

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

- Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. U. Kirchhefer -

Physiologische Charakterisierung aus induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleiteter Kardiomyozyten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Schwarz, Dennis

aus Ibbenbüren

2022

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. F. U. Müller

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. F. U. Müller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. T. Kuhlmann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2022

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
- Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. U. Kirchhefer -

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. F. U. Müller
Korreferent: Prof. Dr. med. T. Kuhlmann

Zusammenfassung

Physiologische Charakterisierung aus induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleiteter
Kardiomyozyten
Schwarz, Dennis

Die seit einigen Jahren mögliche Differenzierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen zu Kardiomyozyten (iPS-Kardiomyozyten) gilt als Hoffnung in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen wie z.B. der Herzinsuffizienz. Zurzeit fehlen umfassende Studien zur Charakterisierung des Calcium-*handlings* der iPS-Kardiomyozyten.

In dieser Arbeit wurde das Calcium-*handling* wildtypischer iPS-Kardiomyozyten der SFS.1-Linie fluoreszenzmikroskopisch mittels Calciumtransientenmessung untersucht. Zur Beurteilung der Maturierung wurden Calciumtransienten von iPS-Kardiomyozyten unterschiedlicher Altersgruppen (zwei, drei und fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart) und von wildtypischen adulten murinen ventrikulären Kardiomyozyten gemessen. Die Calciumtransientenmessung wurde zu jedem Zeitpunkt sowohl unter Basalbedingung als auch unter β -adrenerger Stimulation (Isoprenalin 10^{-6} M) durchgeführt, um die funktionelle Reifung der iPS-Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, auf β -adrenerge Stimuli zu reagieren, beurteilen zu können.

Es zeigte sich, dass die Calciumtransientenkinetik der iPS-Kardiomyozyten mit zunehmendem Alter jener der adulten murinen Kardiomyozyten stärker ähnelt, also einen reiferen Phänotyp aufweist. Darüber hinaus wiesen die iPS-Kardiomyozyten mit steigendem Alter eine stärkere und den murinen ventrikulären Kardiomyozyten ähnliche Reaktion auf die β -adrenerge Stimulation auf. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine höhere Zellkonzentration der iPS-Kardiomyozyten während der Kultivierung zu einer Beeinträchtigung der Reifung hinsichtlich der Calciumtransientenkinetik führt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass mit zunehmendem Alter auch die elektrophysiologische Reifung der iPS-Kardiomyozyten voranschreitet, jedoch nicht den funktionellen Status adulter muriner ventrikulärer Kardiomyozyten erreicht.

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2022

Eidesstattliche Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel

Physiologische Charakterisierung aus induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleiteter Kardiomyozyten

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Münster unter der
Anleitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. F. U. Müller

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und
sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder
ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur
Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, den 13.05.2022

Dennis Schwarz

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen – Herzinsuffizienz.....	1
1.1.1. Etablierte Therapieoptionen der Herzinsuffizienz.....	2
1.1.2. Stammzelltherapie kardialer Erkrankungen.....	2
1.2. iPS-Kardiomyozyten als Modell für die Grundlagenforschung zu kardialen Erkrankungen.....	3
1.2.1. Gewinnung und Reprogrammierung der induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen).....	3
1.2.2. Differenzierung der iPS-Zellen zu Kardiomyozyten.....	4
1.3. Calcium- <i>handling</i> der iPS-Kardiomyozyten.....	7
1.3.1. Vom Aktionspotential zur Kontraktion - die elektromechanische Kopplung.....	7
1.3.2. Regulation des Calcium- <i>handlings</i> durch β -adrenerge Stimulation.....	11
1.4. Reifung der iPS-Kardiomyozyten.....	12
1.4.1. Strukturelle Reifung.....	13
1.4.2. Transkriptionelle Reifung.....	13
1.4.3. Funktionelle Reifung.....	14
2. ZENTRALE FRAGESTELLUNGEN	16
3. MATERIAL & METHODEN	17
3.1. Materialien.....	17
3.1.1. Feinchemikalien.....	17
3.1.2. Verwendete Zell- und Tierlinien.....	17
3.1.2.1. Humane induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) der Zelllinie SFS.1.....	17
3.1.2.2. Isolierte murine ventrikuläre Kardiomyozyten.....	18
3.2. Kultivierung von iPS-Zellen.....	18
3.2.1. Allgemeine Zellkultur.....	18
3.2.2. Kryokonservierung und Auftauen der iPS-Zellen.....	21
3.3. Kardiale Differenzierung der iPS-Zellen und Kultivierung der iPS-Kardiomyozyten.....	22
3.3.1. Ablauf der kardialen Differenzierung.....	22
3.3.2. Passagierung der iPS-Kardiomyozyten.....	24
3.3.2.1. Passagierung der iPS-Kardiomyozyten auf Deckgläschen.....	26
3.3.3. Kryokonservierung und Auftauen der iPS-Kardiomyozyten für die Calciumtransientenmessung fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart.....	27
3.4. Calciumtransientenmessung der iPS-Kardiomyozyten.....	28
3.4.1. Versuchsaufbau und Ablauf der Calciumtransientenmessung der iPS-Kardiomyozyten unter Basalbedingung.....	28
3.4.2. Ablauf der Calciumtransientenmessung der iPS-Kardiomyozyten unter β -adrenerger Stimulation.....	31
3.5. Calciumtransientenmessung muriner ventrikulärer Kardiomyozyten.....	32

3.6. Auswertung.....	33
3.6.1. Analyse der Calciumtransienten mittels IonWizard	33
3.6.2. Statistische Analyse	35
4. ERGEBNISSE	36
4.1. Charakterisierung der Calciumtransienten von iPS-Kardiomyozyten zwei Wochen nach dem Differenzierungsstart	36
4.2. Charakterisierung der Calciumtransienten von iPS-Kardiomyozyten drei Wochen nach dem Differenzierungsstart	37
4.2.1. Einfluss der Zellkonzentration der iPS-Kardiomyozyten auf die Calciumtransientenkinetik.....	40
4.3. Charakterisierung der Calciumtransienten von iPS-Kardiomyozyten fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart	43
4.4. Vergleich elektrisch stimulierter Calciumtransienten von iPS-Kardiomyozyten und adulten murinen ventrikulären Kardiomyozyten	46
4.4.1. Vergleich hinsichtlich der diastolischen intrazellulären Calciumkonzentration	46
4.4.2. Vergleich hinsichtlich der intrazellulären Calciumtransientenamplitude	47
4.4.3. Vergleich hinsichtlich der maximalen Geschwindigkeit des Anstiegs und des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten	47
4.4.4. Zusammenfassender Vergleich	48
5. DISKUSSION	52
5.1. Ausgeprägte elektrophysiologische Reifung der iPS-Kardiomyozyten von Woche zwei zu Woche drei nach dem Differenzierungsstart	53
5.2. Vergleich der iPS-Kardiomyozyten drei und fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart mit murinen ventrikulären Kardiomyozyten insbesondere hinsichtlich ihrer Reaktion auf β -adrenerge Stimulation	56
5.2.1. iPS-Kardiomyozyten an Tag 21 reagieren auf β -adrenerge Stimulation	56
5.2.2. Die Zellkonzentration der iPS-Kardiomyozyten bei der ersten Passagierung hat einen Einfluss auf ihre Calciumtransientenkinetik und ihre β -adrenerge Reaktion	58
5.2.3. iPS-Kardiomyozyten zeigen von der dritten zur fünften Woche eine Reifung insbesondere hinsichtlich ihrer Reaktion auf β -adrenerge Stimulation, erreichen jedoch nicht die Maturität adulter muriner ventrikulärer Kardiomyozyten	59
5.3. Ausblick	63
5.3.1. Limitationen der iPS-Kardiomyozyten	63
5.3.2. Potential der iPS-Kardiomyozyten	64
6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	66
7. LITERATURVERZEICHNIS	67
8. DANKSAGUNG	77
9. LEBENS LAUF	78

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[Ca₂₊]_i	Intrazelluläre Calciumkonzentration
Asc-P	Phospho-Ascorbat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bl	<i>baseline</i> , diastolische intrazelluläre Calciumkonzentration
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BMP-4	<i>Bone morphogenetic protein 4</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CASQ2	<i>Calsequestrin</i>
CHIR 99021	6-[[2-[[4-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(5-methyl-1H-imidazol-2-yl)-2-pyrimidinyl]amino]ethyl]amino]-3-pyridincarboximid
CICR	Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung
d/dt [Ca²⁺]_i	Geschwindigkeit der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration
D0	Tag des Differenzierungsstarts
dep v	<i>departure velocity</i> , maximale Geschwindigkeit des Anstiegs des intrazellulären Calciumtransienten
DHPR	Dihydropyridinrezeptor, L-Typ-Calciumkanal
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dx	Tag x nach Differenzierungsstart
ES-Kardiomyozyten	Aus embryonalen Stammzellen abgeleitete Kardiomyozyten
ES-Zellen, ESC	Embryonale Stammzellen
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FGF2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2
G_s-Protein	cAMP-abhängiges Guanosintriphosphat-bindendes Protein
HCl	Salzsäure
HCN4	<i>Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide Gated Potassium Channel 4</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ICD	Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
I_f	<i>Funny current</i>
Indo-1 AM	Indo-1 Acetoxymethylester
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
iPS-Kardiomyozyten, iPS-CM	Aus induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleitete Kardiomyozyten
iPS-Zellen, iPSC	Induzierte pluripotente Stammzellen

ISL1	<i>ISL LIM Homeobox 1</i>
IWP-2	<i>Inhibitor of Wnt Production-2</i>
KCNJ2	<i>Inward Rectifier Potassium Channel 2</i>
KCNQ1	<i>Potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1</i>
Kif4	<i>Krueppel-like factor 4</i>
KO-DMEM	<i>KnockOut™ Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
Maus-CM	Murine ventrikuläre Kardiomyozyten
mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>
MYH6	<i>Myosin heavy chain 6</i>
MYH7	<i>Myosin heavy chain 7</i>
MYL2	<i>Myosin light chain 2</i>
Na⁺/K⁺-ATPase	ATP-abhängige Natrium/Kalium-Pumpe
NaOH	Natronlauge
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
Nkx2.5	<i>NK2 Homeobox 5</i>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
Oct3/4	<i>Octamer-binding transcription factor 3/4</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
peak h	<i>peak height</i> , intrazelluläre Calciumtransientenamplitude
PKA	Proteinkinase A
PMCA	<i>Plasma membrane calcium ATPase</i>
PSG	Penicillin-Streptomycin-Glutamin
R.E.	Relative Einheiten
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ret v	<i>return velocity</i> , maximale Geschwindigkeit des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten
ROCK	Rho-assoziierte Proteinkinase
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RyR2	Ryanodinrezeptor 2
SCN5A	<i>Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5</i>
SERCA	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
Sox2	<i>(sex determining region Y)-box 2</i>
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TS	Transferrin und Natriumselenit
Wnt-C59	<i>Wnt/β-catenin Inhibitor C59</i>

1. EINLEITUNG

1.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen – Herzinsuffizienz

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems sind nach wie vor die führende Todesursache von Frauen und Männern in Deutschland (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2019). Viele dieser Erkrankungen gehen mit einem Verlust des Myokards einher, allen voran der Myokardinfarkt, bei dem es durch Lösen einer thrombotischen Plaque zur Okklusion eines Koronargefäßes kommt. Dies führt zur Unterbrechung der Perfusion und somit zu einem Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen und zu einer Akkumulation von Stoffwechselprodukten in den Herzmuskelzellen, was sowohl eine Nekrose und Apoptose als auch eine Autophagozytose des Herzmuskelgewebes zur Folge hat (Whelan et al. 2010).

Nach einem Myokardinfarkt kann es bei einem Verlust von etwa 25 % der Herzmuskelzellen konsekutiv zur Entstehung einer Herzinsuffizienz kommen (Caulfield et al. 1976). Die Herzinsuffizienz ist definiert als ein klinisches Syndrom, das gekennzeichnet ist durch eine strukturelle und/oder funktionelle Störung des Herzens, infolge derer es zu einer verringerten Auswurfleistung und/oder zu erhöhten intrakardialen Drücken kommt. Führende Symptome sind Knöchelödeme, Müdigkeit und Dyspnoe, die in frühen Stadien erst bei Belastung, später jedoch auch in Ruhe auftreten (Ponikowski et al. 2016). Die klinische Einteilung erfolgt anhand der Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) in vier Stadien. In Stadium I sind die Patienten/Patientinnen in ihrer körperlichen Aktivität nicht eingeschränkt. In Stadium II kommt es unter moderater Belastung und in Stadium III unter geringer Belastung zu Symptomen wie z.B. Dyspnoe. Patienten/Patientinnen im Stadium IV leiden bereits in Ruhe unter o.g. Symptomen (Ponikowski et al. 2016).

Bei der Herzinsuffizienz handelt sich um ein progressiv fortschreitendes Syndrom, dem ein auslösendes Ereignis vorausgeht. Dieses Ereignis kann einerseits akuter Natur, wie im Falle des Myokardinfarkts, sein, andererseits führen auch chronische Druck- oder Volumenbelastungen, wie sie beispielsweise bei einer arteriellen Hypertonie auftreten, zu einer eingeschränkten Pumpfunktion des Herzens (Ponikowski et al. 2016).

Die Gesamtprävalenz der Herzinsuffizienz beträgt in Industrienationen wie Deutschland 1-2 %. Verdeutlicht man sich, dass die Prävalenz exponentiell mit zunehmendem Alter steigt, nämlich auf über 10 % der über 70-Jährigen, so wird deutlich, wie groß die Bedeutung dieser Erkrankung insbesondere im Alter ist (Ponikowski et al. 2016). Infolge des demografischen Wandels wird die Prävalenz der Herzinsuffizienz beispielsweise in den USA im Jahr 2030 um 46 % höher sein als noch im Jahr 2012 (Benjamin et al. 2017).

Doch ist die Bedeutung der kardialen Insuffizienz im Klinikalltag nicht nur in der hohen Prävalenz und Inzidenz begründet, sondern auch in der noch immer sehr schlechten Prognose. Die 5-Jahres-Mortalität beträgt durch alle Krankheitsstadien gemittelt etwa 50 % und ist damit vergleichbar mit der Mortalität vieler Krebserkrankungen (Askoxylakis et al. 2010; Mosterd et Hoes 2007). Damit gehörte die Herzinsuffizienz im Jahr 2016 sowohl Männer als auch Frauen betreffend zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2019).

1.1.1. Etablierte Therapieoptionen der Herzinsuffizienz

In der heutigen Zeit stehen viele wirksame Therapieoptionen, wie Modulatoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), β -Adrenozeptorantagonisten, Mineralkortikoidrezeptorantagonisten, Angiotensin-Rezeptor/Nepriylsin-Hemmer, die kardiale Resynchronisationstherapie oder implantierbare Kardioverter-Defibrillatoren (ICD), zur Verfügung. Diese stellen jedoch keine kausale Behandlung der Krankheitsursache dar und wirken lediglich in der Frühphase der Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion krankheitsmodulierend (Ponikowski et al. 2016).

Eine kausale Therapie erfordert, dass der Verlust an Kardiomyozyten wieder ausgeglichen wird, um die Funktion des Herzens weiterhin zu gewährleisten. Zwar setzt das Herz einen gewissen Teil seiner Zellen um und kann somit in geringem Maße neue Kardiomyozyten hervorbringen, doch ist die Anzahl bei weitem nicht ausreichend, um einen so großen Zellverlust wie beispielweise nach einem Myokardinfarkt zu kompensieren (Kajstura et al. 2010a; Kajstura et al. 2010b).

Aus diesem Grund besteht die einzige kausale Therapie der Herzinsuffizienz momentan in der Herztransplantation.

1.1.2. Stammzelltherapie kardialer Erkrankungen

Es wurden in den letzten Jahren enorme Fortschritte im Bereich der Stammzellforschung gemacht. Dieser Fortschritt führte zu Überlegungen und Entwicklungen neuer Therapieoptionen kardialer Erkrankungen. So gelang erstmalig die Generierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) aus somatischen Zellen (Takahashi et al. 2007). Aus diesen Stammzellen generierte patientenspezifische Herzmuskelzellen, sogenannte aus induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleitete Kardiomyozyten (iPS-Kardiomyozyten), könnten zur Regeneration von abgestorbenem Herzmuskelgewebe

beitragen und so beispielweise die Entstehung einer ischämiebedingten Herzinsuffizienz nach einem Myokardinfarkt verhindern (Takahashi et al. 2007). Erste Studien in Tiermodellen konnten bereits zeigen, dass iPS-Kardiomyozyten erfolgreich in infarziertes Gewebe integriert werden können und sich hierdurch die kontraktile Funktion des Herzens verbessert (Shiba et al. 2016).

1.2. iPS-Kardiomyozyten als Modell für die Grundlagenforschung zu kardialen Erkrankungen

1.2.1. Gewinnung und Reprogrammierung der induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen)

Stammzellen lassen sich anhand ihrer Fähigkeit, verschiedene Gewebe zu bilden, in totipotente, pluripotente, multipotente, oligopotente und unipotente Stammzellen unterteilen.

Pluripotente Stammzellen teilen sich asymmetrisch, was bedeutet, dass neben einer Tochterzelle mit Stammzeleigenschaften auch eine Vorläuferzelle entsteht, welche differenzierte Eigenschaften besitzt. Sie sind in der Lage, sich zu Zellen aller drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm, Ektoderm) zu differenzieren (Moore et al. 2013).

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) können aus der inneren Zellmasse des Blastozysten (Embryoblast) gewonnen werden und sind pluripotent. In ihnen sind Transkriptionsfaktoren wie (*sex determining region Y*)-*box 2* (Sox2) und *octamer-binding transcription factor 3/4* (Oct3/4) aktiv, die die Differenzierung hemmen (Carpenter et al. 2004). Zwar können sie *in vitro* einfach kultiviert werden, doch erschweren ethische und politische Restriktionen die Forschung an diesen Zellen (de Miguel-Beriain 2015; Moore et al. 2013).

Die Differenzierung von Stammzellen zu somatischen Zellen galt für eine sehr lange Zeit als ein unumkehrbarer unidirektionaler Prozess. Takahashi et al. gelang es als erste, durch retrovirale Transduktion mit Lentiviren verschiedene in ES-Zellen stark exprimierte Gene zunächst in murinen und später in adulten humanen Fibroblasten verstärkt zu exprimieren. Dadurch stellten sich vier Transkriptionsfaktoren heraus, die Pluripotenz in somatischen Zellen induzieren konnten (Takahashi et al. 2007; Takahashi et Yamanaka 2006). Diese vier Transkriptionsfaktoren sind Oct3/4, Sox2, *Krüppel-like factor 4* (Klf4) und c-Myc. Sie werden, benannt nach ihrem Entdecker, auch als Yamanaka-Faktoren bezeichnet (Takahashi et al. 2007, Takahashi et Yamanaka 2006). Die entstehenden Zellen wurden iPS-Zellen genannt. Studien von Nakagawa et al. zeigten, dass eine Induktion von Pluripotenz ohne c-Myc möglich

und sogar spezifischer, dafür aber weniger effizient ist (Nakagawa et al. 2008). Da der Anteil an resultierenden iPS-Zellen nur sehr gering ist, werden die Yamanaka-Faktoren mit niedermolekularen Verbindungen ergänzt. Dadurch können einige Yamanaka-Faktoren ersetzt bzw. die Effizienz der Reprogrammierung gesteigert werden (Federation et al. 2014; Huangfu et al. 2008).

Trotz des unterschiedlichen Ursprungs der iPS-Zellen und der ES-Zellen sind sie sich ausgesprochen ähnlich. Aufgrund ihrer Pluripotenz können beide Zelltypen Gewebe aus allen drei Keimblättern hervorbringen (Moore et al. 2013; Takahashi et al. 2007; Thomson et al. 1998).

Auch auf transkriptioneller Ebene sind die iPS-Zellen den ES-Zellen ähnlich und es zeigt sich eine Abhängigkeit ihres Transkriptoms von der Passage, der verwendeten Technologie zur Generierung der Zellen und von dem genetischen Hintergrund der Donor-Zelle (Chin et al. 2010). Die iPS-Zellen exprimieren typische Marker-Gene der ES-Zellen und lediglich 9 % dieser Gene weichen in ihrer Expression um mehr als das Zweifache voneinander ab. Dieser Unterschied ist zu vernachlässigen, da bereits zwei verschiedene ES-Zelllinien zu 12 % Unterschiede in ihrem Transkriptom aufweisen (Adewumi et al. 2007; Phanstiel et al. 2011; Takahashi et al. 2007).

Betrachtet man das Proteom und Phosphoproteom der beiden Zelltypen, so unterscheiden sich nur weniger als 1 % der Proteine und der Phosphorylierungsstellen um mehr als das Zweifache voneinander (Phanstiel et al. 2011).

Der womöglich größte Unterschied besteht im Hinblick auf die epigenetische Prägung. Insbesondere bei frühen iPS-Zellen mit wenigen Passagen besteht ein epigenetisches Gedächtnis durch unvollständige Aufhebung der epigenetischen Fixierung der Ursprungszelle. Dieses nimmt im Verlauf mehrerer Passagen ab, äußert sich jedoch in der Präferenz der iPS-Zellen, in die Richtung der Donorzelle zu differenzieren (Kim et al. 2011; Ohi et al. 2011).

1.2.2. Differenzierung der iPS-Zellen zu Kardiomyozyten

In den letzten Jahren konnten die Protokolle zur Differenzierung von iPS-Zellen zu iPS-Kardiomyozyten deutlich verbessert werden. Grundsätzlich lassen sich die Differenzierungsprotokolle nach der verwendeten Technik in Monolayer-basierte Verfahren (2D) und *embryoid-body*-basierte Verfahren (3D) unterscheiden.

Embryoid bodies sind dreidimensionale Aggregate, die aus Zellen der drei Keimschichten bestehen (Itskovitz-Eldor et al. 2000). Sie entstehen durch die Kultivierung der iPS-Zellen in

Suspensionskulturen in Reaktionsgefäßen, die so beschaffen bzw. beschichtet sind, dass Zellen nicht an deren Wänden haften können (Sheridan et al. 2012). Die Zellen lagern sich zusammen, da sie in Suspension nur als Aggregate oder durch Zugabe von Inhibitoren der Rho-assoziierten Proteinkinasen (ROCK) überleben können (K. Watanabe et al. 2007). Die entstehenden dreidimensionalen Kulturen enthalten jedoch noch einige undifferenzierte Zellen, und die Expression pankardialer Marker ist im Vergleich zur Verwendung Monolayer-basierter Verfahren vermindert (M. Zhang et al. 2015). Des Weiteren ist das sarkoplasmatische Retikulum (SR) der über *embryoid-body*-basierte Verfahren generierten iPS-Kardiomyozyten häufig nicht komplett funktionsfähig (Hwang et al. 2015; Yang et al. 2014).

In dieser Arbeit wurde ein Monolayer-basiertes Verfahren verwendet. Monolayer-basierte Verfahren beruhen darauf, dass die iPS-Zellen an einer Oberfläche anheften und eine einschichtige Ebene bilden. Bei Verwendung von Matrigel®, einem Extrakt des Engelbreth-Holm-Swarm Tumors, als Matrix zur Anheftung wird die Differenzierung zu iPS-Kardiomyozyten und deren Reifung zusätzlich gefördert (Feaster et al. 2015; Kleinman et Martin 2005; J. Zhang et al. 2012).

Die Möglichkeiten, die kardiale Differenzierung zu initiieren, sind vielfältig, doch allgemein lässt sich festhalten, dass die Differenzierung *in vitro* die Differenzierung *in vivo* nachzuahmen versucht. In der vorliegenden Arbeit wurde das Differenzierungsprotokoll nach Zhang et al. verwendet, welches eine Optimierung von zuvor verwendeten Differenzierungsprotokollen darstellt und unabhängig von der verwendeten iPS-Zelllinie sowohl auf zweidimensionale wie auch dreidimensionale Verfahren anwendbar ist (M. Zhang et al. 2015). Zur Induktion der Mesodermformation werden dem Medium am Tag des Differenzierungsstarts (D0) entsprechend den Vorgängen während der Gastrulation Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2), *bone morphogenetic protein 4* (BMP-4) und CHIR 99021, ein potenter Aktivator des kanonischen Wnt-Signalweges, zugesetzt (s. Abbildung 1) (Kadari et al. 2015; M. Zhang et al. 2015).

Da die Kardiogenese auch *in vitro* biphasisch abläuft, ist in einem nächsten Schritt die Inhibition des kanonischen Wnt-Signalweges Voraussetzung für die Spezifikation zu primordialen kardiovaskulären Vorläuferzellen. Zur Inhibition des kanonischen Wnt-Signalweges können niedermolekulare Inhibitoren wie der *Inhibitor of Wnt Production-2* (IWP-2) oder *Wnt/β-catenin Inhibitor C59* (Wnt-C59) an Tag zwei und drei nach Differenzierungsstart verwendet werden (M. Zhang et al. 2015). Optionale Zusätze wie z.B. Transferrin, Natriumselenit oder Insulin können die kardiale Genexpression verstärken (s. Abbildung 1) (M. Zhang et al. 2015).

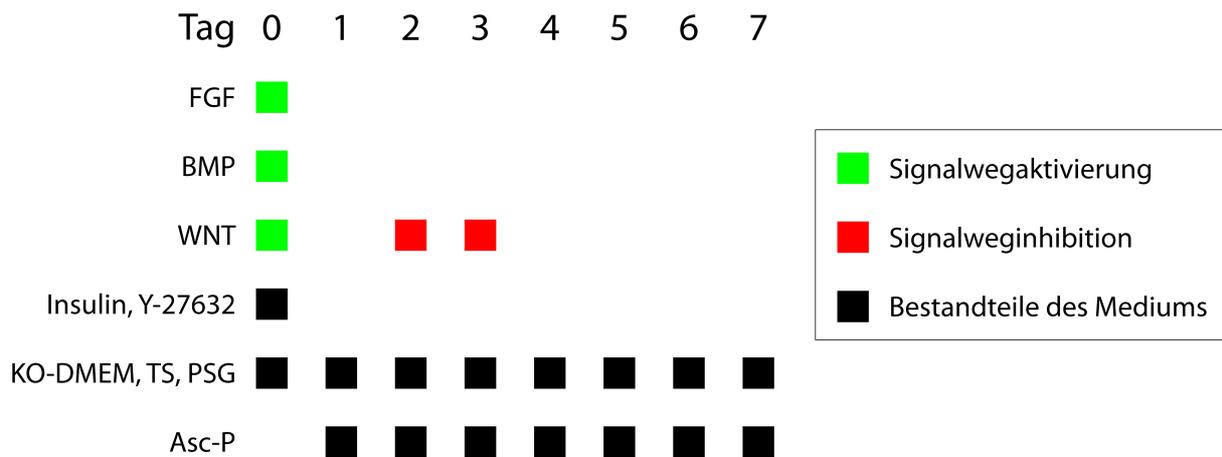


Abbildung 1: Differenzierungsprotokoll der iPS-Zellen modifiziert nach Zhang et al. 2015

Ablauf der Differenzierung der iPS-Zellen zu iPS-Kardiomyozyten. Grundbestandteile der Medien sind *KnockOut*TM DMEM (KO-DMEM), TS (Transferrin und Natriumselenit) und Penicillin-Streptomycin-Glutamin (PSG). Dem D0-Medium werden außerdem Insulin und der ROCK-Inhibitor Y-27632 hinzugegeben. Es folgt die Aktivierung des FGF-Signalwegs mittels FGF-2, die Aktivierung des BMP-Signalwegs mittels BMP-4 und die Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs mittels CHIR 99021. An den weiteren Tagen wird dem Medium Phospho-Ascorbat (Asc-P) hinzugefügt. An Tag 2 und 3 erfolgt die Hemmung des kanonischen WNT-Signalwegs beispielsweise durch Wnt-C59.

1.3. Calcium-handling der iPS-Kardiomyozyten

1.3.1. Vom Aktionspotential zur Kontraktion - die elektromechanische Kopplung

Unter der elektromechanischen Kopplung versteht man jene Mechanismen, die es ermöglichen, durch einen elektrischen Reiz eine mechanische Reaktion auszulösen (s. Abbildung 2) (Bers 2001).

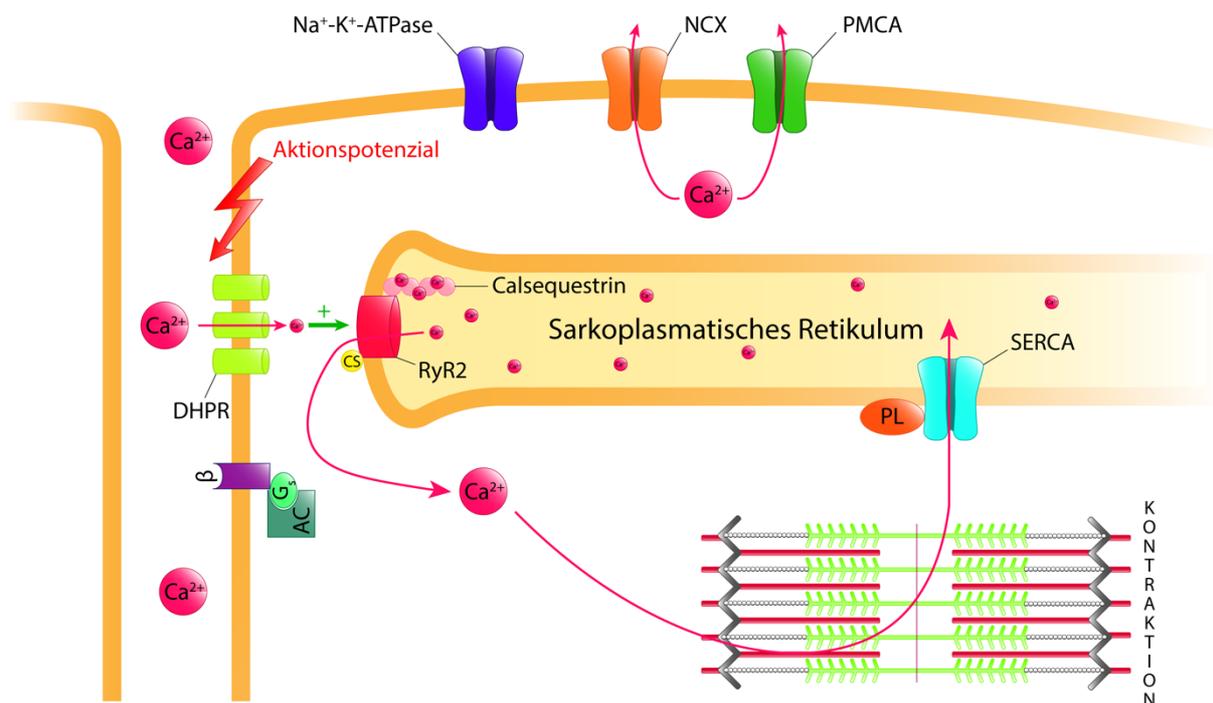


Abbildung 2: Schematischer Ablauf der elektromechanischen Kopplung

Ein Aktionspotential führt zur Depolarisation der Herzmuskelzelle. Die vollständige Depolarisation der Zellmembran ist die Folge. Die Depolarisation führt zur Öffnung des DHPR und dadurch zum Einstrom von Calciumionen. Daraufhin kommt es zur Freisetzung weiterer Calciumionen durch die Öffnung des RyR2 in der Membran des SR. Die Calciumionen binden an das Troponin C und führen so zur Kontraktion. Anschließend werden die Calciumionen größtenteils über die SERCA, den NCX oder die PMCA wieder aus dem Zytosol entfernt. (AC: Adenylylcyclase, β : β_1 -Adrenozeptor, Ca^{2+} : Calciumionen, CS: Calstabin, G_s : G_s -Protein, PL: Phospholamban)

In der Ruhephase beträgt das Membranpotential der Herzmuskelzelle etwa -80 bis -100 mV. Dieses Ruhemembranpotential wird insbesondere durch die ATP-abhängige Natrium/Kalium-Pumpe (Na^+/K^+ -ATPase) generiert, die Natrium im Austausch gegen Kalium aus der Zelle entfernt. Dadurch ist die intrazelluläre Natriumkonzentration gering und die Kaliumkonzentration hoch, wohingegen diese Verteilung extrazellulär genau entgegengesetzt ist. Auch die intrazelluläre Calciumkonzentration ist in der Ruhephase deutlich geringer als im Extrazellularraum (Bers 2001).

Im Herzen beginnt der Erregungszyklus in den Schrittmacherzellen des Sinusknotens. Da diesen Schrittmacherzellen die im sonstigen Arbeitsmyokard vorkommenden gleichrichtenden Kaliumkanäle fehlen, die in der Lage sind leichte Depolarisationen zu kompensieren und somit das Ruhemembranpotential zu stabilisieren, weisen sie ein positiveres und vor allem ein instabileres Ruhemembranpotential auf (Bers 2001). Ein langsamer einwärts gerichteter Kationenstrom namens *funny current* (I_f) hat zur Folge, dass langsame diastolische Depolarisationen bis zu einer Schwelle von etwa -40 mV auftreten. Wird diese Schwelle erreicht, so öffnen sich spannungsgesteuerte Calciumkanäle vom L- und vom T-Typ. Durch den konsekutiven Einstrom von Calciumionen kommt es zur Depolarisation der Sinusknotenzellen. Diese Erregung wird über das spezifische Reizleitungssystem des Herzens zur Ventrikelmuskulatur weitergeleitet. Von dort breitet sich die Erregung über *gap junctions* gleichmäßig über das gesamte Ventrikelmyokard aus (Bers 2001). Kommt es durch ein so entstandenes Aktionspotential zur Depolarisation einer Herzmuskelzelle so öffnen sich zunächst für eine kurze Zeit viele spannungsgesteuerte „schnelle“ Natriumkanäle, die zur vollständigen Depolarisation der Zelle führen (Bers 2001). Darauf folgt eine erste partielle Repolarisation, welche durch einen transienten Kalium-Auswärtsstrom und einen Chlorid-Einwärtsstrom entsteht (Bers 2001).

Die längste Phase des Aktionspotentials ist die Plateauphase. Sie kommt durch die Öffnung der spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanäle, der Dihydropyridinrezeptoren (DHPR), und dem konsekutiven langsamen Einstrom von Calciumionen zustande (s. Abbildung 2). Der Einstrom von Calciumionen wirkt einerseits der Repolarisation entgegen und hält das Membranpotential bei etwa 0 mV konstant. Andererseits ist er verantwortlich für die mittels elektromechanischer Kopplung ausgelöste Kontraktion der Kardiomyozyten (Bers 2001).

Jedoch ist der Einstrom von Calciumionen nicht ausreichend, um den kontraktile Apparat vollständig zu aktivieren. Durch die Öffnung des DHPR werden weitere Calciumkanäle, die Ryanodinrezeptoren 2 (RyR2), in der Membran des SR geöffnet, sodass das dort gespeicherte Calcium entlang des Konzentrationsgradienten in das Zytoplasma diffundieren kann (s. Abbildung 2). Dieser Prozess wird Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung (CICR) genannt (Bers 2001; Fill et Copello 2002; Wang et al. 2001).

Im Ruhezustand verdeckt das Regulatorprotein Tropomyosin die Brückenbindungsstellen des Aktins, sodass die Myosinköpfechen nicht daran binden können. Kommt es durch den zuvor beschriebenen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration dazu, dass Calcium an eine der drei Untereinheiten von Troponin C binden kann, so folgt eine Konformationsänderung des Tropomyosins. Dadurch werden die Brückenbindungsstellen des Aktins frei und ein Myosinköpfechen kann daran binden (Bers 2001; Endoh 2008). Im Folgenden werden durch

die Bindung und Spaltung von Adenosintriphosphat (ATP) die Aktinfilamente durch eine Schlagbewegung der Myosinköpfe aufeinander zu bewegt. Diese wiederholte Interaktion zwischen Aktin- und Myosinfilamenten wird Querbrückenzyklus genannt und resultiert in der Verkürzung des Sarkomers (Bers 2001; Stehle et Iorga 2010).

Die Terminierung der Calciumfreisetzung erfolgt über vielfältige Mechanismen. Gebunden an den DHPR befindet sich das regulatorische Protein Calmodulin, welches während des Calcium-Einstroms einen Komplex mit Calcium bildet und so den weiteren Calciumeinstrom über den DHPR hemmt (Tadross et al. 2010; Tang et al. 2003).

Anschließend erfolgt die endgültige Repolarisation durch die Aktivierung von verschiedenen Kaliumkanälen. Die dadurch entstehenden Kalium-Auswärtsströme tragen entscheidend zum Wiedererreichen des Ruhemembranpotentials bei (Nerbonne et Kass 2005). Während der Repolarisation werden die Calciumionen auf verschiedenen Wegen wieder aus dem Zytoplasma entfernt (s. Abbildung 2). In humanen Kardiomyozyten werden etwa 63 % der Calciumionen über die Calcium-ATPase des SR (*Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*, SERCA) entgegen des Konzentrationsgradienten energieabhängig zurück in das SR transportiert (Bers 2001; Louch et al. 2012; MacLennan et Kranias 2003). Der SERCA angegliedert ist Phospholamban, ein in der Membran des SR lokalisiertes Protein, welches unter Basalbedingung in seinem dephosphorylierten Zustand als endogener Inhibitor der SERCA fungiert. Die Inhibition der SERCA unter Basalbedingung führt dazu, dass weniger Calciumionen in das Lumen des SR zurücktransportiert werden und somit weniger Calcium für die nächste Kontraktion zur Verfügung steht als unter β -adrenerger Stimulation (James et al. 1989). Etwa 37 % der Calciumionen werden in humanen Kardiomyozyten über den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) in den Extrazellularraum transportiert (Bers 2001). Hierbei handelt es sich um einen elektrogenen Prozess, bei dem ein Calciumion aus der Zelle transportiert wird, während drei Natriumionen in die Zelle aufgenommen werden (Bers 2001; ter Keurs 2012). Der NCX macht sich dabei den von der Na^+/K^+ -ATPase aufgebauten Konzentrationsgradienten der Natriumionen zunutze. Ein nur sehr geringer Anteil wird durch eine Calcium-ATPase im Sarkolemm (*plasma membrane calcium ATPase*, PMCA) energieabhängig in den Extrazellularraum oder über einen mitochondrialen Uniporter in das Lumen der Mitochondrien gefördert (Bers 2001; Fearnley et al. 2011). Der Anstieg und das darauffolgende Absinken der intrazellulären Calciumkonzentration über die Zeit wird als Calciumtransient bezeichnet (Kong et al. 2010).

Calcium stellt also in humanen adulten Kardiomyozyten das zentrale Bindeglied der elektrischen Aktivierung und der mechanischen Kontraktion dar. Doch insbesondere über die

Regulation des Calciumhaushalts in iPS-Kardiomyozyten ist noch vieles unbekannt (Lee et al. 2011).

Im Allgemeinen findet die Generierung einer Kontraktion sehr ähnlich wie bei adulten humanen Kardiomyozyten statt (Karakikes et al. 2015). Itzhaki et al. konnten in den von ihnen generierten iPS-Kardiomyozyten die Expression wichtiger molekularer Komponenten wie z.B. RyR2, SERCA und Phospholamban nachweisen, die auch in adulten humanen Kardiomyozyten exprimiert werden (Itzhaki et al. 2011). Auch die Elimination des Calciums aus dem Zytosol geschieht hauptsächlich über den NCX und die SERCA und die iPS-Kardiomyozyten besitzen wie auch adulte humane Kardiomyozyten robuste L-Typ-Calciumkanal-Ströme und intrazelluläre Calciumspeicher (Hwang et al. 2015).

Trotz der generellen Ähnlichkeit bestehen jedoch auch wesentliche Unterschiede im Vergleich zu humanen adulten Kardiomyozyten. Die Calciumtransienten der iPS-Kardiomyozyten zeigen eher einen kuppelförmigen Verlauf. Eine solche Konfiguration der Calciumtransienten wurde zuvor bereits für aus ES-Zellen abgeleiteten Kardiomyozyten (ES-Kardiomyozyten) in frühen Entwicklungsstadien beschrieben und ist unter anderem auf fehlende T-Tubuli zurückzuführen. Das Fehlen der T-Tubuli hat zur Folge, dass der DHPR nicht in räumlicher Nähe zu dem RyR2 zu liegen kommen, sodass die intrazelluläre Calciumkonzentration in der Peripherie schneller ansteigt als im Zentrum. Diese zeitliche Verzögerung führt zum kuppelförmigen Maximum des Calciumtransienten und ist Zeichen einer ineffizienten CICR (Kong et al. 2010; Lee et al. 2011). Die Kuppelform der Calciumtransienten lässt sich auch in Kardiomyozyten bei Herzinsuffizienz sowie in fetalen ventrikulären Kardiomyozyten von Ratten nachweisen. Sie ist Ausdruck der Immaturität sowohl von humanen Kardiomyozyten als auch von iPS-Kardiomyozyten (Lee et al. 2011; Seki et al. 2003).

Darüber hinaus ist auch das SR noch nicht in dem Grad ausgebildet wie es bei adulten humanen Kardiomyozyten der Fall ist (Karakikes et al. 2015). Die iPS-Kardiomyozyten zeigen zwar wie humane adulte Kardiomyozyten auch robuste Calciumfreisetzungen nach Koffeinexposition, die ein Hinweis auf das Vorhandensein funktioneller Calciumspeicher im SR sind, doch ist ihre Calciumtransientenkinetik aufgrund der reduzierten Expression und Funktion der SERCA langsamer (Hartman et al. 2016; Hwang et al. 2015; Itzhaki et al. 2011).

Weiterhin zeigten die Versuche von Itzhaki et al., dass eine durch Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) vermittelte Calciumfreisetzung an der Entstehung der Calciumtransienten beteiligt ist (Itzhaki et al. 2011). Dieser Mechanismus spielt eine besondere Rolle in der kardialen Entwicklung, da der IP3-Rezeptor den am frühesten exprimierten Calcium-freisetzenden Kanal im Embryo darstellt (Garcia et Boehning 2017; Rosembli et al. 1999). Die Beteiligung der IP3-vermittelten Calciumfreisetzung spricht ebenfalls für die Immaturität der iPS-Kardiomyozyten.

1.3.2. Regulation des Calcium-handlings durch β -adrenerge Stimulation

Die intrazelluläre Calciumkonzentration wird über Modifikation von regulatorischen Schlüsselproteinen reguliert. Von großer Bedeutung ist die Funktion der vom zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) abhängigen Proteinkinase A (PKA), deren Aktivität beispielsweise im Zuge der Sympathikusaktivierung gesteigert wird (s. Abbildung 3) (Bers 2002; Fearnley et al. 2011). Nach Bindung von Katecholaminen, wie beispielsweise dem unselektiven β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin, an β_1 -Adrenozeptoren wird die Adenylylcyclase aktiviert, welche folglich verstärkt die Bildung von cAMP aus ATP katalysiert. Das cAMP kann dann an die regulatorische Untereinheit der PKA binden und sie auf diese Weise aktivieren (Bers 2002).

Mittels Phosphorylierung des DHPR und des RyR2 erhöht die PKA auf direkte Weise die Offenwahrscheinlichkeit dieser Calciumkanäle (s. Abbildung 3) (Bers 2002; Fearnley et al. 2011). Dies hat zur Folge, dass mehr Calcium in den Intrazellularraum der Kardiomyozyten gelangt, sodass eine stärkere Verkürzung der Sarkomere und konsekutiv eine stärkere Kontraktion erreicht werden kann (positiv inotrope Wirkung) (Bögeholz et al. 2012).

Außerdem führt eine Aktivierung der PKA zur Phosphorylierung von Phospholamban, welches folglich gehemmt wird und von der SERCA dissoziiert (s. Abbildung 3) (James et al. 1989). Infolgedessen steigt die Aktivität der SERCA und es kann mehr Calcium in das Lumen des SR zurücktransportiert werden als unter Basalbedingung. Dies resultiert einerseits in einer beschleunigten Relaxation des Myokards (positiv lusitrope Wirkung) und andererseits in einer positiven Inotropie der nachfolgenden Herzzyklen (Fearnley et al. 2011; Li et al. 2000).

Darüber hinaus sorgt eine Aktivierung der PKA für eine Ablösung des inhibitorisch auf den RyR2 wirkenden Calstabins von ebendiesem (s. Abbildung 3) (Marx et al. 2000).

Zusammengefasst führt eine β -adrenerge Stimulation über die zuvor beschriebenen Prozesse zu einer positiv inotropen und lusitropen Wirkung auf die Kardiomyozyten.

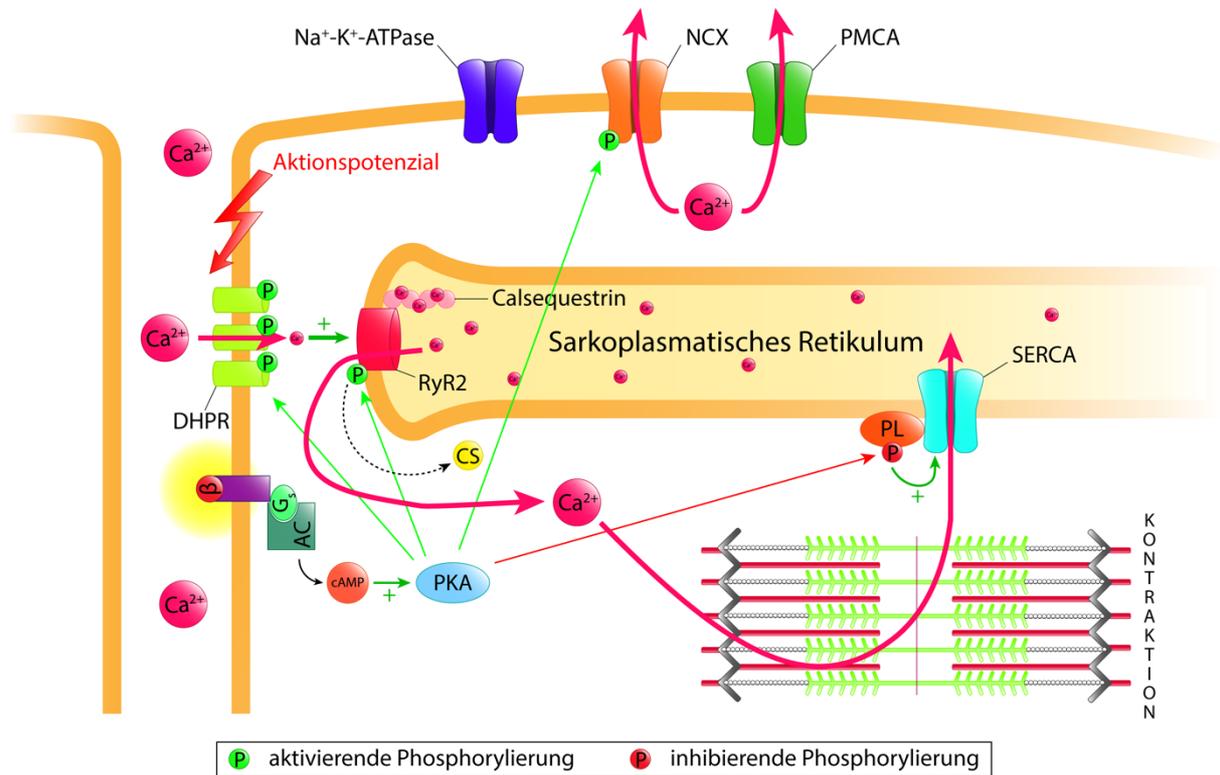


Abbildung 3: Regulation der Calciumfreisetzung durch β -adrenerge Stimulation

Die Bindung von Katecholaminen (β) an β_1 -Adrenozeptoren führt zur cAMP-abhängigen Aktivierung der PKA. Diese phosphoryliert unter anderem den DHPR, den RyR2 sowie das inhibitorisch auf die SERCA wirkende Phospholamban (PL). Es kommt hierdurch sowohl zu einem verstärkten Calciumeinstrom in die Herzmuskelzelle als auch zu einer verstärkten Wiederaufnahme des Calciums in das SR, sodass dieses für den nächsten Kontraktionszyklus wieder zur Verfügung steht. Diese Prozesse haben die positiv inotrope und lusitrope Wirkung der Katecholamine auf das Herz zur Folge. (AC: Adenylylcyclase, β : β_1 -Adrenozeptor, Ca^{2+} : Calciumionen, CS: Calstabin, G_s : G_s -Protein, PL: Phospholamban)

1.4. Reifung der iPS-Kardiomyozyten

Wie auch die Reifung von humanen Kardiomyozyten *in vivo*, findet die Reifung der iPS-Kardiomyozyten über einen längeren Zeitraum statt. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist es noch nicht gelungen, iPS-Kardiomyozyten eines solchen Reifegrades zu generieren, welcher jenem von adulten humanen Kardiomyozyten entspricht. Doch ist es durch verschiedene Modifikationen der Kulturbedingungen sowie durch eine längere Kultivierungsdauer möglich, iPS-Kardiomyozyten eines höheren Reifungsgrades als noch vor einigen Jahren hervorzubringen (Hartman et al. 2016). Die Reifung findet auf verschiedenen Ebenen statt.

1.4.1. Strukturelle Reifung

Junge iPS-Kardiomyozyten (20 bis 40 Tage nach Differenzierungsstart) weisen eine signifikant geringere Zelloberfläche als humane adulte Kardiomyozyten auf und sind eher zirkulär, dreieckig oder vieleckig geformt. Damit ähneln sie morphologisch eher neonatalen Kardiomyozyten (Kolanowski et al. 2017; Lundy et al. 2013). Durch eine längere Kultivierungsdauer von zwei Monaten kommt es zu einer Zunahme der Zelloberfläche, und die iPS-Kardiomyozyten nehmen vergleichbar mit adulten humanen Kardiomyozyten eine eher elongierte Form an (Lundy et al. 2013). Während die Myofibrillen der frühen iPS-Kardiomyozyten noch diffus verteilt und nicht geordnet sind, kommt es im Laufe der Alterung zu einer klaren Entwicklung der Sarkomer-Bänderung und somit zu einer strukturierteren Zellarchitektur (Kamakura et al. 2013; M. Zhang et al. 2015). Darüber hinaus kommt es zusätzlich zu einer Zunahme der Myofilament-Dichte sowie der Anzahl an multinukleären iPS-Kardiomyozyten, welche jedoch geringer als die der humanen adulten Kardiomyozyten ist (Kolanowski et al. 2017; M. Zhang et al. 2015). Auch die iPS-Kardiomyozyten höherer Reifungsstadien besitzen eine ungeordnetere Organisation der Myofilamente als humane adulte Kardiomyozyten, sodass ihre Kraftentwicklung aufgrund der in verschiedene Richtungen zeigenden Kraftvektoren weniger gerichtet ist (Peischard et al. 2017). Trotz der strukturellen Reifung sind auch bei iPS-Kardiomyozyten höherer Reifungsstufen bisher keine T-Tubuli zu finden, sodass auch sie eine ineffiziente CICR aufweisen (Hartman et al. 2016; Kane et al. 2015; Lundy et al. 2013; Yang et al. 2014).

1.4.2. Transkriptionelle Reifung

Grundlage der zuvor erwähnten strukturellen Reifung sind Veränderungen auf transkriptioneller Ebene. Bereits eine Woche nach dem Differenzierungsstart zeigen iPS-Kardiomyozyten eine Expression der *messenger*-Ribonukleinsäuren (mRNA) pankardialer Marker, wie z.B. *myosin heavy chain 6* (MYH6), die denen von humanen adulten Kardiomyozyten ähnelt (M. Zhang et al. 2015). Dennoch ist die Expression der mRNA einiger wichtiger Schlüsselgene der kardiomyozytären Funktion, wie beispielweise *myosin light chain 2* (MYL2), bei den iPS-Kardiomyozyten noch deutlich geringer ausgeprägt als bei adulten humanen Kardiomyozyten, während die iPS-Kardiomyozyten noch eine erhöhte mRNA-Expression früher kardialer entwicklungspezifischer Gene, wie z.B. *NK2 Homeobox 5* (Nkx2.5), aufweisen (M. Zhang et al. 2015). Dies ist Zeichen des noch hochgradig unreifen Transkriptoms der eine Woche alten iPS-Kardiomyozyten (M. Zhang et al. 2015).

Im Laufe des Reifungsprozesses kommt es zur Herunterregulation der mRNA-Expression entwicklungspezifischer Gene auf das Niveau humaner adulter Kardiomyozyten (M. Zhang et al. 2015). Damit verlieren die iPS-Kardiomyozyten unter anderem ihre Fähigkeit zur Proliferation, die sie in frühen Stadien zum Teil noch besitzen (M. Zhang et al. 2015).

Auch nach längerer Kultivierungsdauer ist insbesondere die mRNA-Expression einiger für Ionenkanäle kodierender Gene noch geringer als in humanen adulten Kardiomyozyten (Hartman et al. 2016; Karakikes et al. 2015; Lundy et al. 2013; M. Zhang et al. 2015). So ist beispielsweise die mRNA-Expression des RyR2 in acht Wochen alten iPS-Kardiomyozyten im Vergleich zu humanen adulten Kardiomyozyten noch deutlich vermindert (M. Zhang et al. 2015). Bei den iPS-Kardiomyozyten findet sich darüber hinaus eine erhöhte Expression des *Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide Gated Potassium Channel 4* (HCN4) und eine erniedrigte Expression des *Inward Rectifier Potassium Channel 2* (KCNJ2) (Hartman et al. 2016; Karakikes et al. 2015; Kolanowski et al. 2017). Dies hat relativ betrachtet ein hyperpolarisiertes Ruhemembranpotential und eine höhere elektrische Instabilität zur Folge (Hartman et al. 2016; Kolanowski et al. 2017).

1.4.3. Funktionelle Reifung

Die zuvor genannten Veränderungen auf struktureller und transkriptioneller Ebene wirken sich auch auf die funktionellen Eigenschaften der iPS-Kardiomyozyten aus.

So zeigen junge iPS-Kardiomyozyten (20 bis 40 Tage nach Differenzierungsstart) noch eine Automtizität von etwa 100 Schlägen pro Minute. Dadurch sind sie am ehesten mit frühen fetalen Kardiomyozyten vergleichbar, da eine Automtizität im adulten Herzen lediglich den spezialisierten Schrittmacher-Zentren vorbehalten bleibt. Im Verlauf der Reifung zeigen die iPS-Kardiomyozyten lediglich Kontraktionsraten von weniger als 10 Schlägen pro Minute oder sogar den Verlust ihrer Automtizität (Lundy et al. 2013).

Auch die elektrophysiologischen Eigenschaften der iPS-Kardiomyozyten ändern sich im Laufe ihrer Reifung. Zwar bleibt weiterhin eine Heterogenität der Eigenschaften des Aktionspotentials im Sinne der verschiedenen Zelltypen (ventrikuläre und atriale Kardiomyozyten sowie Schrittmacher-Zellen) bestehen, doch nimmt ohne gerichtete Differenzierung im Verlauf der Anteil an „ventrikulären“ iPS-Kardiomyozyten zu (Karakikes et al. 2015; M. Zhang et al. 2015). Ebenfalls kommt es im Verlauf der Reifung der iPS-Kardiomyozyten zu einer Zunahme der Dauer des Aktionspotentials (M. Zhang et al. 2015). Trotz der Reifungsprozesse bleiben jedoch auch bei den iPS-Kardiomyozyten höherer Reifungsstadien Charakteristika der Immaturität wie beispielweise ein positiveres

Ruhemembranpotential verglichen mit humanen adulten Kardiomyozyten vorhanden (Hartman et al. 2016; Karakikes et al. 2015).

Ebenso verändert sich das *Calcium-handling* der iPS-Kardiomyozyten hin zu einem reiferen Phänotyp. Durch längere Kultivierungsdauer kommt es einerseits zu einer Zunahme der Calciumtransientenamplitude sowie andererseits zu einer Zunahme der Geschwindigkeit der Aufstrichphase sowie des Abfalls des Calciumtransienten (Hartman et al. 2016; Hwang et al. 2015; Lundy et al. 2013; M. Zhang et al. 2015). Des Weiteren nimmt die Bedeutung der SERCA und des NCX im Laufe der Reifung zu, wohingegen die Bedeutung anderer Mechanismen der Calciumelimination abnimmt (Hwang et al. 2015).

Letztendlich lassen sich die zuvor genannten funktionellen Veränderungen in ihrer gemeinsamen Endstrecke, der Kontraktion der iPS-Kardiomyozyten, beobachten. Das Ausmaß der Kontraktion nimmt von etwa 5 % der Zelllänge in Ruhe an Tag 20 bis 40 nach dem Differenzierungsstart auf etwa 10 % der Zelllänge in an Tag 80 bis 120 nach dem Differenzierungsstart zu (Lundy et al. 2013). Doch ist die Kontraktionskraft wesentlich geringer als bei humanen adulten Kardiomyozyten. Dies ist nicht zuletzt in der ungeordneteren Organisation der Myofilamente der iPS-Kardiomyozyten begründet (Peischard et al. 2017).

2. ZENTRALE FRAGESTELLUNGEN

Im Hinblick auf das Potential der iPS-Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Nutzung in der Grundlagenforschung sowie zur Regeneration von Herzmuskelgewebe ist es von besonderer Bedeutung, ihre physiologischen Eigenschaften weiter zu charakterisieren, um einen umfassenden Überblick insbesondere über die Unterschiede zu adulten Kardiomyozyten zu erhalten.

Im Rahmen dieser physiologischen Charakterisierung stellt das Calcium-*handling* das zentrale Bindeglied zwischen elektrischer Aktivierung und mechanischer Herzaktion dar und gibt somit Aufschlüsse über die Funktionalität und den Reifungsgrad der Herzmuskelzellen. Dennoch finden sich nur wenige Arbeiten zu dieser Thematik. Die Studien, die es gibt, befassen sich oftmals mit iPS-Kardiomyozyten, welche mittels *embryoid-body*-Methode generiert wurden und konsekutiv funktionell unreifer sind als jene, welche mittels zweidimensionaler Differenzierungsprotokolle generiert wurden (Hwang et al. 2015).

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stand die Analyse der Calciumtransientenkinetik der iPS-Kardiomyozyten im Alter von zwei, drei und fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart. Es erfolgte die Calciumtransientenmessung von drei verschiedenen Altersgruppen, um ihre elektrophysiologische Reifung hinsichtlich ihres Calcium-*handlings* zu beurteilen. Darüber hinaus wurden die Calciumtransientenmessungen ebenfalls unter Zugabe von Isoprenalin, einem unselektiven β -Adrenozeptoragonisten, durchgeführt. Dies hatte zum Ziel, zu identifizieren, ab welchem Zeitpunkt die iPS-Kardiomyozyten auf β -adrenerge Stimulation reagieren können und in welchem Maße sich diese Reaktion auf die Calciumtransientenkinetik auswirkt. Für die genaue Beurteilung der Reifung der iPS-Kardiomyozyten erfolgte der Vergleich ihrer Calciumtransientenkinetik sowohl unter Basalbedingung als auch unter β -adrenerger Stimulation mit der Calciumtransientenkinetik isolierter adulter muriner ventrikulärer Kardiomyozyten.

3. MATERIAL & METHODEN

3.1. Materialien

3.1.1. Feinchemikalien

Sofern nicht anderweitig angegeben stammten die verwendeten Feinchemikalien von gibco®, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland), AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) oder Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland).

Alle verwendeten Substanzen und Lösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert oder autoklaviert, falls dies nicht schon vom Hersteller durchgeführt wurde. Die Arbeiten mit der Zellkultur haben unter sterilen Bedingungen unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank (Telstar BioVanguard 4, Telstar, Azbil Telstar, S.L.U., Terrassa, Spanien) stattgefunden.

3.1.2. Verwendete Zell- und Tierlinien

3.1.2.1. Humane induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) der Zelllinie

SFS.1

In dieser Arbeit wurden iPS-Zellen der Zelllinie SFS.1 verwendet, die uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Boris Greber (Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin, Münster) zur Verfügung gestellt wurden. Diese iPS-Zellen sind mithilfe der vier Yamanaka-Faktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-Myc nach Melton's Protokoll reprogrammierte humane Vorhaut-Fibroblasten (ATCC #CRL-2097) (Pan et al. 2013). Die Übertragung der Transkriptionsfaktoren erfolgte mittels Sendai-Virus.

Es wurde regelmäßig eine Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Mykoplasmen nach Herstelleranleitung mit dem PCR Mycoplasma Test Kit I/C (Promokine, PromoCell, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die Zellkulturen waren durchgängig negativ für Mykoplasmen. Hierdurch konnte eine Kontamination mit Mykoplasmen, welche den Stoffwechsel und damit die Zellproliferation, die Differenzierung sowie die Funktionsfähigkeit der iPS-Kardiomyozyten beeinträchtigen würde, ausgeschlossen werden.

3.1.2.2. Isolierte murine ventrikuläre Kardiomyozyten

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Vergleich zwischen iPS-Kardiomyozyten und adulten murinen ventrikulären Kardiomyozyten erfolgen. Hierzu wurden FVB/N Wildtyp-Mäuse im Alter von 16-19 Wochen gemessen. Die Versuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (Aktenzeichen 84-02.05.50.15.024). Die murinen ventrikulären Kardiomyozyten wurden von Frau Melanie Voß nach internem Standardprotokoll mittels enzymatischer Dissoziation isoliert (Schulte et al. 2012). Hierzu wurden zunächst die präparierten Herzen der Wildtyp-Mäuse mittels Kanülierung der Aorta an eine Langendorff-Apparatur angeschlossen. Anschließend erfolgte die retrograde Perfusion mit einer Kollagenase-Lösung gefolgt von der mechanischen Dispersion der Zellen, sodass für die Versuche einzelne murine ventrikuläre Kardiomyozyten vorlagen.

3.2. Kultivierung von iPS-Zellen

3.2.1. Allgemeine Zellkultur

Die Kultivierung der iPS-Zellen erfolgte auf mit Matrigel®-Lösung beschichteten 6er-Multiplochplatten. Matrigel®-Lösung ist eine Verdünnung von Matrigel® Matrix, Basement Membrane HC, Growth Factor Reduced (20,67 mg/ml) (Corning Life Sciences, Corning, NY, USA), einem Extrakt des Engelbreth-Holm-Swarm Tumors, und stellt die extrazelluläre Matrix dar (Benton et al. 2014; Kleinman et Martin 2005).

Zur Herstellung der Matrigel®-Lösung wurden 10 ml Matrigel® (Matrigel® Matrix, Basement Membrane HC, Growth Factor Reduced, 20,67 mg/ml, Corning Life Sciences, Corning, NY, USA) über Nacht auf Eis bei 4 °C aufgetaut (Benton et al. 2014). Am folgenden Tag erfolgte eine 1:3 Verdünnung des Matrigels® mit 20 ml eiskaltem KnockOut™ DMEM (Matrigel®-Lagerlösung). Die 1:3 verdünnte Matrigel-Lagerlösung wurde nun zu 1 ml aliquotiert und entweder für den späteren Gebrauch bei -20 °C gelagert oder für den direkten Gebrauch zur Kultivierung der iPS-Zellen weiter verdünnt (Greber et al. 2011). Dazu wurde 1 ml der Matrigel®-Lagerlösung mit 24 ml KO-DMEM/PSG verdünnt. Die so hergestellte Verdünnung des Matrigels® in einem Verhältnis von 1:75 wird im Folgenden als Matrigel®-Lösung bezeichnet. Zur Beschichtung wurde 1 ml Matrigel®-Lösung pro Vertiefung einer bei 4 °C vorgekühlten 6er-Multilochplatte eingesetzt. Danach wurde jede Multilochplatte mit Parafilm eingewickelt, über Nacht bei Raumtemperatur ruhen gelassen und am darauffolgenden Tag bei 4 °C gelagert. Vor Gebrauch wurden die 6er-Multilochplatten für eine Stunde bei

Raumtemperatur äquilibriert und anschließend die Polymerisation des Matrigels unter einem Lichtmikroskop (Olympus CKX41 invertiertes Mikroskop, Olympus, Tokyo, Japan) überprüft. Die genutzten Objektive waren ein UPLanFL N 4X/0,13 PhP (Olympus, Tokyo, Japan), ein LCAch N 20X/0,40 PhP (Olympus, Tokyo, Japan) sowie ein LCAch N 40X/0,55 PhP (Olympus, Tokyo, Japan).

Entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit wurden die iPS-Zellen angelehnt an das Protokoll von Zhang et al. nach Erreichen einer Konfluenz von 90 % in einem drei- bis viertägigen Rhythmus passagiert (M. Zhang et al. 2015). Dazu wurden konfluente iPS-Zellen mit 2 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) pro Vertiefung einer 6er-Multilochplatte gewaschen. Anschließend wurde je 1 ml der vorgewärmten Enzymlösung 1 pro Vertiefung hinzugefügt und die iPS-Zellen für zehn Minuten im Brutschrank (Binder CO₂-Inkubator CB150, Binder, Tuttlingen, Deutschland; 37 °C, 5 % CO₂) inkubiert (M. Zhang et al. 2015). Währenddessen wurde die überstehende Matrigel®-Lösung von der neuen 6er-Multilochplatte verworfen und je 2 ml auf 37 °C erwärmtes FTDAC + Y pro Vertiefung vorgelegt. Nach zehn Minuten Inkubationszeit im Brutschrank wurden die iPS-Zellen makroskopisch (Zellen in Suspension) und mikroskopisch (Abrundung der Zellen) kontrolliert und anschließend durch mehrmaliges Pipettieren mit einer 1 ml Eppendorf Pipette zu einer Einzelzellsuspension dissoziiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion mit je 1 ml HSA/ITS + Y pro Vertiefung gestoppt. Nach Überführen der Zellsuspension in ein 15 ml Schraubröhrchen wurden 9 µl der Zellsuspension entnommen und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Ziel war es, die iPS-Zellen mit einer Zellkonzentration von 0,5 Mio. Zellen pro Vertiefung neu auszuplattieren. Dazu wurde im Anschluss an die Zellzählung das benötigte Volumen der Zellsuspension berechnet und zentrifugiert (Hettich Rotina 35R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland; 200 Umdrehungen pro Minute (rpm), 2 min). Nach Verwerfen des Überstandes wurde der Zellrückstand in je 1 ml FTDAC + Y pro 1 Mio. Zellen resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 500 µl pro Vertiefung einer mit Matrigel®-Lösung beschichteten 6er-Multilochplatte ausplattiert. Um eine gleichmäßige Verteilung der iPS-Zellen sicherzustellen, wurde die 6er-Multilochplatte beim Überführen in den Brutschrank in Form einer Acht bewegt.

Das FTDAC-Medium der iPS-Zellen wurde alle 24 Stunden komplett ausgetauscht. Dabei wurde das Volumen des Mediums wie folgt an das Zellwachstum angepasst: einen Tag nach dem Passagieren wurden 2,5 ml, zwei Tage nach dem Passagieren wurden 3,0 ml, drei Tage nach dem Passagieren wurden 3,5 ml und vier Tage nach dem Passagieren wurden 4,0 ml FTDAC (vorgewärmt, 37 °C) verwendet.

Matrigel®-Lagerlösung für 30 ml: 10 ml Matrigel HC (BS #354263), 20 ml KnockOut™ DMEM (1X)

KO-DMEM/PSG für 100 ml: 98,958 ml KnockOut™ DMEM (1X), 1,042 ml Penicillin-Streptomycin-Glutamine (PSG) (100X)

Matrigel®-Lösung für 25 ml: 24 ml KO-DMEM/PSG, 1 ml Matrigel®-Lagerlösung

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) für 1 l: 8,00 g Natriumchlorid (NaCl), 0,20 g Kaliumchlorid (KCl), 0,20 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄), 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na₂HPO₄·2H₂O). Die Lösung wurde mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit Salzsäure (HCl) und Natronlauge (NaOH) auf 7,45 eingestellt.

Enzymlösung 1 für 10,01 ml: 10 ml Accutase, 10 µl Y-27632-Dihydrochlorid-Lösung

FGF2-Lösung für 5 ml: 50 µg FGF-basic Human Recombinant (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) gelöst in 5 ml 0,1 % bovinem Serumalbumin (BSA)/PBS

TGFb1-Lösung für 5 ml: 5 µg Human TGFb1 Recombinant Protein (eBioscience, San Diego, CA, USA) gelöst in 5 ml 0,1 % BSA/PBS

Dorsomorphin-Lösung: 5 mg Dorsomorphin (BML-275) (Santa Cruz Bio Technology, Dallas, TX, USA) gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) zu 0,5 mM

Activin A-Lösung für 2,5 ml: 250 µl Human Activin A Recombinant Protein (eBioscience, San Diego, CA, USA) gelöst in 2,25 ml 0,1 % BSA/PBS

Wnt-C59-Lösung: 10 mg Wnt-C59 (Tocris, Bristol, United Kingdom) gelöst in DMSO zu 1 mM

Y-27632-Dihydrochlorid-Lösung: 10 mg Y-27632-Dihydrochlorid (Tocris, Bristol, Großbritannien) gelöst in 2,996 ml DMSO

ITS-Lösung: ITS™ Premix (Corning Life Sciences, Corning, NY, USA) 1:1000 gelöst in bidestilliertem Wasser

FTDAC für 100 ml: 96,9 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12), 1 ml PSG, 1 ml Bio-Pure Human Serum Albumin (10 % Solution) (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel), 0,1 ml ITS-Lösung, 1 ml CD Lipid Concentrate, 100 µl FGF2-Lösung, 20 µl TGFb1-Lösung, 10 µl Dorsomorphin-Lösung, 50 µl Activin A-Lösung, 1 µl WNT-C59-Lösung

FTDAC + Y für 10 ml: 10 ml FTDAC, 10 µl Y-27632-Dihydrochlorid-Lösung

HSA/ITS + Y für 10,01 ml: 9,69 ml DMEM/F-12 (1:1), 0,1 ml PSG, 0,1 ml Bio-Pure Human Serum Albumin (10 % Solution) (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel), 0,01 ml ITS-Lösung, 0,1 ml CD Lipid Concentrate, 10 µl Y-27632-Dihydrochlorid-Lösung

3.2.2. Kryokonservierung und Auftauen der iPS-Zellen

Ein gewisser Anteil der iPS-Zellen wurde während der Passagierungen für spätere Versuchsreihen kryokonserviert. Hierzu erfolgte nach zehnmütiger Inkubation der iPS-Zellen mit der Enzymlösung 1 die Zugabe von je 1 ml HSA/ITS + Y zum Beenden der enzymatischen Reaktion. Anschließend wurden die iPS-Zellen in ein 15 ml Schraubröhrchen überführt und zentrifugiert (200 rpm, 2 min). Nach Verwerfen des Überstandes und Bestimmung der Zellzahl erfolgte die Resuspension von 3 Mio. Zellen pro 1 ml Gefriermedium. Das Gefrier-Medium enthält 10 % DMSO (v/v), welches die Ausbildung von Wasserkristallen verhindert, die zum Zelltod führen würden (Norström et al. 2006). Anschließend wurde die Suspension in ein Kryoröhrchen überführt, welches für 24 Stunden in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter (Mr. Frosty, Nalgene®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) bei -80 °C gelagert wurde. Der Gefrierbehälter gewährleistet eine konstante Temperatursenkung von 1 °C pro Minute. Zur Langzeitlagerung wurden die Kryoröhrchen am folgenden Tag in einen Stickstofftank überführt (Norström et al. 2006).

Zum Auftauen der iPS-Zellen wurden die Kryoröhrchen für etwa eine Minute in ein auf 37 °C erwärmtes Wasserbad überführt und die Zellen mit einer 1 ml Eppendorf Pipette resuspendiert. Anschließend erfolgte die Überführung in ein mit 2 ml FTDAC + Y (vorgewärmt, 37 °C) gefülltes 15 ml Schraubröhrchen sowie die Zentrifugation (200 rpm, 2 min). Der Überstand wurde verworfen und der Zellrückstand in 1 ml vorgewärmten FTDAC + Y resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine Vertiefung einer mit Matrigel®-Lösung beschichteten 6er-Multilochplatte gegeben, die im Voraus mit 1,5 ml vorgewärmtem FTDAC + Y befüllt wurde. Die Multilochplatte wurde vor der Inkubation im Brutschrank vorsichtig in Form einer Acht gekreist.

Gefrier-Medium für 10 ml: 4 ml KnockOut™ Serum Replacement, 5 ml FTDAC, 10 µl Y-27632-Dihydrochlorid-Lösung, 1 ml DMSO

3.3. Kardiale Differenzierung der iPS-Zellen und Kultivierung der iPS-Kardiomyozyten

3.3.1. Ablauf der kardialen Differenzierung

Um die kardiale Differenzierung zu starten, wurden die zu differenzierenden iPS-Zellen mit 2 ml PBS pro Vertiefung einer 6er-Multilochplatte gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Enzymlösung 1 pro Vertiefung auf die iPS-Zellen pipettiert. Nach zehnmütiger Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) wurden die iPS-Zellen durch mehrmaliges Pipettieren mit einer 1 ml Eppendorf Pipette zu einer Einzelzellsuspension dissoziiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion mit je 1 ml HSA/ITS + Y pro Vertiefung gestoppt und die iPS-Zellen erneut resuspendiert. Nach Überführen der Zellsuspension in ein 15 ml Schraubröhrchen wurden 9 µl der Zellsuspension entnommen und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Anschließend wurde das für die Differenzierung benötigte Volumen (0,7 Mio. Zellen pro Vertiefung einer 24er-Multilochplatte) an Zellsuspension berechnet und die gewünschte Anzahl an iPS-Zellen zentrifugiert (200 rpm, 2 min). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde der Zellrückstand in je 2 ml D0-Medium pro 0,7 Mio. Zellen resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 2 ml pro Vertiefung einer mit Matrigel®-Differenzierungslösung beschichteten 24er-Multilochplatte ausplattiert. Matrigel®-Differenzierungslösung stellt eine Verdünnung des Matrigels® in einem Verhältnis von 1:450 dar. Hierzu wurde die Matrigel®-Lösung (1:75 Verdünnung) in einem Verhältnis von 1:6 mit KnockOut™ DMEM und PSG weiter verdünnt. Zur Beschichtung wurden 0,5 ml Matrigel®-Differenzierungslösung pro Vertiefung einer bei 4 °C vorgekühlten 24er-Multilochplatte eingesetzt. Anschließend wurde mit den 24er-Multilochplatten wie mit den mit Matrigel®-Lösung beschichteten 6er-Multilochplatten verfahren (s. Kapitel 3.2.1). Um nach dem Ausplattieren der iPS-Zellen eine gleichmäßige Verteilung sicherzustellen, wurde die 24er-Multilochplatte nach Überführung in den Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) in Form einer Acht bewegt. Anschließend wurden die iPS-Zellen im Brutschrank inkubiert.

Der Differenzierungsprozess der iPS-Zellen zu iPS-Kardiomyozyten begann mit der Aussaat auf die 24er-Multilochplatten und der Zugabe von D0-Medium am Tag des Differenzierungsstarts (s. Abbildung 4). Alle 24 Stunden erfolgte ein kompletter Wechsel des Mediums. Am ersten Tag nach dem Differenzierungsstart wurde das D0-Medium durch 2 ml TS-Medium pro Vertiefung einer 24er-Multilochplatte ersetzt. Am zweiten sowie dritten Tag nach dem Differenzierungsstart wurde dem TS-Medium der *small-molecule* WNT-Inhibitor Wnt-C59 in einem Verhältnis von 1:4000 zugegeben. Anschließend erfolgte ab dem vierten Tag nach dem Differenzierungsstart bis zur ersten Passagierung die Versorgung der iPS-

Kardiomyozyten mit je 2 ml des TS-Mediums pro Vertiefung einer 24er-Multilochplatte (s. Abbildung 4).

Nach diesem Protokoll begannen die iPS-Kardiomyozyten sechs bis sieben Tage nach dem Differenzierungsstart lichtmikroskopisch sichtbar zu kontrahieren.

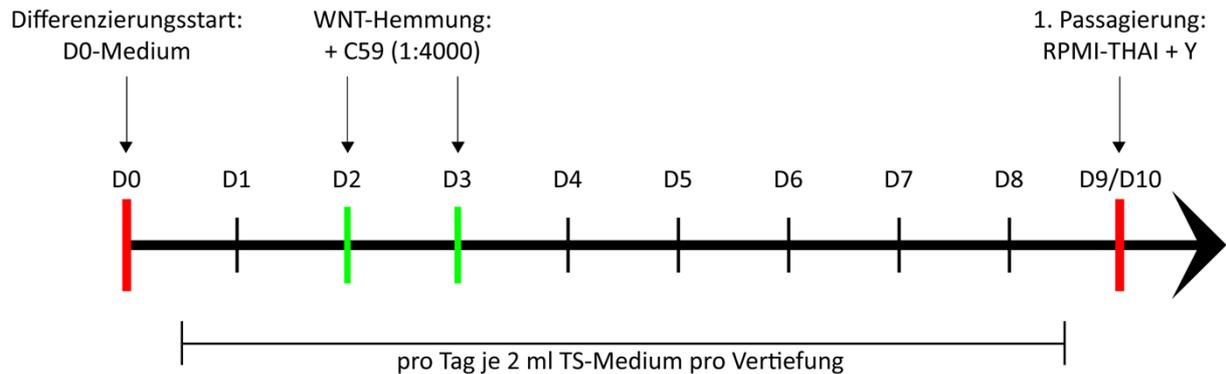


Abbildung 4: Differenzierungsprotokoll der iPS-Zellen vom Differenzierungsstart bis zur ersten Passagierung

Am Tag des Differenzierungsstarts (D0) erfolgte die Zugabe des D0-Mediums zu den iPS-Zellen. In den darauffolgenden Tagen bis zur 1. Passagierung erfolgte alle 24 Stunden ein Wechsel des Mediums mit TS-Medium. Am zweiten (D2) und dritten Tag (D3) nach dem Differenzierungsstart wurde dem TS-Medium der *small-molecule* WNT-Inhibitor Wnt-C59 zugesetzt. Die erste Passagierung der iPS-Kardiomyozyten erfolgte am neunten (D9) oder zehnten Tag (D10) nach dem Differenzierungsstart in RPMI-THAI + Y.

Matrigel®-Differenzierungslösung für 48 ml: 39,6 ml KnockOut™ DMEM (1X), 0,4 ml PSG, 8 ml Matrigel®-Lösung

CHIR 99021-Lösung: 10 mg CHIR 99021 (Tocris, Bristol, United Kingdom) gelöst in DMSO zu 1 µM

BMP-4-Lösung für 1 ml: 10 µg Bone Morphogenetic Protein 4 recombinant human (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) gelöst in 1 ml 0,1 % BSA/PBS

D0-Medium für 50 ml: 49,4 ml KnockOut™ DMEM (1X), 0,5 ml PSG, 50 µl ITS-Lösung, 50 µl Y-27632-Dihydrochlorid-Lösung, 100 µl FGF2-Lösung, 24,98 µl CHIR99021-Lösung, 5 µl BMP-4-Lösung

Natriumselenit Lagerlösung für 400 ml: 27 mg Natriumselenit, 400 ml PBS

TS (100X) für 100 ml: 1 ml Natriumselenit Lagerlösung, 55 mg Transferrin, 99 ml PBS

TS-Medium für 100 ml: 97,9 ml KnockOut™ DMEM (1X), 1 ml PSG, 1 ml TS (100X), 0,1 ml 2-Phospho-L-Ascorbinsäure Trinatriumsalz (250 µM in bidestilliertem Wasser)

TS-Medium + Wnt-C59 für 50 ml: 50 ml TS-Medium, 12,5 µl WNT-C59-Lösung

3.3.2. Passagierung der iPS-Kardiomyozyten

Erste Passagierung

Die erste Passagierung wurde am neunten oder zehnten Tag nach dem Differenzierungsstart durchgeführt.

Es wurden nur diejenigen Vertiefungen der 24er-Multilochplatten komplett genutzt, bei denen die iPS-Kardiomyozyten über die gesamte Fläche der Vertiefung kontrahierten. Nicht kontrahierende Bereiche innerhalb einer Vertiefung wurden unter der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank unter mikroskopischer Kontrolle (Zeiss Stemi 305 Compact Greenough Stereo Microscope, Zeiss, Oberkochen, Germany) mit Hilfe einer Kanüle entfernt und durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Übertragung der Bilder erfolgte von dem Mikroskop auf ein gekoppeltes iPad (Apple Inc., Cupertino, California, USA).

Nach Entfernung der nicht kontrahierenden Bereiche wurden die iPS-Kardiomyozyten vorsichtig mit je 1 ml PBS pro Vertiefung gewaschen und anschließend für zehn Minuten mit je 0,75 ml der Enzymlösung 2 im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die iPS-Kardiomyozyten durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer 1 ml Eppendorf Pipette zu einer Einzelzellsuspension dissoziiert. Dann wurde die enzymatische Reaktion mit RPMI-THAI + Y in einem Verhältnis von 1:1 gestoppt und die iPS-Kardiomyozyten erneut resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Schraubröhrchen überführt und zentrifugiert (200 rpm, 2 min). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde der Zellrückstand in einem Verhältnis von 1:3,5 in RPMI-THAI + Y resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde je 1 ml pro Vertiefung einer mit Matrigel®-Differenzierungslösung beschichteten 24er-Multilochplatte ausplattiert. Um eine gleichmäßige Verteilung der iPS-Kardiomyozyten sicherzustellen, wurde die 24er-Multilochplatte nach Überführen in den Brutschrank in Form einer Acht bewegt und für 24 Stunden inkubiert.

Enzymlösung 2 für 10 ml: 10 ml TrypLE (1x), 10 µl Y-27632-Dihydrochlorid-Lösung

RPMI-THAI für 100 ml: 96,8 ml RPMI 1640 (1x), 4 µl 1-Thioglycerol, 2 ml Bio-Pure Human Serum Albumin (10 % Solution) (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel), 1 ml PSG, 100 µl ITS-Lösung, 100 µl 2-Phospho-L-Ascorbinsäure Trinatriumsalz (250 mM in bidestilliertem Wasser)

RPMI-THAI + Y für 10 ml: 10 ml RPMI-THAI, 10 µl Y-27632-Dihydrochlorid-Lösung

Nach der ersten Passagierung erfolgte nach 24 Stunden ein Wechsel des Mediums von RPMI-THAI + Y auf 2 ml erwärmtes KO-THAI (vorgewärmt, 37 °C). Im KnockOut™ DMEM befindet sich ein pH-Indikator, der bei abfallendem pH-Wert zu einer gelblichen Verfärbung des Mediums führt. Der Wechsel des Mediums erfolgte bei einer Verfärbung in den gelborangen Bereich, was einem 24- bis 48-stündigen Rhythmus entsprach (s. Abbildung 5).

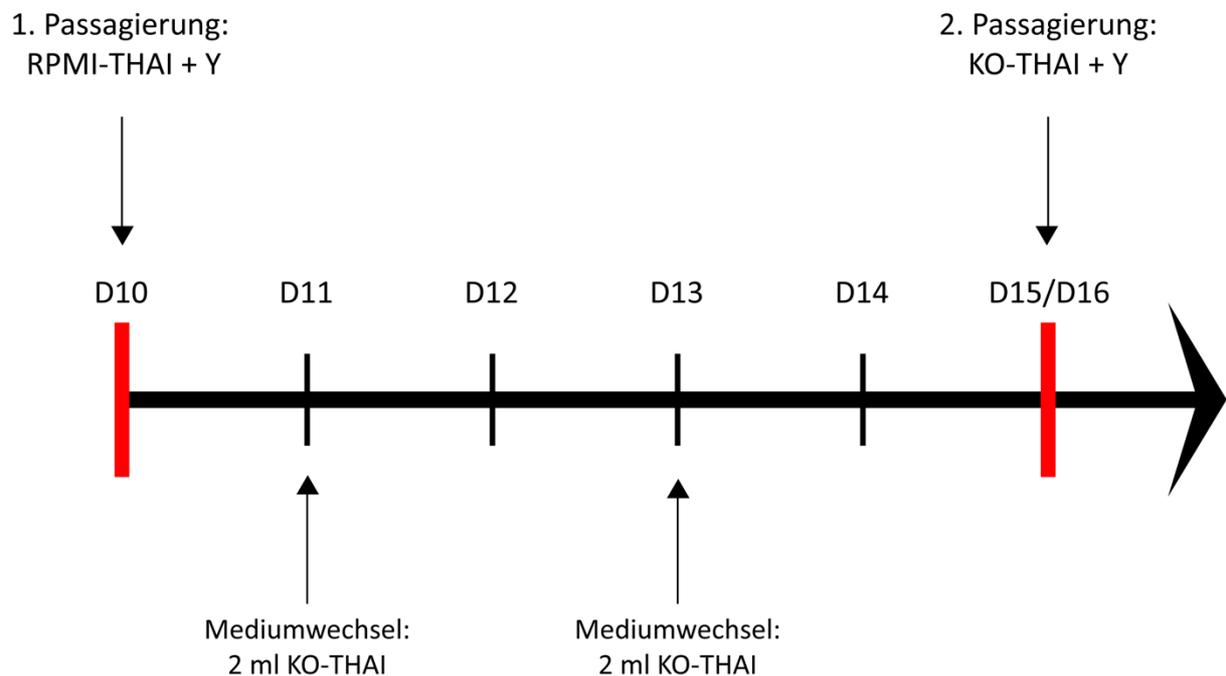


Abbildung 5: Kultivierung der iPS-Kardiomyozyten von der ersten bis zur zweiten Passagierung
Die erste Passagierung der iPS-Kardiomyozyten erfolgte am neunten (D9) oder zehnten Tag (D10) nach dem Differenzierungsstart in RPMI-THAI + Y. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Wechsel des Mediums mit KO-THAI. Anschließend wurde alle 24 bis 48 Stunden das Medium der iPS-Kardiomyozyten gewechselt. Die zweite Passagierung erfolgte mit KO-THAI + Y.

KO-THAI für 100 ml: 96,8 ml KnockOut™ DMEM (1X), 4 µl 1-Thioglycerol, 2 ml Bio-Pure Human Serum Albumin (10 % Solution) (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel), 1 ml PSG, 100 µl ITS-Lösung, 100 µl 2-Phospho-L-Ascorbinsäure Trinatriumsalz (250 mM in bidestilliertem Wasser)

Zweite Passagierung

Die weiteren Passagierungen erfolgten analog zu der ersten Passagierung. Anstelle des für die erste Passagierung verwendeten Mediums (RPMI-THAI + Y) wurde für die weiteren Passagierungen KO-THAI + Y verwendet. Die enzymatische Dissoziation der iPS-Kardiomyozyten erfolgte mit 1 ml der Enzymlösung 3 pro Vertiefung. Da mit dem Alter der Kardiomyozyten ihre Proliferationsfähigkeit abnimmt, erfolgte die zweite Passagierung im Verhältnis 1:1,5.

KO-THAI + Y für 10 ml: 10 ml KO-THAI, 10 µl Y-27632-Dihydrochlorid-Lösung

Enzymlösung 3 für 10 ml: 10 ml TrypLE (10x), 10 µl Y-27632-Dihydrochlorid-Lösung

3.3.2.1. Passagierung der iPS-Kardiomyozyten auf Deckgläschen

Für die anschließende Calciumtransienten-Messung der iPS-Kardiomyozyten (s. Kapitel 3.4) war es erforderlich, sie bei der letzten Passagierung vor dem entsprechenden Messtag auf ein mit Matrigel®-Differenzierungslösung beschichtetes Deckgläschen umzuplattieren.

Hierfür wurden autoklavierte und anschließend in Ethanol (70 %) gelagerte Deckgläschen (Durchmesser 24 mm) nach zweimaligem Waschen mit PBS in noch unbeschichtete 6er-Multilochplatten gelegt. Nachfolgend wurden die Multilochplatten inklusive der Deckgläschen nach bereits zuvor erwähntem Protokoll (s. Kapitel 3.2.1) mit Matrigel®-Differenzierungslösung beschichtet.

Die Passagierung auf Deckgläschen wurde analog zu den Passagierungen auf die Vertiefungen der 24er-Multilochplatten durchgeführt (s. Kapitel 3.3.2). Die iPS-Kardiomyozyten für die Messung zwei Wochen nach dem Differenzierungsstart wurden in RPMI-THAI + Y resuspendiert und mit einer Zellkonzentration von 0,3-0,4 Mio. pro Deckgläschen ausplattiert. Für die Messung drei Wochen nach dem Differenzierungsstart erfolgte die Resuspension in KO-THAI + Y und die iPS-Kardiomyozyten wurden mit einer Zellkonzentration von 1,0-1,8 Mio. Zellen ausplattiert. Die iPS-Kardiomyozyten für die Messung fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart wurden bei der ersten Passagierung an Tag 9/10 eingefroren und beim Auftauen direkt mit einer Zellkonzentration von 2,0 Mio. Zellen auf die Deckgläschen ausplattiert (s. Kapitel 3.3.3).

3.3.3. Kryokonservierung und Auftauen der iPS-Kardiomyozyten für die Calciumtransientenmessung fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart

Die iPS-Kardiomyozyten wurden für die Calciumtransientenmessung der fünf Wochen alten Gruppe aufgrund der verschalteten Differenzierungsstarts und Messungen nach der ersten Passagierung an Tag 9/10 eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgetaut und auf mit Matrigel®-Differenzierungslösung beschichteten 6er-Multilochplatten mit Deckgläschen ausplattiert.

Zur Vorbereitung der Kryokonservierung wurden die iPS-Kardiomyozyten mit je 1 ml PBS pro Vertiefung einer 24er-Multilochplatte gewaschen und anschließend für zehn Minuten mit je 0,75 ml Enzymlösung 2 im Brutschrank inkubiert. Danach wurden sie durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer 1 ml Eppendorf Pipette zu einer Einzelzellsuspension dissoziiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von KO-THAI + Y in einem Verhältnis von 1:1 gestoppt und die iPS-Kardiomyozyten resuspendiert. Nachfolgend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Schraubröhrchen überführt und zentrifugiert (200 rpm, 2 min). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde der Zellrückstand in einem Verhältnis von 1:1 in Gefrier-Medium resuspendiert.

Anschließend wurde das entsprechende Volumen, das etwa 2 Mio. iPS-Kardiomyozyten enthält, in je ein Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden umgehend für 24 Stunden in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter (Mr. Frosty, Nalgene®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) bei -80 °C gekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte in einem Stickstofftank.

Um die an Tag 9/10 kryokonservierten iPS-Kardiomyozyten wieder in Kultur zu bringen, wurden die Kryoröhrchen für etwa eine Minute in ein auf 37 °C erwärmtes Wasserbad überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einer 1 ml Eppendorf Pipette resuspendiert und in ein 15 ml Schraubröhrchen mit 2 ml RPMI-THAI + Y überführt. Nach der Zentrifugation (200 rpm, 2 min) dieser Zellsuspension wurde der Überstand verworfen und der Zellrückstand in 1 ml vorgewärmtem RPMI-THAI + Y resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf ein Deckgläschen in einer Vertiefung einer mit Matrigel®-Differenzierungslösung beschichteten 6er-Multilochplatte getropft, die zuvor mit 1,5 ml vorgewärmtem RPMI-THAI + Y befüllt wurde. Die Multilochplatte wurde vorsichtig in der Form einer Acht gekreist, um eine gleichmäßige Verteilung zu erhalten. Danach wurden die iPS-Kardiomyozyten im Brutschrank inkubiert.

3.4. Calciumtransientenmessung der iPS-Kardiomyozyten

3.4.1. Versuchsaufbau und Ablauf der Calciumtransientenmessung der iPS-Kardiomyozyten unter Basalbedingung

Für die Messung wurde eine von der Feinmechanik Werkstatt der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster erstellte Messkammer benutzt (s. Abbildung 6).

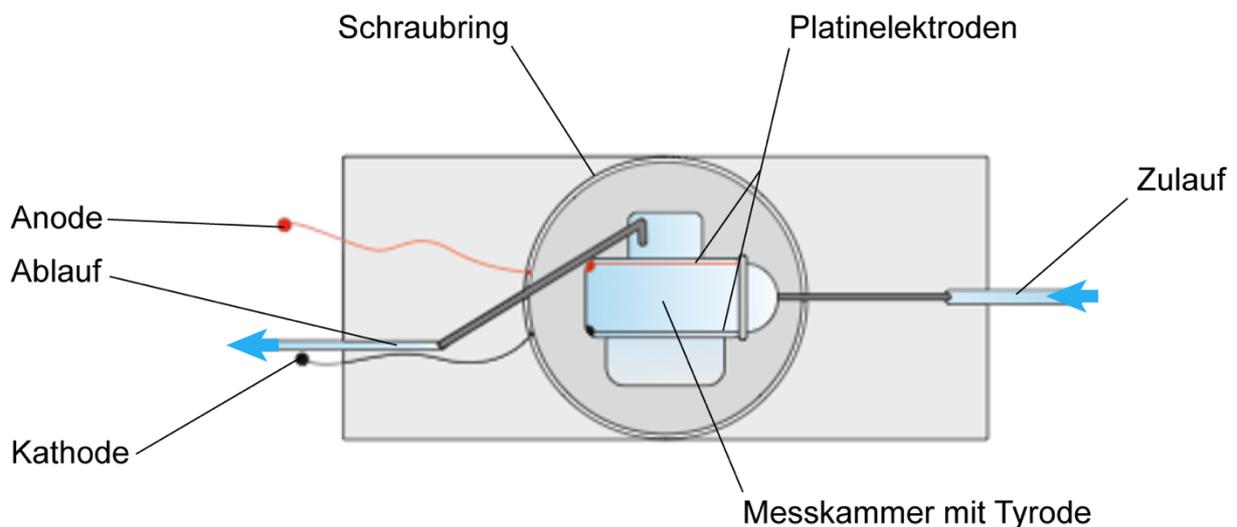


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Messkammer zur Calciumtransientenmessung

Mithilfe der abgebildeten Messkammer ist es möglich, die iPS-Kardiomyozyten mit Medium zu perfundieren und sie elektrisch zu stimulieren. Die Stimulationskabel (rot & schwarz) leiten die elektrische Stimulation vom MyoPacer EP an die Platinelektroden weiter, die an den Seiten der mit Tyrode befüllten Messkammer gelegen sind. Die blauen Pfeile stellen die Flussrichtung der Tyrode dar.

Die Messkammer bestand aus zwei Teilen, zwischen denen ein Deckgläschen eingeschraubt werden konnte. Auf den unteren Rand der Messkammer und auf den Dichtungsring des Aufsatzes wurde Baysilone-Paste mittelviskos (GE Bayer Silicones, Bolton, Großbritannien) aufgetragen, um die Dichtigkeit nach Einsetzen des Deckgläschen zu gewährleisten. Die für die Calciumtransientenmessung vorbereiteten und auf Deckgläschen wachsenden iPS-Kardiomyozyten (s. Kapitel 3.3.2.1) wurden nach Verwerfen des überstehenden Mediums zweimal mit 3 ml PBS gewaschen. Dann wurden die Deckgläschen mit Hilfe einer Pinzette entnommen und in die Messkammer eingesetzt und eingeschraubt. Nachfolgend wurde die Messkammer mit 500 μ l Indo-Verdünnung (9,2 μ M) gefüllt und die iPS-Kardiomyozyten wurden abgedunkelt für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Farbstoff Indo-1 Acetoxymethylester (Indo-1 AM) beladen. Bei Indo-1 AM handelt es sich um einen wasserlöslichen calciumsensitiven ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoff. Nach der Aufnahme

in die Zelle wird Indo-1 AM von nicht-spezifischen Esterasen hydrolysiert, sodass der Fluoreszenzfarbstoff Indo-1 freigesetzt wird, welcher nicht zellpermeabel ist.

Nach dem 20-minütigen Beladungsvorgang wurde die Messkammer auf einem inversen Mikroskop (Nikon Eclipse Ti, Nikon, Tokyo, Japan) fixiert. Es wurde ein Öl-Immersion Objektiv (CFI S Fluor 40X/1.30 Oil, Nikon, Tokyo, Japan) mit Immersionsöl (Type F Immersion liquid, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Die Aufzeichnung der Bilder erfolgte mit einem Hochgeschwindigkeitskmerasystem (MyoCam-S Highspeed Contractility Camera, IonOptix, Westwood, MA, USA). Mithilfe von Blenden am Cell Framing Adapter (IonOptix, Westwood, MA, USA) wurde ein für alle Messungen konstant großer Messbereich festgelegt. Innerhalb dieses definierten Messbereichs erfolgte jeweils die Messung eines Zellclusters.

Tyrode wurde aus einem Reservoir über den Zulauf in einem kontinuierlichen Fluss von 140 ml/h in die Messkammer geleitet. Die Flussrate wurde mit einem Tropfenzähler (Masterflow-Tropfenregler, Angiokard Medizintechnik GmbH, Friedeburg, Deutschland) eingestellt. Die Absaugung der Tyrode aus der Messkammer erfolgte mit einer peristaltischen Pumpe (Peristaltic Pump P-1, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Zunächst wurden die iPS-Kardiomyozyten für fünf Minuten mit Tyrode perfundiert. Anschließend wurden die Platinelektroden der Messkammer an einen externen elektrischen Stimulator (MyoPacer EP Cell Stimulator, IonOptix, Westwood, MA, USA) angeschlossen und die iPS-Kardiomyozyten unter fortlaufender Perfusion mit Tyrode für zehn Minuten mit einer Spannung in Höhe von 15 V, einer Reizdauer von 5 ms und einer Stimulationsfrequenz von 0,2 Hz vorstimuliert. Im Anschluss daran wurde mit der Calciumtransientenmessung begonnen (s. Abbildung 7).

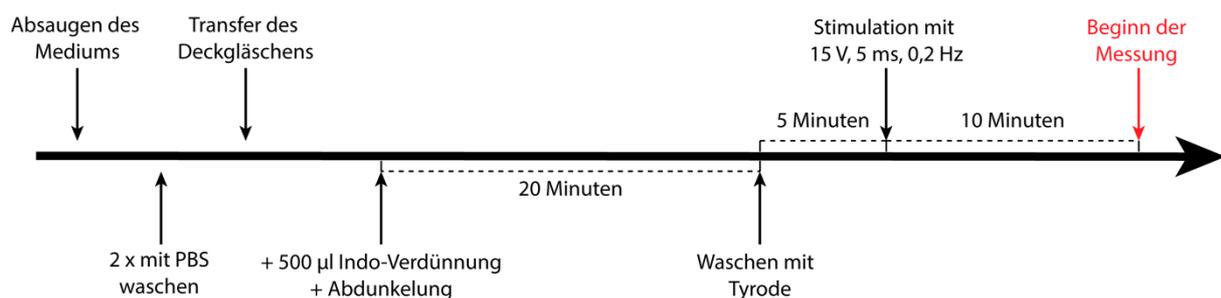


Abbildung 7: Vorbereitungen zur Calciumtransientenmessung der iPS-Kardiomyozyten

Zunächst wurde das überstehende Medium verworfen und die iPS-Kardiomyozyten wurden zweimal mit PBS gewaschen. Dann erfolgte der Transfer des Deckgläschens in die Messkammer. Nach Zugabe der Indo-Verdünnung (9,2 µM) wurden die iPS-Kardiomyozyten für 20 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur mit dem Farbstoff Indo-1 AM beladen. Anschließend wurden die iPS-Kardiomyozyten in der Messkammer fünf Minuten mit Tyrode perfundiert. Danach wurde die Perfusion weiter fortgeführt und die iPS-Kardiomyozyten zusätzlich für zehn Minuten vorstimuliert (15 V, 5 ms, 0,2 Hz). Direkt im Anschluss erfolgte die Calciumtransientenmessung.

Das Prinzip der Calciumtransientenmessung beruht auf dem Umstand, dass Indo-1 im Komplex mit Calciumionen (405 nm) nach Anregung durch UV-Licht ein verschobenes Emissionsmaximum verglichen mit freiem Indo-1 (485 nm) aufweist (Grynkiewicz et al. 1985). Das Verhältnis der beiden Emissionsmaxima zueinander gilt als Maß für die relative intrazelluläre Calciumkonzentration (Grynkiewicz et al. 1985). Der durch die elektrische Stimulation ausgelöste Anstieg und Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration wird als Calciumtransient bezeichnet (Kong et al. 2010).

Die Anregung mit UV-Licht erfolgte mit einer UV-Lichtquelle (Uvico-UV, Rapp OptoElectronic, Wedel, Deutschland). Die Eingrenzung des emittierten UV-Spektrums erfolgte durch Bandpassfilter auf eine Wellenlänge von 340 ± 13 nm. Zusätzlich wurde die Intensität des UV-Lichts durch die Zwischenschaltung eines ND4-Filters reduziert.

Die Detektion von Licht der Wellenlänge 485 nm (freies Indo-1) sowie der Wellenlänge 405 nm (komplexiertes Indo-1) erfolgte mit zwei Photomultipliern (Photon Counting Head H7360-02, Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan). Die aufgezeichneten Signale wurden mit den elektrischen Signalen des externen elektrischen Stimulators durch das Fluorescence System Interface (IonOptix, Westwood, MA, USA) synchronisiert.

Pro Differenzierung wurden die Calciumtransienten der iPS-Kardiomyozyten von ein bis drei technischen Replikaten (Deckgläschen) gemessen. Auf jedem Deckgläschen wurden mindestens elf Zellcluster gemessen, von denen jeweils mindestens zwölf Calciumtransienten aufgezeichnet wurden. Voraussetzung für die Messung waren elektrisch stimulierbare, rhythmisch kontrahierende iPS-Kardiomyozyten. Von der Messung ausgeschlossen wurden Zellcluster von iPS-Kardiomyozyten, die nicht elektrisch stimulierbar waren oder arrhythmisch kontrahierten.

Tyrode-Stammlösung (5X) für 500 ml: 20,45 g Natriumchlorid (NaCl), 1,08 g Kaliumchlorid (KCl), 0,17 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), 0,18 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,909 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 5,95 g 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) (1 M). Es erfolgte die Lösung in bidestilliertem Wasser zu 500 ml.

Tyrode für 250 ml: 50 ml Ca^{2+} -freie Tyrode (5X), 500 mg Glucose, 500 μl Calciumchlorid (CaCl_2 , 1 M). Die Lösung wurde mit bidestilliertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit Natronlauge (NaOH) auf 7,3 eingestellt.

Indo-Lösung (1 mM) für 0,99 ml: 1 mg Indo-1 AM (life technologies™, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR USA), 990 μl DMSO

Pluronic-Lösung für 0,4 ml: 100 mg Pluronic® F-127 (molecular probes®, life technologies™, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, USA), 400 µl DMSO. Die Lösung wurde auf 95 °C erhitzt, bei Raumtemperatur gelagert und vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt.

Lagerlösung für 500 ml: 1,53 g Natriumchlorid (NaCl), 0,179 g Kaliumchlorid (KCl), 0,082 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄), 0,148 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO₄·7H₂O), 1,09 g Glucose, 24,8 g Saccharose, 0,0147 g Calciumchlorid (CaCl₂·2H₂O), 1,192 g HEPES (1 M). Es erfolgte die Lösung in bidestilliertem Wasser zu 500 ml. Der pH-Wert wurde mit Natronlauge (NaOH) auf 7,3 eingestellt.

Indo-Mix (45,9 µM) für 136,25 µl: 6,25 µl Indo-Lösung, 5 µl Pluronic-Lösung, 125 µl Lagerlösung

Indo-Verdünnung (9,2 µM) für 0,5 ml: 100 µl Indo-Mix, 400 µl Tyrode

3.4.2. Ablauf der Calciumtransientenmessung der iPS-Kardiomyozyten unter β -adrenerger Stimulation

Nach Messung der Calciumtransienten unter Basalbedingung erfolgte im direkten Anschluss eine Messung von Calciumtransienten unter β -adrenerger Stimulation mit dem unselektiven β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin. Dieser führt durch Bindung an β_1 -Adrenozeptoren zu einer cAMP-abhängigen Aktivierung der PKA (s. Kapitel 1.3.2).

Die iPS-Kardiomyozyten wurden für zehn Minuten mit kurz vor Gebrauch angesetzter Isoprenalin-Lösung (10^{-6} M) perfundiert, sodass sichergestellt war, dass die in der Messkammer vorhandene Tyrode vollständig durch die Isoprenalin-Lösung ersetzt wurde. Für die Dauer der Messung wurde die Perfusion mit der Isoprenalin-Lösung beibehalten.

Anschließend wurden erneut Zellcluster eines Messbereichs definierter Größe eingestellt und gemessen. Pro Differenzierung wurden die Calciumtransienten der iPS-Kardiomyozyten von ein bis drei technischen Replikaten (Deckgläschen) gemessen. Pro Messdurchlauf und Deckgläschen wurden mindestens elf Zellcluster gemessen, von denen jeweils mindestens zwölf Calciumtransienten aufgezeichnet wurden. Zum Einschluss von Zellclustern galten dieselben Voraussetzungen wie für die Messung unter Basalbedingung (s. Kapitel 3.4.1).

Isoprenalin-Stammlösung (10^{-2} M) für 10 ml: 24,7 mg Isoprenalinhydrochlorid, 40 µl HCl (1 N). Es erfolgte die Lösung in bidestilliertem Wasser zu 10 ml.

Isoprenalin-Lösung (10^{-6} M) für 50 ml: 5 μ l Isoprenalin-Stammlösung (10^{-2} M), 50 ml Tyrode

3.5. Calciumtransientenmessung muriner ventrikulärer Kardiomyozyten

Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurde der Versuchsaufbau sowie das Messprotokoll der iPS-Kardiomyozyten (s. Kapitel 3.4) bis auf geringfügige Änderungen weitestgehend übernommen. Dennoch mussten geringfügige Änderungen vorgenommen werden (s. Abbildung 8).

Direkt nach der Isolation wurden 100 μ l der murine ventrikuläre Kardiomyozyten enthaltenden Zellsuspension für 20 Minuten mit 25 μ l Indo-Mix (45,9 μ M) in einem 1,5-ml Eppendorf-Reaktionsgefäß abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Indo-1 Konzentration in der resultierenden Suspension entsprach mit 9,2 μ M der verwendeten Konzentration für die Messung der iPS-Kardiomyozyten. Während der Inkubation der murinen ventrikulären Kardiomyozyten wurde die bereits zusammengeschraubte und mit einem Deckgläschen bestückte Messkammer zum Spülen mit Tyrode perfundiert.

Dann wurde der Zulauf der Messkammer geschlossen und 125 μ l der Kardiomyozyten-Indo-Suspension wurden in die Messkammer pipettiert. Nach fünf Minuten, in denen sich die murinen ventrikulären Kardiomyozyten absetzten, schloss sich eine fünfminütige Perfusion mit Tyrode bei einem Fluss von 140 ml/h an.

Anschließend wurden die murinen ventrikulären Kardiomyozyten wie auch die iPS-Kardiomyozyten mit dem MyoPacer EP für zehn Minuten mit einer Spannung in Höhe von 15 V, einer Reizdauer von 5 ms und einer Stimulationsfrequenz von 0,2 Hz vorstimuliert. Im Anschluss daran wurde mit der Messung begonnen.

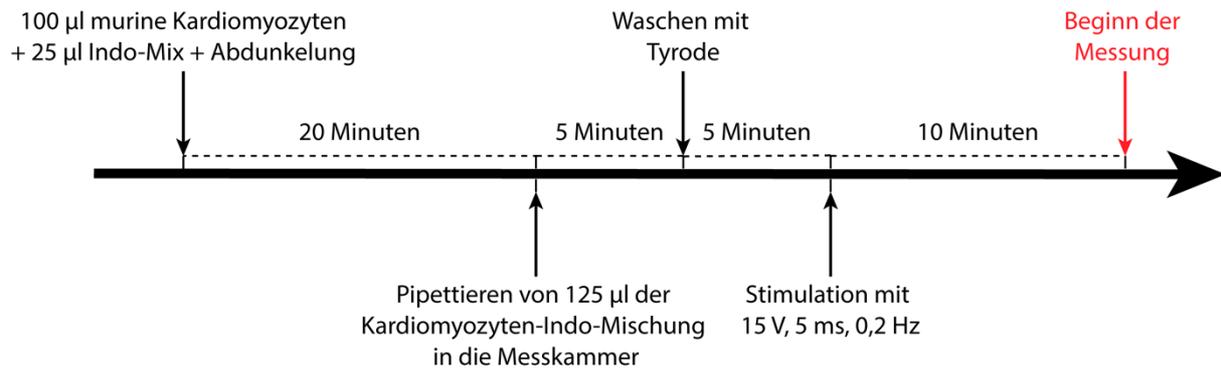


Abbildung 8: Vorbereitung der Calciumtransientenmessung der murinen ventrikulären Kardiomyozyten

Zunächst wurden 100 µl der murine ventrikuläre Kardiomyozyten enthaltenden Zellsuspension mit 25 µl Indo-Mix (45,9 µM) für 20 Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 125 µl der mit dem Farbstoff Indo-1 AM beladenen Kardiomyozyten in die Messkammer pipettiert. Nach fünf Minuten haben sich die Kardiomyozyten abgesetzt und die Messkammer wurde für weitere fünf Minuten mit Tyrode perfundiert. Danach wurden die murinen ventrikulären Kardiomyozyten für zehn Minuten elektrisch vorstimuliert. Anschließend wurde mit der Calciumtransientenmessung begonnen.

Der Ablauf der Messung und die verwendeten Geräte und Programme waren identisch zu den Messungen der iPS-Kardiomyozyten. Im Unterschied zu den Messungen der iPS-Kardiomyozyten erfolgten bei den murinen ventrikulären Kardiomyozyten Einzelzellmessungen.

Anschließend wurden die murinen ventrikulären Kardiomyozyten nach Messung der Calciumtransienten unter Basalbedingung analog zu den iPS-Kardiomyozyten mit kurz vor Gebrauch angesetzter Isoprenalin-Lösung (10^{-6} M) perfundiert. Die Messung wurde begonnen, wenn die Amplitude der Calciumtransienten ein Gleichgewicht erreicht hat und nicht weiter anstieg. Dieses Gleichgewicht trat nach etwa sechs- bis achtminütiger Perfusion mit Isoprenalin ein. Pro Isolation ($n = 7$) wurden von mindestens elf murinen ventrikulären Kardiomyozyten jeweils mindestens zwölf Calciumtransienten gemessen. Arrhythmisch kontrahierende Zellen wurden von der Messung ausgeschlossen.

3.6. Auswertung

3.6.1. Analyse der Calciumtransienten mittels IonWizard

Die Auswertung erfolgte mit IonWizard (IonOptix, Version 6.4 revision 1).

Nur durch externe elektrische Stimulation ausgelöste Calciumtransienten wurden in die Auswertung eingeschlossen.

Ausgeschlossen wurden Zellcluster, die nicht durchgängig auf die elektrische Stimulation reagierten. Selten zeigten einige iPS-Kardiomyozyten eine schnellere Spontanfrequenz als durch die elektrische Stimulation (0,2 Hz) vorgegeben war, sodass sie ebenfalls von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Calciumtransienten mit irregulärer Konformation wurden auch ausgeschlossen.

Von den ausgewählten Zellclustern wurden mindestens zehn Calciumtransienten ausgewählt, die mit der Software zu einem Durchschnittstransienten gemittelt wurden. Von diesem Durchschnittstransienten wurden die Parameter *baseline* (bl), *peak height* (peak h), *departure velocity* (dep v) und *return velocity* (ret v) bestimmt (s. Abbildung 9).

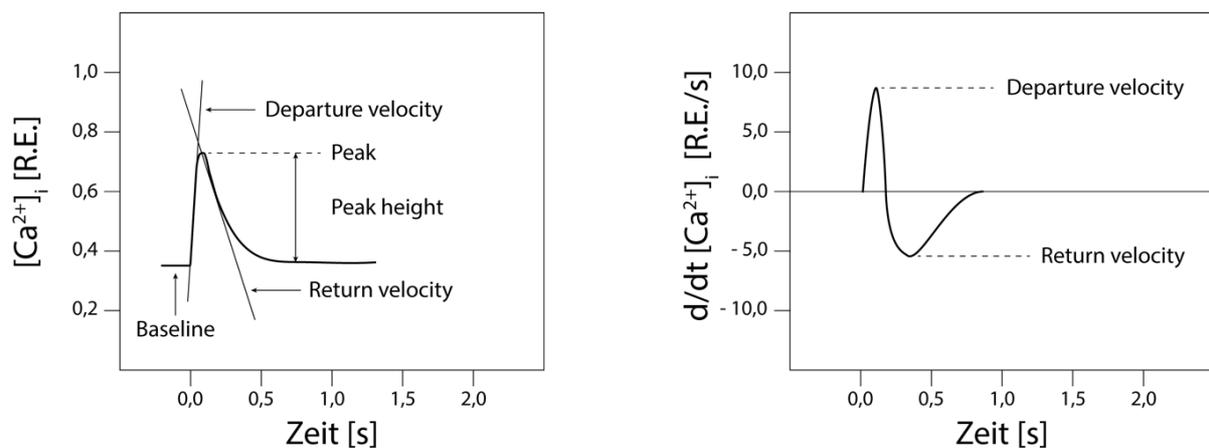


Abbildung 9: Ausgewählte Parameter der Calciumtransienten-Analyse (modifiziert nach IonOptix)

Grafische Darstellung der ausgewählten Parameter zur Calciumtransienten-Analyse. Die *Baseline* entspricht der diastolischen intrazellulären Calciumkonzentration. *Peak* beschreibt die systolische intrazelluläre Calciumkonzentration. *Peak height* stellt die Differenz der diastolischen von der systolischen intrazellulären Calciumkonzentration dar und entspricht somit der intrazellulären Calciumtransientenamplitude. Die *Departure velocity* ist die Steigung der Tangente an dem Punkt der maximalen Zunahme des Calciumtransienten (links), also das Maximum der ersten Ableitung des Calciumtransienten nach der Zeit (rechts). Die *Departure velocity* entspricht somit der maximalen Geschwindigkeit des Anstiegs des intrazellulären Calciumtransienten. Die *Return velocity* ist die Steigung der Tangente an dem Punkt der maximalen Abnahme des Calciumtransienten (links), also das Minimum der ersten Ableitung des Calciumtransienten nach der Zeit (rechts). Die *Return velocity* entspricht somit der maximalen Geschwindigkeit des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten.

Links: Zeit in Sekunden auf der Abszisse, intrazelluläre Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in relativen Einheiten (R.E.) auf der Ordinate

Rechts: Zeit in Sekunden auf der Abszisse, Geschwindigkeit der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration ($d/dt [Ca^{2+}]_i$) in relativen Einheiten pro Sekunde (R.E./s) auf der Ordinate

3.6.2. Statistische Analyse

Die mit IonWizard bestimmten Parameter (*baseline*, *peak height*, *departure velocity* und *return velocity*) wurden mit dem Programm OriginPro (OriginLab Corporation, Version 8.1.88.89) statistisch ausgewertet und grafisch in Form von Boxplots dargestellt (s. Abbildung 10).

Die Boxplots zeigen die zehnte und 90. Perzentile (Whiskers), die 25. und 75. Perzentile (untere und obere Kante der Box) und den Median (horizontale Linie innerhalb der Box). Der Mittelwert entspricht dem Punkt innerhalb der Box. Die ermittelten Einzelwerte (*baseline*, *peak height*, *departure velocity* und *return velocity*) der untersuchten iPS-Kardiomyozyten bzw. der murinen ventrikulären Kardiomyozyten sind in Form einer Punktwolke links neben dem Boxplot dargestellt.

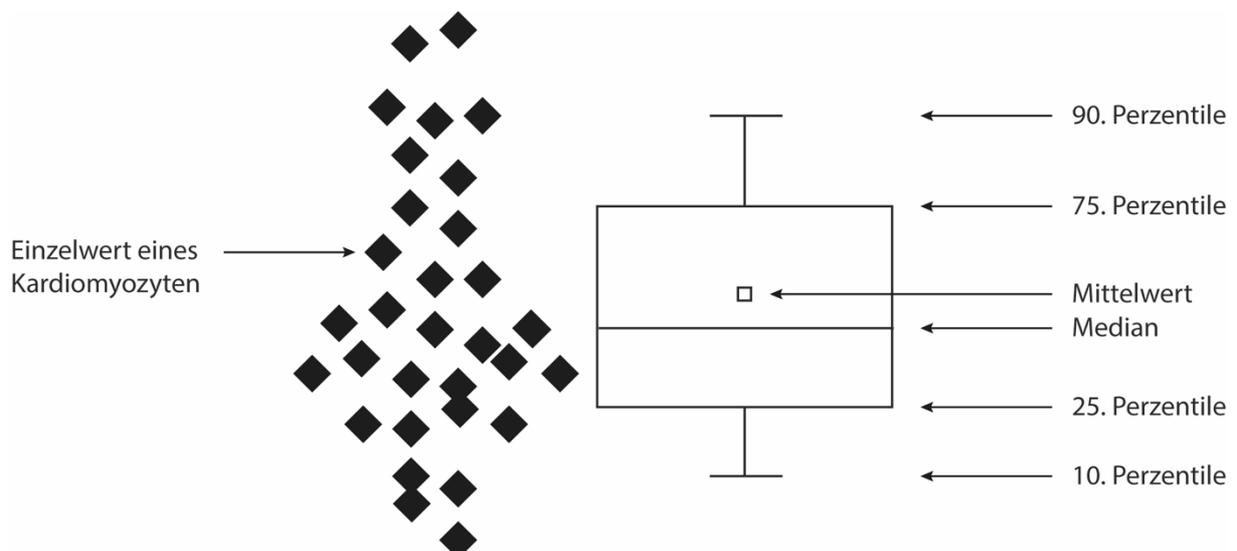


Abbildung 10: Beispielhafter Boxplot zur grafischen Darstellung der Ergebnisse

Zur statistischen Analyse zweier Gruppen (z.B. basal vs. Isoprenalin) wurde ein Mann-Whitney-Rangsummentest durchgeführt. Ein Unterschied in diesen Gruppen galt als signifikant, wenn der Signifikanzwert kleiner als 0,05 ($p < 0,05$) war.

Der statistische Zusammenhang zwischen der Zellkonzentration der iPS-Kardiomyozyten und der Veränderung der Parameter der Calciumtransientenkinetik wurde mit Hilfe einer Mehrebenenanalyse mit dem Programm IBM SPSS Statistics (IBM Corporation, Version 27.0.0.0) ermittelt. Der errechnete Korrelationskoeffizient r beschreibt die Stärke des statistischen Zusammenhangs. Die Signifikanz des Zusammenhangs wurde mit einem t-Test ermittelt. Der statistische Zusammenhang galt als signifikant, wenn der Signifikanzwert kleiner als 0,05 ($p < 0,05$) war.

4. ERGEBNISSE

Es wurden iPS-Kardiomyozyten dreier verschiedener Altersgruppen (zwei, drei und fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart) hinsichtlich ihrer Calciumtransientenkinetik untersucht. Die Calciumtransientenmessung erfolgte ratiometrisch mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indo-1 AM unter zwei verschiedenen Messbedingungen. Zum einen wurde die Messung unter Perfusion mit Tyrode (Basalbedingung) durchgeführt (s. Kapitel 3.4.1). Zum anderen erfolgte die Messung unter Stimulation mit dem unselektiven β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin (s. Kapitel 3.4.2).

4.1. Charakterisierung der Calciumtransienten von iPS-Kardiomyozyten zwei Wochen nach dem Differenzierungsstart

In der jüngsten Altersgruppe (zwei Wochen bzw. Tag 14-15 nach dem Differenzierungsstart) wurden iPS-Kardiomyozyten aus fünf unabhängigen Differenzierungen hinsichtlich ihrer Calciumtransientenkinetik untersucht. Pro Differenzierung wurden dabei ein bis fünf biologische Replikate gemessen, sodass insgesamt 18 Messungen sowohl unter Basalbedingung als auch unter β -adrenerger Stimulation erfolgten.

In 83 % der Messungen (15 von 18 Messungen) konnten Zellcluster von iPS-Kardiomyozyten beobachtet werden, die auf der einen Seite zwar spontane Calciumtransienten zeigten, auf der anderen Seite allerdings nicht auf die externe elektrische Feldstimulation reagierten. Sie kontrahierten in ihrer Eigenfrequenz, welche deutlich unterhalb der vorgegebenen Stimulationsfrequenz von 0,2 Hz lag (s. Abbildung 11 C). In den übrigen 17 % der Messungen (3 von 18 Messungen) ließen sich weder spontane noch stimulierte Calciumtransienten aufzeichnen.

Von den 83 % der Messungen, in denen spontane Calciumtransienten von Zellclustern der iPS-Kardiomyozyten aufgezeichnet werden konnten, waren nur in 60 % (9 von 15 Messungen) Kontraktionen mikroskopisch sichtbar.

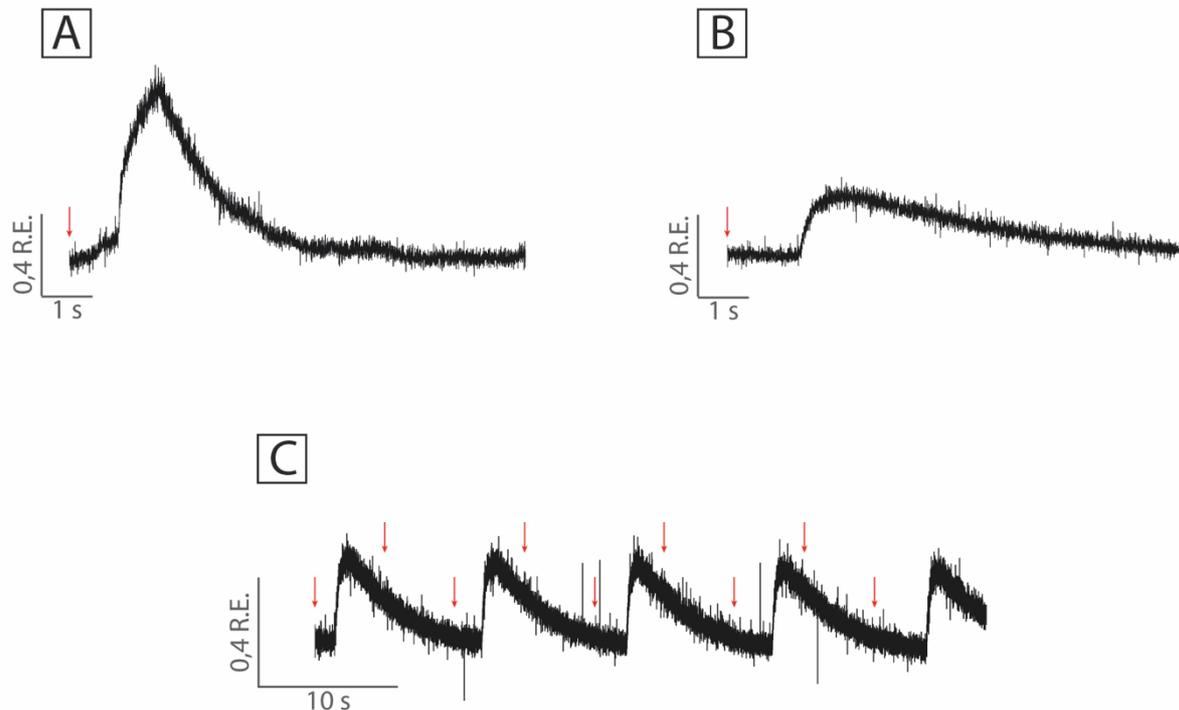


Abbildung 11: Repräsentative Beispiele für Calciumtransienten von Indo-1 AM beladenen iPS-Kardiomyozyten zwei Wochen nach dem Differenzierungsstart

Die Abszisse stellt die Zeit in Sekunden und die Ordinate die Fluoreszenz-Ratio ($F_{405 \text{ nm}}/F_{485 \text{ nm}}$) dar. Abbildung A und B stellen beispielhaft die Calciumtransienten zweier Cluster der iPS-Kardiomyozyten zwei Wochen nach dem Differenzierungsstart aus verschiedenen Differenzierungen dar. Die elektrische Stimulation (rote Pfeile) erfolgte mit einer Spannung in Höhe von 15 V, bei einer Reizdauer von 5 ms und einer Stimulationsfrequenz von 0,2 Hz. Abbildung C zeigt die Abfolge mehrerer Calciumtransienten eines iPS-Kardiomyozytenclusters. Es wird deutlich, dass eine erhebliche Variabilität bezüglich der Calciumtransienten innerhalb der unabhängigen Differenzierungen vorliegt. Außerdem reagierten die iPS-Kardiomyozyten zwei Wochen nach dem Differenzierungsstart nicht auf die externe elektrische Stimulation.

Da die iPS-Kardiomyozyten nicht auf die externe elektrische Stimulation des MyoPacers reagierten, wurde auf eine Messung unter β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin verzichtet. Ebenso wurde keine Auswertung mit IonOptix durchgeführt, da keine Vergleichbarkeit mit den stimulierten Calciumtransienten der iPS-Kardiomyozyten drei und fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart gegeben gewesen wäre.

4.2. Charakterisierung der Calciumtransienten von iPS-Kardiomyozyten drei Wochen nach dem Differenzierungsstart

In der mittleren Altersgruppe (drei Wochen bzw. Tag 21 nach dem Differenzierungsstart) erfolgte die Untersuchung von vier unabhängigen Differenzierungen der iPS-Kardiomyozyten

hinsichtlich ihrer Calciumtransientenkinetik. Von jeder Differenzierung wurden ein bis drei biologische Replikate gemessen. In der Gesamtheit waren es somit zehn Messungen unter Basalbedingung sowie unter β -adrenerger Stimulation.

Auf die externe elektrische Feldstimulation reagierten die untersuchten iPS-Kardiomyozytencluster unter beiden Messbedingungen mit synchronisierten Calciumtransienten sowie mit Kontraktionen in der vorgegebenen Frequenz (0,2 Hz).

Die β -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin nahm Einfluss auf die Calciumtransientenkinetik der iPS-Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe. So erhöhte sich die diastolische intrazelluläre Calciumkonzentration um 11 % im Vergleich zur Messung unter Basalbedingung (s. Abbildung 12, B Median \pm SE (Median) in R.E., Basal: $0,68\pm 0,01$, Isoprenalin: $0,75\pm 0,02$). Die intrazelluläre Calciumtransientenamplitude stieg unter β -adrenerger Stimulation um 38 % gegenüber der Messung unter Basalbedingung an (s. Abbildung 12, C Median \pm SE (Median) in R.E., Basal: $0,35\pm 0,02$, Isoprenalin: $0,48\pm 0,02$). Außerdem nahm die maximale Geschwindigkeit des Anstiegs des intrazellulären Calciumtransienten unter β -adrenerger Stimulation um 49 % im Vergleich zur Messung unter Basalbedingung zu (s. Abbildung 12, D Median \pm SE (Median) in R.E./s, Basal: $8,91\pm 0,64$, Isoprenalin: $13,29\pm 0,86$). Ebenso kam es unter β -adrenerger Stimulation zu einer Zunahme der maximalen Geschwindigkeit des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten um 39 % verglichen mit der Messung unter Basalbedingung (s. Abbildung 12, E Median \pm SE (Median) in R.E./s, Basal: $-0,33\pm 0,02$, Isoprenalin: $-0,46\pm 0,03$). Eine Zunahme der maximalen Geschwindigkeit des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten entspricht einem negativeren Wert, da es sich bei diesem Wert um die Abnahme der Calciumkonzentration pro Zeiteinheit handelt.

Die β -adrenerge Stimulation führte bei den iPS-Kardiomyozytenclustern der mittleren Altersgruppe somit zu einer Zunahme sowohl der diastolischen intrazellulären Calciumkonzentration als auch der intrazellulären Calciumtransientenamplitude. Ebenso kam es zu einer Steigerung der maximalen Geschwindigkeit des Calciumflusses in der Kontraktions- wie auch in der Relaxationsphase.

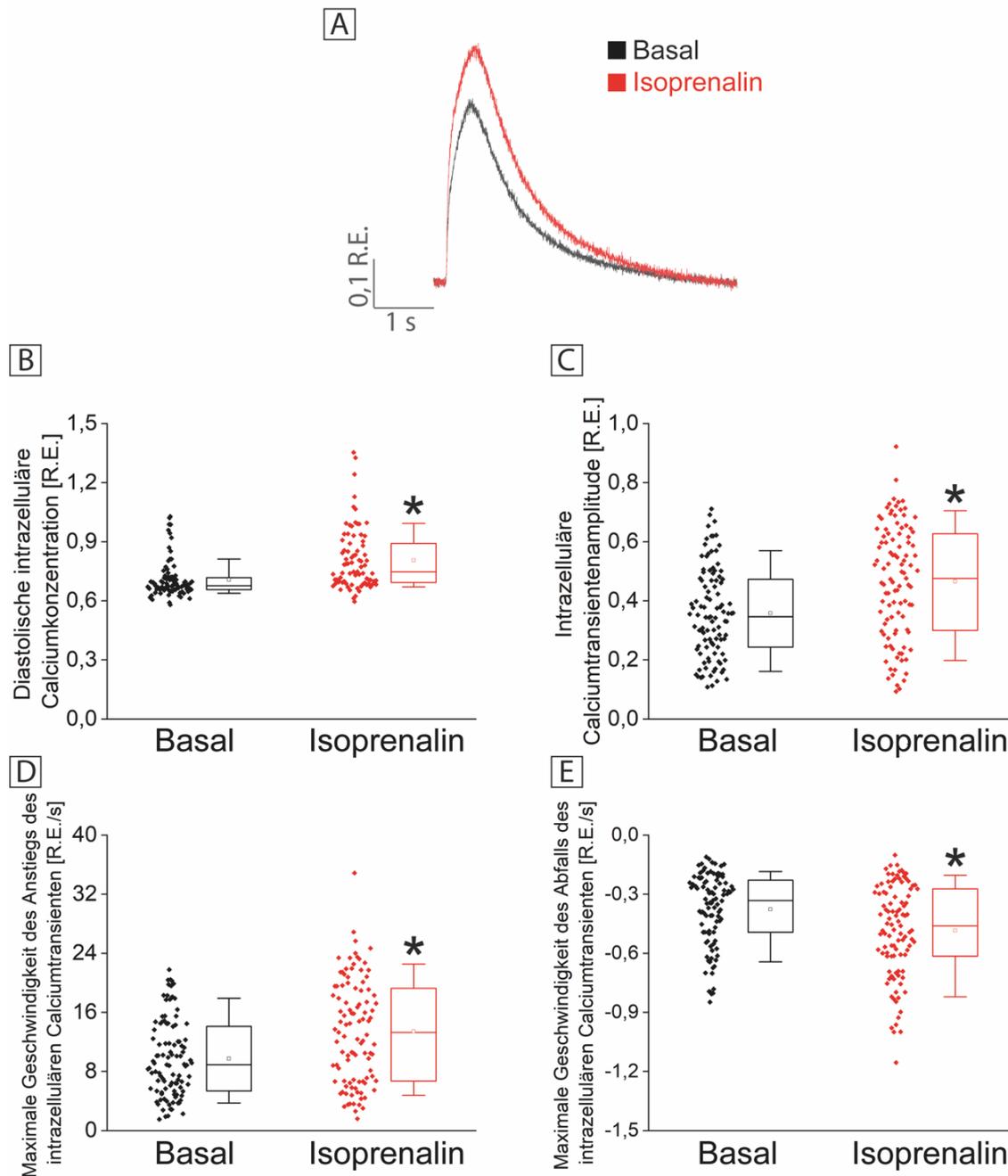


Abbildung 12: Ergebnisse der Calciumtransientenanalyse der iPS-Kardiomyozyten drei Wochen nach dem Differenzierungsstart

Fluoreszenzmikroskopisch wurde die Kinetik der Calciumtransienten elektrisch stimulierter und mit Indo-1 AM beladener iPS-Kardiomyozyten drei Wochen nach dem Differenzierungsstart untersucht. Die Calciumtransientenmessung erfolgte unter Basalbedingung (schwarz) sowie nach Perfusion mit Isoprenalin (rot). Abbildung A zeigt ein repräsentatives Beispiel eines Calciumtransienten unter Basalbedingung sowie nach Perfusion mit Isoprenalin. Die ermittelten Parameter der Transientenkinetik sind die diastolische intrazelluläre Calciumkonzentration (B), die intrazelluläre Calciumtransientenamplitude (C) und die maximale Geschwindigkeit des Anstiegs (D) sowie des Abfalls (E) des intrazellulären Calciumtransienten. Unter Perfusion mit Isoprenalin zeigte sich eine Zunahme der zuvor genannten Parameter. (Anzahl der gemessenen Zellcluster/Deckgläschen/unabhängigen Differenzierungen: 103/10/4 (C,D,E), 92/10/4 (B, Basal), 83/10/4 (B, Isoprenalin); * $p < 0,05$ vs. basal, Mann-Whitney-Rangsummentest)

4.2.1. Einfluss der Zellkonzentration der iPS-Kardiomyozyten auf die Calciumtransientenkinetik

Zur Bestimmung des Einflusses der Zellkonzentration der iPS-Kardiomyozyten auf die Calciumtransientenkinetik drei Wochen nach dem Differenzierungsstart wurden die iPS-Kardiomyozyten an Tag 15 bzw. 16 mit einer definierten Zellkonzentration von 1,0 Mio. bis 1,8 Mio. ($0,113 \text{ Mio./cm}^2$ bis $0,203 \text{ Mio./cm}^2$) auf mit Matrigel®-Differenzierungslösung beschichtete Deckgläschen umplattiert (s. Kapitel 3.3.2.1). Diese Deckgläschen befanden sich in den Vertiefungen einer 6er-Multilochplatte. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer genutzt, sodass die iPS-Kardiomyozyten in einer definierten Zellkonzentration ausplattiert werden konnten.

Um den Einfluss der Zellkonzentration auf die Kinetik der intrazellulären Calciumtransienten zu ermitteln, wurden die ermittelten Parameter abhängig von der Zellkonzentration separat ausgewertet und anschließend miteinander verglichen (s. Abbildung 13).

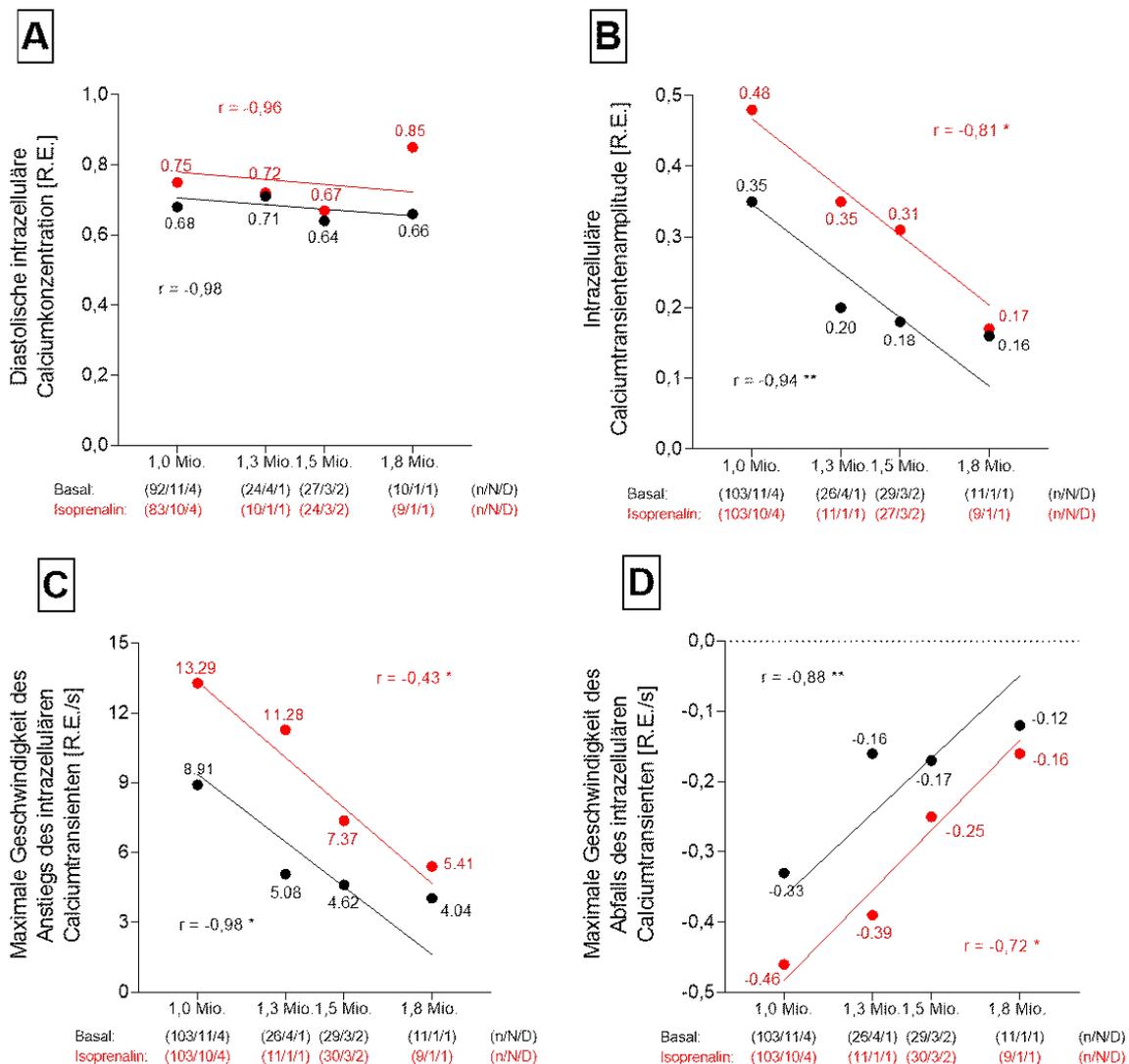


Abbildung 13: Einfluss der Zellkonzentration der iPS-Kardiomyozyten auf die Calciumtransientenkinetik

Fluoreszenzmikroskopisch wurde die Kinetik der Calciumtransienten elektrisch stimulierter und mit Indo-1 AM beladener iPS-Kardiomyozyten zwei Wochen nach dem Differenzierungsstart untersucht. Die Calciumtransientenmessung erfolgte unter Basalbedingung (schwarz) sowie nach Perfusion mit Isoprenalin (rot). Die iPS-Kardiomyozyten wurden bei der ersten Passagierung in Zellkonzentrationen von 1,0 Mio. bis 1,8 Mio. pro Vertiefung einer 6er-Multilochplatte ausplattiert. Die ermittelten Parameter der Transientenkinetik (diastolische intrazelluläre Calciumkonzentration (A), intrazelluläre Calciumtransientenamplitude (B) und maximale Geschwindigkeit des Anstiegs (C) sowie des Abfalls (D) des intrazellulären Calciumtransienten) wurden entsprechend der Zellkonzentration einzeln aufgetragen. Es wurde eine Regressionsgerade sowie der entsprechende Korrelationskoeffizient (r) ermittelt. Die iPS-Kardiomyozyten, die mit einer Zellkonzentration von 1 Mio. ausplattiert wurden, zeigten sowohl basal als auch unter β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin den schnellsten Anstieg und Abfall des intrazellulären Calciumtransienten, sowie die größte intrazelluläre Calciumtransientenamplitude. Mit steigender Zellkonzentration kam es zu einer Abnahme der vier ermittelten Parameter. (n/N/D = Anzahl der gemessenen Zellcluster/Deckgläschen/unabhängigen Differenzierungen; * $p < 0,05$ bzw. ** $p < 0,01$ für $r \neq 0$)

Die Höhe der diastolischen intrazellulären Calciumkonzentration war unter Basalbedingung bei allen verwendeten Zellkonzentrationen tendenziell konstant (s. Abbildung 13, A, $r = -0,98$, $p = 0,31$). Auch unter β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin war der Einfluss der Zellkonzentration auf die diastolische intrazelluläre Calciumkonzentration tendenziell gering (s. Abbildung 13, A, $r = -0,96$, $p = 0,56$).

Unter Basalbedingung nahm die Höhe der intrazellulären Calciumtransientenamplitude im Vergleich zu jener bei einer Zellkonzentration von 1,0 Mio. um 43 % bei einer Zellkonzentration von 1,3 Mio., um 49 % bei einer Zellkonzentration von 1,5 Mio. sowie um 54 % bei einer Zellkonzentration von 1,8 Mio. ab (s. Abbildung 13, B Median \pm SE (Median) in R.E., 1,0 Mio.: $0,35\pm 0,02$, 1,3 Mio.: $0,20\pm 0,02$, 1,5 Mio.: $0,18\pm 0,02$, 1,8 Mio.: $0,16\pm 0,01$). Parallel hierzu zeigte sich unter β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin verglichen mit der Höhe der intrazellulären Calciumtransientenamplitude bei einer Zellkonzentration von 1,0 Mio. eine Abnahme ebendieser um 27 % bei einer Zellkonzentration von 1,3 Mio., um 35 % bei einer Zellkonzentration von 1,5 Mio. sowie um 65 % bei einer Zellkonzentration von 1,8 Mio. (s. Abbildung 13, B Median \pm SE (Median) in R.E., 1,0 Mio.: $0,48\pm 0,02$, 1,3 Mio.: $0,35\pm 0,03$, 1,5 Mio.: $0,31\pm 0,02$, 1,8 Mio.: $0,17\pm 0,05$). Unter beiden Messbedingungen liegt eine inverse Korrelation zwischen der Zellkonzentration der iPS-Kardiomyozyten und der Höhe der intrazellulären Calciumtransientenamplitude vor (s. Abbildung 13, B, Basal: $r = -0,94$, $p = 0,006$, Isoprenalin: $r = -0,81$, $p = 0,03$).

Die maximale Geschwindigkeit des Anstiegs des intrazellulären Calciumtransienten nahm unter Basalbedingung im Vergleich zu jener bei einer Zellkonzentration von 1,0 Mio. um 43 % bei einer Zellkonzentration von 1,3 Mio., um 48 % bei einer Zellkonzentration von 1,5 Mio. sowie um 55 % bei einer Zellkonzentration von 1,8 Mio. ab (s. Abbildung 13, C Median \pm SE (Median) in R.E./s, 1,0 Mio.: $8,91\pm 0,64$, 1,3 Mio.: $5,08\pm 0,55$, 1,5 Mio.: $4,62\pm 0,41$, 1,8 Mio.: $4,04\pm 0,62$). Ebenso kam es unter β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin verglichen mit der maximalen Geschwindigkeit des Anstiegs des intrazellulären Calciumtransienten bei einer Zellkonzentration von 1,0 Mio. zu einer Abnahme ebendieser um 15 % bei einer Zellkonzentration von 1,3 Mio., um 45 % bei einer Zellkonzentration von 1,5 Mio. sowie um 59 % bei einer Zellkonzentration von 1,8 Mio. (s. Abbildung 13, C Median \pm SE (Median) in R.E./s, 1,0 Mio.: $13,29\pm 0,87$, 1,3 Mio.: $11,28\pm 1,22$, 1,5 Mio.: $7,37\pm 0,66$, 1,8 Mio.: $5,41\pm 1,18$). So korreliert auch die maximale Geschwindigkeit des Calciumeinstroms während der Kontraktionsphase invers mit der Zellkonzentration der iPS-Kardiomyozyten. Dieses Verhalten war sowohl unter Basalbedingung (s. Abbildung 13, C, $r = -0,98$, $p = 0,01$) als auch unter β -adrenerger Stimulation (s. Abbildung 13, C, $r = -0,43$, $p = 0,02$) zu beobachten.

Diese inverse Korrelation zur Zellkonzentration zeigte sich auch in Bezug auf die maximale Geschwindigkeit des Calciumausstroms während der Relaxationsphase unter beiden Messbedingungen (s. Abbildung 13, D, Basal: $r = -0,88$, $p = 0,004$, Isoprenalin: $r = -0,72$, $p = 0,01$). So verringerte sich die maximale Geschwindigkeit des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten unter Basalbedingung im Vergleich zu jener bei einer Zellkonzentration von 1,0 Mio. um 52 % bei einer Zellkonzentration von 1,3 Mio., um 49 % bei einer Zellkonzentration von 1,5 Mio. sowie um 64 % bei einer Zellkonzentration von 1,8 Mio. (s. Abbildung 13, D Median \pm SE (Median) in R.E./s, 1,0 Mio.: $-0,33\pm 0,02$, 1,3 Mio.: $-0,16\pm 0,02$, 1,5 Mio.: $-0,17\pm 0,01$, 1,8 Mio.: $-0,12\pm 0,01$). Unter β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin war die Auswirkung der Zellkonzentration vergleichbar. Es zeigte sich verglichen mit der maximalen Geschwindigkeit des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten bei einer Zellkonzentration von 1,0 Mio. eine Abnahme ebendieser um 15 % bei einer Zellkonzentration von 1,3 Mio., um 46 % bei einer Zellkonzentration von 1,5 Mio. sowie um 65 % bei einer Zellkonzentration von 1,8 Mio. (s. Abbildung 13, D Median \pm SE (Median) in R.E./s, 1,0 Mio.: $-0,46\pm 0,03$, 1,3 Mio.: $-0,39\pm 0,03$, 1,5 Mio.: $-0,25\pm 0,02$, 1,8 Mio.: $-0,16\pm 0,04$).

4.3. Charakterisierung der Calciumtransienten von iPS-Kardiomyozyten fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart

In der ältesten Altersgruppe (fünf Wochen bzw. Tag 35 nach dem Differenzierungsstart) wurden drei unabhängige Differenzierungen der iPS-Kardiomyozyten in Bezug auf ihre Calciumtransientenkinetik untersucht. Es erfolgte pro Differenzierung die Messung von zwei biologischen Replikaten, sodass insgesamt sechs Messungen unter Basalbedingung wie auch unter β -adrenerger Stimulation durchgeführt wurden.

Unter β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin erhöhte sich die diastolische intrazelluläre Calciumkonzentration um 18 % im Vergleich zur Basalbedingung (s. Abbildung 14, B Median \pm SE (Median) in R.E., Basal: $0,87\pm 0,04$, Isoprenalin: $1,02\pm 0,03$). Auch die intrazelluläre Calciumtransientenamplitude stieg unter β -adrenerger Stimulation um 76 % gegenüber der Messung unter Basalbedingung an (s. Abbildung 14, C Median \pm SE (Median) in R.E., Basal: $0,20\pm 0,02$, Isoprenalin: $0,35\pm 0,03$). Außerdem nahm die maximale Geschwindigkeit des Anstiegs des intrazellulären Calciumtransienten unter β -adrenerger Stimulation um 56 % im Vergleich zur Basalbedingung zu (s. Abbildung 14, D Median \pm SE (Median) in R.E./s, Basal: $5,41\pm 0,63$, Isoprenalin: $8,44\pm 0,87$). Ebenso kam es unter β -adrenerger Stimulation zu einer Zunahme der maximalen Geschwindigkeit des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten

um 81 % verglichen mit der Messung unter Basalbedingung (s. Abbildung 14, E Median \pm SE (Median) in R.E./s, Basal: $-0,17\pm 0,03$, Isoprenalin: $-0,31\pm 0,03$).

Die β -adrenerge Stimulation bewirkte bei den iPS-Kardiomyozytenclustern der ältesten Altersgruppe somit eine Zunahme sowohl der diastolischen intrazellulären Calciumkonzentration als auch der intrazellulären Calciumtransientenamplitude. Zudem erhöhte sich die maximale Geschwindigkeit des Calciumflusses während der Diastole wie auch während der Systole unter β -adrenerger Stimulation.

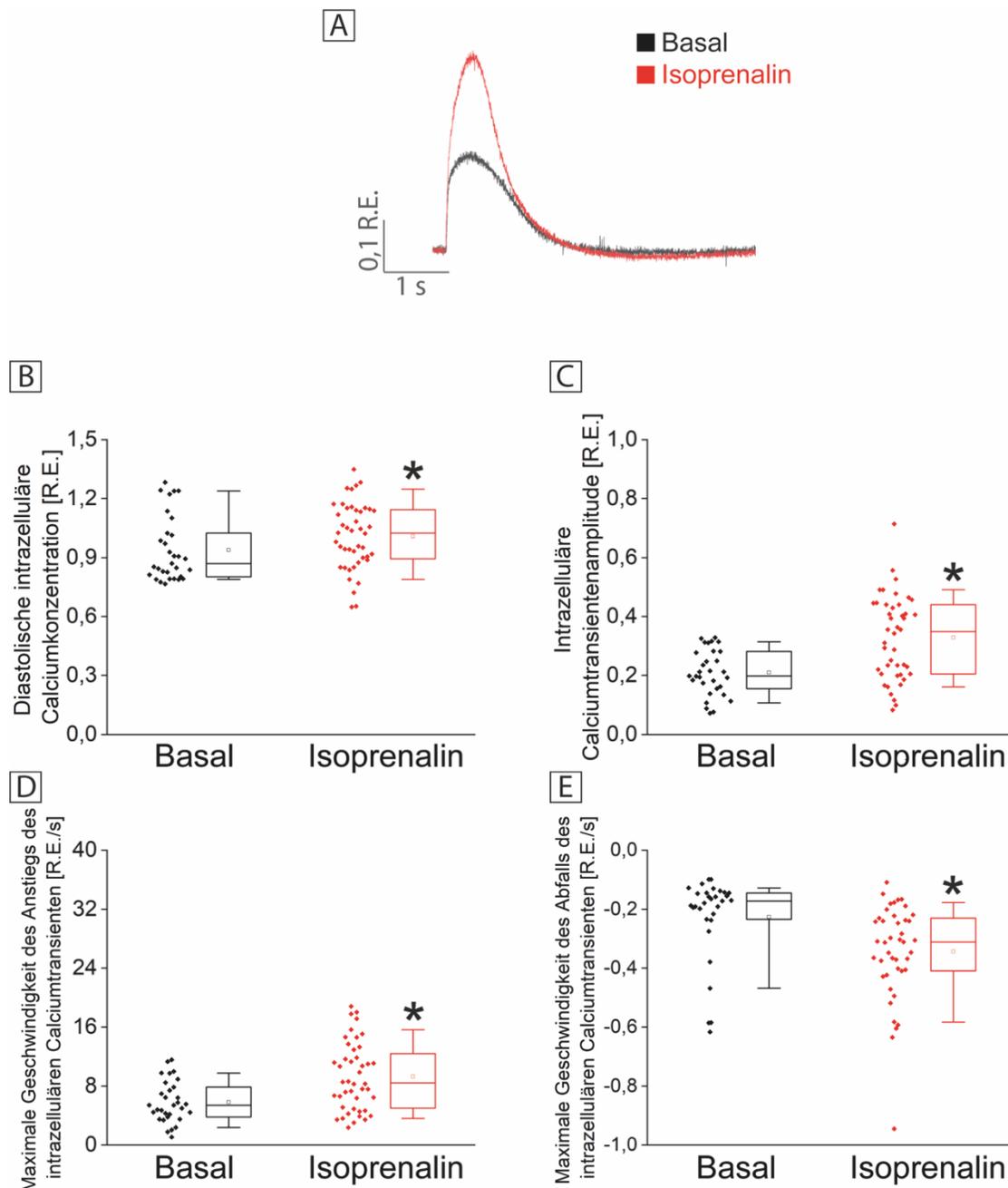


Abbildung 14: Ergebnisse der Calciumtransientenanalyse der iPS-Kardiomyozyten fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart

Die Calciumtransientenkinetik elektrisch stimulierter und mit Indo-1 AM beladener iPS-Kardiomyozyten fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart wurde fluorezenzmikroskopisch untersucht. Die Calciumtransientenmessung wurde unter Basalbedingung (schwarz) sowie nach Perfusion mit Isoprenalin (rot) durchgeführt. In Abbildung A ist ein repräsentatives Beispiel eines Calciumtransienten unter Basalbedingung sowie nach Perfusion mit Isoprenalin dargestellt. Die ermittelten Parameter der Calciumtransientenkinetik sind die diastolische intrazelluläre Calciumkonzentration (B), die intrazelluläre Calciumtransientenamplitude (C) und die maximale Geschwindigkeit des Anstiegs (D) sowie des Abfalls (E) des intrazellulären Calciumtransienten. Unter Perfusion mit Isoprenalin zeigte sich eine Zunahme der zuvor genannten Parameter. (Anzahl der gemessenen Zellcluster/Deckgläschen/unabhängigen Differenzierungen: 31/6/3 (B-E, Basal), 44/6/3 (B-D, Isoprenalin), 43/6/3 (E, Isoprenalin); * $p < 0,05$ vs. basal, Mann-Whitney-Rangsummentest)

4.4. Vergleich elektrisch stimulierter Calciumtransienten von iPS-Kardiomyozyten und adulten murinen ventrikulären Kardiomyozyten

Um die fortschreitende Reifung der iPS-Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften zu beurteilen, wurde die Calciumtransientenkinetik verschiedener Altersgruppen von iPS-Kardiomyozyten miteinander verglichen. Die mittlere Altersgruppe umfasste iPS-Kardiomyozyten drei Wochen nach dem Differenzierungsstart, während die iPS-Kardiomyozyten fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart als älteste Altersgruppe bezeichnet wurden. Darüber hinaus erfolgte der Vergleich mit adulten murinen ventrikulären Kardiomyozyten, da diese aufgrund der geringen Verfügbarkeit adulter humaner ventrikulärer Kardiomyozyten ein häufig verwendetes Modell ebendieser darstellen und im Gegensatz zu kultivierten Zellen eine korrekte subzelluläre Organisation aufweisen (Dobrev et Wehrens 2018; O'Hara et Rudy 2012).

Nach erfolgter Calciumtransientenmessung der iPS-Kardiomyozyten der mittleren sowie der ältesten Gruppe (s. Kapitel 3.4) und der murinen ventrikulären Kardiomyozyten (s. Kapitel 3.5) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indo-1 AM sowohl unter Basalbedingung als auch unter Stimulation mit dem unselektiven β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin wurde die Kinetik der Calciumtransienten miteinander verglichen.

Die β -adrenerge Stimulation führte in allen drei untersuchten Gruppen zu einer Zunahme sowohl der diastolischen intrazellulären Calciumkonzentration als auch der intrazellulären Calciumtransientenamplitude sowie der maximalen Geschwindigkeit des Anstiegs und des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten.

4.4.1. Vergleich hinsichtlich der diastolischen intrazellulären Calciumkonzentration

Die diastolische intrazelluläre Calciumkonzentration (s. Abbildung 15, B) nahm unter β -adrenerger Stimulation in allen drei Gruppen zu. Der Zuwachs war mit 4 % bei den murinen ventrikulären Kardiomyozyten am geringsten ausgeprägt (s. Abbildung 15, B Median \pm SE (Median) in R.E., Basal: $0,73\pm 0,01$, Isoprenalin: $0,75\pm 0,0$), gefolgt den iPS-Kardiomyozyten der jüngsten Altersgruppe mit 11 % Zuwachs. Die iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe zeigten den stärksten Anstieg (18 %) der diastolischen intrazellulären Calciumkonzentration unter β -adrenerger Stimulation.

Nicht nur die Veränderung, auch die absolute Höhe der diastolischen intrazellulären Calciumkonzentration war bei den iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe sowohl unter Basalbedingung (28 % bzw. 19 %) als auch unter β -adrenerger Stimulation (36 %) deutlich höher als bei den beiden anderen Gruppen. Die diastolische intrazelluläre Calciumkonzentration der iPS-Kardiomyozyten der jüngsten Altersgruppe war unter Basalbedingung lediglich 7 % geringer als die der murinen ventrikulären Kardiomyozyten. Unter β -adrenerger Stimulation glichen sich die beiden Gruppen an.

4.4.2. Vergleich hinsichtlich der intrazellulären Calciumtransientenamplitude

Auch die intrazelluläre Calciumtransientenamplitude (s. Abbildung 15, C) nahm in allen drei untersuchten Gruppen unter β -adrenerger Stimulation zu. Die Größe des Zuwachses war unterschiedlich stark ausgeprägt. Der stärkste Anstieg der intrazellulären Calciumtransientenamplitude wurde mit einer Verdreifachung (+ 201 %) im Vergleich zu unter Basalbedingung bei den murinen ventrikulären Kardiomyozyten verzeichnet (s. Abbildung 15, C Median \pm SE (Median) in R.E., Basal: 0,09 \pm 0,01, Isoprenalin: 0,28 \pm 0,1). Bei den iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe erhöhte sich die intrazelluläre Calciumtransientenamplitude unter β -adrenerger Stimulation um das 1,8-fache (+ 76 %), während bei den iPS-Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe die Zunahme (+ 38 %) am geringsten ausgeprägt war.

Die iPS-Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe zeigten sowohl unter Basalbedingung als auch unter β -adrenerger Stimulation die höchste intrazelluläre Calciumtransientenamplitude. Diese war um 75 % (Basalbedingung) bzw. 37 % (β -adrenerge Stimulation) höher als die intrazelluläre Calciumtransientenamplitude der iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe, welche ihrerseits unter Basalbedingung um 122 % höher war als die intrazelluläre Calciumtransientenamplitude der murinen ventrikulären Kardiomyozyten. Unter β -adrenerger Stimulation war die intrazelluläre Calciumtransientenamplitude der murinen ventrikulären Kardiomyozyten lediglich tendenziell geringer (25 %) als bei den iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe.

4.4.3. Vergleich hinsichtlich der maximalen Geschwindigkeit des Anstiegs und des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten

Auch bei Betrachtung der maximalen Geschwindigkeit des Anstiegs sowie des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten (s. Abbildung 15, D + E) zeigte sich in allen drei Gruppen

eine Zunahme unter β -adrenerger Stimulation. Diese Zunahme war bei den murinen ventrikulären Kardiomyozyten mit Abstand am stärksten ausgeprägt. Bei ihnen zeigte sich eine Zunahme der maximalen Geschwindigkeit des Anstiegs um 339 % (s. Abbildung 15, D Median \pm SE (Median) in R.E./s, Basal: 5,35 \pm 0,42, Isoprenalin: 23,47 \pm 1,64) sowie des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten um 479 % (s. Abbildung 15, E Median \pm SE (Median) in R.E./s, Basal: 0,09 \pm 0,01, Isoprenalin: 0,28 \pm 0,1). Weniger stark ausgeprägt war der Effekt der β -adrenergen Stimulation bei den iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe. Bei ihnen führte die β -adrenerge Stimulation zu einem Zuwachs der maximalen Geschwindigkeit des Anstiegs sowie des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten um 56 % bzw. 81 %. Den geringsten Effekt hatte die β -adrenerge Stimulation auf die iPS-Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe, bei denen die maximale Geschwindigkeit des Anstiegs um 49 % und die des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten um 39 % zunahm.

Unter Basalbedingung zeigten die iPS-Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe die höchste maximale Geschwindigkeit des Calciumflusses während der Systole. Diese war um 65 % höher als die maximale Geschwindigkeit des Anstiegs des intrazellulären Calciumtransienten der iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe und um 67 % höher als die der murinen ventrikulären Kardiomyozyten. Zwischen den iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe und den murinen ventrikulären Kardiomyozyten bestand hinsichtlich dieses Parameters kein signifikanter Unterschied. Auch die maximale Geschwindigkeit des Calciumflusses während der Diastole war bei den iPS-Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe am höchsten. Sie übertraf die maximale Geschwindigkeit des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten der murinen ventrikulären Kardiomyozyten um 50 % sowie die der iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe um 94 %. Aufgrund der Tatsache, dass der Effekt der β -adrenergen Stimulation auf die murinen ventrikulären Kardiomyozyten am stärksten ausgeprägt war, zeigten sie auch absolut die höchste maximale Geschwindigkeit des Anstiegs sowie des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten. Ihre maximale Geschwindigkeit des Calciumflusses war unter β -adrenerger Stimulation in der Systole um 77 % und in der Diastole um 130 % höher als bei den iPS-Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe, welche ihrerseits eine um 57 % größere maximale Geschwindigkeit des Anstiegs und eine um 48 % größere Geschwindigkeit des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten als die iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe aufwiesen.

4.4.4. Zusammenfassender Vergleich

Es lässt sich zusammenfassen, dass es unter Basalbedingung mit steigendem Alter der iPS-Kardiomyozyten zu einer Abnahme sowohl der intrazellulären Calciumtransientenamplitude

als auch der maximalen Geschwindigkeit des Anstiegs und des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten kam. Dadurch ähnelten die iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe den murinen ventrikulären Kardiomyozyten hinsichtlich dieser Parameter mehr als noch die iPS-Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe.

Darüber hinaus zeigte sich, dass die iPS-Kardiomyozyten auf eine β -adrenerge Stimulation mit einer Zunahme sowohl der diastolischen intrazellulären Calciumkonzentration als auch der intrazellulären Calciumtransientenamplitude sowie der maximalen Geschwindigkeit des Anstiegs und des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten reagierten. Der Effekt der β -adrenergen Stimulation auf die iPS-Kardiomyozyten war gleichgerichtet zu dem Effekt auf die murinen ventrikulären Kardiomyozyten, sodass die Gruppen somit untereinander vergleichbar waren. Die Auswirkung der β -adrenergen Stimulation auf die iPS-Kardiomyozyten war (außer bezogen auf die diastolische intrazelluläre Calciumkonzentration) jedoch schwächer ausgeprägt als die Auswirkung auf die murinen ventrikulären Kardiomyozyten. Der Effekt der β -adrenergen Stimulation auf die iPS-Kardiomyozyten nahm mit steigendem Alter zu, sodass die ältere Altersgruppe den murinen ventrikulären Kardiomyozyten hinsichtlich der untersuchten Parameter der Calciumtransientenkinetik stärker ähnelte.

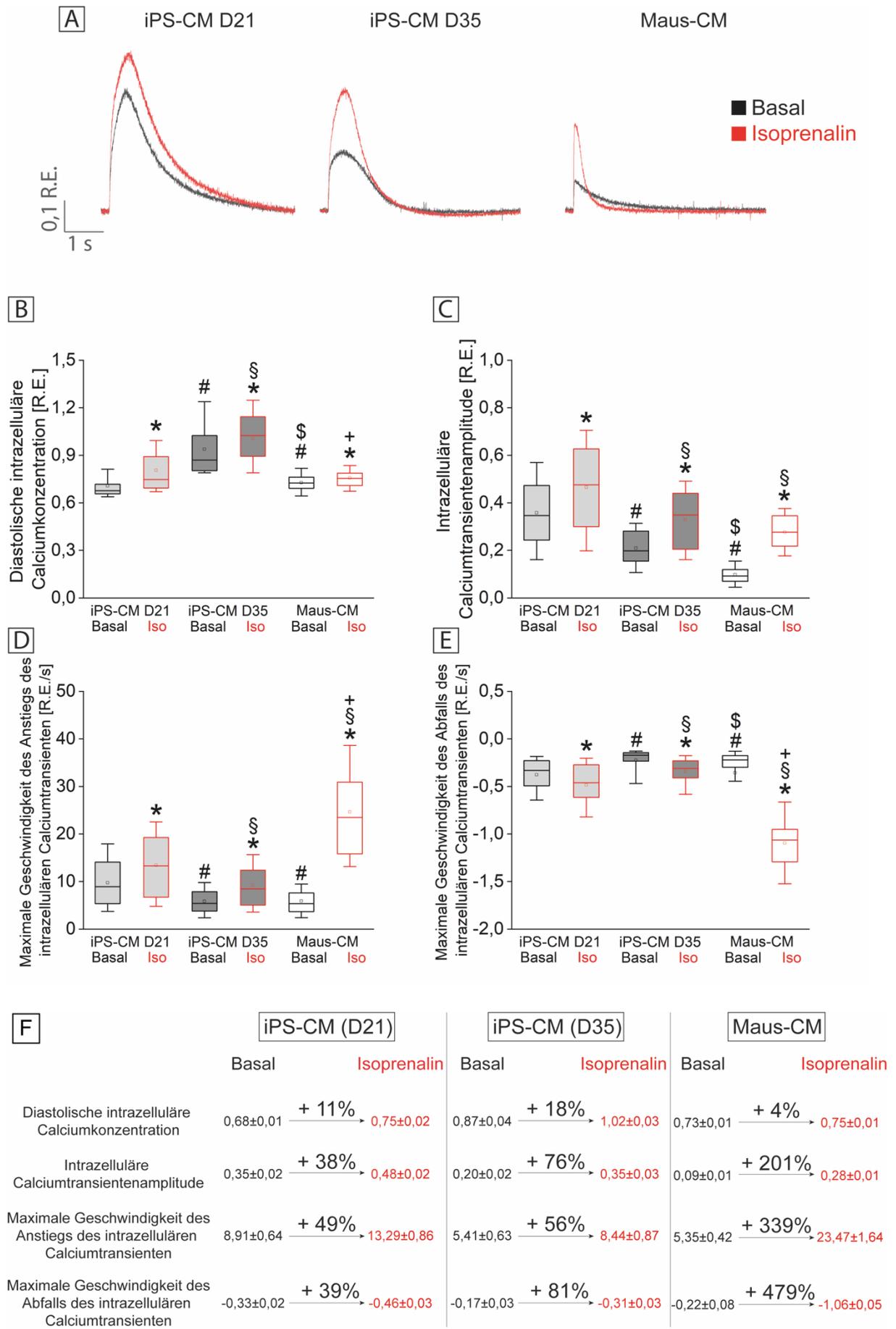


Abbildung 15: Vergleich der Calciumtransienten der iPS-Kardiomyozyten drei Wochen sowie fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart mit denen muriner ventrikulärer Kardiomyozyten

Fluoreszenzmikroskopisch wurden Calciumtransienten von elektrisch stimulierten und mit Indo-1 AM beladenen iPS-Kardiomyozyten der mittleren (hellgrau) sowie der ältesten Altersgruppe (dunkelgrau) und von murinen ventrikulären Kardiomyozyten (weiß) untersucht. Die Calciumtransientenmessung erfolgte unter Basalbedingung (schwarze Umrandung) sowie nach Perfusion mit Isoprenalin (rote Umrandung). Abbildung A zeigt repräsentative Beispiele der Calciumtransienten von iPS-Kardiomyozyten der mittleren und ältesten Altersgruppe sowie von murinen ventrikulären Kardiomyozyten unter Basalbedingung sowie nach Perfusion mit Isoprenalin. Die ermittelten Parameter sind die diastolische intrazelluläre Calciumkonzentration (B), die intrazelluläre Calciumtransientenamplitude (C) und die maximale Geschwindigkeit des Anstiegs (D) sowie des Abfalls (E) des intrazellulären Calciumtransienten. In Abbildung F wird die relative Veränderung der Mediane der ermittelten Parameter unter β -adrenerger Stimulation veranschaulicht. 100 % entsprechen hierbei dem Median des jeweiligen Parameters unter Basalbedingung. Unter Perfusion mit Isoprenalin zeigte sich bei den murinen ventrikulären Kardiomyozyten wie auch bei den iPS-Kardiomyozyten eine Zunahme der ermittelten Parameter. Diese Zunahme war bei den murinen ventrikulären Kardiomyozyten deutlich stärker ausgeprägt als bei den iPS-Kardiomyozyten (ausgenommen der diastolischen intrazellulären Calciumkonzentration). Unter den iPS-Kardiomyozyten wies die älteste Altersgruppe eine stärkere Zunahme der zuvor benannten Parameter der Calciumtransientenkinetik unter β -adrenerger Stimulation auf als die mittlere Altersgruppe. (Anzahl der gemessenen Zellcluster/Deckgläschen/unabhängigen Differenzierungen: für iPS-Kardiomyozyten nach drei Wochen s. Abbildung 12, für iPS-Kardiomyozyten nach fünf Wochen s. Abbildung 14; Anzahl der gemessenen murinen ventrikulären Kardiomyozyten/Tiere: 69/7 (B-E, Basal), 56/7 (B-E, Isoprenalin); Basal = unter Basalbedingung; Iso = unter β -adrenerger Stimulation; * $p < 0,05$ vs. basal, # $p < 0,05$ vs. iPS-CM D21 (Basal), § $p < 0,05$ vs. iPS-CM D21 (Isoprenalin), \$ $p < 0,05$ vs. iPS-CM D35 (Basal), + $p < 0,05$ vs. iPS-CM D35 (Isoprenalin), Mann-Whitney-Rangsummentest)

5. DISKUSSION

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems und insbesondere des Herzens sind die führende Ursache für die Hospitalisierung von Patienten/Patientinnen und die Haupttodesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2019). Dies liegt nicht zuletzt daran, dass sowohl die Regenerationsfähigkeit der Kardiomyozyten als auch die Verfügbarkeit kausaler Therapieansätze sehr begrenzt ist.

Für die Grundlagenforschung, die Testung neuer Medikamente und die regenerative Medizin (Zelltherapie) sind humane Kardiomyozyten von immenser Bedeutung und der Bedarf zurzeit größer denn je (Germanguz et al. 2011; Peischard et al. 2017; Skalova et al. 2015). Dennoch ist ihre Verfügbarkeit aufgrund technischer und ethischer Probleme sehr gering.

Mit der bahnbrechenden Errungenschaft der Generierung von Stammzellen aus humanen Fibroblasten und deren Differenzierung unter anderem zu iPS-Kardiomyozyten steht der Wissenschaft nun eine neue Quelle humaner Kardiomyozyten zur Verfügung (Takahashi et al. 2007). Außerdem können ethische Kontroversen wie bei der Verwendung von humanen ES-Kardiomyozyten umgangen werden (Singh et al. 2015).

Aktuelle Studien legen nahe, dass die momentan verfügbaren Differenzierungsmethoden zur Generierung von iPS-Kardiomyozyten eines eher unreifen Phänotyps führen, welche somit eher fetalen Kardiomyozyten ähneln (Ivashchenko et al. 2013; Yang et al. 2014). Insbesondere in Bezug auf das Calcium-*handling* der iPS-Kardiomyozyten ist noch vieles unbekannt (Lee et al. 2011). So liegen für die iPS-Kardiomyozyten, wie in einer Übersichtsarbeit von Knollmann et al. angeführt, mehrere Studien vor, in denen eine große Variabilität der verschiedenen elektrophysiologischen Parameter dargestellt wurde (Knollmann 2013). Einerseits ist dies den unterschiedlichen Differenzierungsprotokollen der noch undifferenzierten iPS-Zellen geschuldet (Knollmann 2013). Andererseits beschäftigen sich viele Studien zum Beispiel nur mit einzelnen elektrophysiologischen Fragestellungen zu den iPS-Kardiomyozyten oder untersuchen nur einzelne Parameter des Calcium-*handlings* zu bestimmten Zeitpunkten (Itzhaki et al. 2011; Lee et al. 2011; M. Zhang et al. 2015).

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit iPS-Kardiomyozyten in drei verschiedenen Altersstufen (zwei, drei und fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart) elektrophysiologisch hinsichtlich der Calciumtransientenkinetik untersucht. Es erfolgte wie auch bei einigen weiteren Arbeitsgruppen die Messung von Zellclustern (Hwang et al. 2015; Riedel et al. 2014). Diese Zellcluster der iPS-Kardiomyozyten bildeten, wie Spencer et al. 2014 zeigen konnten, ein funktionelles Synzytium und ihre spontanen Calciumtransienten waren annähernd

identisch und synchronisiert. Damit zeigten sie, dass die Messung von Zellclustern eine valide Alternative zur Messung von Einzelzellen darstellt (Spencer et al. 2014).

Um die elektrophysiologische Reifung der iPS-Kardiomyozyten in den drei Altersgruppen beurteilen zu können, erfolgte der Vergleich mit murinen adulten ventrikulären Kardiomyozyten. Es ist zu beachten, dass Unterschiede zwischen humanen und murinen ventrikulären Kardiomyozyten bestehen. Insbesondere der für die myokardiale Relaxation erforderliche Transport von Calciumionen aus dem Zytosol ist bei murinen Kardiomyozyten wesentlich stärker von der SERCA abhängig als bei größeren Säugetieren wie z.B. Menschen oder Kaninchen (Bers 2001). Ebenso unterscheidet sich die Form des Aktionspotentials zwischen humanen und murinen ventrikulären Kardiomyozyten insbesondere hinsichtlich der Repolarisationsphase aufgrund einer unterschiedlichen Expression repolarisierender Ionenkanäle (Nerbonne 2004). Deswegen ist zu betonen, dass die murinen Kardiomyozyten lediglich als Modell für humane Kardiomyozyten fungieren und ein gewisser Anteil der Unterschiede hinsichtlich der Calciumtransientenkinetik durch den Speziesunterschied zu erklären ist (Dobrev et Wehrens 2018; Nerbonne 2004).

Kardiomyozyten müssen selbst bei gesunden Menschen in der Lage sein zumindest kurzfristig adäquat auf β -adrenergen Stress (z.B. Sport) zu reagieren. Die Fähigkeit der Kardiomyozyten, auf β -adrenerge Stimuli zu reagieren, ist unter pathophysiologischen Gesichtspunkten deutlich relevanter, da beispielweise bei der Herzinsuffizienz die dauerhaft gesteigerte Sympathikusaktivierung einen grundlegenden Pathomechanismus darstellt (Hartupee et Mann 2016). Aus diesen Gründen wurden alle Calciumtransientenmessungen sowohl unter Basalbedingung als auch unter β -adrenerger Stimulation durchgeführt.

5.1. Ausgeprägte elektrophysiologische Reifung der iPS-Kardiomyozyten von Woche zwei zu Woche drei nach dem Differenzierungsstart

In der jüngsten Altersgruppe erfolgte die erste Calciumtransientenmessung zwei Wochen nach Beginn der Differenzierung. Die iPS-Kardiomyozyten lagen zu diesem Zeitpunkt in den Vertiefungen der 6er-Multilochplatten als konfluierende Zellinseln vor und zeigten spontan regelmäßige Kontraktionen über die gesamte Fläche der Vertiefung. Nach dem in dieser Arbeit verwendeten Protokoll zur Differenzierung der iPS-Zellen war zu erwarten, dass eine kontraktile Aktivität ab Tag 6 nach Differenzierungsstart zu beobachten ist, die iPS-Kardiomyozyten jedoch noch hochgradig unreif sind (M. Zhang et al. 2015).

Trotz der beobachteten spontanen Kontraktionen, die auch als Calciumtransienten detektiert werden konnten (s. Abbildung 11), fanden sich keine Cluster von iPS-Kardiomyozyten, die auf die externe elektrische Feldstimulation reagierten. Ein Teil der iPS-Kardiomyozyten besaß eine elektrische Spontanaktivität, welche aufgezeichnet werden konnte. Diese lag mit einer Frequenz von zum Teil deutlich unter 0,1 Hz jedoch unterhalb der Frequenz der externen elektrischen Feldstimulation (0,2 Hz).

Es finden sich keine Publikationen, in denen elektrisch stimulierte Calciumtransienten von zwei Wochen alten iPS-Kardiomyozyten untersucht wurden. Jedoch gelang Zhang et al. die Aufzeichnung von elektrisch stimulierten Calciumtransienten von ES-Kardiomyozyten zwei Wochen nach deren Differenzierungsstart (M. Zhang et al. 2015). Zudem konnten sie zeigen, dass die aufgezeichneten intrazellulären Calciumtransienten der zwei Wochen alten ES-Kardiomyozyten eine geringere Amplitude aufwiesen als die der vier Wochen alten ES-Kardiomyozyten. Dies zeigt, dass die ES-Kardiomyozyten zu diesem frühen Zeitpunkt bereits die grundlegenden Strukturen des Calcium-*handlings* besitzen. Zhang et al. wiesen dies auch auf transkriptioneller Ebene nach. Hier untersuchten sie sowohl ES- als auch iPS-Kardiomyozyten. Sowohl die ES- als auch die iPS-Kardiomyozyten besaßen bereits eine Woche nach dem Differenzierungsstart ähnliche Expressionsprofile vieler pankardialer Marker wie sie auch bei adulten humanen Kardiomyozyten zu finden sind. Dennoch waren die Expressionslevel der mRNA einiger Schlüsselgene der kardiomyozytären Funktion wie z.B. *Calsequestrin* (CASQ2) oder des *Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5* (SCN5A) bei den ES- und iPS-Kardiomyozyten noch wesentlich geringer, während die Expressionslevel der mRNA früher kardialer entwicklungspezifischer Gene wie z.B. Nkx2.5 bei ihnen noch höher als bei adulten humanen Kardiomyozyten waren (M. Zhang et al. 2015). Dies legt nahe, dass die in dieser Arbeit untersuchten iPS-Kardiomyozyten auf transkriptioneller Ebene zu diesem frühen Zeitpunkt grundlegenden Strukturen des Calcium-*handlings* besitzen, jedoch funktionell unreifer sind als die von Zhang et al. untersuchten ES-Kardiomyozyten.

Viatchenko-Karpinski et al. zeigten am Beispiel von murinen ES-Kardiomyozyten, dass die Kontraktionen in frühen Entwicklungsstadien nicht durch transmembranäre Ionen-Ströme, die zu einem Aktionspotential führen, ausgelöst werden, sondern durch intrazelluläre Calciumoszillationen. Dabei fungiert die Zelle mit der höchsten Frequenz der Oszillationen als interner Oszillator und bestimmt somit die Kontraktionshäufigkeit des Zellclusters (Viatchenko-Karpinski et al. 1999). Dies könnte ein Erklärungsansatz für die Beobachtung sein, dass die iPS-Kardiomyozyten der jüngsten Altersgruppe spontane Calciumtransienten und sichtbare Kontraktionen zeigten, jedoch nicht auf eine externe elektrische Feldstimulation reagierten.

Im Gegensatz zu den iPS-Kardiomyozyten der jüngsten Altersgruppe reagierten die iPS-Kardiomyozyten der mittleren und ältesten Altersgruppe auf eine externe elektrische Feldstimulation. Diese funktionelle Reifung von Woche zwei zu Woche drei nach dem Differenzierungsstart geschieht analog zur Reifung auf transkriptioneller Ebene (M. Zhang et al. 2015). So zeigten Zhang et al., dass die Expressionslevel der mRNA kardialer entwicklungspezifischer Gene wie NKX2.5 oder *ISL LIM Homeobox 1* (ISL1) während der längeren Kultivierung sanken und die iPS-Kardiomyozyten ihre Fähigkeit zur Proliferation verloren (M. Zhang et al. 2015). Gleichermaßen kam es zur Hochregulierung von Schlüsselgenen der kardiomyozytären Funktion wie beispielweise *myosin heavy chain 7* (MYH7) oder dem *potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1* (KCNQ1), welche nach drei bis vier Wochen vergleichbare Expressionslevel wie in adulten humanen Kardiomyozyten erreichten (M. Zhang et al. 2015).

Daraus lässt sich schließen, dass die iPS-Kardiomyozyten durch die längere Kultivierung drei Wochen nach ihrem Differenzierungsstart einen höheren Reifungsgrad erreichen als noch eine Woche zuvor. Dies zeigt sich daran, dass die drei Wochen alten iPS-Kardiomyozyten auf jede externe elektrische Stimulation mit einem Calciumtransienten reagieren.

Zusammenfassend zeigt sich also, dass die in dieser Arbeit generierten iPS-Kardiomyozyten zwei Wochen nach ihrem Differenzierungsstart eine zu geringe Reifungsstufe aufweisen, um auf eine externe elektrische Feldstimulation zu reagieren. Die externe elektrische Feldstimulation scheint nicht zu einer Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle und konsekutiv auch nicht über eine CICR zur Kontraktion zu führen. Dies legt nahe, dass einige grundlegende für die kardiomyozytäre Funktion relevante Strukturen zu diesem frühen Zeitpunkt noch nicht angelegt oder nicht vollständig entwickelt sind. Von Woche zwei zu Woche drei nach dem Differenzierungsstart findet eine ausgeprägte funktionelle Reifung der iPS-Kardiomyozyten statt, sodass eine konstante Reaktion auf die externe elektrische Stimulation in Form von gleichmäßigen Calciumtransienten aufzuzeichnen ist.

5.2. Vergleich der iPS-Kardiomyozyten drei und fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart mit murinen ventrikulären Kardiomyozyten insbesondere hinsichtlich ihrer Reaktion auf β -adrenerge Stimulation

5.2.1. iPS-Kardiomyozyten an Tag 21 reagieren auf β -adrenerge Stimulation

Die iPS-Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe reagierten auf eine β -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin, einem unspezifischen β -Adrenozeptoragonisten, mit einer Zunahme der diastolischen intrazellulären Calciumkonzentration um 11 %, der intrazellulären Calciumtransientenamplitude um 38 %, der maximalen Geschwindigkeit des Anstiegs des intrazellulären Calciumtransienten um 49 % und der maximalen Geschwindigkeit des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten um 39 % verglichen zur Messung unter Basalbedingung (s. Abbildung 12).

Diese Wirkung der β -adrenergen Stimulation auf die iPS-Kardiomyozyten ist hinsichtlich ihrer Ausrichtung qualitativ ähnlich zur Wirkung von Isoprenalin auf adulte humane Kardiomyozyten. Isoprenalin führt dort durch die Bindung an β_1 -Adrenozeptoren zur Aktivierung der Adenylylcyclase, welche folglich verstärkt die Bildung von cAMP aus ATP katalysiert. Das cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit der PKA und aktiviert sie auf diese Weise. Durch eine PKA-medierte Phosphorylierung des DHPR und des RyR2 kommt es über eine verstärkte CICR zu einem gesteigerten Calciumeinstrom in das Zytosol und zu einer gesteigerten Calciumfreisetzung aus dem SR (s. Kapitel 1.3.2). Folglich nimmt die intrazelluläre Calciumkonzentration nach β -adrenerger Stimulation zu mit einer daraus resultierenden Erhöhung der Calciumtransientenamplitude wie auch der maximalen Geschwindigkeit des Anstiegs des intrazellulären Calciumtransienten (Bers 2008; X.-H. Zhang et al. 2013). Diese Veränderungen der Calciumtransientenkinetik unter β -adrenerger Stimulation waren in der vorliegenden Arbeit auch für die iPS-Kardiomyozyten zu beobachten.

Gleichzeitig führt bei adulten humanen Kardiomyozyten eine durch β -adrenerge Stimulation vermittelte Phosphorylierung von Phospholamban zur Enthemmung der SERCA (s. Kapitel 1.3.2), sodass mehr Calcium pro Zeiteinheit zurück in das Lumen des SR transportiert werden kann, was eine Steigerung der maximalen Geschwindigkeit des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten zur Folge hat (Bers 2001). Auch die iPS-Kardiomyozyten reagierten auf die β -adrenerge Stimulation mit einer Zunahme der maximalen Geschwindigkeit des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten.

Durch die gesteigerte Aktivität der SERCA gelangt weniger Calcium über den NCX in den Extrazellularraum. Zhang et al. bezeichnen diesen Vorgang als Isoprenalin-induzierte Verstärkung der Rezirkulationsfraktion des freigesetzten Calciums (X.-H. Zhang et al. 2013). Dieser Vorgang erklärt die ermittelte Steigerung der diastolischen intrazellulären Calciumkonzentration der iPS-Kardiomyozyten unter β -adrenerger Stimulation. Zur Bestätigung dieser These müsste die Aktivität der SERCA sowie des NCX sowohl unter Basalbedingung als auch unter β -adrenerger Stimulation ermittelt werden.

Aufgrund der Tatsache, dass Calcium als zentrales Bindeglied zwischen elektrischer Aktivierung und mechanischer Aktion der Herzmuskelzelle fungiert, stellt die gesteigerte Calciumtransientenamplitude ein indirektes Maß für eine gesteigerte Kontraktionskraft im Sinne der positiv inotropen Wirkung des Isoprenalins dar. Gleichermäßen ist die Steigerung der maximalen Geschwindigkeit des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten ein indirektes Maß für eine beschleunigte Relaxation im Sinne der positiv lusitropen Wirkung.

Watanabe et al. konnten 2017 zeigen, dass eine Stimulation von zwei bis vier Wochen alten iPS-Kardiomyozyten mit Isoprenalin (1 μ M) zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumtransientenamplitude um 30,4 % verglichen zur Messung unter Basalbedingung führte (H. Watanabe et al. 2017). Auch Zhang et al. konnten in ihren Untersuchungen von iPS-Kardiomyozyten eines Alters von 30 bis 40 Tagen eine Steigerung der Calciumtransientenamplitude unter β -adrenerger Stimulation um etwa 20 % beobachten (X.-H. Zhang et al. 2013). Diese Ergebnisse decken sich mit der von uns ermittelten Zunahme der intrazellulären Calciumtransientenamplitude der drei Wochen alten iPS-Kardiomyozyten um 38 %. Ebenfalls konnten Zhang et al. unter β -adrenerger Stimulation eine Zunahme der diastolischen Calciumkonzentration der iPS-Kardiomyozyten um 5 – 8 % beobachten (X.-H. Zhang et al. 2013). Dieses Ergebnis ist äquivalent zu der in dieser Arbeit ermittelten Zunahme der diastolischen Calciumkonzentration der iPS-Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe um 11 % unter β -adrenerger Stimulation.

Es bestätigen also mehrere Studien, dass iPS-Kardiomyozyten drei Wochen nach dem Differenzierungsstart auf Ebene der Calciumfreisetzung eine Reaktion auf eine β -adrenerge Stimulation mittels Isoprenalin zeigen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, sodass sich konstatieren lässt, dass die iPS-Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe reif genug sind, um auf β -adrenerge Stimulation adäquat zu reagieren. Sie zeigen in einer ähnlichen Weise wie auch adulte humane Kardiomyozyten eine positiv chronotrope, inotrope wie auch lusitrope Reaktion (Huebsch et al. 2015; Ivashchenko et al. 2013; H. Watanabe et al. 2017; Wu et al. 2015).

5.2.2. Die Zellkonzentration der iPS-Kardiomyozyten bei der ersten Passagierung hat einen Einfluss auf ihre Calciumtransientenkinetik und ihre β -adrenerge Reaktion

Die vorliegende Arbeit ist die erste ihrer Art, die sich mit der Auswirkung der Zellkonzentration von iPS-Kardiomyozyten bei der ersten Passagierung auf ihre Calciumtransientenkinetik beschäftigt. Die iPS-Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe wurden fünf bis sechs Tage vor der Messung mit einer definierten Zellzahl von 1 Mio. Zellen (entspricht ca. 1042 Zellen/mm²) bis 1,8 Mio. Zellen (entspricht ca. 1875 Zellen/mm²) auf die Deckgläschen ausplattiert und getrennt voneinander ausgewertet. Trotz teilweise geringer Versuchszahlen für die Calciumtransientenmessungen mit hohen Zellkonzentrationen, zeigt sich eine statistisch signifikante negative Korrelation für drei der vier ermittelten Parameter zur Beschreibung der Calciumtransientenkinetik (s. Abbildung 13).

Die Messungen haben ergeben, dass sowohl die intrazelluläre Calciumtransientenamplitude als auch die maximale Geschwindigkeit des Anstiegs und des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten invers mit der Zellkonzentration korrelieren (s. Abbildung 13). Diese Beobachtung war unter Einfluss von Isoprenalin stärker ausgeprägt als unter Basalbedingung (s. Abbildung 13). Es scheint also, dass eine höhere Zellkonzentration zu einem unreiferen Phänotyp der iPS-Kardiomyozyten in Bezug auf ihr Calcium-*handling* führt.

Ein Grund hierfür könnte sein, dass die iPS-Kardiomyozyten durch die höhere Zellkonzentration weniger Kontakt mit dem umgebenden Medium haben. Dies hat zur Folge, dass die von ihnen benötigten Wachstumsfaktoren, Nährstoffe sowie parakrinen Signale sie schlechter erreichen, was einen geringeren Reifungsgrad zur Folge haben kann. Darüber hinaus führt eine höhere Zellkonzentration über eine gesteigerte Produktion von Stoffwechselmetaboliten zu metabolischen Veränderungen, welche ebenfalls die funktionellen Eigenschaften der iPS-Kardiomyozyten beeinflussen können.

Doch ist es keine Alternative, die iPS-Kardiomyozyten konsekutiv mit geringeren Zellkonzentrationen zu kultivieren, da eine hohe Zellkonzentration unabdingbar für eine einheitliche Differenzierung ist (Uesugi et al. 2014). Uesugi et al. konnten nachweisen, dass die Zellkonzentration während der Differenzierung der iPS-Kardiomyozyten einen Einfluss auf verschiedene Charakteristika wie auf das Genexpressionsprofil und die elektrophysiologischen Eigenschaften hat (Uesugi et al. 2014). Dadurch dass sie iPS-Kardiomyozyten nach einer zwei- bis 21-tägigen Vorkultivierung (4688-6250 Zellen/mm²) für zwei bis sieben weitere Tage mit einer sehr geringen Zellkonzentration (500-1200 Zellen/mm²) kultivierten, erhielten sie iPS-Kardiomyozyten, die als Modell der kardialen Hypertrophie

genutzt werden konnten und weniger adult waren als jene Zellen, die mit einer höheren Zellkonzentration (2800-4800 Zellen/mm²) kultiviert wurden (Uesugi et al. 2014).

Es lässt sich also zusammenfassen, dass die Zellkonzentration der iPS-Kardiomyozyten während der Differenzierung Einfluss auf ihre Reifung nimmt. Dieser Einfluss ist, wie die vorliegende Arbeit zeigt, auch für drei Wochen alte iPS-Kardiomyozyten noch relevant, sogar wenn sie lediglich für fünf bis sechs Tage vor der Calciumtransientenmessung in dieser Zellkonzentration kultiviert wurden. Dies unterstreicht, dass auch zu diesem späteren Zeitpunkt noch eine Reifung der iPS-Kardiomyozyten stattfindet. Die Komplexität besteht darin, einerseits eine Zellkonzentration zu wählen, welche hoch genug ist, um eine einheitliche Differenzierung und die Bildung eines Synzytiums zu gewährleisten. Andererseits sollte diese Zellkonzentration niedrig genug sein, um eine freie Diffusion von Wachstumsfaktoren, Nährstoffen und parakrinen Botenstoffen nicht zu beeinträchtigen, da es ansonsten ebenfalls zu einer Störung der Reifung käme.

5.2.3. iPS-Kardiomyozyten zeigen von der dritten zur fünften Woche eine Reifung insbesondere hinsichtlich ihrer Reaktion auf β -adrenerge Stimulation, erreichen jedoch nicht die Maturität adulter muriner ventrikulärer Kardiomyozyten

Es konnte gezeigt werden, dass die iPS-Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe verglichen mit den iPS-Kardiomyozyten der jüngsten Altersgruppe in Bezug auf ihre elektrophysiologischen Eigenschaften einen reiferen Phänotyp besitzen. Aus diesem Grund erfolgte analog zu den vorherigen Messungen die Messung der Calciumtransienten von iPS-Kardiomyozyten fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart, um den Effekt einer längeren Kultivierung auf die Reifung hinsichtlich des Calcium-*handlings* und der β -adrenergen Reaktion beurteilen zu können. Darüber hinaus wurden die Calciumtransienten der iPS-Kardiomyozyten mit denen adulter muriner ventrikulärer Kardiomyozyten verglichen. Die Befunde dieser Arbeit zeigten, dass von den drei Wochen alten iPS-Kardiomyozyten zu den fünf Wochen alten iPS-Kardiomyozyten eine weitere Reifung stattfindet. Insbesondere die Reaktion auf eine β -adrenerge Stimulation ist bei den iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe stärker ausgeprägt als bei der mittleren Altersgruppe. Insgesamt bleiben die in dieser Arbeit untersuchten iPS-Kardiomyozyten hinsichtlich ihres Calcium-*handlings* jedoch unreifer als adulte murine ventrikuläre Kardiomyozyten.

Reifung hinsichtlich des Calcium-handlings:

Es fiel auf, dass sowohl die intrazelluläre Calciumtransientenamplitude als auch die maximale Geschwindigkeit des Anstiegs und des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten der iPS-Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe unter Basalbedingung sowie unter β -adrenerger Stimulation absolut gesehen höher war als bei den iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe und den adulten murinen ventrikulären Kardiomyozyten (s. Abbildung 15). Dies bedeutet jedoch nicht, wie es auf den ersten Blick erscheinen mag, dass die iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe unreifer sind als noch zwei Wochen zuvor. Die iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe ähneln hinsichtlich der zuvor genannten Parameter der Calciumtransientenkinetik den adulten murinen ventrikulären Kardiomyozyten stärker als die jüngeren iPS-Kardiomyozyten (s. Abbildung 15).

Anhand publizierter Literatur war eine Reifung der iPS-Kardiomyozyten hinsichtlich ihres Calcium-handlings von der dritten zur fünften Woche zu erwarten, welche in dieser Arbeit lediglich auf Ebene der β -adrenergen Reaktion nachgewiesen werden konnte. Eine zugrundeliegende Problematik könnte sein, dass eine höhere Zellkonzentration zur Kultivierung der iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe verwendet wurde, um eine einheitliche Differenzierung und die Bildung eines Synzytiums trotz der höheren Belastung aufgrund der längeren Kultivierungsdauer zu gewährleisten. Wie bereits zuvor beschrieben, wirkte sich die Erhöhung der Zellkonzentration negativ auf die Reifung der iPS-Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe aus (s. Kapitel 5.2.2). Da ein auch Einfluss der Zellkonzentration auf die iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe nicht auszuschließen ist, ist es für einen abschließenden Vergleich der iPS-Kardiomyozyten zu den beiden Messzeitpunkten nötig, die Kultivierung wie auch die Calciumtransientenmessung mit einer identischen Zellkonzentration durchzuführen.

Die aktuelle Literatur spricht ebenfalls für eine Reifung der iPS-Kardiomyozyten hinsichtlich ihres Calcium-handlings mit längerer Kultivierungsdauer. So konnten Experimente von Zhang et al., an deren Differenzierungsprotokoll sich das in der vorliegenden Arbeit verwendete orientierte, herausstellen, dass es bei den von ihnen generierten ES- und iPS-Kardiomyozyten nach etwa vier Wochen zu einer Stabilisierung des Transkriptoms kommt (M. Zhang et al. 2015). Diese Reifung auf transkriptioneller Ebene spiegelte sich ebenfalls in einer Reifung auf funktioneller Ebene wider. Die Arbeitsgruppe um Zhang konnte für ES-Kardiomyozyten zeigen, dass es vier Wochen nach Differenzierungsstart zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumtransientenamplitude verglichen mit der Messung nach zwei Wochen kommt (M. Zhang et al. 2015).

Analog hierzu konnte in den Untersuchungen von Wu et al. gezeigt werden, dass von Tag 30 bis Tag 60 nach dem Start der Differenzierung eine weitere Reifung der iPS-Kardiomyozyten in Bezug auf ihr Calcium-*handling* stattfindet. Sie zeigten, dass sowohl die Geschwindigkeit des Anstiegs als auch des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten im Laufe dieser Zeit zunahm (Wu et al. 2015).

Im Gegensatz hierzu konnten Hwang et al. zwar eine Reifung des Calcium-*handlings* von Tag 15 bis Tag 21 nach dem Differenzierungsstart nachweisen, doch zeigten ihre iPS-Kardiomyozyten (Monolayer-basierte Differenzierung) keine weitere Reifung von Tag 21 bis Tag 30. Dies äußerte sich dadurch, dass sich weder die intrazelluläre Calciumtransientenamplitude noch die Kinetik des Abfalls des Calciumtransienten signifikant änderte (Hwang et al. 2015). Diese Beobachtungen widersprechen sowohl den in dieser Arbeit generierten Ergebnissen als auch den zuvor erwähnten von Zhang et al. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass der von Hwang et al. gewählte Zeitraum von neun Tagen zwischen den beiden Messungen nicht lang genug war, um eine signifikante Veränderung beobachten zu können. Darüber hinaus verglichen Hwang et al. das Calcium-*handling* der iPS-Kardiomyozyten an Tag 24 bis 26 nach dem Differenzierungsstart mit dem Calcium-*handling* muriner ventrikulärer Kardiomyozyten. Sie konnten zeigen, dass sich die iPS-Kardiomyozyten in Bezug auf ihre diastolische intrazelluläre Calciumkonzentration und intrazelluläre Calciumtransientenamplitude nicht signifikant von adulten murinen ventrikulären Kardiomyozyten unterscheiden (Hwang et al. 2015). Im Gegensatz zu unseren Messungen wertete die Forschungsgruppe zur Beschreibung der Kinetik des Anstiegs des Calciumtransienten die Zeit bis zur maximalen Calciumkonzentration (*time to peak*) sowie zur Beschreibung der Kinetik des Abfalls des Calciumtransienten die Zeitkonstante einer an den absteigenden Teil des Calciumtransienten angelegten Exponentialfunktion (*sin exp tau*) aus. Dabei verzeichneten sie eine signifikant langsamere Kinetik der iPS-Kardiomyozyten sowohl bezogen auf den Anstieg als auch auf den Abfall des Calciumtransienten im Vergleich zu murinen ventrikulären Kardiomyozyten (Hwang et al. 2015). Dagegen ist kritisch einzuwenden, dass die beiden gewählten Parameter im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit gewählten Parametern von dem Punkt der maximalen Calciumkonzentration (*peak*) abhängig sind und idealerweise nur verwendet werden sollten, wenn der Calciumtransient eine spitze Form aufweist. Durch die Kuppelform der Calciumtransienten der iPS-Kardiomyozyten können diese Parameter verfälscht werden und einen langsameren An- und Abstieg des Calciumtransienten vortäuschen (Lee et al. 2011). Darüber hinaus wurden die von Hwang et al. untersuchten iPS-Kardiomyozyten mit geringen Zellkonzentrationen (1000 Zellen/mm²) kultiviert, was – wie Uesugi et al. zeigen konnten – generell zu einem unreiferen Phänotyp der iPS-Kardiomyozyten führen kann (Hwang et al. 2015; Uesugi et al. 2014).

Reifung hinsichtlich der β -adrenergen Reaktion:

Die β -adrenerge Reaktion der fünf Wochen alten iPS-Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Calciumtransientenkinetik ist stärker ausgeprägt als bei den iPS-Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe (s. Abbildung 15). Damit ähneln die die iPS-Kardiomyozyten der ältesten Altersgruppe mehr den adulten murinen ventrikulären Kardiomyozyten. Dies bestärkt die Hypothese, dass in dem zweiwöchigen Zeitraum von der dritten zur fünften Woche nach Differenzierungsstart der iPS-Kardiomyozyten auch eine funktionelle Reifung stattfindet. Trotz längerer Kultivierungsdauer erreicht die β -adrenerge Reaktion der iPS-Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Calciumtransientenkinetik nicht das bei den adulten murinen ventrikulären Kardiomyozyten zu beobachtende Ausmaß.

Eine mögliche Ursache für die geringer ausgeprägte Reaktion der iPS-Kardiomyozyten auf β -adrenerge Stimulation könnte die Tatsache sein, dass junge iPS-Kardiomyozyten vor allem β_2 -Rezeptoren und erst später vermehrt β_1 -Rezeptoren exprimieren (Wu et al. 2015). Die über β_2 -Rezeptoren vermittelte adrenerge Reaktion unterscheidet sich von jener über β_1 -Rezeptoren vermittelte: es kommt wie bei adulten humanen Kardiomyozyten gezeigt wurde zu einer geringeren Zunahme der intrazellulären Calciumamplitude und zu keiner Veränderung der Kinetik des Anstiegs oder des Abfalls des Calciumtransienten (Shinozawa et al. 2012; Xiao et al. 1994).

Zusammenfassend handelt es sich bei den iPS-Kardiomyozyten der mittleren und ältesten Altersgruppe um Kardiomyozyten mit einer stabilen Calciumtransientenkinetik. Bezüglich der intrazellulären Calciumtransientenamplitude wie auch der maximalen Geschwindigkeit des Anstiegs und des Abfalls des intrazellulären Calciumtransienten unter Basalbedingung unterscheiden sie sich noch von adulten murinen ventrikulären Kardiomyozyten. Wie bereits in Kapitel 5.2.3 beschrieben, ist die Reaktion auf die β -adrenerge Stimulation bei den murinen ventrikulären Kardiomyozyten ebenfalls noch deutlich stärker ausgeprägt als bei den iPS-Kardiomyozyten (s. Abbildung 15). Mit steigender Kultivierungsdauer ähneln die iPS-Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Calciumtransientenkinetik und ihrer Reaktion auf β -adrenerge Stimulation mehr den adulten murinen ventrikulären Kardiomyozyten.

Insgesamt lässt der Vergleich mit den adulten murinen ventrikulären Kardiomyozyten den Schluss zu, dass die iPS-Kardiomyozyten der mittleren und ältesten Altersgruppe eine Reifungsstufe bezüglich ihrer Calciumtransientenkinetik aufweisen, die eine Vergleichbarkeit mit murinen ventrikulären Kardiomyozyten erlaubt. Dennoch ist zu betonen, dass die in der vorliegenden Arbeit generierten iPS-Kardiomyozyten noch einen wesentlich geringeren

funktionellen Reifegrad aufweisen, was sich unter anderem an der deutlich geringer ausgeprägten Reaktion auf eine β -adrenerge Stimulation zeigt (s. Abbildung 16).

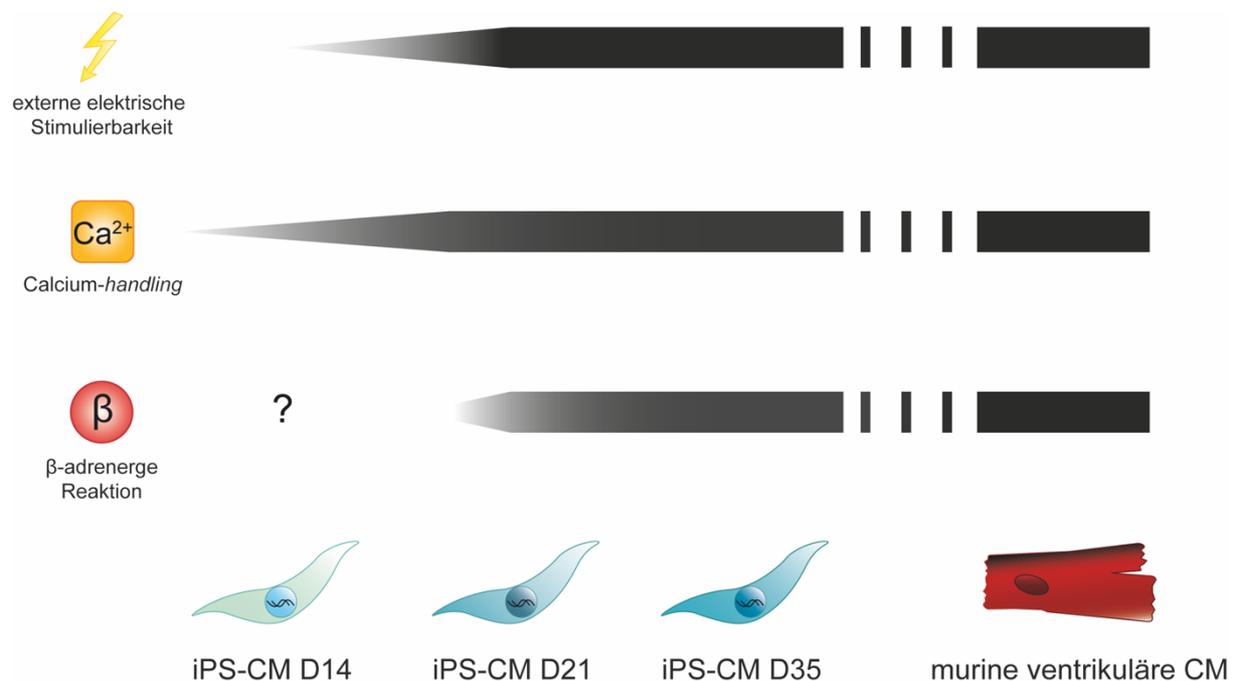


Abbildung 16: Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit

Die iPS-Kardiomyozyten zeigen im Verlauf ihrer Kultivierung eine funktionelle Reifung. Zeigten die iPS-Kardiomyozyten der jüngsten Altersgruppe lediglich spontane Calciumtransienten, so reagierten die iPS-Kardiomyozyten der mittleren Altersgruppe auf eine externe elektrische Feldstimulation. Auch bezogen auf das Calcium-handling, in dieser Arbeit charakterisiert durch die diastolische intrazelluläre Calciumkonzentration, die intrazelluläre Calciumtransientenamplitude und die maximale Geschwindigkeit des Anstiegs sowie des Abfalls der intrazellulären Calciumtransienten, fand eine Reifung hinsichtlich der β-adrenergen Reaktion statt. Mit zunehmendem Alter passten sich die iPS-Kardiomyozyten in Bezug auf ihr Calcium-handling den adulten murinen ventrikulären Kardiomyozyten an. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Fähigkeit der iPS-Kardiomyozyten, auf eine β-adrenerge Stimulation zu reagieren, von Woche drei zu Woche fünf nach dem Differenzierungsstart zunimmt. Doch erreichte die Auswirkung der β-adrenergen Stimulation auf die Calciumtransientenkinetik nicht das Ausmaß wie bei den adulten murinen ventrikulären Kardiomyozyten.

5.3. Ausblick

5.3.1. Limitationen der iPS-Kardiomyozyten

Trotz des enormen Potentials der iPS-Kardiomyozyten stehen der Verwendung im klinischen sowie im experimentellen Kontext einige Limitationen gegenüber.

Wie unter anderem Hartman et al. zeigen konnten, liegt auch nach längerer Kultivierung der iPS-Kardiomyozyten noch ein unreifer Phänotyp vor. Um diese Limitation zu überwinden,

werden zurzeit verschiedene Optimierungen in Bezug auf die Kultivierung vorgenommen. Dazu gehören die Behandlung mit Wachstumsfaktoren, die elektromechanische Konditionierung, sowie die Kultivierung in Umgebungen, welche die Verhältnisse *in vivo* besser abbilden (Hartman et al. 2016). Darauf aufbauend wäre es von großem Interesse, die iPS-Kardiomyozyten nach noch längerer Kultivierung zu untersuchen, um herauszufinden, ob und wann sie einen Zustand der Reifung erreichen, der jenem adulter humaner Kardiomyozyten entspricht (s. Abbildung 16).

Außerdem findet die Reprogrammierung der somatischen Zellen zu iPS-Zellen inkomplett statt und die iPS-Zellen behalten ein epigenetisches Gedächtnis (Knollmann 2013). Nach momentanem Kenntnisstand sind noch weitere Untersuchungen nötig, um zu sagen, ob es möglich ist, sich die epigenetische Regulation der Zellen zum Vorteil zu machen (Hartman et al. 2016). Riedel et al. konnten nachweisen, dass das epigenetische Gedächtnis abhängig von der Herkunft der somatischen Zellen zumindest in Bezug auf ihre elektrophysiologischen Eigenschaften keine Auswirkungen hat (Riedel et al. 2014).

Ein weiteres Problem stellt die hohe Zell-zu-Zell- und Linie-zu-Linie-Variabilität der iPS-Kardiomyozyten dar (Knollmann 2013). Einerseits führt die Variabilität innerhalb einer Zelllinie zu größeren Streuungen der Messergebnisse als bei vergleichbaren reinen Zellkulturen wie zum Beispiel von murinen ventrikulären Kardiomyozyten. Andererseits ist die Vergleichbarkeit von Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen erschwert. Die Variabilität kann reduziert werden, indem die iPS-Kardiomyozyten mit ähnlichen Differenzierungsprotokollen generiert und zu definierten Zeitpunkten untersucht werden (Hwang et al. 2015).

5.3.2. Potential der iPS-Kardiomyozyten

Trotz der zuvor erwähnten Limitationen hinsichtlich der Verwendung der iPS-Kardiomyozyten, bieten sie vielfältige Möglichkeiten sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der klinischen Anwendung.

Zum jetzigen Zeitpunkt stellen iPS-Kardiomyozyten bereits ein erfolgreich angewandtes Modell zur Erforschung kardialer Krankheitsbilder wie erblicher Herzrhythmusstörungen dar (Jones et al. 2016; Singh et al. 2015). So existieren bereits geeignete Zellmodelle für das Long-QT-Syndrom und weitere monogene Herzerkrankungen wie Kanalopathien und Kardiomyopathien (Hartman et al. 2016; Liang et al. 2013; Spencer et al. 2014). Die Bedeutung liegt darin begründet, dass Kardiomyozyten ansonsten nur durch eine Myokardbiopsie gewonnen werden können und ihre Verfügbarkeit dementsprechend gering ist. Somit

erleichtern diese Modelle die Erforschung dieser zum Teil schwerwiegenden Krankheitsbilder enorm.

Darüber hinaus können mithilfe der iPS-Kardiomyozyten Testungen zur Ermittlung der Kardiotoxizität von Medikamenten durchgeführt werden (Knollmann 2013). In den letzten Jahren kamen vor allem Modelle zur Einschätzung der Gefahr von Arrhythmien, zellulärer Toxizität und kontraktile Dysfunktion auf (Sinnecker et al. 2014). Insbesondere ist es bekannt, dass arrhythmogene Substanzen unter anderem die Calciumtransienten verändern, sodass die Analyse dieser nicht nur Aufschluss über die Auswirkungen auf die kardiale Kontraktilität, sondern auch über das arrhythmogene Potential geben kann (Sirenko et al. 2013). Vorteilhaft ist insbesondere, dass die Testungen an den iPS-Kardiomyozyten deutlich weniger aufwändig sind als beispielsweise Langendorff-Analysen von Meerschweinchen-Herzen, welche aufgrund unterschiedlicher Expressionslevel wichtiger Ionenkanäle verglichen mit humanen Kardiomyozyten darüber hinaus ungenauer sind (O'Hara et Rudy 2012).

Doch ist die Verwendung der iPS-Kardiomyozyten nicht nur auf die Grundlagenforschung im Allgemeinen beschränkt. Vielmehr kann ihre Verwendung eine patientenspezifische personalisierte Diagnostik und Therapie in der Medizin ermöglichen (Knollmann 2013). So können beispielweise patientenspezifische Mechanismen, welche zu Arrhythmien führen, erkannt und in einem nächsten Schritt individualisiert therapiert werden (Knollmann 2013).

Da bis heute die Herztransplantation die einzige kausale Therapie bei Herzinsuffizienz darstellt, wird vermehrt daran gearbeitet die iPS-Kardiomyozyten zur Therapie dieser und zur Remuskularisierung nach Myokardinfarkten verwenden zu können (Hartman et al. 2016). Initiale Studien zeigten in Tiermodellen, dass iPS-Kardiomyozyten erfolgreich in infarziertes Gewebe integriert werden konnten und die kontraktile Funktion des Herzens verbesserten (Shiba et al. 2016).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die iPS-Kardiomyozyten vielfältige Möglichkeiten sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der patientenspezifischen Diagnostik und Therapie kardialer Erkrankungen bieten. Doch darf nicht vernachlässigt werden, dass die zum jetzigen Zeitpunkt zu generierenden Kardiomyozyten einen noch zu unreifen Phänotyp besitzen. Demnach ist es von großer Bedeutung, weitere Methoden zu entwickeln mithilfe derer die iPS-Kardiomyozyten zu einem reiferen Phänotyp differenziert werden können.

6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Differenzierungsprotokoll der iPS-Zellen modifiziert nach Zhang et al. 2015	6
Abbildung 2: Schematischer Ablauf der elektromechanischen Kopplung.....	7
Abbildung 3: Regulation der Calciumfreisetzung durch β -adrenerge Stimulation.....	12
Abbildung 4: Differenzierungsprotokoll der iPS-Zellen vom Differenzierungsstart bis zur ersten Passagierung.....	23
Abbildung 5: Kultivierung der iPS-Kardiomyozyten von der ersten bis zur zweiten Passagierung	25
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Messkammer zur Calciumtransientenmessung	28
Abbildung 7: Vorbereitungen zur Calciumtransientenmessung der iPS-Kardiomyozyten	29
Abbildung 8: Vorbereitung der Calciumtransientenmessung der murinen ventrikulären Kardiomyozyten	33
Abbildung 9: Ausgewählte Parameter der Calciumtransienten-Analyse (modifiziert nach IonOptix)	34
Abbildung 10: Beispielhafter Boxplot zur grafischen Darstellung der Ergebnisse	35
Abbildung 11: Repräsentative Beispiele für Calciumtransienten von Indo-1 AM beladenen iPS-Kardiomyozyten zwei Wochen nach dem Differenzierungsstart.....	37
Abbildung 12: Ergebnisse der Calciumtransientenanalyse der iPS-Kardiomyozyten drei Wochen nach dem Differenzierungsstart.....	39
Abbildung 13: Einfluss der Zellkonzentration der iPS-Kardiomyozyten auf die Calciumtransientenkinetik.....	41
Abbildung 14: Ergebnisse der Calciumtransientenanalyse der iPS-Kardiomyozyten fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart.....	45
Abbildung 15: Vergleich der Calciumtransienten der iPS-Kardiomyozyten drei Wochen sowie fünf Wochen nach dem Differenzierungsstart mit denen muriner ventrikulärer Kardiomyozyten	51
Abbildung 16: Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit	63

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW et al. (2007) Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 25: 803–816. doi: 10.1038/nbt1318
- 2) Askoxylakis V, Thieke C, Plegler ST, Most P, Tanner J, Lindel K, Katus HA, Debus J, Bischof M (2010) Long-term survival of cancer patients compared to heart failure and stroke: A systematic review. *BMC Cancer* 10: 105. doi: 10.1186/1471-2407-10-105
- 3) Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR et al. (2017) Heart disease and stroke statistics - 2017 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 135: e146–e603. doi: 10.1161/CIR.0000000000000485
- 4) Benton G, Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Koblinski J (2014) Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv Drug Deliv Rev* 79–80: 3–18. doi: 10.1016/j.addr.2014.06.005
- 5) Bers DM (2001) Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Kluwer Academic, Dordrecht, Niederlande.
- 6) Bers DM (2002) Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415: 198–205. doi: 10.1038/415198a
- 7) Bers DM (2008) Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 70: 23–49. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455
- 8) Bögeholz N, Muszynski A, Pott C (2012) The physiology of cardiac calcium handling. *Wien Med Wochenschr* 162: 278–282. doi: 10.1007/s10354-012-0102-3
- 9) Carpenter MK, Rosler ES, Fisk GJ, Brandenberger R, Ares X, Miura T, Lucero M, Rao MS (2004) Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Dev Dyn* 229: 243–258. doi: 10.1002/dvdy.10431
- 10) Caulfield JB, Leinbach R, Gold H (1976) The relationship of myocardial infarct size and prognosis. *Circulation* 53: 1141-4.
- 11) Chin MH, Pellegrini M, Plath K, Lowry WE (2010) Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 7: 263–269. doi: 10.1016/j.stem.2010.06.019
- 12) de Miguel-Beriain I (2015) The ethics of stem cells revisited. *Adv Drug Deliv Rev* 82–83:

-
- 176–180. doi: 10.1016/j.addr.2014.11.011
- 13) Dobrev D, Wehrens XHT (2018) Mouse models of cardiac arrhythmias. *Circ Res* 123: 332–334. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313406
- 14) Endoh M (2008) Cardiac Ca²⁺ signaling and Ca²⁺ sensitizers. *Circ J* 72: 1915–1925. doi: 10.1253/circj.CJ-08-0838
- 15) Fearnley CJ, Llewelyn Roderick H, Bootman MD (2011) Calcium signaling in cardiac myocytes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: 1–20. doi: 10.1101/cshperspect.a004242
- 16) Feaster TK, Cadar AG, Wang L, Williams CH, Chun YW, Hempel J, Bloodworth N, Merryman WD, Lim CC, Wu JC, Knollmann BC, Hong CC (2015) Matrigel mattress: A method for the generation of single contracting human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res* 117: 995–1000. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307580
- 17) Federation AJ, Bradner JE, Meissner A (2014) The use of small molecules in somatic-cell reprogramming. *Trends Cell Biol* 24: 179–187. doi: 10.1016/j.tcb.2013.09.011
- 18) Fill M, Copello JA (2002) Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* 82: 893–922. doi: 10.1152/physrev.00013.2002
- 19) Garcia MI, Boehning D (2017) Cardiac inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864: 907–914. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.11.017
- 20) Germanguz I, Sedan O, Zeevi-Levin N, Shtrichman R, Barak E, Ziskind A, Eliyahu S, Meiry G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Binah O (2011) Molecular characterization and functional properties of cardiomyocytes derived from human inducible pluripotent stem cells. *J Cell Mol Med* 15: 38–51. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00996.x
- 21) Greber B, Coulon P, Zhang M, Moritz S, Frank S, Müller-Molina AJ, Araúzo-Bravo MJ, Han DW, Pape H-C, Schöler HR (2011) FGF signalling inhibits neural induction in human embryonic stem cells. *EMBO J* 30: 4874–4884. doi: 10.1038/emboj.2011.407
- 22) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440–3450.
- 23) Hartman ME, Dai DF, Laflamme MA (2016) Human pluripotent stem cells: Prospects and challenges as a source of cardiomyocytes for in vitro modeling and cell-based cardiac repair. *Adv Drug Deliv Rev* 96: 3–17. doi: 10.1016/j.addr.2015.05.004
- 24) Hartupee J, Mann DL (2016) Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nat Rev Cardiol* 14: 30–38. doi: 10.1038/nrcardio.2016.163

-
- 25) Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, Melton DA (2008) Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 26: 795–797. doi: 10.1038/nbt1418
- 26) Huebsch N, Loskill P, Mandegar MA, Marks NC, Sheehan AS, Ma Z, Mathur A, Nguyen TN, Yoo JC, Judge LM, Spencer CI, Chukka AC, Russell CR, So P-L, Conklin BR, Healy KE (2015) Automated video-based analysis of contractility and calcium flux in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes cultured over different spatial scales. *Tissue Eng Part C Methods* 21: 467–479. doi: 10.1089/ten.tec.2014.0283
- 27) Hwang HS, Kryshtal DO, Feaster TK, Sánchez-Freire V, Zhang J, Kamp TJ, Hong CC, Wu JC, Knollmann BC (2015) Comparable calcium handling of human iPSC-derived cardiomyocytes generated by multiple laboratories. *J Mol Cell Cardiol* 85: 79–88. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.05.003
- 28) Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N (2000) Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 6: 88–95. doi: 10.1007/bf03401776
- 29) Itzhaki I, Rapoport S, Huber I, Mizrahi I, Zwi-Dantsis L, Arbel G, Schiller J, Gepstein L (2011) Calcium handling in human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *PLoS One* 6: e18037. doi: 10.1371/journal.pone.0018037
- 30) Ivashchenko CY, Pipes GC, Lozinskaya IM, Lin Z, Xiaoping X, Needle S, Grygielko ET, Hu E, Toomey JR, Lepore JJ, Willette RN (2013) Human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes exhibit temporal changes in phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305: H913–H922. doi: 10.1152/ajpheart.00819.2012
- 31) James P, Tada M, Chiesit M, Carafoli E (1989) Nature and site of phospholamban regulation of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 342: 90–92. doi: 10.1038/342090a0
- 32) Jones AR, Edwards DH, Cummins MJ, Williams AJ, George CH (2016) A systemized approach to investigate Ca²⁺ synchronization in clusters of human induced pluripotent stem-cell derived cardiomyocytes. *Front Cell Dev Biol* 3: 89. doi: 10.3389/fcell.2015.00089
- 33) Kadari A, Mekala S, Wagner N, Malan D, Köth J, Doll K, Stappert L, Eckert D, Peitz M, Matthes J, Sasse P, Herzig S, Brüstle O, Ergün S, Edenhofer F (2015) Robust generation of cardiomyocytes from human iPS cells requires precise modulation of BMP and WNT

-
- signaling. *Stem Cell Rev Rep* 11: 560–569. doi: 10.1007/s12015-014-9564-6
- 34) Kajstura J, Gurusamy N, Ogórek B, Goichberg P, Clavo-Rondon C, Hosoda T, D’Amario D, Bardelli S, Beltrami AP, Cesselli D, Bussani R, Del Monte F, Quaini F, Rota M, Beltrami CA, Buchholz BA, Leri A, Anversa P (2010a) Myocyte turnover in the aging human heart. *Circ Res* 107: 1374–1386. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.231498
- 35) Kajstura J, Urbanek K, Perl S, Hosoda T, Zheng H, Ogórek B, Ferreira-Martins J, Goichberg P, Rondon-Clavo C, Sanada F, D’Amario D, Rota M, Del Monte F, Orlic D, Tisdale J, Leri A, Anversa P (2010b) Cardiomyogenesis in the adult human heart. *Circ Res* 107: 305–315. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223024
- 36) Kamakura T, Makiyama T, Sasaki K, Yoshida Y, Wuriyanghai Y, Chen J, Hattori T, Ohno S, Kita T, Horie M, Yamanaka S, Kimura T (2013) Ultrastructural maturation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a long-term culture. *Circ J* 77: 1307–1314. doi: 10.1253/circj.CJ-12-0987
- 37) Kane C, Couch L, Terracciano CMN (2015) Excitation-contraction coupling of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Front Cell Dev Biol* 3: 59. doi: 10.3389/fcell.2015.00059
- 38) Karakikes I, Ameen M, Termglinchan V, Wu JC (2015) Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Insights into molecular, cellular, and functional phenotypes. *Circ Res* 117: 80–88. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.305365
- 39) Kim K, Zhao R, Doi A, Ng K, Unternaehrer J, Cahan P, Hongguang H, Loh YH, Aryee MJ, Lensch MW, Li H, Collins JJ, Feinberg AP, Daley GQ (2011) Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29: 1117–1119. doi: 10.1038/nbt.2052
- 40) Kleinman HK, Martin GR (2005) Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* 15: 378–386. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.05.004
- 41) Knollmann BC (2013) Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Boutique science or valuable arrhythmia model? *Circ Res* 112: 969–976. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300567
- 42) Kolanowski TJ, Antos CL, Guan K (2017) Making human cardiomyocytes up to date: Derivation, maturation state and perspectives. *Int J Cardiol* 241: 379–386. doi: 10.1016/j.ijcard.2017.03.099
- 43) Kong CW, Akar FG, Li RA (2010) Translational potential of human embryonic and induced pluripotent stem cells for myocardial repair: Insights from experimental models. *Thromb*

-
- Haemost 104: 30–38. doi: 10.1160/TH10-03-0189
- 44) Lee YK, Ng KM, Lai WH, Chan YC, Lau YM, Lian Q, Tse HF, Siu CW (2011) Calcium homeostasis in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Rev Rep* 7: 976–986. doi: 10.1007/s12015-011-9273-3
- 45) Li L, Desantiago J, Chu G, Kranias EG, Bers DM (2000) Phosphorylation of phospholamban and troponin I in β -adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H769–H779. doi: 10.1152/ajpheart.2000.278.3.h769
- 46) Liang P, Lan F, Lee AS, Gong T, Sanchez-Freire V, Wang Y, Diecke S, Sallam K, Knowles JW, Wang PJ, Nguyen PK, Bers DM, Robbins RC, Wu JC (2013) Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity. *Circulation* 127: 1677–1691. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001883
- 47) Louch WE, Stokke MK, Sjaastad I, Christensen G, Sejersted OM (2012) No Rest for the weary: Diastolic calcium homeostasis in the normal and failing myocardium. *Physiology (Bethesda)* 27: 308–323. doi: 10.1152/physiol.00021.2012
- 48) Lundy SD, Zhu W-Z, Regnier M, Laflamme MA (2013) Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 22: 1991–2002. doi: 10.1089/scd.2012.0490
- 49) MacLennan DH, Kranias EG (2003) Phospholamban: A crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 566–577. doi: 10.1038/nrm1151
- 50) Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosembliit N, Marks AR (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): Defective regulation in failing hearts. *Cell* 101: 365–376. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80847-8
- 51) Moore K, Persaud T, Torchia M, Viebahn C (2013) Funktionelle Prinzipien der Entwicklungsbiologie. In: Moore K, Persaud T, Torchia M, Viebahn C (Hrsg.) *Embryologie*, 6. Auflage, Elsevier, München, Deutschland, S. 555-569
- 52) Mosterd A, Hoes AW (2007) Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 93: 1137–1146. doi: 10.1136/hrt.2003.025270
- 53) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26: 101–106. doi: 10.1038/nbt1374

-
- 54) Nerbonne JM (2004) Studying cardiac arrhythmias in the mouse - A reasonable model for probing mechanisms? *Trends Cardiovasc Med* 14: 83–93. doi: 10.1016/j.tcm.2003.12.006
- 55) Nerbonne JM, Kass RS (2005) Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 85: 1205–1253. doi: 10.1152/physrev.00002.2005
- 56) Norström A, Åkesson K, Hardarson T, Hamberger L, Sartipy P (2006) Molecular and pharmacological properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Exp Biol Med (Maywood)* 231: 1753–1762. doi: 10.1177/153537020623101113
- 57) O'Hara T, Rudy Y (2012) Quantitative comparison of cardiac ventricular myocyte electrophysiology and response to drugs in human and nonhuman species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H1023–H1030. doi: 10.1152/ajpheart.00785.2011
- 58) Ohi Y, Qin H, Hong C, Blouin L, Polo JM, Guo T, Qi Z, Downey SL, Manos PD, Rossi DJ, Yu J, Hebrok M, Hochedlinger K, Costello JF, Song JS, Ramalho-Santos M (2011) Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat Cell Biol* 13: 541–549. doi: 10.1038/ncb2239
- 59) Pan F, Zhang M, Wu G, Lai Y, Greber B, Schöler HR, Chi L (2013) Topographic effect on human induced pluripotent stem cells differentiation towards neuronal lineage. *Biomaterials* 34: 8131–8139. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.025
- 60) Peischard S, Piccini I, Strutz-Seebohm N, Greber B, Seebohm G (2017) From iPSC towards cardiac tissue—a road under construction. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 469: 1233–1243. doi: 10.1007/s00424-017-2003-1
- 61) Phanstiel DH, Brumbaugh J, Wenger CD, Tian S, Probasco MD, Bailey DJ, Swaney DL, Tervo MA, Bolin JM, Ruotti V, Stewart R, Thomson JA, Coon JJ (2011) Proteomic and phosphoproteomic comparison of human ES and iPS cells. *Nat Methods* 8: 821–827. doi: 10.1038/nmeth.1699
- 62) Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF et al. (2016) 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* 37: 2129–2200. doi: 10.1093/eurheartj/ehw128
- 63) Riedel M, Jou CJ, Lai S, Lux RL, Moreno AP, Spitzer KW, Christians E, Tristani-Firouzi M, Benjamin IJ (2014) Functional and pharmacological analysis of cardiomyocytes differentiated from human peripheral blood mononuclear-derived pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 3: 131–141. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.04.017
- 64) Rosemblyt N, Moschella MC, Ondriašová E, Gutstein DE, Ondriaš K, Marks AR (1999)

- Intracellular calcium release channel expression during embryogenesis. *Dev Biol* 206: 163–177. doi: 10.1006/dbio.1998.9120
- 65) Schulte JS, Seidl MD, Nunes F, Freese C, Schneider M, Schmitz W, Müller FU (2012) CREB critically regulates action potential shape and duration in the adult mouse ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H1998–H2007. doi: 10.1152/ajpheart.00057.2011
- 66) Seki S, Nagashima M, Yamada Y, Tsutsuura M (2003) Fetal and postnatal development of Ca²⁺ transients and Ca²⁺ sparks in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 58: 535–548.
- 67) Sheridan SD, Surampudi V, Rao RR (2012) Analysis of embryoid bodies derived from human induced pluripotent stem cells as a means to assess pluripotency. *Stem Cells Int* 2012:. doi: 10.1155/2012/738910
- 68) Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H et al. (2016) Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 538: 388–391. doi: 10.1038/nature19815
- 69) Shinozawa T, Imahashi K, Sawada H, Furukawa H, Takami K (2012) Determination of appropriate stage of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for drug screening and pharmacological evaluation in vitro. *J Biomol Screen* 17: 1192–1203. doi: 10.1177/1087057112449864
- 70) Singh VK, Kalsan M, Kumar N, Saini A, Chandra R (2015) Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front Cell Dev Biol* 3: 1–18. doi: 10.3389/fcell.2015.00002
- 71) Sinnecker D, Laugwitz KL, Moretti A (2014) Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for drug development and toxicity testing. *Pharmacol Ther* 143: 246–252. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.03.004
- 72) Sirenko O, Crittenden C, Callamaras N, Hesley J, Chen YW, Funes C, Rusyn I, Anson B, Cromwell EF (2013) Multiparameter in vitro assessment of compound effects on cardiomyocyte physiology using iPSC cells. *J Biomol Screen* 18: 39–53. doi: 10.1177/1087057112457590
- 73) Skalova S, Svadlakova T, Qureshi WMS, Dev K, Mokry J (2015) Induced pluripotent stem cells and their use in cardiac and neural regenerative medicine. *Int J Mol Sci* 16: 4043–4067. doi: 10.3390/ijms16024043
- 74) Spencer CI, Baba S, Nakamura K, Hua EA, Sears MAF et al. (2014) Calcium transients closely reflect prolonged action potentials in iPSC models of inherited cardiac arrhythmia. *Stem Cell Reports* 3: 269–281. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.06.003

-
- 75) Statistisches Bundesamt (Destatis) (2019) Statistisches Jahrbuch 2019, S. 138 - 139.
- 76) Stehle R, Iorga B (2010) Kinetics of cardiac sarcomeric processes and rate-limiting steps in contraction and relaxation. *J Mol Cell Cardiol* 48: 843–850. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.12.020
- 77) Tadross MR, Johny M Ben, Yue DT (2010) Molecular endpoints of Ca²⁺/calmodulin- and voltage-dependent inactivation of Cav1.3 channels. *J Gen Physiol* 135: 197–215. doi: 10.1085/jgp.200910308
- 78) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861–872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019
- 79) Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- 80) Tang W, Halling DB, Black DJ, Pate P, Zhang JZ, Pedersen S, Altschuld RA, Hamilton SL (2003) Apocalmodulin and Ca²⁺-calmodulin-binding sites on the Ca V1.2 channel. *Biophys J* 85: 1538–1547. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74586-X
- 81) ter Keurs HEDJ (2012) The interaction of Ca²⁺ with sarcomeric proteins: Role in function and dysfunction of the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H38–H50. doi: 10.1152/ajpheart.00219.2011
- 82) Thomson JA, Thomson JA, Itskovitz-eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145–1147. doi: 10.1126/science.282.5391.1145
- 83) Uesugi M, Ojima A, Taniguchi T, Miyamoto N, Sawada K (2014) Low-density plating is sufficient to induce cardiac hypertrophy and electrical remodeling in highly purified human iPS cell-derived cardiomyocytes. *J Pharmacol Toxicol Methods* 69: 177–188. doi: 10.1016/j.vascn.2013.11.002
- 84) Viatchenko-Karpinski S, Fleischmann BK, Liu Q, Sauer H, Gryshchenko O, Ji GJ, Hescheler J (1999) Intracellular Ca²⁺ oscillations drive spontaneous contractions in cardiomyocytes during early development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8259–8264. doi: 10.1073/pnas.96.14.8259
- 85) Wang SQ, Song LS, Lakatta EG, Cheng H (2001) Ca²⁺ signalling between single L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in heart cells. *Nature* 410: 592–596. doi: 10.1038/35069083

-
- 86) Watanabe H, Honda Y, Deguchi J, Yamada T, Bando K (2017) Usefulness of cardiotoxicity assessment using calcium transient in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Toxicol Sci* 42: 519–527. doi: 10.2131/jts.42.519
- 87) Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi JB, Nishikawa S, Nishikawa SI, Muguruma K, Sasai Y (2007) A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 25: 681–686. doi: 10.1038/nbt1310
- 88) Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN (2010) Cell death in the pathogenesis of heart disease: Mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* 72: 19–44. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163111
- 89) Wu H, Lee J, Vincent LG, Wang Q, Gu M, Lan F, Churko JM, Sallam KI, Matsa E, Sharma A, Gold JD, Engler AJ, Xiang YK, Bers DM, Wu JC (2015) Epigenetic regulation of phosphodiesterases 2A and 3A underlies compromised β -adrenergic signaling in an iPSC model of dilated cardiomyopathy. *Cell Stem Cell* 17: 89–100. doi: 10.1016/j.stem.2015.04.020
- 90) Xiao RP, Hohl C, Altschuld R, Jones L, Livingston B, Ziman B, Tantini B, Lakatta EG (1994) β 2-Adrenergic receptor-stimulated increase in cAMP in rat heart cells is not coupled to changes in Ca^{2+} dynamics, contractility, or phospholamban phosphorylation. *J Biol Chem* 269: 19151–19156.
- 91) Yang X, Pabon L, Murry CE, Wang G, Jacquet L et al. (2014) Engineering Adolescence: Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes Xiulan. *Circ Res* 114: 511–523. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.300558.Engineering
- 92) Zhang J, Klos M, Wilson GF, Herman AM, Lian X, Raval KK, Barron MR, Hou L, Soerens AG, Yu J, Palecek SP, Lyons GE, Thomson JA, Herron TJ, Jalife J, Kamp TJ (2012) Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: The matrix sandwich method. *Circ Res* 111: 1125–1136. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.273144
- 93) Zhang M, Schulte JS, Heinick A, Piccini I, Rao J, Quaranta R, Zeuschner D, Malan D, Kim K-P, Röpke A, Sasse P, Araúzo-Bravo M, Seebohm G, Schöler H, Fabritz L, Kirchhof P, Müller FU, Greber B (2015) Universal cardiac induction of human pluripotent stem cells in two and three-dimensional formats: Implications for in vitro maturation. *Stem cells* 33: 1456–1469. doi: 10.1002/stem.1964
- 94) Zhang X-H, Haviland S, Wei H, Saric T, Fatima A, Hescheler J, Cleemann L, Morad M

(2013) Ca²⁺ signaling in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iPS-CM) from normal and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT)-afflicted subjects. *Cell Calcium* 54: 57–70. doi: 10.1016/j.ceca.2013.04.004

8. DANKSAGUNG

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller, für die Überlassung des Themas sowie die hervorragende und freundliche Betreuung sowohl in der experimentellen Phase dieser Arbeit als auch danach. Insbesondere für die kritische Diskussion der Ergebnisse und die wegweisenden Ideen bin ich sehr dankbar.

Mein größter Dank richtet sich ebenfalls an Frau Dr. rer. nat. Edda Fehrmann für die ausgezeichnete und freundschaftliche Betreuung sowie für ihre unermüdliche Unterstützung sowohl innerhalb als auch außerhalb des Labors.

In aller Herzlichkeit möchte ich ebenfalls Frau Andrea Traupe für ihre Anleitung und Hilfe bei der Arbeit mit den Zellkulturen danken. Ich danke außerdem Frau Melanie Voß für die Isolation der murinen ventrikulären Kardiomyozyten. Mein Dank gilt uneingeschränkt den gesamten Mitarbeitern/Mitarbeiterinnen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für ihre Unterstützung und für die freundliche Zusammenarbeit.

Insbesondere möchte ich meiner Familie und meinen Freunden dafür danken, dass sie mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben und ich mich immer auf sie verlassen kann.

9. LEBENSLAUF
