials*. 32, 7355–7362 (2011).
90. Kawamura, M., Miyagawa, S., Miki, K., Saito, A., Fukushima, S., Higuchi, T., Kawamura, T., Kuratani, T., Daimon, T., Shimizu, T., Okano, T., Sawa, Y.: Feasibility, Safety, and Therapeutic Efficacy of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Sheets in a Porcine Ischemic Cardiomyopathy Model. *Circulation*. 126, S29–S37 (2012).
91. Zimmermann, W.H., Melnychenko, I., Eschenhagen, T.: Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts. *Biomaterials*. 25, 1639–1647 (2004).
92. Masumoto, H., Nakane, T., Tinney, J.P., Yuan, F., Ye, F., Kowalski, W.J., Minakata, K., Sakata, R., Yamashita, J.K., Keller, B.B.: The myocardial regenerative potential of three-dimensional engineered cardiac tissues composed of multiple human iPS cell-derived cardiovascular cell lineages. *Scientific Reports*. 6, 29933 (2016).
93. Dai, B., Huang, W., Xu, M., Millard, R.W., Gao, M.H., Hammond, H.K., Menick, D.R., Ashraf, M., Wang, Y.: Reduced Collagen Deposition in Infarcted Myocardium Facilitates Induced Pluripotent Stem Cell Engraftment and Angiomyogenesis for Improvement of Left Ventricular Function. *J. Am. Coll. Cardiol*. 58, 2118–2127 (2011).
94. Masumoto, H., Ikuno, T., Takeda, M., Fukushima, H., Marui, A., Katayama, S., Shimizu, T., Ikeda, T., Okano, T., Sakata, R., Yamashita, J.K.: Human iPS cell-engineered cardiac tissue sheets with cardiomyocytes and vascular cells for cardiac regeneration. *Scientific Reports*. 4, 6716 (2014).
95. Martens, A., Rojas, S.V., Baraki, H., Rathert, C., Schecker, N., Zweigerdt, R., Schwanke, K., Rojas-Hernandez, S., Martin, U., Saito, S., Schmitto, J.D., Haverich, A., Kutschka, I.: Substantial early loss of induced pluripotent stem cells following transplantation in myocardial infarction. *Artif Organs*. 38, 978–984 (2014).
96. Kawamura, M., Miyagawa, S., Fukushima, S., Saito, A., Miki, K., Ito, E., Sougawa, N., Kawamura, T., Daimon, T., Shimizu, T., Okano, T., Toda, K., Sawa, Y.: Enhanced Survival of Transplanted Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes by the Combination of Cell Sheets With the Pedicled Omental Flap Technique in a Porcine Heart. *Circulation*. 128, S87–S94 (2013).

97. Masui, N., Nishikawa, T., Takagi, Y., Kimura, H., Mori, M., Yokose, S., Asai, H., Gonda, T., Yanabe, M., Sato, K.: Establishment of a Set of Combined Immunodeficient DA/Slc-Foxn1^{rnu} Lystbg Congenic Rat Strains. *Experimental Animals*. 53, 399–407 (2004).
98. Devos, T., Shengqiao, L., Gysemans, C., Yan, Y., Damme, B.V., Nelson-Holte, M., Billiau, A.D., Waer, M., Mathieu, C.: Late CD8⁺ T Cell-Dependent Xenoantibody Production in Innate Tolerant Nude Rats After Hamster Islet Grafting But Not After Hamster Heart Grafting. *Transplantation*. 85, 1489–1495 (2008).
99. Araki, R., Uda, M., Hoki, Y., Sunayama, M., Nakamura, M., Ando, S., Sugiura, M., Ideno, H., Shimada, A., Nifuji, A., Abe, M.: Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature*. 494, 100–104 (2013).
100. Ying, Q.-L., Smith, A.G.: Defined Conditions for Neural Commitment and Differentiation. In: *Differentiation of Embryonic Stem Cells*. pp. 327–341. Elsevier (2003).
101. Chen, Y., Blair, K., Smith, A.: Robust Self-Renewal of Rat Embryonic Stem Cells Requires Fine-Tuning of Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibition. *Stem Cell Reports*. 1, 209–217 (2013).
102. Wobus, A.M., Wallukat, G., Hescheler, J.: Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation*. 48, 173–182 (1991).
103. Xu, C., Police, S., Rao, N., Carpenter, M.K.: Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res*. 91, 501–508 (2002).
104. Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, X., Levasseur, D.N., Theunissen, T.W., Orkin, S.H.: A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*. 444, 364–368 (2006).
105. Zweigerdt, R.: Large scale production of stem cells and their derivatives. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 114, 201–235 (2009).
106. Martin, G.R.: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *PNAS*. 78, 7634–7638 (1981).
107. Fernandes, S., Naumova, A.V., Zhu, W.Z., Laflamme, M.A., Gold, J., Murry, C.E.: Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes engraft but do not alter cardiac remodeling after chronic infarction in rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 49, 941–949 (2010).
108. Soonpaa, M.H., Koh, G.Y., Klug, M.G., Field, L.J.: Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science*. 264, 98–101 (1994).
109. Zimmermann, W.H., Didié, M., Wasmeier, G.H., Nixdorff, U., Hess, A., Melnychenko, I., Boy, O., Neuhuber, W.L., Weyand, M., Eschenhagen, T.: Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation*. 106, 1151–7 (2002).
110. Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., Smith, A.: Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*. 12, 2048–2060 (1998).
111. Men, H., Bryda, E.C.: Derivation of a Germline Competent Transgenic Fischer 344 Embryonic Stem Cell Line. *PLoS ONE*. 8, e56518 (2013).

112. Catalina, P., Montes, R., Ligeró, G., Sanchez, L., la Cueva, de, T., Bueno, C., Leone, P.E., Menendez, P.: Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties? *Molecular Cancer* 2008 7:1. 7, 76 (2008).
113. Loo, D.T., Fuquay, J.I., Rawson, C.L., Barnes, D.W.: Extended culture of mouse embryo cells without senescence: inhibition by serum. *Science*. 236, 200–202 (1987).
114. Ludwig, T.E., Levenstein, M.E., Jones, J.M., Berggren, W.T., Mitchen, E.R., Frane, J.L., Crandall, L.J., Daigh, C.A., Conard, K.R., Piekarczyk, M.S., Llanas, R.A., Thomson, J.A.: Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol*. 24, 185–187 (2006).
115. Hong, S.G., Dunbar, C.E., Winkler, T.: Assessing the risks of genotoxicity in the therapeutic development of induced pluripotent stem cells. *Mol. Ther.* 21, 272–281 (2013).
116. Taapken, S.M., Nisler, B.S., Newton, M.A., Sampsell-Barron, T.L., Leonhard, K.A., McIntire, E.M., Montgomery, K.D.: Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 29, 313–314 (2011).
117. Ben-David, U., Benvenisty, N.: High Prevalence of Evolutionarily Conserved and Species-Specific Genomic Aberrations in Mouse Pluripotent Stem Cells. *STEM CELLS*. 30, 612–622 (2012).
118. Chen, Q., Shi, X., Rudolph, C., Yu, Y., Zhang, D., Zhao, X., Mai, S., Wang, G., Schlegelberger, B., Shi, Q.: Recurrent trisomy and Robertsonian translocation of chromosome 14 in murine iPS cell lines. *Chromosome Res.* 19, 857–868 (2011).
119. Olmer, R., Lange, A., Selzer, S., Kasper, C., Haverich, A., Martin, U., Zweigerdt, R.: Suspension Culture of Human Pluripotent Stem Cells in Controlled, Stirred Bioreactors. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 18, 772–784 (2012).
120. Mauritz, C., Schwanke, K., Reppel, M., Neef, S., Katsirntaki, K., Maier, L.S., Nguemo, F., Menke, S., Hausteiner, M., Hescheler, J., Hasenfuss, G., Martin, U.: Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation*. 118, 507–517 (2008).
121. Kattman, S.J., Witty, A.D., Gagliardi, M., Dubois, N.C., Niapour, M., Hotta, A., Ellis, J., Keller, G.: Stage-Specific Optimization of Activin/Nodal and BMP Signaling Promotes Cardiac Differentiation of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell Lines. *Cell Stem Cell*. 8, 228–240 (2011).
122. Kempf, H., Olmer, R., Kropp, C., Rückert, M., Jara-Avaca, M., Robles-Diaz, D., Franke, A., Elliott, D.A., Wojciechowski, D., Fischer, M., Roa Lara, A., Kensah, G., Gruh, I., Haverich, A., Martin, U., Zweigerdt, R.: Controlling Expansion and Cardiomyogenic Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells in Scalable Suspension Culture. *Stem Cell Reports*. 3, 1132–1146 (2014).
123. Burridge, P.W., Matsa, E., Shukla, P., Lin, Z.C., Churko, J.M., Ebert, A.D., Lan, F., Diecke, S., Huber, B., Mordwinkin, N.M., Plews, J.R., Abilez, O.J., Cui, B., Gold, J.D., Wu, J.C.: Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Meth.* 11, 855–860 (2014).
124. Cao, N., Liu, Z., Chen, Z., Wang, J., Chen, T., Zhao, X., Ma, Y., Qin, L., Kang, J., Wei, B.,

- Wang, L., Jin, Y., Yang, H.-T.: Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. *Cell Res.* 22, 219–236 (2011).
125. Sato, H., Takahashi, M., Ise, H., Yamada, A., Hirose, S.-I., Tagawa, Y.-I., Morimoto, H., Izawa, A., Ikeda, U.: Collagen synthesis is required for ascorbic acid-enhanced differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 342, 107–112 (2006).
126. Tohyama, S., Hattori, F., Sano, M., Hishiki, T., Nagahata, Y., Matsuura, T., Hashimoto, H., Suzuki, T., Yamashita, H., Satoh, Y., Egashira, T., Seki, T., Muraoka, N., Yamakawa, H., Ohgino, Y., Tanaka, T., Yoichi, M., Yuasa, S., Murata, M., Suematsu, M., Fukuda, K.: Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell.* 12, 127–137 (2013).
127. Klug, M.G., Soonpaa, M.H., Koh, G.Y., Field, L.J.: Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *Journal of Clinical Investigation.* 98, 216–224 (1996).
128. Kensah, G., Gruh, I., Viering, J., Schumann, H., Dahlmann, J., Meyer, H., Skvorc, D., Bär, A., Akhyari, P., Heisterkamp, A., Haverich, A., Martin, U.: A Novel Miniaturized Multimodal Bioreactor for Continuous In Situ Assessment of Bioartificial Cardiac Tissue During Stimulation and Maturation. *Tissue Engineering Part C: Methods.* 17, 463–473 (2011).

10 Appendix

Tabelle 10.1: Laborgeräte

Kategorie	Name	Kommentare	Firma
Analytische Waage	ACJ 120-4M		Kern & Sohn
Benchtop Orbitalschüttler	Celltron	Schüttler wurde im CO ₂ -Inkubator mit 60 rpm verwendet.	Infors HT
Zellkultur Zentrifuge	Allegra X-12R Centrifuge	Schwingbecherrotor, temperaturgesteuert	Beckman Coulter
Geldokumentationskammer	FluorChem 5500 Chemilmager		Alpha Innotec
CO ₂ -Inkubator (Säugetier-Zellkultur)	MCO-18AC	37°C, 5% (v/v) CO ₂ , gesättigte Luftfeuchtigkeit	Panasonic Biomedical
Horizontale Elektrophorese-Kammer	Sub-Cell GT		Bio-Rad
Durchflusssystem	FACS Canto II		BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop	EVOS FL Auto	mit Inkubatorkammer zur Kontrolle von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Atmosphäre	Thermo Scientific
Mikroskop für Routine-Zellkultur	EVOS XL Core		Thermo Scientific
Hemozytometer	Neubauer		Marienfeld
Sterilwerkbank	Herasafe KS II		Thermo Scientific
Mikrozentrifuge	PerfectSpin	Festwinkelrotor , temperaturgesteuert	Peqlab
Mikrovolumen UV/Vis Spektralphotometer	Nanophotometer P-Class		Implen
Mini-Zentrifuge	Sprout		Heathrow Scientific
PCR-Thermocycler	PTC-200 Peltier Thermal Cycler		MJ Research
Pipetten	Eppendorf Research® plus		Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus		Hirschmann
Energieversorgung der Elektrophorese-Kammer	PowerPac 200		Bio-Rad
Schüttler	MS1 Minishaker		IKA
Thermomixer	Mixing Block MB-102	Temperatur-gesteuerter Mischblock	BIOER
Bestrahlungsgeräts	Biobeam 3000		Gamma-Service Medical GmbH
Einfriercontainer	Mr.Frosty		Nalgene

Tabelle 10.2: **Software**

Name	Version	Kommentare
FlowJo	VX 0,7 (TreeStar, Inc.).	Analyse von durchflusszytometrischen Daten
ImageJ	2.0.0.0-rc-43/1.50e	Bildbearbeitung
Microsoft Excel	14.6.4	Tabellenkalkulation
Graphpad Prism	Prism 7 for Mac OS X	Erstellung von Graphiken und statistische Analyse

Tabelle 10.3: **Verbrauchsmaterialien**

Name	Kommentar	Bestellung Nr.	Firma
Aerosolfilter Pipettenspitzen	1-100 µL	732-0522	VWR
	1-200 µL	732-0540	
BD Discardit II Spritze	20 mL	300330	Becton Dickinson
Flaschenaufsatzfilter		4510448645	Thermo Scientific
Zentrifugenröhrchen	15 mL	188271	Greiner bio-one
	50 mL	227261	
Zellkulturgefäße	6-Well-Suspensionsplatte	83.3920.500	Sarstedt
	6-Well-Suspensionsplatte	657185	Greiner bio-one
	6-Well-Zellkultur-Platte mit Nunclon Delta Oberfläche	140675	Thermo Scientific
	12-Well-Zellkulturplatte mit Nunclon Delta Oberfläche	150628	Thermo Scientific
	48-Well-Zellkulturplatte mit Nunclon Delta Oberfläche	10644901	Thermo Scientific
	96-Well Zellkulturplatte mit Nunclon Delta Oberfläche	167008	Thermo Scientific
	10 cm Zellkulturschale	664160	Sarstedt
	10 cm Suspensions-Zellkulturschale	83.3902.500	Sarstedt
	Zellkulturflasche (T25), 25 cm ²	4510452037	TPP
	Zellkulturflasche (T75), 75 cm ²	4510443408	TPP
Kryoröhrchen	2 mL	122280	Greiner bio-one
DURAN® Laborflasche	50 mL	21801175	Duran
	250 mL	21801365	
	500 mL	21801445	
	1000 mL	21801545	
Pipettenspitzen	0,5-20 µL	022492021	Eppendorf
	2-200 µL	0030 000.870	
	50-1000 µL	0030 000.919	
Glas-Pasteurpipetten		747715	Brand
PCR-Röhrchen, (RNase-, DNase- und Pyrogen-frei)		G002	Kisker Biotech
Safe-Lock Tubes Reaktionsgefäße, PCR clean	1,5 mL	0030 123.328	Eppendorf
SafeSeal Reagiergefäße	1,5 mL	72.706	Sarstedt
Serologische Pipetten	5 mL	86.1253.001	Sarstedt
	10 mL	86.1254.001	
	25 mL	86.1685.001	

Spritzenvorsatzfilter	0,22 µm	99722	TPP
Cryomolds	10 mm x 10 mm x 5 mm	4565	Sakura
	25 mm x 20 mm x 5 mm	4557	
Objektträger (Superfrost)	25 x 75 x 1,0 mm	J1800AMNZ	Thermo Scientific
Glasboden-Petrischalen (Fluorodish)	35mm	FD3510-100	World precision Instruments

Tabelle 10.4: Reagenzien, Chemikalien und weitere Zusätze

Name	Bestellnr.	Firma
0,5% Trypsin-EDTA, 10x	15400-054	Thermo Scientific
2-Mercaptoethanol	M3148	Sigma Aldrich
2-Propanol	9866.5	Carl Roth
4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	D9542	Sigma Aldrich
Accutase	A1110501	Thermo Scientific
Agarose, NEEQ ultra quality	2267.4	Carl Roth
Albumin from bovine serum (BSA)	A7906	Sigma Aldrich
Alkaline Phosphatase Detection Kit	SCR004	Millipore
Aqua, sterile, pyrogen-free	0082479E	Braun Melsungen AG
B27 supplement, minus vitamin A, 50x	12587-010	Thermo Scientific
Basic fibroblast growth factor (bFGF)	100-18B	PeproTech
BSA Fraction V	15260-037	Thermo Scientific
Chir99021	SML104	Sigma Aldrich
Chloroform	7331.2	Carl Roth
Kollagenase B	11088807001	Roche
D-(+)-Glukose	G7021-1KG	Sigma Aldrich
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	D8418	Sigma Aldrich
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	21969-035	Thermo Scientific
DMEM/F12 (1:1) 1x	11320-074	Thermo Scientific
DMEM/F12+Glutamax	31331-028	Thermo Scientific
IMDM	31	
DNase I, RNase-free, 1 U/µL	EN0521	Thermo Scientific
DreamTaq Green PCR Mastermix, 2x	K1081	Thermo Scientific
ESGRO® Mouse LIF Medium Supplement	ESG1106	Millipore
Ethanol	9065.2	Carl Roth
Ethidium bromide	2218.1	Carl Roth
Fetal bovine serum		Thermo Scientific
Gelatine from porcine skin	G2500	Sigma Aldrich
Geltrex	A1413202	Thermo Scientific
GeneJET Genomic DNA Purification Kit	K0721	Thermo Scientific
Glycerol	3783.1	Carl Roth
Glycogen, nuclease-free	R0561	Thermo Scientific
Goat serum	S26	Merck/Millipore
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)+Glutamax	31980-048	Thermo Scientific
L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate	A8960	Sigma Aldrich
L-Glutamine, 200 mM	25030-024	Thermo Scientific
N2 supplement, 100x	17502-048	Thermo Scientific
Neurobasal Medium	21103-049	Thermo Scientific
Non-essential Amino Acids (NEAA), 100x	11140-35	Thermo Scientific
Paraformaldehyde (PFA)	0335.3	Carl Roth
PD0325901	PZ0162-5MG	Sigma Aldrich
Phenol/chloroform/isoamyl alcohol	A156.3	Carl Roth
Phosphate-buffered saline (PBS), 10x w/o	70011-051	Life Technologies

PBS w/ Mg ²⁺ and Ca ²⁺	14040-174	Thermo Scientific
ReverAid First Strand cDNA Synthesis Kit	K1622	Thermo Scientific
RNaseAway	1998.2	Carl Roth
Sodium-Acetate, 3M, pH 5,2	R1181	Thermo Scientific
Tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM)	T-668	Thermo Scientific
Triton X-100	T8787	Sigma Aldrich
TRIZOL	15596018	Thermo Scientific
Trypan blue	CN76.1	Sigma Aldrich
Water, RNase-free	109777-035	Thermo Scientific
Tissue- Tek	4583	Sakura
2-Methylbutan (Isopentan)	3927.1	Carl Roth

Tabelle 10.5: **Primäre Antikörper**

Name	Isotyp	Firma	Konzentration	Verdünnung
Titin	Maus IgM	DSHB	53 µg/mL	1:30
α-Actinin, sarcomeric	Maus IgG1	Sigma Aldrich	0,2 mg/mL	1:4000
cardiac troponin T	Maus IgG1	Thermo Scientific	0,2 mg/mL	1:50
Connexin 43	Maus IgM	Sigma Aldrich		1:4000
human Ki-67	Maus IgG1	DakoCytomation	46 mg/L	1:100
Oct 3/4	Maus IgG2b	Santa Cruz	0,2 mg/mL	1:100
SSEA1	Maus IgM <i>kappa</i>	StemCell Technologies	0,5 mg/mL	1:50
Prolyl-4-Hydroxylase	Maus IgG1	Acris GmbH	0,2 mg/mL	1:500
Laminin	Kaninchen polyklonal	DakoCytomation,	3,8 g/L	1:500

Tabelle 10.6: **Isotyp-Kontroll-Seren**

Spezies	Klasse	Firma	Konzentration
Maus	IgM	DakoCytomation	53 µg/mL
Maus	IgM Kappa Isotype	StemCell Technologies	46 mg/L
Maus	IgG1	DakoCytomation	100 mg/L
Maus	IgG2b	DakoCytomation	100 mg/L
Maus	IgG3	Immunostep	0,1 mg/mL
Ratte	IgM		
Ratte	IgG	Jackson Immuno Reaserch	11 mg/mL
Kaninchen	IgG	Santa Cruz Biotechnology, INC, U.S.A	0,4 mg/mL

Tabelle 10.7: **Sekundäre Antikörper**

Spezies	Spezifität	Label	Firma	Konzentration	Verdünnung
Ziege	Anti-mouse IgM (µ)	Cy2	Jackson ImmunoResearch	1,4 mg/mL	1:200 1:400
Ziege	Anti-mouse IgG (Fc _γ , Subklassen 1+2a+2b+3)	Alexa fluor 488	Jackson ImmunoResearch	1,4 mg/mL	1:500
Ziege	Anti-mouse IgG (Fc _γ)	Cy3	Jackson ImmunoResearch	1,4 mg/mL	1:200
Esel	Anti-mouse IgG (H+L)	Cy3	Jackson ImmunoResearch	1,5 mg/mL	1:500
Ziege	Anti-Kaninchen IgG	Cy2	Jackson ImmunoResearch	1,5 mg/mL	1:500

Tabelle 10.8: **Durchflusszytometrie- und Immunfärbungs-Puffer**

Flow Puffer-1	Flow Puffer-2
PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ mit 5% BSA (v/v)	PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ mit 5% BSA (v/v) und 1% (v/v) TritonX-100

Tabelle 10.9: **Kollagenase B in Niedrig-Ca²⁺-Lösung**

Low Ca ²⁺ Solution (pH-Wert von 6,9.)	Kollagenase B Lösung
120 mM NaCl, 4 mM KCl, 5,5 mM MgSO ₄ , 5 mM Na-Pyruvat, 20 mM, Glukose, 20 mM Taurin, 10 mM HEPES	Niedrig Ca ²⁺ -Lösung 100 ml mit CaCl ₂ 30 µM und 0,1% Kollagenase B (w/v)

Tabelle 10.10: **FCS Test Lots**

FCS Nummer	Firma	Bestellungsnummer	Lot
FCS-1	Life Technologies	10270098	42G7651K
FCS-2	Sigma Aldrich	F7524	BCBQ7892V
FCS-3	Sigma Aldrich	F7524	BCBQ7890V
FCS-4	Sigma Aldrich	F7524	025M3355
FCS-5	Life Technologies	10270-106	41F5635K
FCS-6	Life Technologies	10270-106	41A1119K

Primer

Tabelle 10.11: Haushaltsgene (*Rattus norvegicus*)

Name	Sequenz (5'-3') Forward Primer Reverse Primer	Produktgröße in Basenpaare (bp)	Annealing - temperatur	Funktion
GAPDH	GGCCAAGGTCATCCATGA TCAGTGTAGCCCAGGATG	352 bp	55°C	Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase,

Tabelle 10.12: Pluripotenz-assoziierte Gene (*Rattus norvegicus*)

Name	Sequenz (5'-3') Forward Primer (for) Reverse Primer (rev)	Produktgr öße in Basenpa re (bp)	Annealing- temperatur	Name
Oct3/4	CCTGGCTAAGCTTCCAGGGGC CCACGCCAACTTGGGGGACTA	159 bp	55°C	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor
Nanog	GCCACTAGGGAAAGCCAGGCG AAGAAAGCTGACCCTGGCCCTG	144 bp	66°C	Homöobox Transkriptionsfaktor
Rex1	CTGCTGCTCTGGGTGCGAGT ACACGAGGCAGCACGGTGAG	139 bp	55°C	reduced expression 1, Transkriptionsfaktor

Tabelle 10.13: Kardiale Gene (*Rattus norvegicus*)

Name	Sequenz (5'-3') Forward Primer (for) Reverse Primer (rev)	Produktgröße in Basenpaare (bp)	Annealingtemperatur	Name and Funktion
GATA4	GCTTCTGGAGCCACCTCGGG AAGGAGAAGCGCGGGGACAC	146 bp	62°C	kardialer Transkriptionsfaktor
cTnT	TGGAGGCCGAGAAGTTTCGAC CTGGGATTCACAGGGCAAGG	200 bp	55°C	kardiales Troponin T
α-MHC	GATGCCCAGATGGCTGACTT GGTCAGCATGGCCATGTCCT	276 bp	60°C	α-Myosin schwere Kette
β-MHC	CGGAGGAACAGGCCAACACCA GTCTCAGGGCTTCACAGGCATC C	200 bp	62°C	β-Myosin leichte Kette
Mlc2a	GGGCCTTTGGGTGATAAGGTTT CACGTTGAGCCTGCTTGGTG	133 bp	55°C	Myosin leichte Kette-2 atrial
Mlc2v	CCTGACGTCACCGGCAACCTT TGGGATGGTGAACACCCGCAG	158 bp	62°C	Myosin leichte Kette-2 ventricular
ANP	ATACAGTGCAGGTGTCCAACA AGCCCTCAGTTTGCTTTTCA	268 bp	62°C	Atriales natriuretisches Peptid
Cx43	CGGGGTCAACGTGGAGATGCAC ACCGCGCTCAAGCTGAACCC	195 bp	55°C	Gap junction alpha-1 protein
Cx45	AAGAGCAGAGCCAACCAAAA CCCACCTCAAACACAGTCCT	112 bp	60°C	Gap junction gamma-1 protein
Cx40	TCCTGACTTCAACAGTGCC GGCTTCTGGCCATACTGTGT	171 bp	54°C	Gap junction alpha-5 protein
Nkx2.5	GTGACCCTGACCCCGCCAAG AGACCTGCGCCTGCGAGAAG	159bp	60°C	kardialer NK- Homeodomänen- Transkriptionsfaktor
Brachyury	GAACGGCAGGTAGGTGCGTG GGAATCCCCTGGGGGCTGTTA	138 bp	58,2°C	T-box Transkriptionsfaktor

Tabelle 10.14: Fibroblasten Marker (*Rattus norvegicus*)

Name	Sequenz (5'-3') Forward Primer (for) Reverse Primer (rev)	Produktgröße In Basenpaare (bp)	Annealingtemperatur	Name and Funktion
Col1a1	ATCAGCCCAAACCCCAAGGAGA CGCAGGAAGGTCAGCTGGATAG	128 bp	55°C	Kollagen, Typ I, alpha 1.
Col3a1	GCCAGGAGCCAGTGGCCATAA GCCACCAGGAGATCCGTCTCG	145 bp	61°C	Kollagen, Typ III, alpha 1
rP4hb	GCAGTAAGGGGGAGGCGTGG ACGGCTCAGCATGTCGGACG	147 bp	55°C	Prolyl 4-hydroxylase

Tabelle 10.15: Unterscheidung von Ratten-Stämmen (für Mikrosatellitenanalyse)

Name	Sequenz (5'-3') Forward Primer (for) Reverse Primer (rev)	Produktgröße in Basenpaare (bp)		Annealing- temperatur
		Dark Agouti (rESC)	Fischer 344 (riPSC)	
D1Rat122	CTGCTCCACCTGCCTGTATT TCCCTTTGCAATAGACAATGG	223 bp	248 bp	50°C
D2Rat250	GTCCTCTCCTGTCCCTCTC GAAGTCTGAACGCTCATGCA	158 bp	180 bp	58,2°C
D3Rat17	TCATTTTCCTTCCTCTCTCTC A AAGACAAAATGCTGGAGGGA	136 bp	174 bp	50°C

11 Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde im Forschungslabor der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie. Otto-von-Guericke Universitätsklinik, Magdeburg in der Zeit von Februar 2015 bis September 2016 angefertigt. Ich bedanke mich bei meinem Chef, **Prof. Dr. med. Ingo Kutschka**, der mir die Möglichkeit einer Forschungsrotation im Bereich der Stammzellforschung unter hervorragenden Bedingungen bot und mich eigens für meine wissenschaftliche Arbeit über 18 Monate hinweg freistellte. Für seine unermüdliche Unterstützung und dafür, dass er meine Arbeit unmittelbar und in unbegrenztem Maße betreute, bin ich ihm sehr dankbar.

Auch bei **Frau Dr. Hassina Baraki** möchte ich mich ganz herzlich für ihre stetige Unterstützung und ausgezeichnete Hilfe sowohl in der Klinik als auch bei dieser Arbeit bedanken, die sie mir zu jeder Zeit und in jeder Situation zuteilwerden ließ.

Von **Dr. George Kensah** habe ich in diesen Monaten sehr viel gelernt, sowohl auf seinem geliebten Gebiet der Stammzellenforschung als auch im sonstigen akademischen Alltag. Seine persönliche Betreuung, Förderung, konstruktive Kritik sowie seine engagierte und sympathische Art haben mich besonders motiviert. Für seine Geduld in der Anfangsphase dieser Promotionsarbeit sowie bei der Korrektur meiner Dissertation bin ich ihm sehr dankbar.

Ein besonders großes Dankeschön geht an **Dr. Julia Dahmann**, die sich sehr um mich bemüht und mich immer wieder stark motiviert hat. Ohne ihre ebenso intensive wie exzellente Betreuung, ihre unbegrenzte Geduld und ihre Unterstützung, sowohl in der Praxis als auch in den letzten Monaten bei der Korrektur meiner Promotion, wäre ein erfolgreicher Abschluss dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich danke auch unseren Kooperationspartnern aus dem Institut für Humangenetik, **Frau Dr. Volleth** und Herrn **Prof. Zenker**, für die Karyotypisierung der rPSC und Herrn **Dr. Munsch** und Herrn **Prof. Leßmann** aus dem Institut für Physiologie für die Patch-Clamp-Analysen der Kardiomyozyten.

Marion Möckel danke ich für die ausgezeichnete Einführung und spätere Hilfe in der praktischen Arbeit mit der Zellkultur, sowie für ihre unermüdliche Hilfe bei der Bearbeitung der FACS-Analysen.

Unserer lieben Sekretärin **Janine Klehm** danke ich für die grammatikalische Korrektur meiner Dissertation. Ihre kontinuierliche sprachliche Unterstützung war sehr hilfreich und hat die Fertigstellung der Arbeit sehr beschleunigt.

Auch unserer Studentin **Carolin Ebeling** bin ich äußerst dankbar für ihre großartige Unterstützung und die liebevolle Betreuung unserer Zellen. Ich wünsche ihr viel Erfolg bei ihrem Medizinstudium.

Mein besonderer Dank geht an alle anderen Labor-Kollegen, **Carsten Dolny**, **Annemarie Ecke** und **Rebecca Warmuth** für ihre Unterstützung und die schöne Zeit in unserer Arbeitsgruppe. Ich war immer stolz ein Mitglied dieses Teams zu sein.

Bei allen ärztlichen Kollegen, den Pflegerinnen und Pflegern auf Station und im OP bedanke ich mich für die dauerhafte Unterstützung und für die kollegiale Arbeitsatmosphäre in der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie am Uniklinikum Magdeburg.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung während dieser Arbeit bedanken, vor allem bei meinen Eltern, die es mir durch ihre stetige Förderung und ihr großes Vertrauen erst ermöglicht haben, mein Medizinstudium und diese Arbeit erfolgreich abzuschließen.

12 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Generierung und Charakterisierung funktionaler Herzmuskelzellen aus pluripotenten Stammzellen der Ratte für syngene myokardiale Rekonstruktionsmodelle“ im Forschungslabor der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Otto-von-Guericke Universitätsklinik Magdeburg mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. Ingo Kutschka und Dr. rer. nat. George Kensah ohne sonstige Hilfe durchgeführt habe und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 08.02.2017

Unterschrift