Aus dem Institut für Molekular- und Zellphysiologie
der Medizinischen Hochschule Hannover

Maturierung von Kardiomyozyten aus humanen embryonalen Stammzellen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von
Stephan Greten aus Friesoythe

Hannover 2017

Angenommen vom Senat: 11.07.2018

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med Christopher Baum
Wissenschaftliche Betreuung: Prof.‘in Dr. rer. nat. Theresia Kraft

1. Referent: Prof. Dr. rer. nat. Falk Büttner
2. Referent: Prof. Dr. med. Kai Wollert

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2018
Prüfungsausschuss
Vorsitz: Prof. Dr. rer. nat. Evgeni Ponimaskin
1. Prüfer: Prof.‘in Dr. rer. nat. Rita Gerardy-Schahn
2. Prüfer: Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schwinzer

In Gedenken an

Prof. Dr. med. Bernhard Brenner

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 7

1 Einleitung 10

1.1 Kardiomyozyten aus humanen embryonalen und induzierten Stammzellen 10

1.2 Morphologische und funktionelle Charakteristika adulter humaner Kardiomyozyten 13

1.3 Einfluss von Schilddrüsenhormonen auf Kardiomyozyten 16

1.4 Zielsetzungen dieser Dissertation 18

2 Material und Methoden 19

2.1 Verwendete Materialen 19

2.1.1 Chemikalien 19

2.1.2 Lösungen 20

2.1.3 Verbrauchmaterialien 21

2.1.4 Antikörper 21

2.1.5 Hardware/Software 21

2.2 Zellkultur von hESC- und hiPS-Kardiomyozyten 22

2.2.1 Differenzierung und Anreicherung von hESC-Kardiomyozyten 22

2.2.2 Langzeitkultivierung von hESC-Kardiomyozyten in *Cardiac Bodies* und auf Laminin-beschichteten Deckgläsern 23

2.2.3 Kultivierung von hESC-Kardiomyozyten mit *T4* 24

2.2.4 Differenzierung und Kultivierung von hiPS-Kardiomyozyten 25

2.3 Immunfluoreszenzfärbung 25

2.3.1 Entwicklung eines spezifischen Antikörpers gegen α-Myosin 26

2.3.2 Färbung von hESC- und hiPS-Kardiomyozyten 27

2.3.3 Färbung von Gefrierschnitten aus humanem atrialen Myokard 27

2.3.4 Analysen der Immunfluoreszenzfärbungen 28

2.3.4.1 Analyse des Crosstalk 28

2.3.4.2 Ermittlung der Zellzahl und des Anteils von hESC-Kardiomyozyten auf Deckgläsern 31

2.3.4.3 Morphologische Analyse 32

2.4 Wiederfindung von Einzelzellen nach der funktionellen Messung und Immunfluoreszenzfärbung 33

2.5 Funktionelle Analysen an hESC-Kardiomyozyten 35

2.5.1 Analyse der Kontraktion und Relaxation mittels *edge detection* 35
2.5.2 Analyse der Calciumtransienten 37
2.6 Statistische Analysen 40
3 Ergebnisse 41
3.1 Etablierung der Methodik 41
3.1.1 Spezifität der Antikörper gegen α- bzw. β-Myosin 41
3.1.2 Wiederfindung und Charakterisierung funktionell analysierter hESC-Kardiomyozyten 44
3.2 Langzeitkultivierung von hESC-Kardiomyozyten unter verschiedenen Bedingungen 45
3.2.1 Veränderung der α- und β-Myosin-Expression 45
3.2.2 Myosin-Expression in gemischt α- und β-Myosin exprimierenden hESC-Kardiomyozyten 48
3.2.3 Anzahl von hESC-Kardiomyozyten an der Gesamtzahl der Zellen auf Laminin-beschichteten Deckgläsern 50
3.2.4 Morphologie der hESC-Kardiomyozyten 52
3.3 Kultivierung von hESC-Kardiomyozyten mit *T4* 58
3.3.1 Myosin-Expression in hESC-Kardiomyozyten unter Einfluss von *T4* 58
3.3.2 Einfluss von *T4* auf die Morphologie von hESC-Kardiomyozyten 59
3.3.3 Einfluss von *T4* auf die Funktion von hESC-Kardiomyozyten 62
3.3.3.1 Spontane Kontraktionen der hESC-Kardiomyozyten 62
3.3.3.2 Effekt einer unvollständigen Umwaldung zu rein α-Myosin-positiven hESC-Kardiomyozyten auf die Kontraktionseigenschaften 62
3.3.3.3 Kontraktilität von α-Myosin-positiven hESC-Kardiomyozyten unter *T4*-Einfluss verglichen mit rein β-Myosin-positiven Zellen ohne *T4*-Einfluss 64
3.3.3.4 Effekt der Myosin-Isoform auf die Kontraktilität von hESC-Kardiomyozyten ohne Kultivierung mit *T4* 66
3.3.3.5 Calciumtransienten von hESC-Kardiomyozyten nach Kultivierung mit *T4* 68
4 Diskussion 72
4.1 Kritische Diskussion der Methodik 72
4.1.1 Validierung der Antikörperspezifität 72
4.1.2 Analyse des *Crosstalks* 72
4.1.3 Wiederfindung von Einzelzellen an verschiedenen Mikroskopen 73
4.2 Charakterisierung von hESC-Kardiomyozyten nach unterschiedlicher Kultivierung 75

4.2.1 Selektion oder tatsächlicher Wechsel der Myosin-Isoform? 75
4.2.2 Einfluss anderer Kultivierungsmethoden auf die Myosin-Expression 77
4.2.2.1 Die Mechanotransduction als Ursache des Wechsels der Myosin-Isoform? 78
4.2.2.2 Regulation der Myosin-Expression durch miRNAs 82
4.2.3 Morphologische Entwicklung von hESC-Kardiomyozyten 84
4.2.3.1 Effekte unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen 84
4.2.3.2 Mechanismen für eine Veränderung der Morphologie 86
4.3 Maturierung von hESC-Kardiomyozyten durch *T4*? 87
4.3.1 Veränderungen der Myosin-Isoform und Morphologie 87
4.3.2 Spontane Kontraktionen von hESC-Kardiomyozyten 90
4.3.3 Einfluss von *T4* auf die Kontraktion und Calciumtransienten 91
4.3.4 Maturierung von hESC-Kardiomyozyten durch T4 94
4.4 Ausblick 95
5 Zusammenfassung 98
6 Literaturverzeichnis 100
Lebenslauf 118
Eidesstattliche Erklärung 120
Danksagung 123

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
BIN1	bridging integrator-1
BSA	Bovines Serumalbumin
bSF	Basic Serum-Free
bzw.	beziehungsweise
c-Myc	Cellular myelocytomatosis-oncogene
c-SRC	Tyrosinkinase Src
CALR	Calreticulin
CARP	kardiales Ankyrin-Repeat Protein
CHIR	CHIR99021
CSQ	Calsequestrin
cTnC	Cardiac Troponin C
cTnI	Cardiac Troponin I
cTnT	Cardiac Troponin T
DAPI	4,6-Diamidino-phenylindol
di-8-ANEPPs	di-8-butyl-amino-naphthyl-ethylene-pyridinium-propyl-sulfonate
D1	5‘-Deiodinase vom Typ 1
D2	5‘-Deiodinase vom Typ 2
ERK1/2	extracellular-signal regulated kinase 1/2
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FITC	Fluorescein
FKS	Fetales Kälberserum
G418	Geneticin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HCN-Kanal	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel
hESC-Kardiomyozyten	Kardiomyozyten abgeleitet aus humanen embryonale Stammzellen

(hESC-CM)	
hiPS-Kardiomyozyten (hiPS-CM)	Kardiomyozyten abgeleitet aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen
hES-Zellen	Humane embryonale Stammzellen
hiPS-Zellen	Humane induzierte pluripotente Stammzellen
Hz	Hertz
ILK	Integrin-linked Kinase
IWP	Inhibitor of Wnt production
IWR	Inhibitor of Wnt response
KHK	Koronare Herzkrankheit
Kir	Kalium inward rectifier
Klf4	Krüppel-like family of transcription factor 4
LIN28	Cell lineage abnormal 28
MAPK	P38-mitogenaktivierte Proteinkinase
MARPs	Muskel Ankyrin-Repeat Proteine
mESC-Kardiomyozyten	Kardiomyozyten abgeleitet aus murinen embryonalen Stammzellen
mES-Zellen	Murine embryonale Stammzellen
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
MI	Myokardinfarkt
miRNA	Micro RNA
MLC-2a/v	Atriale/ ventrikuläre regulatorische leichte Myosinkette
MLP	Muskel LIM Protein
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µm²	Quadratmikrometer
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
ms	Millisekunden
MuRF-1	Muskel Ring-finger Protein-1
MYH6	Myosin heavy chain 6 – α-Myosin-Gen
MYH7	Myosin heavy chain 7 – β-Myosin-Gen
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
NF-AT3	Nuclear factor of activated T-cells 3

nm	Nanometer
nM	Nanomolar
Oct3/4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor3/4
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDMS-Membranen	Polydimethylsiloxan-Membranen
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
pHH3	Phosphohiston 3
PI3k	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB bzw. Akt	Proteinkinase B
PMCA	Plasma membrane Calcium-ATPase
RISC	RNA-induced silencing complex
RyR2	Ryanodin-Rezeptor 2
SERCA	Calciumpumpe des Sarkoplasmatischen Retikulums
Sox-2	Sex determining region Y-Box 2
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T-Tubuli	Transversale Tubuli
T3	Trijodthyroinin
T4	Tetrajodthyronin (L-Thyroxin)
TAK1	Transforming Growth Factor beta-activated Kinase 1
TGF-β	Transforming growth factor-β
THRAP1	Schilddrüsenhormonrezeptor assoziiertes Protein 1
TR	Thyroid hormone receptor
TRE	*T3* responsive Elemente
TRITC	Tetramethylrhodamine
V	Volt
Wnt	Wingless Int-1

1 Einleitung

1.1 Kardiomyozyten aus humanen embryonalen und induzierten Stammzellen

Humane pluripotente Stammzellen sind entweder embryonalen Ursprungs (humane embryonale Stammzellen (hES-Zellen)) oder durch Reprogrammierung entstanden (humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPS-Zellen)) und ermöglichen eine unlimitierte *in vitro* Produktion von Kardiomyozyten (hESC- und hiPS-Kardiomyozyten). Die generierten hESC- und hiPS-Kardiomyozyten sind eine hoffnungsvolle Quelle für den regenerativen Zellersatz [9]. Aufgrund ihrer hohen Lebenszeitprävalenz werden Herzerkrankungen, wie die koronare Herzkrankheit (KHK) mit 8% und der Myokardinfarkt (MI) mit 4,7%, zu den Volkskrankheiten gezählt [25]. Da die Proliferations- und somit die Regenerationsfähigkeit adulter humaner Kardiomyozyten limitiert ist, können degenerative Prozesse oder ischämische Ereignisse im Verlauf dieser Erkrankungen zu einem irreversiblen Gewebsverlust führen [6, 93]. Die infolge dieses Gewebsverlustes entstehende akute oder chronische Herzinsuffizienz kann schließlich in einem Herzversagen enden. Die aktuellen Therapieoptionen umfassen eine symptomatische medikamentöse Behandlung sowie interventionelle und operative Verfahren [134]. Die als Ultima Ratio angewandte Herztransplantation ist zurzeit die einzig kausale Therapie, die aber aufgrund zahlreicher Kontraindikationen, Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie und geringer Ressourcen keine massentaugliche Behandlungsmöglichkeit ist [134, 135]. Aus diesen Gründen sind ischämische Herzerkrankungen, wie die KHK mit einem Anteil von 8,2% und der MI mit einem Anteil von 5,8%, im Jahre 2013 weiterhin die führende Todesursache in Deutschland [25].
Durch die Generierung und Transplantation von hESC- und hiPS-Kardiomyozyten könnte zukünftig eine zweite kausale Therapieoption als Alternative zur Herztransplantation zur Verfügung stehen. Insbesondere die patientenspezifischen hiPS-Kardiomyozyten scheinen für den regenerativen Zellersatz in Frage zu kommen, da eine Abstoßungsreaktion aufgrund ihrer Immunkompatibilität nicht zu erwarten ist und demzufolge keine immunsuppressive Therapie erforderlich wäre [48].

Darüber hinaus bieten hESC- und hiPS-Kardiomyozyten aussichtsvolle Möglichkeiten für *in vitro* Krankheitsmodelle [96, 230]. Einige Hindernisse erschweren die Untersuchungen zur Pathophysiologie hereditärer kardialer Erkrankungen, wie der familiären hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) [130]. Hierzu zählen insbesondere der limitierte Zugang zu ausreichendem Patientenmaterial, namentlich kryokonservierte Myokardproben aus Myektomien und Explantaten, und

die eingeschränkte Aussagekraft aufgrund von sekundären Adaptationen der Kardiomyozyten. Auch Tiermodelle, wie Maus- oder Rattenmodelle, sind aufgrund ihrer nicht äquivalenten Myosin-Isoform und Physiologie nur bedingt als Krankheitsmodell geeignet [124].
Patientenspezifische, mutationstragende hiPS-Kardiomyozyten produziert aus dermalen Fibroblasten oder anderen Ursprungszellen könnten nicht nur ausreichend Zellmaterial bereitstellen, sondern auch longitudinale Studien zur Pathophysiologie von Erkrankungen ermöglichen. Einige Arbeitsgruppen analysierten bereits hiPS-Kardiomyozyten von Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM), dem Long-QT-Syndrom und der HCM und wiesen funktionelle Anomalien der mutationstragenden Zellen nach [89, 107, 197].

1981 wurden erstmals murine embryonale Stammzellen (mES-Zellen) aus der inneren Zellschicht von murinen Blastozysten, dem Embryoblasten, nach *in vitro* Fertilisation gewonnen und kultiviert [52]. Zentrale Charakteristika der mES-Zellen sind die unbegrenzte Teilungsfähigkeit, die stabile Chromosomenzahl und die Pluripotenz. Pluripotenz bezeichnet die Fähigkeit der mES-Zellen, sich zu Zellen aller drei Keimblätter sowie zu Zellen der Keimbahn zu differenzieren. In den darauffolgenden Jahren gelang unter Einsatz spezifischer Kultivierungsmedien die gezielte Differenzierung der mES-Zellen zu Kardiomyozyten (mESC-Kardiomyozyten), die üblicherweise einen sehr heterogenen Phänotyp aufwiesen [46, 218].
Im Jahre 1998 generierten und kultivierten Thomson et al. die ersten hES-Zellen aus humanen Blastozysten, die zystische Zellverbände bestehend aus Zellen aller drei Keimblätter bildeten, sogenannte *Embryoid Bodies* [88, 204]. In diesen *Embryoid Bodies* konnten auch spontan schlagende, α-Aktin positive Bereiche als Zeichen einer kardialen Differenzierung der Zellen nachgewiesen werden. Nachdem der Einfluss einiger Wachstumsfaktoren auf die Differenzierung der hES-Zellen analysiert worden war, konnten mithilfe spezifischer Kultivierungsbedingungen, wie der Ko-Kultivierung mit anderen Zellen, hESC-Kardiomyozyten generiert werden [96, 185].

Im Gegensatz zu den m/hES-Zellen entstehen iPS-Zellen durch Reprogrammierung. Takahashi und Yamanaka konnten 2006 durch Umprogrammieren von mES-Zellen sowie adulten Mausfibroblasten erstmalig murine iPS-Zellen generieren [200]. Das Umprogrammieren gelang über eine retroviral-vermittelte Transfektion von Vektoren, die die Expression der Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 steigerten. Oct3/4 sowie Sox2 sind Transkriptionsfaktoren, die für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz in frühen Embryonen und m/hES-Zellen verant-

wortlich sind [4, 144]. Die Gene Klf4 und c-Myc, welche im Tumorgewebe häufig hochreguliert sind, dienen der Erhaltung der Proliferation und des Phänotyps von m/hES-Zellen [32, 116].

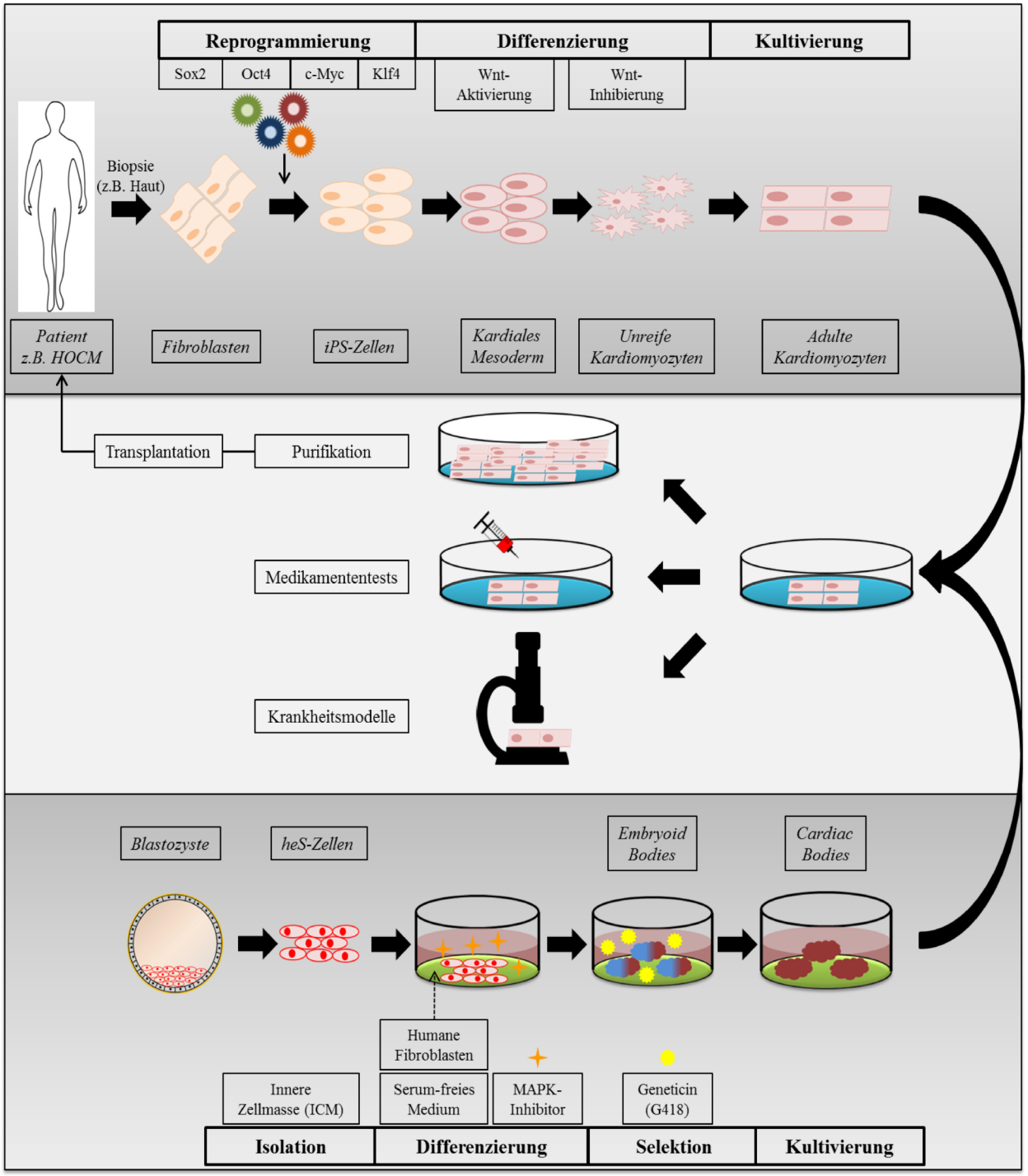


Abbildung 1: Überblick zur Generierung von hES- und hiPS-Kardiomyocyten.

Im darauffolgenden Jahr wurden mithilfe der identischen Methode von Takahashi et al. hiPS-Zellen aus humanen dermalen Fibroblasten generiert [199]. Da c-Myc auch die Apoptose und

Differenzierung von hES-Zellen induzierte und demnach die Entwicklung zu hiPS-Zellen erschwerte, nutzten Yu et al. zur Produktion von hiPS-Zellen eine Kombination der Faktoren Oct3/4, Sox2, NANOG und LIN28 [195, 230]. Mittlerweile wurde eine Vielzahl von Methoden publiziert, um iPS-Zellen zu generieren [225]. Die Differenzierung von hiPS-Zellen zu hiPS-Kardiomyozyten wurde wenig später unter Verwendung eines speziellen Differenzierungsmediums, welches unter anderem fetales Kälberserum (FKS) enthielt, realisiert [132].

Seither wurden die Methoden zur Differenzierung von hESC- und hiPS-Kardiomyozyten deutlich weiterentwickelt [201]. Der Einsatz eines *basic serum free*-Mediums (*bSF*-Medium) in Kombination mit dem Prostaglandin I2 und einem Inhibitor der p38 mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), SB203580, erwies sich über viele Jahre als effektive Differenzierungsmethode ([223]; Abb. 1). Die Ausbeute an Kardiomyozyten konnte durch eine Methode zur Anreicherung zusätzlich gesteigert werden [105, 224]. Hierfür wurde ein Neomycin-Resistenz-Gen durch Transfektion in den Promoter des α-Myosin-Gens (*MYH6*) eingebracht. Die anschließende Behandlung mit dem Antibiotikum Geneticin (G418) überlebten somit nur Kardiomyozyten, die *MYH6* exprimierten.
Die aktuellsten Differenzierungsansätze nutzen die Modulation des *Wnt*-Signalweges, der eine zentrale Rolle bei der mesodermalen Differenzierung von hES-Zellen spielt [26, 196]. Zur koordinierten Modulation des *Wnt*-Signalweges werden niedermolekulare Verbindungen, sogenannte *small molecules*, eingesetzt ([66]; Abb. 1). Im Anschluss an eine initiale Aktivierung des Signalweges mit GSK3-Inhibitor CHIR99021 (CHIR) erfolgt dabei eine Inhibition mit *inhibitor of Wnt production* (*IWP*) oder *inhibitor of Wnt response* (*IWR*). Durch eine Kombination der präzisen Modulation des *Wnt*-Signalweges mit der Inaktivierung des *Transforming Growth Factor-β* (*TGF-β*) und der Aktivierung des Sonic-Hedgehog-Signalweges konnten schließlich hESC- und hiPS-Kardiomyozyten mit einer Reinheit von über 90% generiert werden [55].

1.2 Morphologische und funktionelle Charakteristika adulter humaner Kardiomyozyten

Aus der Generierung und Differenzierung ging bisher eine heterogene Gruppe von hESC- oder hiPS-Kardiomyozyten hervor, die adulten humanen Kardiomyozyten kaum ähnelte. Um den Einsatz dieser Kardiomyozyten als Zellersatz oder Krankheitsmodell zu ermöglichen, sollte idealerweise eine Entwicklung zu adulten Kardiomyozyten mithilfe spezifischer Kultivierungsmethoden erreicht werden.

Verschiedenste morphologische und funktionelle Charakteristika determinieren den Phänotyp eines humanen adulten Kardiomyozyten. Typischerweise zeigen diese Kardiomyozyten eine längliche Form mit einer Fläche von ungefähr 1800µm² und weisen in 25% aller Fälle mehr als einen Zellkern auf [148]. Darüber hinaus exprimieren adulte Kardiomyozyten je nach Lokalisation spezifische Proteine, zu denen das α-/ β-Myosin, die atriale/ ventrikuläre regulatorische leichte Myosinkette (MLC-2a/v), das α-kardiale Aktin, die kardialen Troponine I (cTnI), C (TnC) und T (cTnT) zählen [67, 158, 198]. Im Gegensatz zu den letztgenannten Proteinen, welche unspezifische kardiale Marker darstellen, sind sowohl β-Myosin als auch MLC-2v spezifische Marker für ventrikuläre Kardiomyozyten. Neben der bloßen Expression zeichnen sich adulte Kardiomyozyten durch eine typische intrazelluläre Anordnung der kontraktilen Proteine aus. Diese formieren sich in sogenannten Sarkomeren und bilden durch Aneinanderreihung parallel verlaufende Myofibrillen, die die Kardiomyozyten in Längsrichtung durchziehen [43, 177].
Im Hinblick auf elektrophysiologische und kontraktile Eigenschaften zeigen sich ebenfalls Unterschiede zwischen atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten. Ventrikuläre Kardiomyozyten weisen ein niedriges Ruhemembranpotenzial von ca. -90mV auf. Dies wird durch den K^{+-} Einwärtsgleichrichterstrom (i_{k1}) stabilisiert [150]. Aufgrund eines geringeren K^+-Stroms ist das Ruhemembranpotenzial in atrialen Kardiomyozyten positiver [212]. Die Erregung eines Kardiomyozyten durch benachbarte Zellen erfolgt über *gap junctions*. Nach der Depolarisation auf einen Schwellenwert von ca. -70mV öffnen Na^+-Kanäle, die zu einem raschen Na^+-Einwärtsstrom (i_{Na}) und somit zur schnellen weiteren Depolarisation führen. Die Dichte der Na^+-Kanäle ist in atrialen geringer als in ventrikulären Kardiomyozyten [69]. Nach der Aufstrichphase folgt die partielle Repolarisation in ventrikulären Kardiomyozyten über einen K^+-Ausstrom (i_{to}) und einen Cl^--Einstrom (i_{CL}). L-Typ-Calcium-Kanäle (i_{CaL}), welche oberhalb von -40mV öffnen, stabilisieren im Folgenden das positive Membranpotenzial. Diese sogenannte Plateauphase (ca. 200-400ms) verhindert eine Tetanisierung von ventrikulären Kardiomyozyten und sichert somit die Pumpfunktion des Herzens. In atrialen Kardiomyozyten ist die Plateauphase wegen des höheren K^+-Ausstroms (i_{to}) und eines zusätzlichen K^+-Ausstroms (k_{ur}) kürzer [69]. Nach der Inaktivierung der L-Typ-Calcium-Kanäle erfolgt die Repolarisation der ventrikulären Kardiomyozyten durch K^+-Auswärtsgleichrichterströme (i_{kr} und i_{ks}). Diese letzte Phase des Aktionspotenzials verläuft in atrialen Kardiomyozyten langsamer [184]. Zum Ende der Repolarisation führt der zunehmende K^{+-}Einwärtsgleichrichterstrom (i_{k1}) zur Stabilisierung des Ruhemembranpotenzials. Aufgrund des großen Einflusses von i_{k1} auf das Membranpotenzial und des Fehlens von speziellen Na^+- (i_f) und Calcium-Kanälen (i_{CaT}) sind ventrikuläre Kardiomyozyten nicht

zur spontanen Depolarisation imstande [45]. Atriale Kardiomyozyten sowie Schrittmacherzellen besitzen dagegen derartige Na^+-Kanäle [205]. Schrittmacherzellen weisen zusätzlich T-Typ-Calciumkanäle (i_{CaT}) auf. Die Bedeutung des K^+-Einwärtsgleichrichterstrom (i_{k1}) und des raschen Na^+-Stroms (i_{Na}) für das Membranpotenzial in Schrittmacherzellen ist gering [74, 129].
Die Aktionspotenziale erreichen über transversale Tubuli (T-Tubuli), die mit den Terminalzisternen des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) Diaden bilden, auch die Tiefen der Zellen [23]. So wird eine synchrone und schnelle Calciumfreisetzung in das gesamte Zytoplasma adulter Kardiomyozyten über spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle (Dihydropyridin-Rezeptoren) und durch die Calcium-induzierte Calciumfreisetzung über Ryanodin-Rezeptoren (RyR2) aus dem SR gewährleistet [11]. Durch diesen als elektromechanische Kopplung bezeichneten Vorgang wird die Kontraktion initiiert, die individuelle zeitliche und mechanische Parameter für atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten besitzt. Die aktive Kraft von einzelnen permeabilisierten Kardiomyozyten des linken Ventrikels liegt zwischen 26-35kN/m², die passive Kraft zwischen 1,4-4,5kN/m² [22, 210]. Das Ende der Kontraktion wird durch Repolarisation und einen Abfall der Calciumkonzentration eingeleitet, an dem Calciumkanäle der Membran, die Plasmamembran Calcium-ATPase (PMCA) und der Natrium-Calcium-Austauscher (NCX), sowie die Calcium-ATPase des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums (SERCA) beteiligt sind [150]. Die Expression der Proteine, die für die Calciumfreisetzung und -wiederaufnahme verantwortlich sind, bestimmt die zeitlichen Parameter des Calciumzyklus in adulten Kardiomyozyten.

Die ersten Kultivierungsansätze zur gezielten Maturierung von hESC-Kardiomyozyten erfolgten in Zellverbänden, den *Embryoid* oder *Cardiac Bodies*, und wiesen eine erhöhte Expression kardialer Proteine, wie cTnI, cTnT, α-Myosin und SERCA, nach [16, 96, 194]. Ultrastrukturelle und morphologische Analysen zeigten Ähnlichkeiten der in *Embryoid Bodies* kultivierten hESC-Kardiomyozyten zu Kardiomyozyten embryonaler Entwicklungsstufen [194]. Auch die Calciumtransienten unterschieden sich von denen der adulten Kardiomyozyten [47, 96]. In den darauffolgenden Jahren wurde die Kultivierung von hESC-Kardiomyozyten als Einzelzellen sowie in Langzeitkultur erprobt [126, 178]. Unter diesen Bedingungen wiesen die hESC-Kardiomyozyten eine erhöhte mRNA-Expression von MLC-2v und β-Myosin sowie eine zu ventrikulären Kardiomyozyten relativ ähnliche Morphologie auf [126]. Darüber hinaus zeigten die funktionell untersuchten hESC-Kardiomyozyten ventrikuläre Aktionspotenziale und einen funktionsfähigen Calciumzyklus [126, 178].

Alle bisherigen Kultivierungsansätze, die den Einfluss verschiedener physikalischer Faktoren nutzten, führten lediglich zu einer partiellen Maturierung der hESC-Kardiomyozyten, weswegen die vollständige Entwicklung zu adulten Kardiomyozyten weiterhin eine Herausforderung bleibt ([231]; Abb. 2).

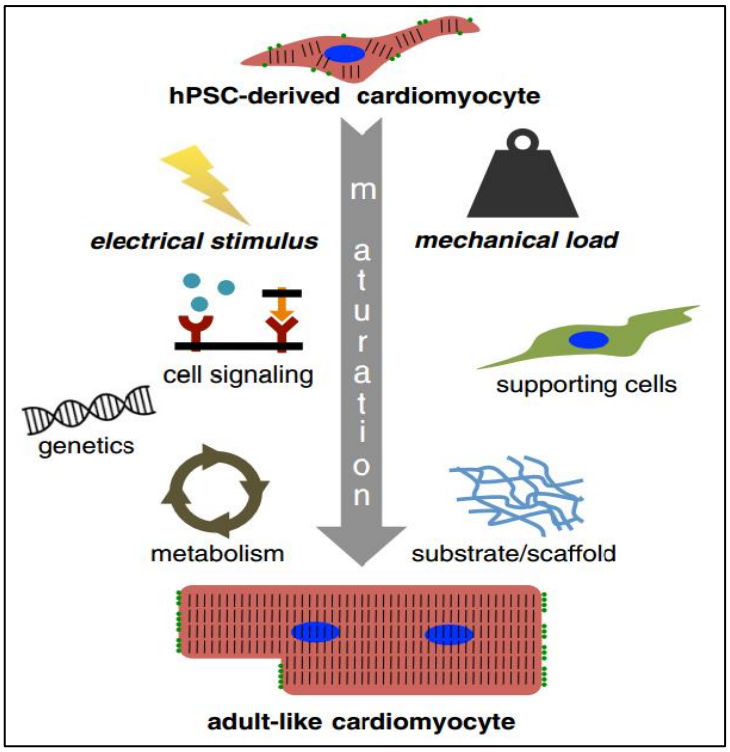


Abbildung 2: Schematische Darstellung der exogenen Faktoren, die die in vitro Reifung von hESC- oder hiPS-Kardiomyozyten unterstützen. Quelle: [231]

1.3 Einfluss von Schilddrüsenhormonen auf Kardiomyozyten

Eine Verbindung zwischen Schilddrüsenhormonen und dem kardiovaskulären System ist seit fast zwei Jahrhunderten bekannt [70, 152]. Der aktuelle Stand der Wissenschaft ist, dass Schilddrüsenhormone diverse Aspekte des kardiovaskulären Systems, wie die Herzfrequenz, den totalen peripheren Widerstand, das Schlag- und Blutvolumen sowie die Wärmeproduktion, beeinflussen [51, 57, 146].

Die Wirkungen werden durch das prädominant sekretierte, wenig aktive Hormon der Schilddrüse, Tetrajodthyronin (*T4*), und dessen aktive Form, Trijodthyronin (*T3*), vermittelt [72]. Die Umwandlung geschieht bedarfs- und gewebsspezifisch durch 5‘-Deiodinasen vom Typ I (D1) oder II (D2), wobei in humanen Kardiomyozyten überwiegend D2 exprimiert wird [10]. Nach Umwandlung besitzt *T3* genomische und nicht genomische Effekte auf Kardiomyozyten [91].

Über spezifische Rezeptoren (Thyroid Hormon Rezeptor ≙ TR) werden die genomischen Wirkungen von *T3* vermittelt [64]. Die Bindung von *T3* initiiert eine Konformationsänderung der Rezeptoren TRα1, β1 oder β2 und somit die Formation eines Koaktivatorkomplexes zusammen mit Proteinen der SRC oder p160 Familie [79, 91]. Dieser Koaktivatorkomplex fungiert als Transkriptionskomplex und stimuliert nach Bindung an *T3* responsive Elemente (TRE) der Desoxyribonukleinsäure (DNS) die Transkription spezifischer Gene, wie dem *MYH6* (Abb. 3). Die nicht genomischen Effekte der Schilddrüsenhormone, in diesem Fall von *T3* und *T4*, betreffen primär Ionenkanäle und -pumpen, wie PMCA, SERCA und den einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal (K_{ir}). Auf diese Weise beeinflussen *T3* und *T4* mit deutlich verkürzter Latenzzeit das Calciumhandling sowie die Elektrophysiologie von Kardiomyozyten ([42, 173]; Abb. 3).

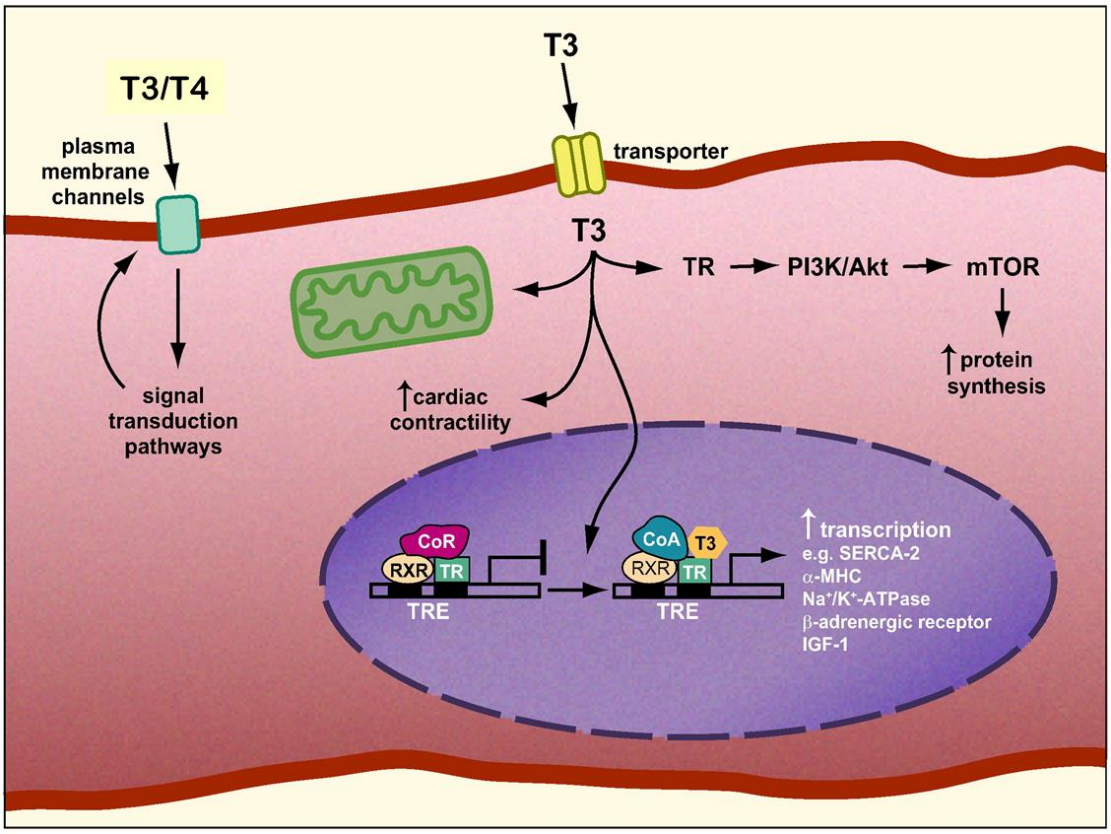


Abbildung 3: Genomische und nicht-genomische Wirkungen von Schilddrüsenhormonen. Modifiziert nach [115]

Schilddrüsenhormone sind ferner von zentraler Bedeutung für die reguläre Entwicklung des Herzens [215]. Yang et al. und Lee et al. nutzten daher die Kultivierung mit *T3*, um die morphologische und funktionelle Maturierung auch in hiPS- und hESC-Kardiomyozyten voranzutreiben [113, 228]. Das Resultat dieser Kultivierungsmethode war neben einer erhöhten Expression funktionell relevanter Proteine, wie α-Myosin und SERCA, auch reifere Calciumtransienten,

eine Kraftsteigerung sowie ventrikuläre Aktionspotenziale. Somit förderte *T3* zwar teilweise die funktionelle Entwicklung von hESC- und hiPS-Kardiomyozyten zu adulten ventrikulären Kardiomyozyten, aber die Genexpression ähnelte eher adulten atrialen Kardiomyozyten.

1.4 Zielsetzungen dieser Dissertation

In bisherien Kultivierungsansätzen entstanden hESC-Kardiomyozyten mit einem heterogenen Phänotyp, der adulten ventrikulären Kardiomyozyten funktionell und morphologisch wenig nahekam. Im Allgemeinen boten hESC-Kardiomyozyten weiterhin spontane Kontraktionen und eine ungleichmäßige Calciumfreisetzung, vergleichbar mit Schrittmacherzellen sowie frühen Vorstufen adulter Kardiomyozyten. Morphologisch zeigten hESC-Kardiomyozyten eine hohe Formvariabilität sowie unorganisierte, häufig netzartig angeordnete Myofibrillen. Die Analyse der Proteinexpression, wie β-Myosin, wurde in vorangegangenen Experimenten meist vernachlässigt. Diese wurde entweder auf mRNA-Ebene oder mithilfe des Western Blot-Verfahrens in der Gesamtpopulation durchgeführt.

Die Etablierung zellulärer Krankheitsmodelle für die HCM erfordert jedoch eine homogene Population von hESC-Kardiomyozyten, die in ihrem Phänotyp, insbesondere in der Expression kardialer Proteine, adulten ventrikulären Kardiomyozyten nahekommen. Dementsprechend war zu klären, ob diese Maturierung von hESC-Kardiomyozyten durch einen spezifischen Kultivierungsansatz erreicht werden kann.

Um diese Frage zu beantworten, waren Ziele dieser Dissertation

1. die Auswirkungen der Langzeitkultivierung auf Laminin-beschichteten Deckgläsern und in *Cardiac Bodies* auf die Expression von α- und β-Myosin sowie die Morphologie von einzelnen hESC-Kardiomyozyten zu analysieren. Neuartig war die Charakterisierung von einzelnen hESC-Kardiomyozyten durch die Etablierung einer spezifischen Immunfluoreszenzdoppelfärbung gegen α- und β-Myosin.
2. die Auswirkungen von *T4* auf die Maturierung von hESC-Kardiomyozyten auf Laminin-beschichteten Deckgläsern zu untersuchen. Die Proteinexpression und die Morphologie sowie funktionelle Aspekte, wie die Kontraktilität und die Calciumtransienten, wurden in hESC-Kardiomyozyten mit und ohne *T4* Stimulation analysiert. Hierfür wurde eine Methode zur Wiederfindung von einzelnen funktionell analysierten hESC-Kardiomyozyten nach der Immunfluoreszenzdoppelfärbung etabliert.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialen

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin (BSA)-Type H1	GERBU Biotechnik, Heidelberg
Calciumchlorid-dihydrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid 99,9% (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, Darmstadt
Fibronektin	Corning Inc., Corning, NY, USA
Fluoroshield Eindeckmedium	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
FURA-2-Acetomethylester (FURA-2-AM)	Life Technologies, Darmstadt
Geneticin (G418)	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
Glukose	Merck, Darmstadt
HEPES, minimum 99,5% Titration	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Humanes Insulin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kollagenase B	Roche, Mannheim
Kreatin Monohydrat	Sigma-Aldrich
Laminin	Life Technologies, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid 10M	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumselenite	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Nicht essentielle Aminosäuren	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Calcium, Magnesium	Biochrom, Berlin
L-Thyroxin Henning® inject (*T4*)	Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main
Transferrin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton-X-100 wässrige Lösung, 10%	Roche, Mannheim

2.1.2 Lösungen

a) bSF-Medium:

DMEM	
L-Glutamin	1 mmol/L
Nicht essentielle Aminosäuren	1%
β-Mercaptoethanol	0,1 mmol/L
Natriumselenite	17 µg/ml
Transferrin	11 µg/ml
Humanes Insulin	50 µg/ml

b) Lösung für kontraktile Messungen:

Destilliertes Wasser	
Natriumchlorid	6,84 g/L
Kaliumchlorid	0,42 g/L
Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	0,19 g/L
Magnesiumsulfat	0,16 g/L
Glukose	1,80 g/L
Natriumpyruvat	0,55 g/L
Kreatin Monohydrat	1,49 g/L
HEPES	4,77 g/L
Calciumchlorid-dihydrat	0,18 g/L

Der pH-Wert der angesetzten Lösung wurde bei 37°C durch Zugabe von Natriumhydroxid auf 7,4 eingestellt. Die Lagerung der endgültigen Lösung geschah bei -20°C.

2.1.3 Verbrauchmaterialien

Material	Hersteller
12er Well, Zellkulturplatten, Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckglas	VWR International, Darmstadt
Millimeterpapier	Brunnen, Heilbronn
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig
Nagellack	Verschiedene
Reagiergefäß 1/2ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß schwarz 1,5 ml	neoLab Migge, Heidelberg
Schraubbecher 100ml	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubröhre 15ml/ 50ml	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) dihydrochloride		1:5000	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-α-huMYH6	Kaninchen, polyklonal	1:50	BioGenes, Berlin
Anti-β-Myosin	Maus, monoklonal	1:100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-Mouse-IgG,TRITC-gekoppelt	Ziege, polyklonal	1:100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen,
Anti-Rabbit-IgG,FITC-gekoppelt	Schaf, polyklonal	1:100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen,

2.1.5 Hardware/Software

Hardware/Software	Hersteller
cell^D-Software	Olympus, Hamburg
Dual excitation fluorescence photomultiplier system	IonOptix, Milton, MA, USA
Durchflusskammer	Eigenanfertigung

Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
ImageJ-Software	National Institutes of Health, Bethesda, MD,USA
IonWizard-Software	IonOptix, Milton, MA, USA
IX 51 Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg
IX 71 invertiertes Mikroskop	Olympus, Hamburg
MyoCam	IonOptix, Milton, MA, USA
MyoCam edge detection acquisition module	IonOptix, Milton, MA, USA
MyoPacer EP Cell Stimulator	IonOptix, Milton, MA, USA

2.2 Zellkultur von hESC- und hiPS-Kardiomyozyten

Die im Folgenden beschriebene Differenzierung und Selektion von hESC- und hiPS-Kardiomyozyten wurden von Kristin Schwanke (Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe), die Langzeitkultivierung von Meike Wendland (Institut für Molekular- und Zellphysiologie) durchgeführt.

Der Antrag zur Generierung und Verwendung von aus Patientenmaterial generierten iPS-Zellen wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) am 09.02.2011 genehmigt (Ethikvotum-Nr.409). Die Experimente an hESC-Kardiomyozyten wurden vom Robert-Koch-Institut genehmigt (38.Genehmigung vom 12.02.2009; 77.Genehmigung vom 25.04.2013; 108.Genehmigung vom 31.03.2016) und stehen im Einklang mit dem Stammzellgesetz sowie der Zentralen Ethik-Kommission für Stammzellforschung (ZES).

2.2.1 Differenzierung und Anreicherung von hESC-Kardiomyozyten

Die Differenzierung von hESC-Kardiomyozyten wurde nach einem standardisierten Protokoll unter Verwendung eines Inhibitors der MAPK, dem SB203580, oder durch Modulation des *Wnt*-Signalwegs in einem bSF-Medium initiiert [97, 223]. Die Modulation erfolgte durch eine initiale Aktivierung des Signalwegs mit CHIR und einer anschließenden Inhibierung mit *IWP* und *IWR*. Durch Nutzung der transgenen Zelllinie hES3 αMyHCnoPGKhygro, die einen an den Kardiomyozyten spezifischen α-Myosin-Promotor gekoppelten Selektionsmarker für Neomycin trägt,

konnten daraufhin innerhalb von 21 Tagen Kardiomyozyten angereichert werden [224]. Hierfür wurde das Zellkulturmedium für eine Woche mit 200 µg/ml G418 versetzt (Abb. 4). Nach der Differenzierung ergaben durchflusszytometrische Untersuchungen einen Anteil von 60-80% Kardiomyozyten vor und einen Anteil von über 90% im Anschluss an die Anreicherung G418 [213].

2.2.2 Langzeitkultivierung von hESC-Kardiomyozyten in *Cardiac Bodies* und auf Laminin-beschichteten Deckgläsern

Nach der Differenzierung und Selektion wurden die hESC-Kardiomyozyten zunächst in Form von Zellverbänden, sogenannten *Cardiac Bodies*, für 35 Tage im bSF-Medium kultiviert (d35; Abb.4). Ein Teil der hESC-Kardiomyozyten wurde auch über den gesamten Zeitraum des Experiments von 110 Tagen (d110; Abb.4) in *Cardiac Bodies* kultiviert.

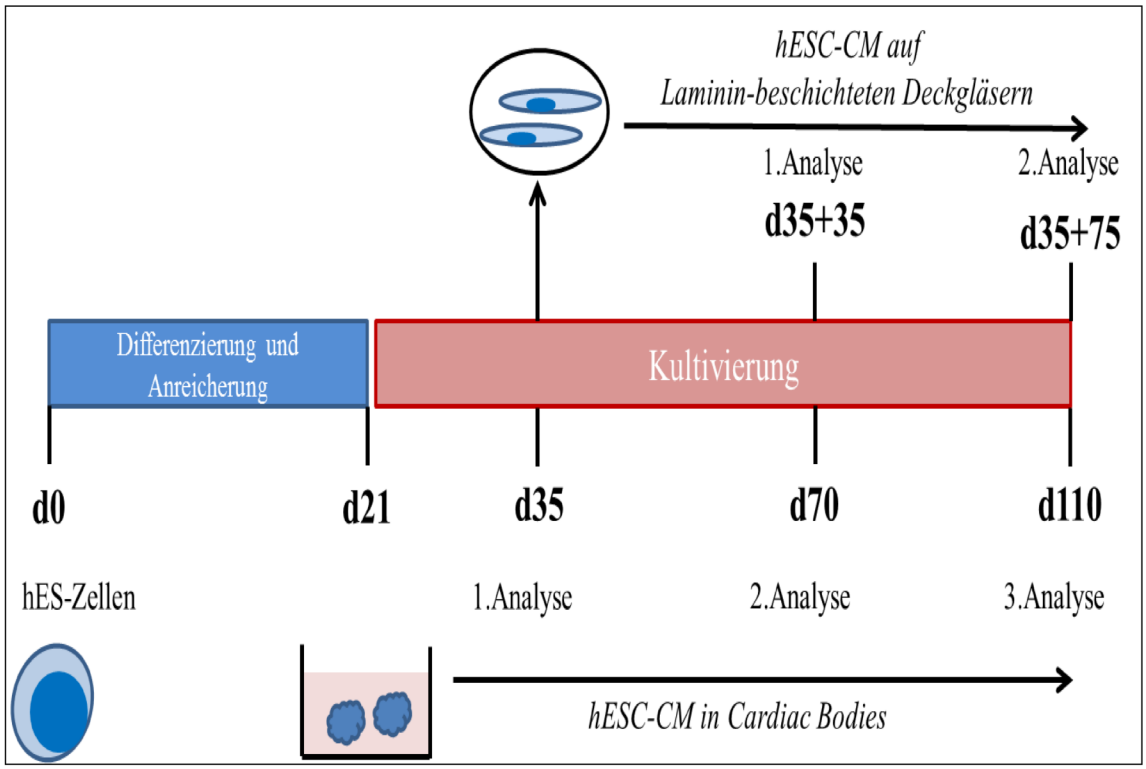


Abbildung 4: Zeitliches Schema der Differenzierung, Anreicherung und Kultivierung von hESC-Kardiomyozyten (hESC-CM).
hESC-Kardiomyozyten, die in *Cardiac Bodies* kultiviert worden waren (unterer Bildabschnitt), wurden funktionell und morphologisch mit hESC-Kardiomyozyten, die auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren (oberer Bildabschnitt), verglichen.

Am 35. Tag der Kultivierung (d35; Abb.4) wurde ein Teil der *Cardiac Bodies* mit Kollagenase B dissoziiert und die isolierten hESC-Kardiomyozyten anschließend auf Laminin-beschichteten Deckgläsern im bSF-Medium kultiviert. Nachdem diese hESC-Kardiomyozyten für weitere 35 bzw. 75 Tage auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren (d35+35 bzw. d35+75; Abb.4), wurden Analysen der α- und β-Myosin-Expression, der Morphologie sowie der Funktion durchgeführt. Die genaue Bezeichnung des Alters der hESC-Kardiomyozyten in den folgenden Ausführungen setzt sich stets aus der Kultivierungsdauer im *Cardiac Body* an erster (bspw. d**35**+35) und der Kultivierungsdauer auf Laminin-beschichteten Deckgläsern an zweiter Position zusammen (bspw. d35+**35**).

Auch die in *Cardiac Bodies* kultivierten hESC-Kardiomyozyten wurden morphologisch und funktionell analysiert. Hierfür wurden an Tag 35, 70 und 110 der Kultivierungszeit ebenfalls einzelne hESC-Kardiomyozyten aus den *Cardiac Bodies* isoliert und für kurze Zeit auf Laminin-beschichteten Deckgläsern ausgesät (d35, d70, d110; Abb. 4). Die Analysen wurden dabei nach drei Tagen Kultivierung begonnen, da hESC-Kardiomyozyten diese Zeit für eine ausreichende Adhäsion auf den Deckgläsern benötigten.

Um die Vergleichbarkeit innerhalb der Untersuchungsgruppen zu gewährleisten, wurden die unterschiedlich kultivierten hESC-Kardiomyozyten an den festgelegten Zeitpunkten innerhalb von fünf bis sieben Tagen funktionell analysiert und für die weiteren Untersuchungen fixiert. (d35, d70 bzw. d35+35, d110 bzw. d35+75; Abb. 4). Insgesamt zwei Zellchargen wurden zeitlich versetzt auf identische Art und Weise differenziert, kultiviert und analysiert. Der letzte Untersuchungszeitpunkt der zweiten Zellcharge fiel auf Tag 130 bzw. Tag 35+95.

2.2.3 Kultivierung von hESC-Kardiomyozyten mit *T4*

Zur Untersuchung des Effektes von *T4* auf hESC-Kardiomyozyten, die auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, wurden die Kardiomyozyten wie in 2.2.1. beschrieben differenziert und angereichert. An Tag 21 wurden einzelne hESC-Kardiomyozyten aus den *Cardiac Bodies* dissoziiert und auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert, wie in 2.2.2 dargestellt. Eine Gruppe Deckgläsern mit hESC-Kardiomyozyten wurde vor den morphologischen und funktionellen Untersuchungen für 14 Tage mit 0,01µM *T4*, welches im bSF-Medium gelöst worden war, kultiviert (Abb. 5). Die hESC-Kardiomyozyten der Kontrollgruppe, die für den gesamten Zeitraum von 40 Tagen ohne *T4* kultiviert worden waren, wurden eine Woche später untersucht (Abb. 5). Die funktionellen Messungen wurden jeweils innerhalb von 2-4 Tagen durchgeführt.

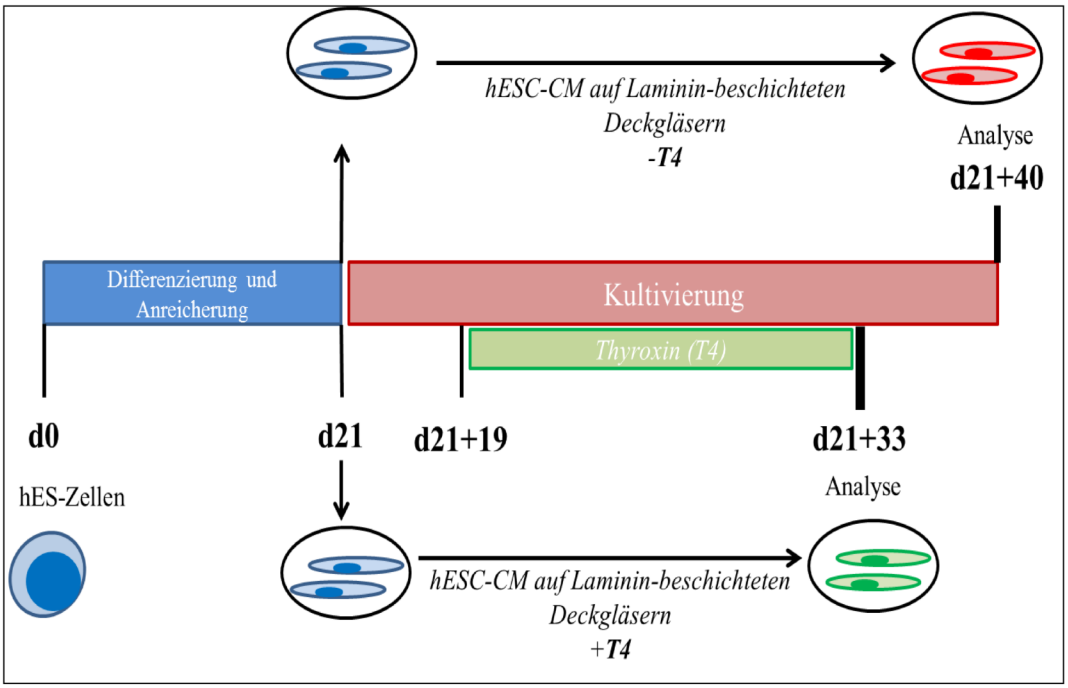


Abbildung 5: Zeitliches Schema der Differenzierung, Anreicherung und Kultivierung von hESC-Kardiomyozyten (hESC-CM) zur Untersuchung des Effektes von T4.
hESC-Kardiomyozyten, die für zwei Wochen mit *T4* auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren (unterer Bildabschnitt), wurden funktionell und morphologisch mit hESC-Kardiomyozyten, die ohne *T4* auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren (oberer Bildabschnitt), verglichen. Illustriert ist die Expression von α-Myosin (grün) und β-Myosin (rot) infolge der Kultivierung mit oder ohne *T4*.

2.2.4 Differenzierung und Kultivierung von hiPS-Kardiomyozyten

hiPS-Kardiomyozyten wurden für die Überprüfung der Antikörperspezifität und die Analyse des *Crosstalks* eingesetzt. Die Differenzierung von hiPS-Kardiomyozyten wurde anhand eines standardisierten Protokolls durchgeführt [223]. Die Kultivierung dieser Kardiomyozyten in *Cardiac Bodies* erfolgte nach dem gleichen Schema wie bei den hESC-Kardiomyozyten (s. 2.2.2). An Tag 84 wurden einzelne hiPS-Kardiomyozyten isoliert und im Anschluss für weitere 7 Tage (*Crosstalk*-Analyse) bzw. 28 Tage (Analyse der Antikörperspezifität) auf Fibronektin-beschichteten Deckgläsern kultiviert.

2.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung dient im Allgemeinen der Darstellung molekularer Strukturen in histologischen oder zytologischen Präparaten. Dabei werden spezifische Antikörper eingesetzt, die gegen bestimmte Proteine gerichtet sind. Häufig werden die verwendeten Primärantikörper mithilfe eines fluoreszenzfarbstoffmarkierten, gegen diesen Antikörper gerichteten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht. Dieses Verfahren wird auch als indirekte Immunfluoreszenzfärbung

bezeichnet (Abb. 6B). Die sogenannte direkte Immunfluoreszenzfärbung, bei der die Primärantikörper direkt mit einem Farbstoff gekoppelt sind, wird seltener angewandt (Abb. 6A).
In den durchgeführten Experimenten wurden Proteine des Sarkomers mithilfe der indirekten Immunfluoreszenzfärbung in hESC- und hiPS-Kardiomyozyten und in Gefrierschnitten aus humanem atrialen Myokard dargestellt. Der Fokus lag dabei auf der Analyse der Expression von humanem kardialem α- und β-Myosin.

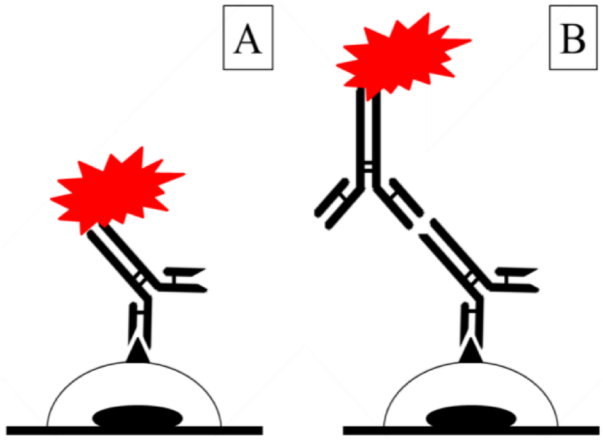


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer direkten (A) und indirekten (B) Immunfluoreszenzfärbung.

2.3.1 Entwicklung eines spezifischen Antikörpers gegen α-Myosin

Für die simultane Immunfluoreszenzfärbung von α- und β-Myosin mussten Primärantikörper verwendet werden, die höchstspezifisch das jeweilige Protein identifizieren. Ein spezifischer Antikörper gegen das β-Myosin war kommerziell verfügbar, wohingegen ein Antikörper gegen das α-Myosin neu generiert werden musste.
Für die Entwicklung des Antikörpers wurde ein für das humane kardiale α-Myosin spezifisches Epitop mit der Peptidsequenz YATADTGDSGKSKG (Aminosäuren 625-638) ausgewählt, welches an der Oberfläche der Kopfdomäne des α-Myosins lokalisiert ist. Der Antikörper wurde von der Firma BioGenes (Berlin, Deutschland) hergestellt, indem Kaninchen über 4 Wochen insgesamt 3-mal mit dem Peptid infiziert wurden und anschließend das anti-α-Myosin-IgG unter Anwendung der Affinitätschromatographie aus dem Serum isoliert wurde. Die Spezifität des polyklonalen anti-α-Myosin Antikörpers wurde unter anderem durch Immunfluoreszenzfärbungen von hESC-, hiPS-Kardiomyozyten und von Gewebeschnitten aus humanem atrialen Myokard sowie in Western Blots von Myosin aus humanem atrialen Myokard verifiziert (s. 3.1.1; [213]).

2.3.2 Färbung von hESC- und hiPS-Kardiomyozyten

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von hESC- oder hiPS-Kardiomyozyten wurde anhand eines etablierten Standardprotokolls durchgeführt. Die auf Laminin-beschichteten Deckgläsern adhärenten Kardiomyozyten wurden hierfür 20 Minuten in 4%iger PFA-Lösung fixiert und anschließend 3 mal mit PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen. Danach wurden die Kardiomyozyten für 5 Minuten in 0,2%iger Triton-Lösung permeabilisiert. Einer erneuten Spülung mit PBS folgte das Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit 5%iger BSA-Lösung für mindestens 10 Minuten. Nach Überführen der Deckgläser in eine feuchte Kammer wurden die darauf adhärenten Kardiomyozyten für eine Stunde mit dem Primärantikörper in BSA-Lösung inkubiert. Als Primärantikörper wurden der Anti-α-Myosin-Antikörper aus dem Kaninchen (Verdünnung 1:50) und der Anti-β-Myosin-Antikörper aus der Maus (Verdünnung 1:100) eingesetzt. Nach dreimaligem Spülen mit PBS für jeweils 5 Minuten wurden die Kardiomyozyten für eine weitere Stunde mit dem Sekundärantikörper in BSA-Lösung inkubiert. Es wurden ein gegen Kaninchen gerichteter, Fluorescein (FITC)-markierter Antikörper und ein gegen Maus gerichteter, Tetramethylrhodamine (TRITC)-markierter Antikörper verwendet (Verdünnung beide 1:100). Die gesamte Immunfluoreszenzfärbung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Nachdem eine Färbung mit DAPI und eine letzte Spülung mit destilliertem Wasser erfolgt waren, wurden die Deckgläser unter Verwendung von Fluoroshield auf Objektträgern eingedeckt und schließlich mit Nagellack fixiert.

2.3.3 Färbung von Gefrierschnitten aus humanem atrialen Myokard

Zur Überprüfung der Spezifität der Antikörper wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Gefrierschnitten aus humanem atrialen Myokard durchgeführt. Die atriale Gewebeprobe stammte von einer Patientin mit hypertropher Kardiomyopathie (47). Die Nutzung der anonymisierten Patientenprobe wurde von der Ethikkommission der MHH am 26.05.2009 genehmigt (Ethikvotum-Nr.507). Die Gefrierschnitte wurden von Stefanie Nedel (Institut für Molekular- und Zellphysiologie) nach einem standardisierten Protokoll mithilfe eines Cryotoms aus einer Gewebeprobe hergestellt und auf einen Objektträger aufgebracht. Bis zur Immunfluoreszenzfärbung wurden die Gefrierschnitte bei -80°C gelagert.

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurden die auf Objektträger befindlichen Gefrierschnitte entsprechend des in 2.3.2 aufgeführten Protokolls zunächst in 4%iger PFA-Lösung fixiert und gefärbt.

2.3.4 Analysen der Immunfluoreszenzfärbungen

2.3.4.1 Analyse des Crosstalk

Zu den zahlreichen Fehlerquellen, die eine korrekte Auswertung von Immunfluoreszenzfärbungen beeinträchtigen können, zählen unter anderem die Autofluoreszenz, die unspezifische Antikörperbindung und nicht zuletzt der *Crosstalk*. Unerwünschter *Crosstalk* entsteht bei Immunfluoreszenzfärbungen von zwei oder mehr Proteinen, da hierfür mehrere, an Sekundärantikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe zur Darstellung der Primärantikörper genutzt werden. Während der isolierten Betrachtung eines dieser beiden Sekundärantikörper wird der Fluoreszenzfarbstoff mit einer für ihn spezifischen Wellenlänge angeregt, sodass er in der für ihn spezifischen Wellenlänge emittieren kann. Die Problematik, die die Charakterisierung der Myosin-Expression beeinträchtigen könnte, ergibt sich erst durch die Nutzung zweier Fluoreszenzfarbstoffe deren Anregungs- oder Emissionsmaxima nah beieinander liegen. Dabei könnte die zur Anregung verwendete Wellenlänge für den einen Fluoreszenzfarbstoff zugleich den anderen anregen, wodurch ein gemischtes Fluoreszenzsignal und damit ein *Crosstalk* entstehen.

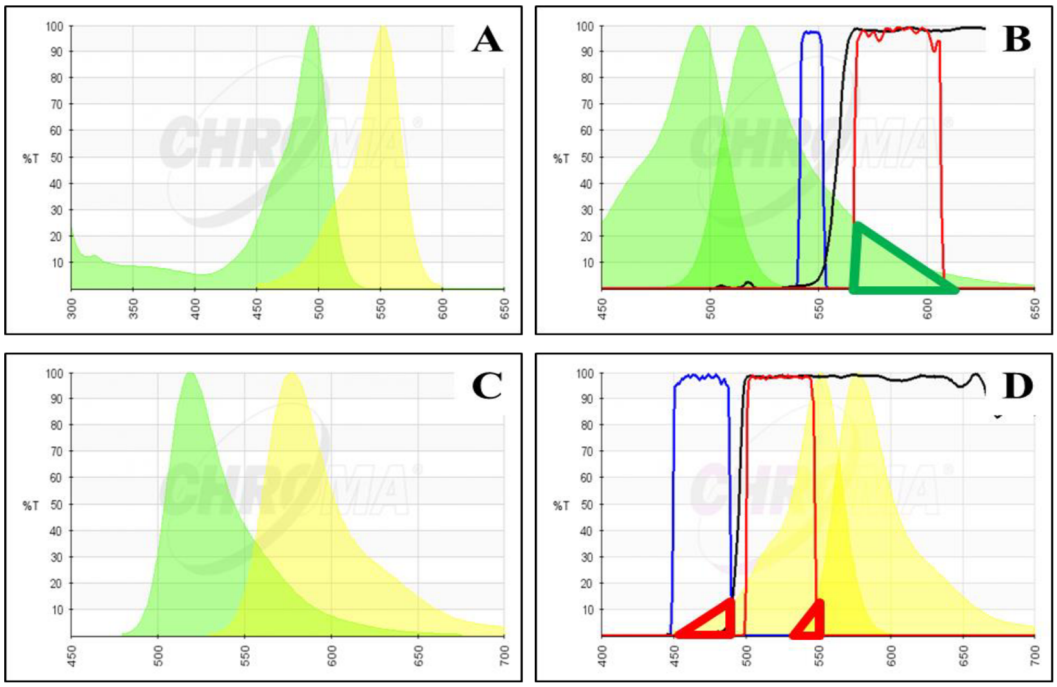


Abbildung 7: Crosstalk zwischen FITC und TRITC.
(A) Anregungs- und (C) Emissionsspektren von FITC (grün) und TRITC (gelb) im Vergleich. Spektren der dichroitischen Filter als schwarze Linie gezeigt. (B) Anregungs- und Emissionsspektrum von FITC. Der eingesetzte Emissionsfilter (rot) für den TRITC-Fluoreszenzfarbstoff registriert einen Teil der FITC-Emission (grünes Dreieck) mit. Der TRITC-Anregungsfilter ist blau gezeigt. (D) Anregungs- und Emissionsspektrum für TRITC. Die verwendeten Anregungs- (blau) und Emissionsfilter (rot) für den FITC-Fluoreszenzfarbstoff können den TRITC-Fluoreszenzfarbstoff sowohl anregen als auch einen Teil der Emission aufzeichnen (rote Dreiecke). Spektren der Homepage chroma.com entnommen.

Für die Analyse der Myosin-Expression wurden zur Darstellung der Primärantikörper gegen α- und β-Myosin Sekundärantikörper verwendet, die mit FITC oder TRITC gekoppelt waren. Bei Betrachtung der Anregungs- und Emissionsspektren von FITC und TRITC und der zur Aufzeichnung genutzten Filter wird ersichtlich, dass mit den Filterkombinationen für die FITC-Fluoreszenz auch der TRITC-Fluoreszenzfarbstoff angeregt und aufgezeichnet wird (Abb. 7D). Außerdem wird die Emission des FITC-Fluoreszenzfarbstoffes partiell im Kanal für die TRITC-Fluoreszenz registriert (Abb. 7B). Bei einer Immunfluoreszenzfärbung gegen α- und β-Myosin könnte dieser *Crosstalk* dazu führen, dass das spezifische Fluoreszenzsignal im TRITC-Fluoreszenzkanal, welcher zur Darstellung des β-Myosins genutzt wurde, teilweise aus dem Signal des FITC-Fluoreszenzfarbstoffes resultiert. Da die durchgeführten Analysen eine exakte Charakterisierung der Myosin-Expression in einzelnen hESC-Kardiomyozyten zum Ziel hatten, musste der *Crosstalk* zwischen TRITC und FITC unter Einsatz der zur Verfügung stehenden Filter vorab quantifiziert werden.

Die Analyse des *Crosstalks* der Fluoreszenzfarbstoffe TRITC und FITC wurde an Einzelfärbungen von hiPS-Kardiomyozyten, die auf Fibronektin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, durchgeführt. Hierfür wurden Kardiomyozyten unter Einsatz eines FITC gekoppelten Sekundärantikörpers gegen α-Myosin und Kardiomyozyten auf einem zweiten Deckglas unter Nutzung eines TRITC gekoppelten Sekundärantikörpers gegen β-Myosin gefärbt (s. 2.3.2.). Anschließend wurden mithilfe des Fluoreszenzmikroskops sowohl im FITC- als auch im TRITC-Fluoreszenzkanal Aufnahmen von einzelnen Kardiomyozyten angefertigt. Nur Kardiomyozyten, die fluoreszenzmarkierte Sarkomeren aufwiesen, wurden bei den Analysen berücksichtigt. Aufgrund des äußerst geringen Signals im nicht gefärbten Fluoreszenzkanal wurde keine einheitliche Belichtungszeit verwendet.

Anhand einer Immunfluoreszenzfärbung von α-Myosin unter Verwendung eines FITC gekoppelten Sekundärantikörpers wird das weitere Vorgehen illustriert (Abb. 8). In dem Bild, welches mit der Filterkombination für α-Myosin-FITC aufgezeichnet wurde, wurde mithilfe der Olympus cell^D-Software ein Intensitätsprofil des spezifischen Fluoreszenzsignals für α-Myosin erstellt. Das Intensitätsprofil schloss den Hintergrund, repräsentativ für das geringste Signal, und Sarkomere der Zelle, repräsentativ für das stärkste spezifische Signal, mit ein. In einem zweiten Bild, welches mit der Filterkombination für β-Myosin-TRITC aufgezeichnet wurde, wurde an identischer Position der Zelle ein Intensitätsprofil erstellt.

Nach Darstellung beider Intensitätsprofile in Excel konnte die Amplitude des Fluoreszenzsignals in den analysierten Fluoreszenzkanälen ermittelt werden (I_1 und I_2; Abb. 8). Dafür wurde die

gemittelte Intensität der Backgroundfluoreszenz (I_{min}) von der gemittelten Intensität des stärksten Fluoreszenzsignals eines α-Myosin positiven Sarkomers (I_{max}) subtrahiert. Die identischen Datenpunkte wurden für die Berechnung der Amplitude des β-Myosin-Fluoreszenzsignals gemittelt und anschließend subtrahiert. Nach der Normierung der Fluoreszenzamplituden auf die Belichtungszeit konnte der *Crosstalk* quantifiziert werden. In diesem Beispiel wurde dabei der Anteil der Fluoreszenzamplitude der β-Myosin-TRITC-Fluoreszenz (I_2) an der Fluoreszenzamplitude der spezifischen α-Myosin-FITC-Fluoreszenz (I_1) berechnet (I_2/I_1*100; Abb. 8). Umgekehrt wurde der *Crosstalk* in Einzelfärbungen gegen β-Myosin unter Verwendung eines TRITC gekoppelten Sekundärantikörpers als Anteil der α-Myosin-FITC- an der spezifischen β-Myosin-TRITC-Fluoreszenzamplitude errechnet.

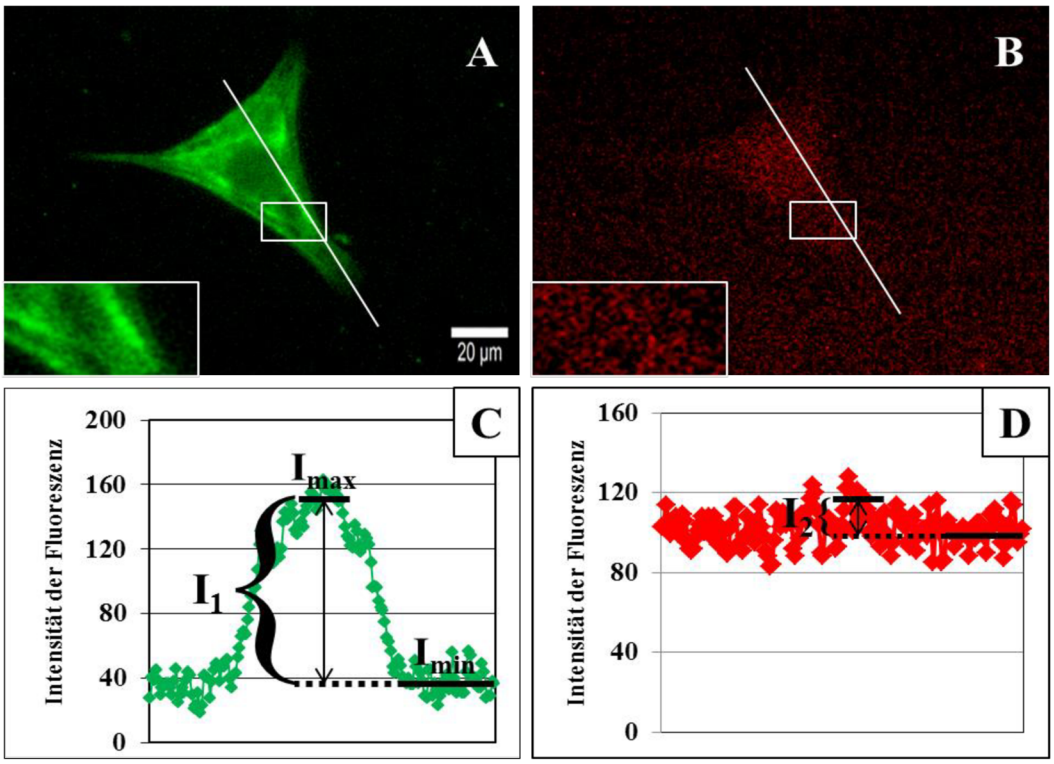


Abbildung 8: Crosstalk-Analyse am Beispiel einer Färbung gegen α-Myosin mit FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper.
hiPS-Kardiomyozyt im FITC- (A) und TRITC-Fluoreszenzkanal (B) dargestellt. Typische Intensitätsprofile entlang der weißen Linien in den Aufnahmen (A, B) und als Graph (C, D) gezeigt. Die Fluoreszenzamplitude des Fluoreszenzsignals (I_1, I_2) entspricht der Differenz zwischen dem schwächsten Fluoreszenzsignal (Background ≙ I_{min}) und dem stärksten, spezifischen Fluoreszenzsignal (Sarkomer ≙ I_{max}). Der prozentuale Anteil der Amplitude des schwächeren Fluoreszenzsignals an der Amplitude des spezifischen Fluoreszenzsignals ist als *Crosstalk* definiert (I_2/I_1 *100).

Für die Quantifizierung des mittleren *Crosstalks* von FITC und TRITC wurden n=19 Intensitätsprofile der Einzelfärbung α-Myosin-FITC und n=33 Intensitätsprofile der Einzelfärbung β-

Myosin-TRITC auf die beschriebene Weise ausgewertet. Der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung aus den prozentualen Anteilen wurden berechnet. Demzufolge lag der mittlere *Crosstalk* der TRITC-Fluoreszenz in den FITC-Fluoreszenzkanal bei 7,5%, der *Crosstalk* der FITC-Fluoreszenz in den TRITC-Fluoreszenzkanal bei 3,0% (Abb. 9). Dieser nachweislich geringe *Crosstalk* zeigte darüber hinaus kein deutliches Sarkomer-spezifisches Fluoreszenzmuster, welches die Charakterisierung der Myosin-Expression verfälschen könnte. Nach den Einzelfärbungen wiesen die Kardiomyozyten im Fluoreszenzkanal des nicht eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffes keine differenzierbaren fluoreszenzmarkierten Sarkomere auf, wie für den Fluoreszenzkanal des β-Myosins in Abb. 8b gezeigt. Demzufolge wurde dieser geringe *Crosstalk*, der nicht zuletzt auf den gewählten Filtern basiert, bei der Charakterisierung der Myosin-Expression in hESC-Kardiomyozyten vernachlässigt.

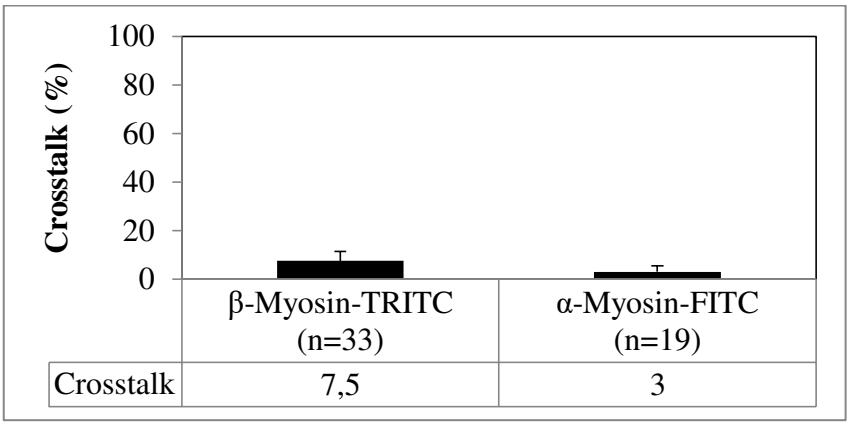


Abbildung 9: Der anhand von Einzelfärbungen gegen β-Myosin (n=33 Zellen) und gegen α-Myosin (n=19 Zellen) berechnete mittlere Crosstalk (%).

2.3.4.2 Ermittlung der Zellzahl und des Anteils von hESC-Kardiomyozyten auf Deckgläsern

Die Zellzahl sowie der Anteil der hESC-Kardiomyozyten pro Deckglas wurden für die Untersuchungszeitpunkte d35, d35+35 und d35+75 bestimmt. Zu jedem Zeitpunkt wurden jeweils n=5 Deckgläser, die gegen α-, β-Myosin sowie mit DAPI gefärbt worden waren, analysiert. Unter Nutzung der Apparatur zur Wiederfindung von Zellen (s. 2.4) wurden nach einem bestimmten Muster Aufnahmen von neun Bereichen der Laminin-beschichteten Deckgläser angefertigt. Ein Millimeterpapier wurde zu diesem Zweck mit neun Markierungen versehen. Mithilfe des fokussierenden Lichtstrahls wurde der Mikroskoptisch einzeln an die Position der Markierungen bewegt. Im Anschluss wurden mit dem 20er Objektiv Übersichtsaufnahmen im FITC-, TRITC- und DAPI-Fluoreszenzkanal angefertigt. Die Zellzahl pro Aufnahme wurde mithilfe der cell^D-

Software bestimmt, indem die Zellkerne in der DAPI-Fluoreszenz gezählt wurden. Mehrkernige Kardiomyozyten wurden dabei als einzelne Zellen eingeordnet. Der Anteil der Kardiomyozyten an der Gesamtzahl der Zellen wurde in der α- und β-Myosin-Fluoreszenz ermittelt. Um eine Zelle dabei als Kardiomyozyt zu klassifizieren, musste dieseR fluoreszenzmarkierte Sarkomere aufweisen (s. 3.1).

Damit die Zellzahl und der Anteil der Kardiomyozyten für ein Deckglas mit einer Fläche von 254,47mm² hochgerechnet werden konnten, wurden die Daten aller neun Bereiche, die insgesamt einer Fläche von 3,43mm² entsprachen, zunächst addiert und anschließend mit dem Faktor 74,12 multipliziert. Schließlich wurden aus den Daten der fünf Deckgläser der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet (s. 2.6).

2.3.4.3 Morphologische Analyse

Zur Analyse der Morphologie wurden zunächst mithilfe des Fluoreszenzmikroskops Aufnahmen von einzelnen hESC-Kardiomyozyten in der α-, β-Myosin- und DAPI-Fluoreszenz mit der identischen Belichtungszeit angefertigt.

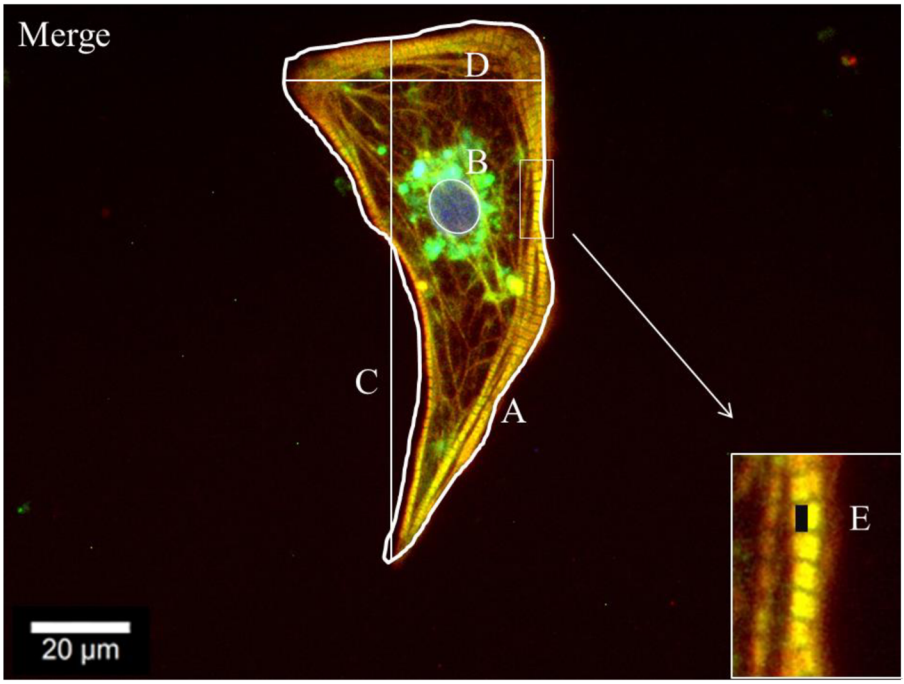


Abbildung 10: Ein gegen α- (rot), gegen β-Myosin (grün) und mit DAPI (blau) gefärbter hESC-Kardiomyozyt; alle drei Fluoreszenzen überlagert.
Bestimmung der Zellfläche (A), Zellkernfläche (B), Zelllänge (C) und Zellbreite (D) eines hESC-Kardiomyozyten. Aus dem Mittelwert von drei gemessenen Sarkomeren (E) wurde die mittlere Sarkomerlänge berechnet.

Anhand der aufgezeichneten Bilder konnten in der α- oder β-Myosin-Fluoreszenz unter Anwendung der Olympus cell^D-Software morphologische Parameter der hESC-Kardiomyozyten, wie die Zellfläche, Zelllänge, Zellbreite und Sarkomerlänge, bestimmt werden (Abb. 10). Der maximale Durchmesser eines Kardiomyozyten wurde dabei als Zelllänge, der hierzu senkrechte größte Durchmesser als Zellbreite betrachtet (Abb. 10). Aus dem Quotienten der Zellbreite und Zelllänge (Zellbreite/Zelllänge) wurde der Zirkularitätsindex berechnet. Für die Bestimmung der mittleren Sarkomerlänge wurde der Mittelwert aus drei gemessenen Sarkomerlängen pro Zelle gebildet. In der DAPI-Fluoreszenz konnte darüber hinaus die Zellkernfläche sowie die Anzahl der Kerne pro Zelle ermittelt werden (Abb. 10). Auf diese Weise konnte der Anteil der mehrkernigen Zellen an der Gesamtheit der analysierten Zellen bestimmt werden.
Pro Deckglas wurden 10-20 hESC-Kardiomyozyten analysiert. Aufgrund der Vergleichbarkeit der Daten konnten alle gemessenen Zellen beider Zellchargen, insgesamt 305-320 Zellen pro Untersuchungszeitpunkt, für die statistischen Berechnungen zusammengenommen werden.

2.4 Wiederfindung von Einzelzellen nach der funktionellen Messung und Immunfluoreszenzfärbung

Für die Charakterisierung der Myosin-Expression von funktionell untersuchten hESC-Kardiomyozyten musste jede zuvor gemessene Zelle nach der Immunfluoreszenzfärbung an einem zweiten Mikroskop individuell auf dem Deckglas wiedergefunden werden. Eigens für diesen Zweck wurde eine Apparatur zur Wiederfindung von Einzelzellen konstruiert (Abb. 11, 12). Diese Apparatur bestand aus zwei Komponenten: Die erste Komponente befand sich am invertierten Mikroskop, an dem die funktionellen Messungen durchgeführt wurden, und wurde für die Markierung der Zellposition auf dem Deckglas genutzt (Abb. 11). Eine dünne Nadel wurde dabei so am Mikroskop befestigt, dass sie den Bewegungen des Mikroskoptisches folgte. Nach dem Zentrieren der analysierten Zelle im Gesichtsfeld wurde mithilfe dieser dünnen Nadel eine Markierung in Form eines Loches in das Millimeterpapier gesetzt (Abb. 11). Die Mitte dieses in der Apparatur eingelegten Millimeterpapiers wurde vorab auf die Mitte des Deckglases kalibriert. Um die Markierung der jeweiligen Zelle zuzuordnen, wurden die Koordinaten der Markierung auf dem Millimeterpapier dokumentiert und Aufnahmen der gemessenen Zelle mit dem 10er und 40er Objektiv im Durchlichtverfahren erstellt. Im Anschluss an die funktionelle Messung wurden die Deckgläser umgehend fixiert und gefärbt (s. 2.3.2). Die exakte Positionierung und Ausrichtung des Deckglases auf eine definierte Stelle des Objektträgers am Ende der Immunfluoreszenzfärbung war essentiell für die folgende Wiederfindung der Zellen.

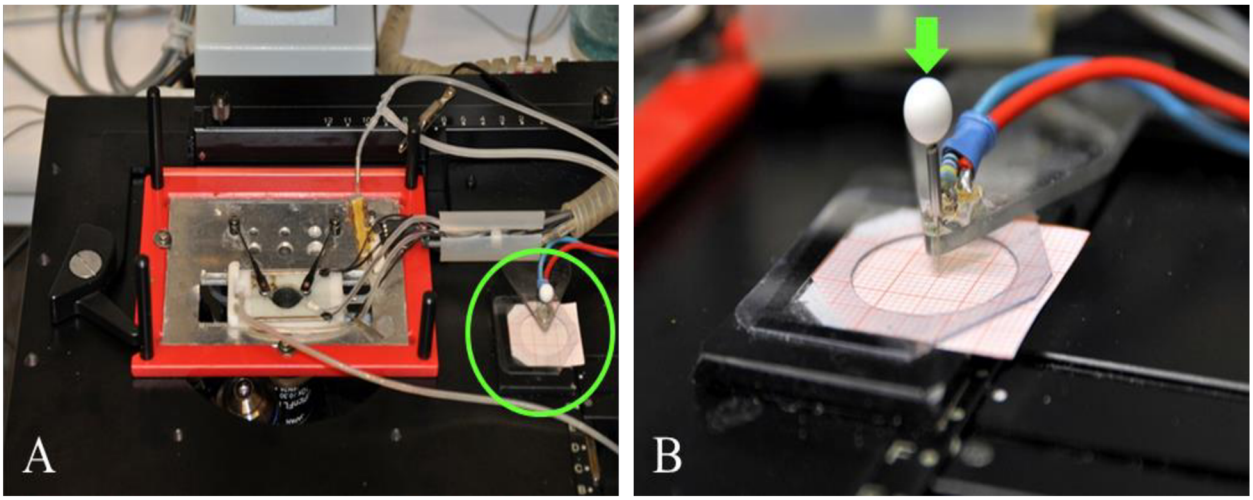


Abbildung 11: Erste Komponente der Apparatur zur Wiederfindung von funktionell untersuchten Zellen am Mikroskop mit dem Aufbau für funktionelle Untersuchungen.
(A) Übersicht des Messaufbaus. Die Halterung des Millimeterpapiers ist hervorgehoben (Kreis). (B) Vergrößerte Darstellung der Apparatur zur Markierung der Zellen. Durch Druck auf die Nadel wurde eine individuelle Markierung gesetzt (Pfeil).



Abbildung 12: Zweite Komponente der Apparatur zur Wiederfindung von gemessenen Zellen am Mikroskop für die Fluoreszenzanalysen.
Mithilfe des feinen Lichtstrahls wurde der Tisch des Mikroskops an die individuelle Position der Zelle bewegt.

Das zum jeweiligen Deckglas gehörende Millimeterpapier wurde in die zweite Komponente der Apparatur, welche auf dem Mikroskop für die Fluoreszenzanalysen befestigt worden war, eingelegt (Abb. 12). Das Millimeterpapier wurde hierbei in umgekehrter Position positioniert, da das Deckglas am Ende der Immunfluoreszenzfärbung mit der zelltragenden Seite nach unten platziert worden war. Zur Wiederfindung einer zuvor funktionell untersuchten Zelle wurde der Tisch des Mikroskops mithilfe eines fein fokussierenden Lichtstrahls an die jeweilige Position einer

Markierung auf dem Millimeterpapier gefahren. Auf diese Weise wurde die Zelle in das Zentrum des Gesichtsfeldes gerückt.

Anhand ihrer einzigartigen Morphologie und der individuellen Umgebung konnten die Zellen wiedergefunden werden (Abb. 13). Durch Analyse der Immunfluoreszenzfärbung gegen α- und β-Myosin wurde die Myosin-Expression jeder einzelnen, funktionell gemessenen und wiedergefundenen Zelle bestimmt (s. 3.1.1).

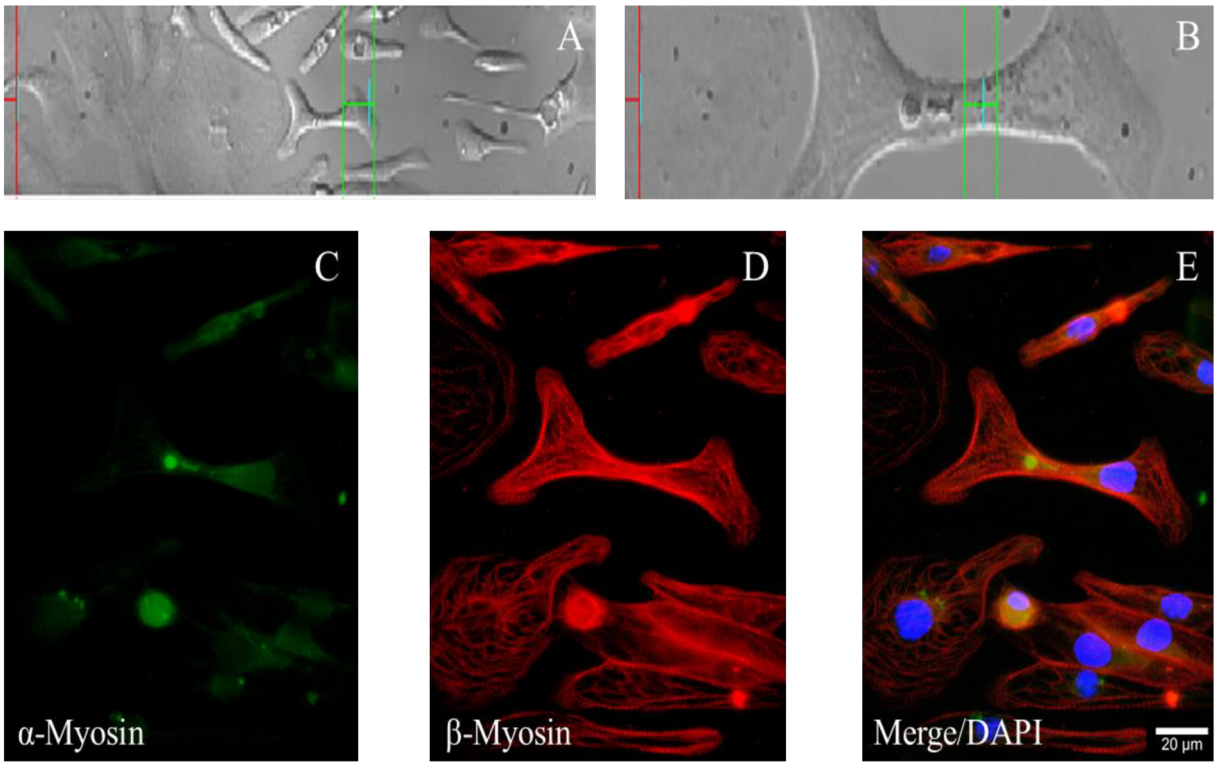


Abbildung 13: hESC-Kardiomyozyten während der funktionellen Untersuchung und in der Immunfluoreszenz.

Dargestellt sind hESC-Kardiomyozyten in 10facher (A) und 40facher Vergrößerung (B). Nach der Immunfluoreszenzfärbung gegen α- und β-Myosin sowie mit DAPI konnte der funktionell charakterisierte hESC-Kardiomyozyt (B) wiedergefunden und seine Myosin-Expression bestimmt werden (C-E).

2.5 Funktionelle Analysen an hESC-Kardiomyozyten

2.5.1 Analyse der Kontraktion und Relaxation mittels *edge detection*

Die Analyse der Kontraktionen einzelner hESC -Kardiomyozyten wurde mithilfe eines videobasierten Systems (*MyoCam*, IonOptix, Milton, MA, USA) durchgeführt. Hierfür wurden die Laminin-beschichteten Deckgläser mit den adhärenten hESC-Kardiomyozyten vorsichtig in einer Durchflusskammer befestigt und zirkulierend mit einer 37±0,5°C temperierten, gepufferten Lösung überspült (Abb. 14). Nach Platzierung der Durchflusskammer auf dem invertierten Mikroskop wurden die Zellen mit dem *MyoPacer EP Cell Stimulator* (IonOptix, Milton, MA, USA)

über Platinelektroden, die an den Seiten der Durchflusskammer eingebaut sind, elektrisch stimuliert. Nachdem bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5Hz kontrahierende hESC-Kardiomyozyten identifiziert worden waren, wurden in einer nachfolgend eingelegten Stimulationspause (max. 60s) potentielle spontane Kontraktionen aufgezeichnet. Anhand dieser Daten wurde der Anteil spontan schlagender hESC-Kardiomyozyten sowie die spontane Kontraktionsfrequenz bestimmt. Nach dieser Pause wurden die Zellen entsprechend eines standardisierten Protokolls mit einer Spannung von 35V, einer Impulsdauer von 14ms und Frequenzen von 0,5 bis 3Hz stimuliert.

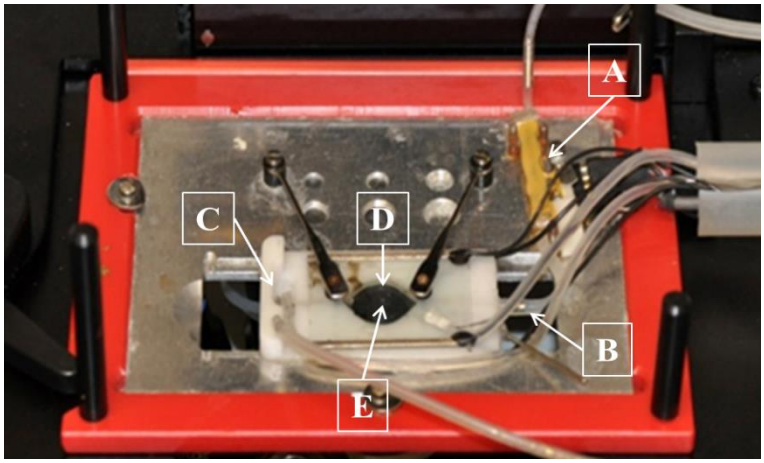


Abbildung 14: Darstellung der Durchflusskammer auf dem invertierten Mikroskop.
(A) Vorheizelement; (B) Zufluss der gepufferten Perfusionslösung; (C) Abfluss der Lösung; (D) Platinelektroden in der Kammer; (E) Deckglas mit adhärenten hESC-Kardiomyozyten (Boden der Durchflusskammer)

Für die videobasierte Aufzeichnung der Kontraktionen von einzelnen hESC-Kardiomyozyten wurde die *edge detection* genutzt, da die Sarkomere der hESC-Kardiomyozyten nicht genügend Kontrast für eine Messung der Sarkomerlänge aufwiesen. Unter Verwendung einer drehbaren Kamera (*MyoCam*, IonOptix, Milton, MA, USA) wurde zunächst ein stark kontrastierter Punkt auf einer kontrahierenden Zelle so eingestellt, dass seine horizontale Verschiebung der Hauptkontraktion der Zelle entsprach und mithilfe des *MyocCam edge detection acquisition module* (IonOptix, Milton, MA, USA) sicher registriert werden konnte (Abb. 15). So konnte die Bewegung dieses Punktes als repräsentativ für die Verkürzung des hESC-Kardiomyozyten gewertet werden.

Für jede Stimulationsfrequenz wurden 20-30 Artefakt-freie Verkürzungen gemittelt und anschließend analysiert. Als Parameter für die Kontraktilität eines hESC-Kardiomyozyten wurden von der IonWizard-Software unter anderem die Zeiten vom gesetzten Stimulus bis zu 30%, 50% und 90% der maximalen Verkürzung, die Zeit bis zur maximalen Verkürzung und die Zeit von

der maximalen Verkürzung bis zur Hälfte der Relaxation, auch Zeit bis zur halbmaximalen Relaxation genannt, berechnet (Abb. 16). Die ermittelten Daten wurden in Excel exportiert und mit GraphPad-Prism statistisch ausgewertet (s. 2.6).

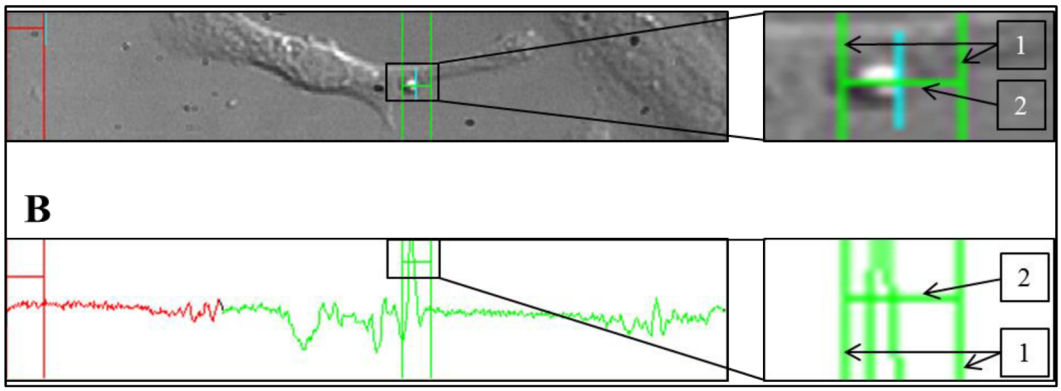


Abbildung 15: Messung eines hESC-Kardiomyozyten mithilfe der videobasierten edge detection.
(A) Videoaufnahme eines hESC-Kardiomyozyten während der funktionellen Messung in der Hellfeldmikroskopie. Ein stark kontrastierter Punkt (*edge*) wird zwischen die Aufnahmegrenzen (1) eingestellt. Der Punkt, der als Indikator für die Verkürzung der Zelle fungiert, sollte sich dabei horizontal entlang der gewählten Linie für die Videoanalyse (2) bewegen und möglichst genau die Hauptkontraktion der Zelle repräsentieren. (B) Intensitätsprofil entlang der gewählten Linie für die Videoanalyse. Der starke Kontrast des gewählten Punktes entspricht der Intensitätsspitze zwischen den Aufnahmegrenzen (1). Für die präzise Aufzeichnung der Bewegung des Punktes wird die Messschwelle (2) so gelegt, dass lediglich die Intensitätsspitze erfasst wird.

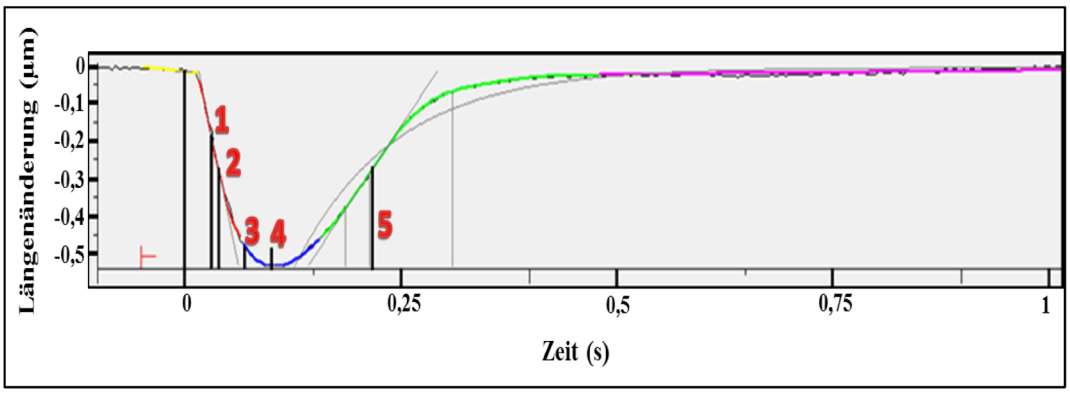


Abbildung 16: Exemplarische Darstellung des gemittelten Kontraktionsverlaufes eines hESC-Kardiomyozyten.
Der gesetzte Stimulus wurde als Zeitpunkt „0“ festgelegt. Die Zeit bis zu 30% (1), 50% (2) und 90% (3) der maximalen Verkürzung, die Zeit bis zur maximalen Verkürzung (4) und die Zeit bis zur halbmaximalen Relaxation (5) wurden ermittelt.

2.5.2 Analyse der Calciumtransienten

Zur Messung der zeitlichen Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration während der Kontraktion, den sogenannten Calciumtransienten, des hESC-Kardiomyozyten wurde der

membranpermeable Fluoreszenzindikator FURA-2-Acetoxymethylester (FURA-2-AM) eingesetzt. Intrazellulär kann dieser Fluoreszenzindikator nach Esterhydrolyse zu FURA-2 freie Calciumionen binden. FURA-2 weist in Abhängigkeit von Anregungswellenlänge und der Konzentration intrazellulärer Calciumionen eine unterschiedliche Emission bei 510nm auf (Abb. 17).

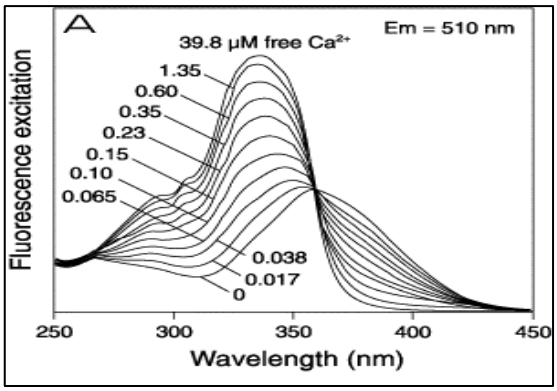


Abbildung 17: Darstellung der Emission von FURA-2 bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge (nm).

Demzufolge nimmt die Emission von FURA-2 mit steigender Calciumkonzentration bei einer Anregung mit 340nm zu, bei einer Anregung mit 380nm ab. Die Bildung des Quotienten (Ratio) der Emission bei den beiden genannten Anregungswellenlängen (340nm/380nm) erlaubt die relative Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration im zeitlichen Verlauf darzustellen. Diese Ratio ist weitestgehend unabhängig von unterschiedlicher Beladung, Ausbleichen, Verlust des Farbstoffes und der Messung von Zellen mit unterschiedlicher Dicke.

Für die Messung der Calciumtransienten wurden die auf Laminin-beschichteten Deckgläsern adhärenten hESC-Kardiomyozyten im Inkubator für 30 Minuten bei 37°C mit 2,5µM FURA-2-AM, welches gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) zum Zellkulturmedium zugegeben worden war, beladen. Die Messung wurde nach einer Waschung der Deckgläser mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) und einer darauffolgenden 30-minütigen Pause begonnen, da nun eine Esterhydrolyse des FURA-2-AM zu FURA-2 in den hESC-Kardiomyozyten angenommen werden konnte. Nach Platzierung des Deckglases in der Durchflusskammer wurden die Calciumtransienten im zeitlichen Verlauf aufgezeichnet. Das FURA-2 in den hESC-Kardiomyozyten wurde dabei abwechselnd mit 340nm und 380nm angeregt (Frequenz des Wechsels 250 Hz; *Hyperswitch*, IonOptix, Milton, MA, USA) und die Emission mithilfe eines *Photomultipliers* (IonOptix, Milton, MA, USA) bei 510nm registriert. Ein zu 2.5.1 analoges Stimulationsprotokoll mit 0,5 und 1 Hz wurde angewandt.

Da auch nicht beladene hESC-Kardiomyozyten bei den genannten Anregungswellenlängen eine geringe Emission aufweisen, wurde vor der Analyse die Autofluoreszenz an 15 hESC-Kardiomyozyten, die nicht mit FURA-2-AM beladen worden waren, gemessen und gemittelt. Aufgrund der geringen Dicke und der ausgeprägten Beladung der Zellen war der Anteil der Autofluoreszenz am gemessenen Fluoreszenzsignal sehr niedrig. Die gemittelte Autofluoreszenz wurde anschließend von dem registrierten Fluoreszenzsignal abzogen und die Ratio der Emission bei 340nm und 380nm berechnet.

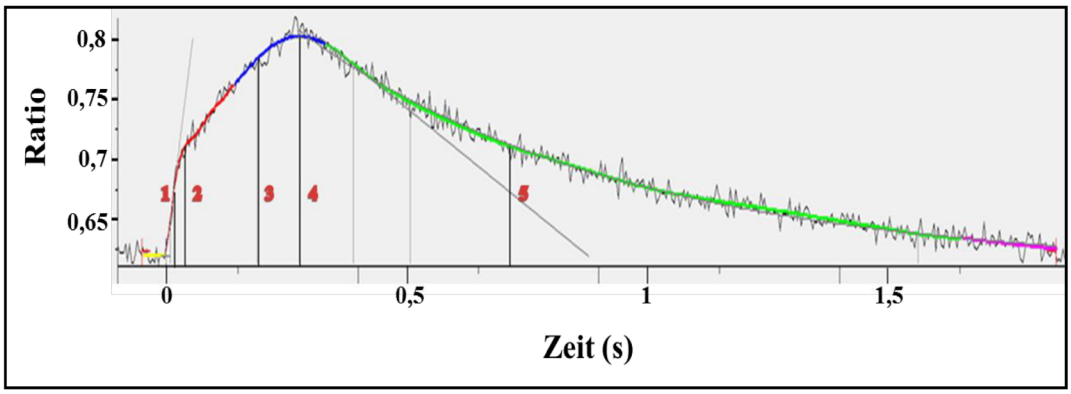


Abbildung 18: Exemplarische Darstellung eines gemittelten Calciumtransienten.
Der gesetzte Stimulus markierte den Zeitpunkt „0“. Die Zeit bis zu 30% (1), 50% (2) und 90% (3) des Maximums des Calciumtransienten, die Zeit bis zum maximalen Calciumtransienten (4) und die Zeit vom Maximum bis zur Hälfte des Abfalls des Calciumtransienten (5) wurden ermittelt.

Mindestens 20 Calciumtransienten pro Stimulationsfrequenz wurden von der IonWizard-Software gemittelt und analysiert. Bestimmt wurden die Zeit vom gesetzten Stimulus bis zu 30%, 50% und 90% des Maximums des Calciumtransienten, die Zeit bis zum Maximum des Calciumtransienten und die Zeit vom Maximum bis zur Hälfte des Abfalls des Calciumtransienten (Abb. 18). Darüber hinaus wurde die Zeitkonstante Tau (τ) der Abnahme der zytoplasmatischen Calciumkonzentration berechnet, die ein Marker für die Calciumaufnahme in das SR ist. Die ermittelten Daten wurden in Excel exportiert und mit GraphPad-Prism statistisch ausgewertet (s. 2.6).

Bei der Interpretation der Calciumtransienten müssen bestimmte Eigenschaften der genutzten Fluoreszenzfarbstoffe wie deren Affinität zu Calciumionen beachtet werden [151]. FURA-2 weist eine hohe Affinität zu Calciumionen im Zytoplasma und folglich eine hohe Dissoziationskonstante auf (K_{off}/K_{on}=Kd~100nM gemessen *in vitro*; [103]). Die Dissoziationskonstante bezeichnet diejenige Calciumkonzentration, bei der die Hälfte aller Farbstoffmoleküle im Gleichgewicht Calcium gebunden haben [103]. FURA-2 besitzt aus diesem Grund eine hohe Sensitivi-

tät gegenüber minimalen Änderungen der Calciumkonzentration (von 100nM bis 100µM) und ist deshalb gut geeignet, um Änderungen der Calciumkonzentration zu detektieren [39, 151]. Aufgrund der relativ hohen Affinität von FURA-2 zu Calciumionen weist der Calciumtransient in Gegenwart von FURA-2 insbesondere in der Phase der Relaxation jedoch einen langsameren zeitlichen Verlauf auf, als aufgrund des Zeitverlaufs der Twitch-Relaxation zu erwarten wäre [61, 103].

2.6 Statistische Analysen

Die gesamten statistischen Auswertungen wurden mithilfe der GraphPad Prism-Software durchgeführt. Für die Zellzahl, die morphologischen Parameter sowie die funktionellen Parameter der Kontraktion und Calciumtransienten wurden die arithmetischen Mittelwerte sowie die Standardabweichung berechnet. Bei Vergleichen zweier Gruppen wurde Student‘s t-Test für zwei unabhängige Stichproben angewandt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p<0,05$ festgelegt.

Für die Analyse der Myosin-Expression wurde eine nominale Skala mit den Kategorien α-Myosin-, β-Myosin- sowie gemischt α- und β-Myosin exprimierende Zelle verwendet (s. 3.1.1). Die Anteile der unterschiedlichen Kategorien an der Gesamtheit wurden berechnet. Mithilfe des χ^2-Unabhängigkeitstest wurde untersucht, ob die Häufigkeitsverteilung der drei Kategorien zwischen zwei Gruppen stochastisch unabhängig voneinander ist. Das Signifikanzniveau wurde auf $p<0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Methodik

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von hESC-Kardiomyozyten, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert worden waren. Verglichen wurden hESC-Kardiomyozyten, die auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, mit gleich lang in frei schwimmenden Zellaggregaten, den sogenannten *Cardiac Bodies,* kultivierten hESC-Kardiomyozyten. Neben der Analyse der Morphologie dieser Zellen stand die Charakterisierung der Expression von α- und β-Myosin auf Proteinebene nach der Immunfluoreszenzdoppelfärbung im Vordergrund. Zu diesem Zweck wurden zunächst spezifische Antikörper gegen α- und β-Myosin etabliert, die in einer Doppelfärbung eingesetzt werden konnten (s. 3.1.1). Darüber hinaus wurden Zweitantikörper und Fluoreszenzfilter gewählt, die den *Crosstalk* zwischen den Fluoreszenzkanälen minimierten (s. 2.3.4.1).

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob und wie hESC-Kardiomyozyten auf einen Einfluss von *T4* reagieren. Es wurden Funktion, Morphologie und Myosin-Expression von mit und ohne *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten charakterisiert. Insbesondere wurde für individuelle hESC-Kardiomyozyten nach der Erhebung funktioneller Parameter die Expression von α- und β-Myosin analysiert. Hierfür war neben einer spezifischen Immunfluoreszenzfärbung auch eine Methode zur Wiederfindung der funktionell charakterisierten Zellen notwendig (s. 3.1.2).

3.1.1 Spezifität der Antikörper gegen α- bzw. β-Myosin

Für eine korrekte Charakterisierung der Myosin-Expression in hESC-Kardiomyozyten mussten Antikörper eingesetzt werden, die eine hohe Spezifität gegenüber ihren Epitopen aufweisen. Die Überprüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper gegen α- bzw. β-Myosin erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbungen von hESC-Kardiomyozyten (Abb. 19). Ein aufgezeichnetes Fluoreszenzsignal wurde dann als spezifisch bezeichnet, wenn fluoreszenzmarkierte Sarkomere zu erkennen waren und hESC-Kardiomyozyten mit unterschiedlicher Myosin-Isoform voneinander differenziert werden konnten.

Nach Immunfluoreszenzdoppelfärbungen gegen α- und β-Myosin konnten hESC-Kardiomyozyten, die reines α-Myosin, reines β-Myosin oder gemischt α- und β-Myosin exprimierten, voneinander abgegrenzt werden (Abb. 19). Die Expression eines hESC-Kardiomyozyten wurde als „rein“ bezeichnet, wenn nur eine Myosin-Isoform oberhalb des Detektionslimits lag und folglich in der Immunfluoreszenz ausschließlich Sarkomere mit einer My-

osin-Isoform nachgewiesen werden konnten. Die hohe Spezifität der Antikörpers gegen α- und β-Myosin wurde folglich bestätigt.

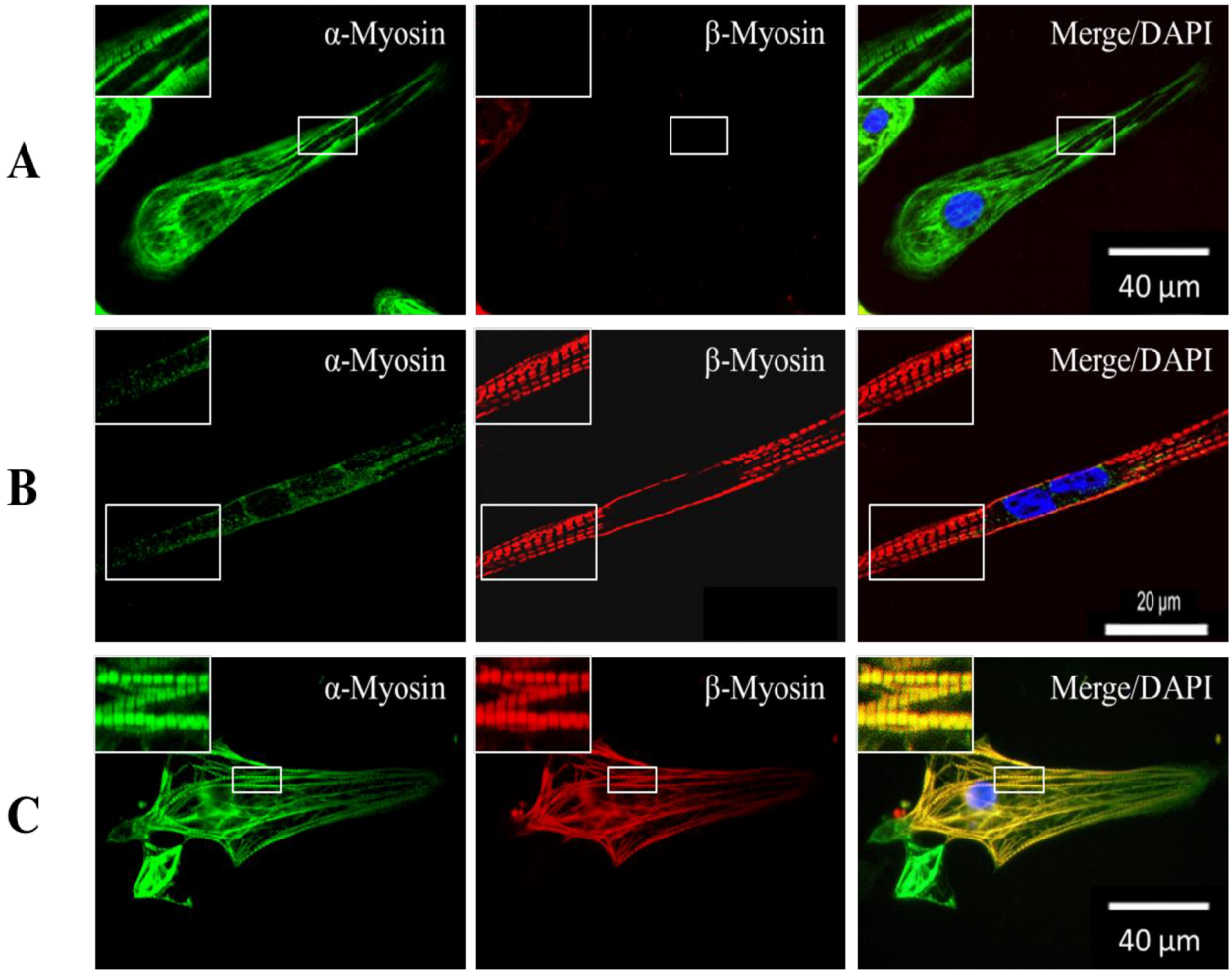


Abbildung 19: Abbildungen von hESC-Kardiomyozyten, die gegen α-Myosin, β-Myosin und mit DAPI gefärbt wurden.
(A) α-Myosin positiver, (B) β-Myosin positiver sowie (C) gemischt α- und β-Myosin positiver hESC-Kardiomyozyt. In der vergrößerten Darstellung sind die Kardiomyozyten-spezifischen Sarkomere in der jeweiligen Fluoreszenz verdeutlicht.

Darüber hinaus zeigten atriale humane Kardiomyozyten, welche sowohl α- als auch β-Myosin exprimierten, ein spezifisches Fluoreszenzmuster nach der Immunfluoreszenzdoppelfärbung gegen α- und β-Myosin ([164]; Abb. 20). Es konnte ein Mosaik von Kardiomyozyten mit unterschiedlicher Myosin-Expression nachgewiesen werden. Das Ergebnis einer Immunfluoreszenzfärbung von hiPS-Kardiomyozyten war ein besonderes Beispiel für die hohe Spezifität der α- und β-Myosin-Antikörper (Abb. 21). In der demonstrierten Gruppe von hiPS-Kardiomyozyten fand sich neben Zellen, die nur β-Myosin exprimierten, eine einzelne, rein α-Myosin positive

Zelle. hiPS-Kardiomyozyten, die exklusiv β-Myosin aufwiesen, zeigten dabei lediglich ein geringes unspezifisches Fluoreszenzsignal für α-Myosin.

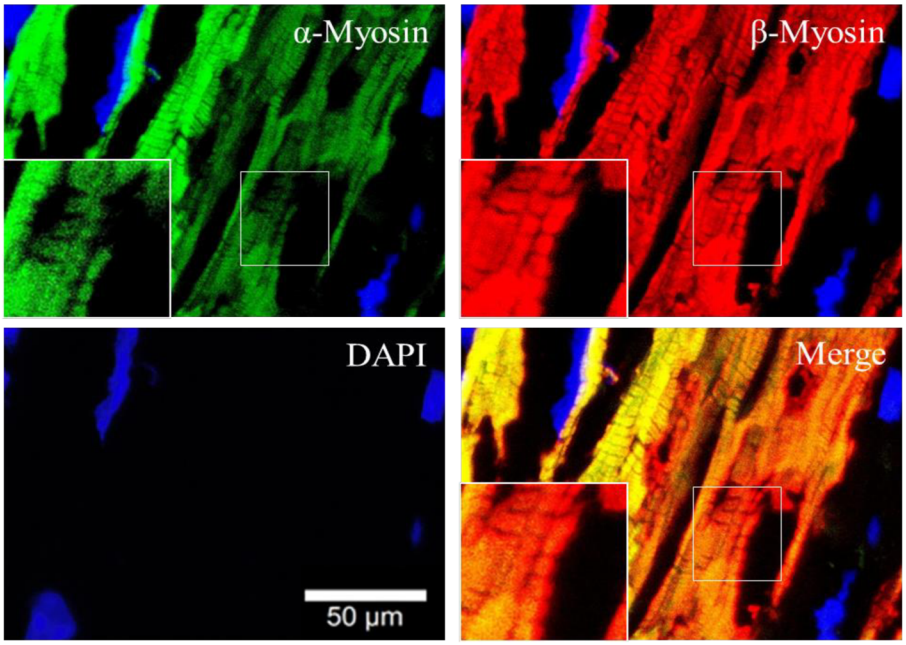


Abbildung 20: Gefrierschnitt aus humanem atrialen Myokard.
Dargestellt ist die Immunfluoreszenzfärbung von humanen atrialen Kardiomyozyten gegen α-, gegen β-Myosin sowie mit DAPI. Artefakte („Löcher im Gewebe“) sind durch das initiale Einfrieren der Gewebeproben in flüssigem Stickstoff ohne Fixierung bedingt.

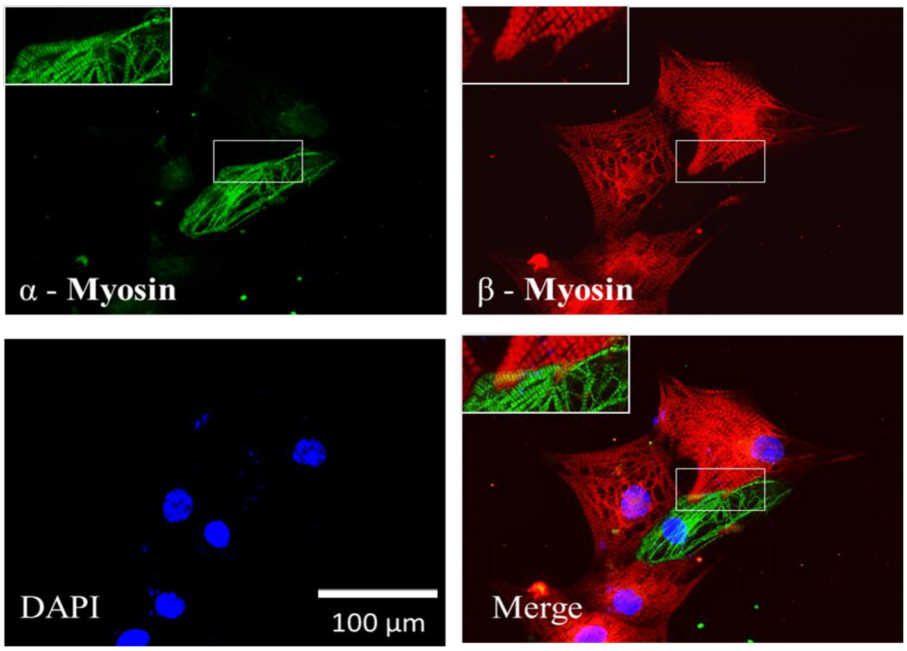


Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung von hiPS-Kardiomyozyten (d84+28).
Dargestellt die Immunfluoreszenzfärbung gegen α-, β-Myosin und mit DAPI. Hervorgehoben die Zellgrenze zwischen hiPS-Kardiomyozyten mit jeweils Expression von nur α- oder β-Myosin. Gelbe Fluoreszenz bedingt durch die zufällige Überlagerung der Einzelfluoreszenzen.

Nach der Verifikation der Antikörperspezifität in verschiedenen Immunfluoreszenzfärbungen konnten die Antikörper gegen α- und β-Myosin für die korrekte Charakterisierung der Myosin-Expression in hESC-Kardiomyozyten verwendet werden. Dabei wurden die hESC-Kardiomyozyten anhand der Myosin-Expression in die Kategorien rein α-Myosin, rein β-Myosin oder gemischt α- und β-Myosin exprimierend eingeteilt (s. 3.2.1).

3.1.2 Wiederfindung und Charakterisierung funktionell analysierter hESC-Kardiomyozyten

Eine wichtige Fragestellung war, inwieweit die Myosin-Isoform einzelner hESC-Kardiomyozyten Einfluss auf die kontraktilen Eigenschaften der jeweils identischen Zelle besitzt. Für diese Analysen war die Charakterisierung der Myosin-Isoform in den funktionell gemessenen hESC-Kardiomyozyten im Anschluss an die Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung notwendig. Hierfür wurde eine neue Methode zur Wiederfindung etabliert (s. 2.4). Diese Wiederfindungsmethode wurde sowohl bei der Langzeitkulitivierung von hESC-Kardiomyozyten auf Laminin-beschichteten Deckgläsern als auch bei der Analyse des Effektes von *T4* auf hESC-Kardiomyozyten eingesetzt.

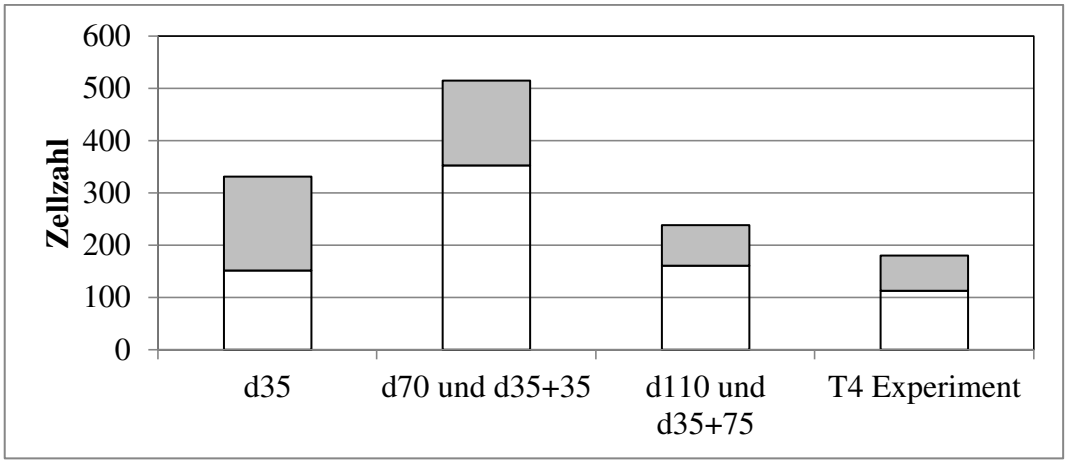


Abbildung 22: Anteil der wiedergefundenen hESC-Kardiomyozyten (schraffierte Fläche) von allen funktionell analysierten hESC-Kardiomyozyten (grauer Balken).

Mithilfe der individuell konstruierten Apparatur konnten insgesamt 61,55% aller funktionell gemessenen hESC-Kardiomyozyten nach der Immunfluoreszenzfärbung wiedergefunden und hinsichtlich ihrer Proteinexpression charakterisiert werden (Abb. 22). Für die Wiederfindung waren neben den dokumentierten Koordinaten vor allem die einzigartige Morphologie der Einzelzelle sowie ihrer Umgebung entscheidend. Zusammengenommen gingen für den ersten Zeitpunkt (d35) 152 der funktionell gemessenen hESC-Kardiomyozyten in die α- und β-Myosin-Analyse

ein, für den zweiten Zeitpunkt (d70 und d35+35) waren es 352 Zellen und für den dritten Zeitpunkt (d110 und d35+75) 161 Zellen (Abb. 22). Für die Untersuchung des Effektes von *T4* auf die Funktion von hESC-Kardiomyozyten wurde die Myosin-Expression von ingesamt 113 Zellen charakterisiert.

3.2 Langzeitkultivierung von hESC-Kardiomyozyten unter verschiedenen Bedingungen

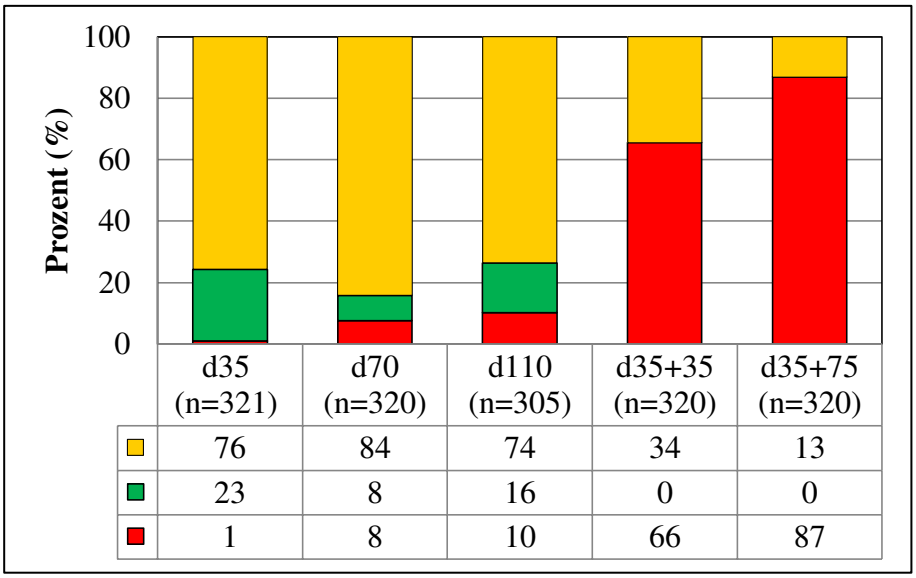
3.2.1 Veränderung der α- und β-Myosin-Expression

Die hESC-Kardiomyozyten wurden nach einer 35-tägigen Selektion und Differenzierung (d35) einerseits im *Cardiac Body* (d70, d110) und andererseits auf Laminin-beschichteten Deckgläsern (d35+35, d35+75) kultiviert. Die Kardiomyozyten wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten hinsichtlich ihrer Expression von α- und β-Myosin in den Sarkomeren charakterisiert. Für die durchzuführenden Untersuchungen mussten auch die hESC-Kardiomyozyten aus den *Cardiac Bodies* auf Deckgläser ausplattiert werden, wobei diese Zeit möglichst kurz gehalten wurde (3-5 Tage). Nach der Immunfluoreszenzfärbung gegen α-, gegen β-Myosin und mit DAPI zur Anfärbung der Zellkerne wurden Aufnahmen von einzelnen hESC-Kardiomyozyten in einem bestimmten Muster angefertigt und anschließend die Myosin-Expression charakterisiert. Dabei wurde das Deckglas vom oberen Rand beginnend in waagerechten Linien abgefahren und in der DAPI-Fluoreszenz auf Zellen hin untersucht. Anhand der Aufnahmen wurden ebenfalls die morphologischen Parameter bestimmt (s. 2.3.4.3; s. 3.2.3).

Mit zunehmender Kultivierungsdauer nahm unabhängig von der Kultivierungsmethode die Anzahl der rein β-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten im Vergleich zu hESC-Kardiomyozyten an d35 zu (1% β-Myosin positive hESC-Kardiomyozyten an d35; Abb. 23). Der Anteil der rein β-Myosin exprimierenden hESC-Kardiomyozyten bei Langzeitkultivierung in den *Cardiac Bodies* lag bei 8% an d70 und erhöhte sich auf 10% an d110 (Abb. 23). Auch bei Langzeitkultivierung auf Laminin-beschichteten Deckgläsern konnte eine Zunahme des Anteils rein β-Myosin positiver Zellen festgestellt werden. So wiesen 66% der hESC-Kardiomyozyten an d35+35 und 87% an d35+75 reines β-Myosin auf (Abb. 23).

Bei Vergleich der unterschiedlichen Kultivierungsmethoden war weiterhin zu erkennen, dass bei Langzeitkultivierung der hESC-Kardiomyozyten auf Laminin-beschichteten Deckgläsern die Zunahme des Anteils rein β-Myosin positiver Zellen wesentlich größer war als bei Kultivierung im *Cardiac Body*. Der Unterschied in dem Anteil an rein β-Myosin exprimierenden hESC-Kardiomyozyten war sowohl nach 70 bzw. 35+35 Tagen (8% im *Cardiac Body* versus 66% auf

Deckgläsern) als auch nach 110 bzw. 35+75 Tagen Kultivierungszeit sehr deutlich (10% im *Cardiac Body* versus 87% auf Deckgläser). Der χ^2-Unabhängigkeitstest bestätigte, dass die Myosin-Expression nicht unabhängig von der Kultivierungsmethode und -zeit war ($p<0{,}001$; χ^2-Test). Insgesamt war nicht die Dauer, sondern vor allem die Art der Kultivierung, in diesem Fall auf Laminin-beschichteten Deckgläsern, der entscheidende Faktor für die Induktion der β-Myosin Expression auf Proteinebene.



	d35 (n=321)	d70 (n=320)	d110 (n=305)	d35+35 (n=320)	d35+75 (n=320)
	76	84	74	34	13
	23	8	16	0	0
	1	8	10	66	87

Abbildung 23: Myosin-Expression in hESC-Kardiomyozyten nach unterschiedlicher Kultivierung.
Prozentualer Anteil der rein α-Myosin (grün), rein β-Myosin (rot) sowie gemischt α- und β-Myosin exprimierenden (gelb) hESC-Kardiomyozyten an allen analysierten Zellen. Zu den Zeitpunkten (d35, d70, d110, d35+35, d35+75) wurden ausschließlich einzelne hESC-Kardiomyozyten klassifiziert. Zellen beider Zellchargen wurden in die Analyse miteinbezogen.

Aus der Literatur bekannte Vorexperimente zeigten, dass hESC-Kardiomyozyten selbst nach längerer Kultivierung auf Deckgläsern stets ein hohes Maß an *MYH6*-mRNA aufwiesen (53). Im Rahmen dieses Experiments waren lediglich unter den hESC-Kardiomyozyten aus den *Cardiac Bodies* Zellen nachzuweisen, die reines α-Myosin exprimierten. Mit 23% war der Anteil der α-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten zu Beginn des Experiments (d35) am höchsten. Mit fortlaufender Kultivierungsdauer in *Cardiac Bodies* nahm der Anteil dieser hESC-Kardiomyozyten zunächst ab auf 8% (d70), um zuletzt wiederum auf 16% (d110) zuzunehmen. Die Kultivierung der hESC-Kardiomyozyten auf Deckgläsern reduzierte die Expression von α-Myosin so weit, dass an d35+35 und d35+75 keine rein α-Myosin positive Zellen nachgewiesen werden konnten (Abb. 23).

Alle α-Myosin exprimierenden hESC-Kardiomyozyten, die auf Deckgläsern kultiviert worden waren, zeigten stets auch β-Myosin. Diese hESC-Kardiomyozyten wurden als gemischt α- und β-Myosin exprimierende hESC-Kardiomyozyten bezeichnet (gelber Balkenanteil; Abb. 23). Der Anteil dieser gemischt exprimierenden hESC-Kardiomyozyten war bei Kultivierung der Zellen auf Deckgläsern im Vergleich zu den rein β-Myosin positiven Zellen deutlich geringer. Hingegen dominierte diese Gruppe von gemischten hESC-Kardiomyozyten unter den analysierten Zellen aus den *Cardiac Bodies* unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt (Abb. 23).

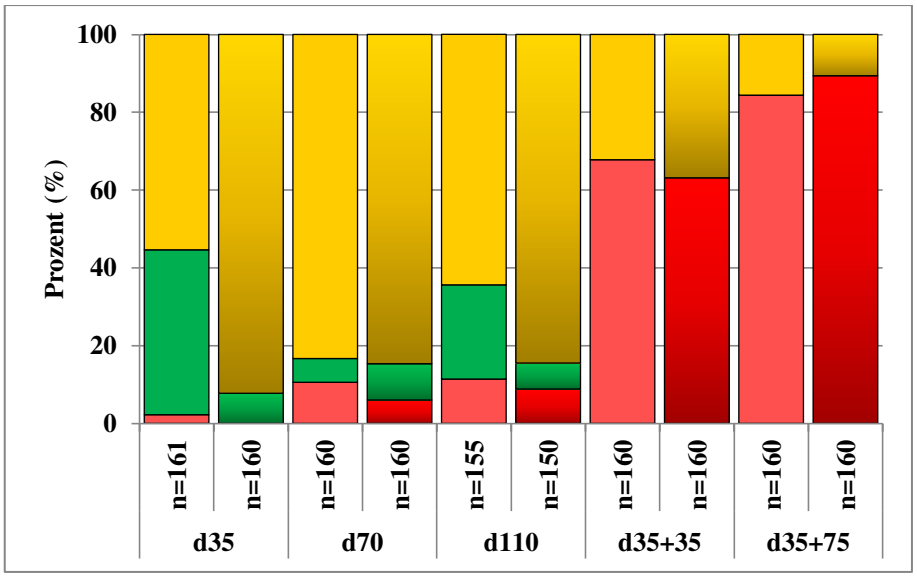


Abbildung 24: Myosin-Expression in hESC-Kardiomyozyten nach unterschiedlicher Kultivierung. Vergleich zweier unabhängiger Zellchargen.
Anteile der rein β-Myosin (Rot), rein α-Myosin (Grün) und gemischt exprimierenden hESC-Kardiomyozyten (Gelb) an allen analysierten Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten. 1. Zellcharge (linke Balkenreihe) ist der 2. Zellcharge (rechte Balkenreihe) gegenübergestellt.

Die Reproduzierbarkeit der Resultate wurde mithilfe einer zweiten, unabhängigen Charge von hESC-Kardiomyozyten evaluiert. Die Kultivierungsbedingungen, Messzeitpunkte und durchgeführten Analysen waren praktisch identisch mit denen des ersten Experimentes. Die Analysen ergaben ein ähnliches Verhältnis der Myosin-Expression in den beiden Zellchargen (Abb. 24). Hinsichtlich der Anzahl der rein α-Myosin und gemischt exprimierenden hESC-Kardiomyozyten bestand jedoch ein erkennbarer Unterschied. hESC-Kardiomyozyten der ersten Zellcharge wiesen vor allem an d35 und d110 einen höheren Anteil an Zellen auf, die ausschließlich α-Myosin exprimierten. Parallel dazu war die Gruppe der gemischt exprimierenden hESC-Kardiomyozyten im Vergleich zur zweiten Zellcharge geringer (Abb. 24). Hinsichtlich des Anteils rein β-Myosin positiver hESC-Kardiomyozyten waren beide Zellchargen miteinander vergleichbar. Durch die

Kultivierung auf Deckgläsern stieg der Anteil an rein β-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten im Vergleich zur Kultivierung in *Cardiac Bodies* deutlich an (68% bzw. 63% an d35+35 und 84% bzw. 89% an d35+75; Abb. 24).

Demzufolge konnte im zweiten, unabhängigen Experiment bestätigt werden, dass die Kultivierung von hESC-Kardiomyozyten auf Laminin-beschichteten Deckgläsern die Expression des β-Myosins induziert. Da die Verteilung der unterschiedlichen Myosin-Isoformen in den hESC-Kardiomyozyten beider Zellchargen insgesamt ähnlich war, wurden alle analysierten Zellen in die eingangs aufgeführte Statistik miteinbezogen (Abb. 23).

3.2.2 Myosin-Expression in gemischt α- und β-Myosin exprimierenden hESC-Kardiomyozyten

Die Veränderung der Myosin-Expression in den hESC-Kardiomyozyten durch Langzeitkultivierung auf Laminin-beschichteten Deckgläsern wurde bei detaillierter Analyse der gemischt α- und β-Myosin exprimierenden Zellen noch prägnanter.

Hierfür wurde die Verteilung des Fluoreszenzsignals für α-Myosin und für β-Myosin innerhalb der Zellen genauer untersucht. Die β-Myosin positiven Sarkomere der hESC-Kardiomyozyten wurden auf die parallele Expression von α-Myosin geprüft und umgekehrt. hESC-Kardiomyozyten, die neben vielen Sarkomeren mit gemischter α- und β-Myosin-Expression auch einige Sarkomere mit reiner α- oder β-Myosin-Expression zeigten, und hESC-Kardiomyozyten, die gänzlich gemischt exprimierende Sarkomere zeigten, konnten voneinander unterschieden werden (Abb. 25).

Es zeigte sich, dass unter den gemischt exprimierenden, auf Deckgläsern kultivierten hESC-Kardiomyozyten an d35+35 84% der Zellen auch einige rein β-Myosin positive Sarkomere aufwiesen (Abb. 26). Dieser Anteil an hESC-Kardiomyozyten nahm mit fortlaufender Kultivierung auf Deckgläsern weiter auf 95% zu (Abb. 26). Dahingegen besaß der größte Teil der hESC-Kardiomyozyten aus den *Cardiac Bodies* ausschließlich Sarkomere, die gleichzeitig sowohl α-Myosin als auch β-Myosin exprimierten. Der Anteil dieser Zellen lag dabei zu jedem Zeitpunkt bei näherungsweisen 70% (Abb. 26). hESC-Kardiomyozyten, in denen einzelne Sarkomere ausschließlich α-Myosin exprimierten, waren lediglich bei Kultivierung in *Cardiac Bodies* nachzuweisen. Verglichen mit den hESC-Kardiomyozyten vom d35 nahm der Anteil dieser Zellen im Verlauf der Zeit jedoch von 24% (d35) auf 12% (d70) bzw. 13% (d110) ab (Abb. 26).

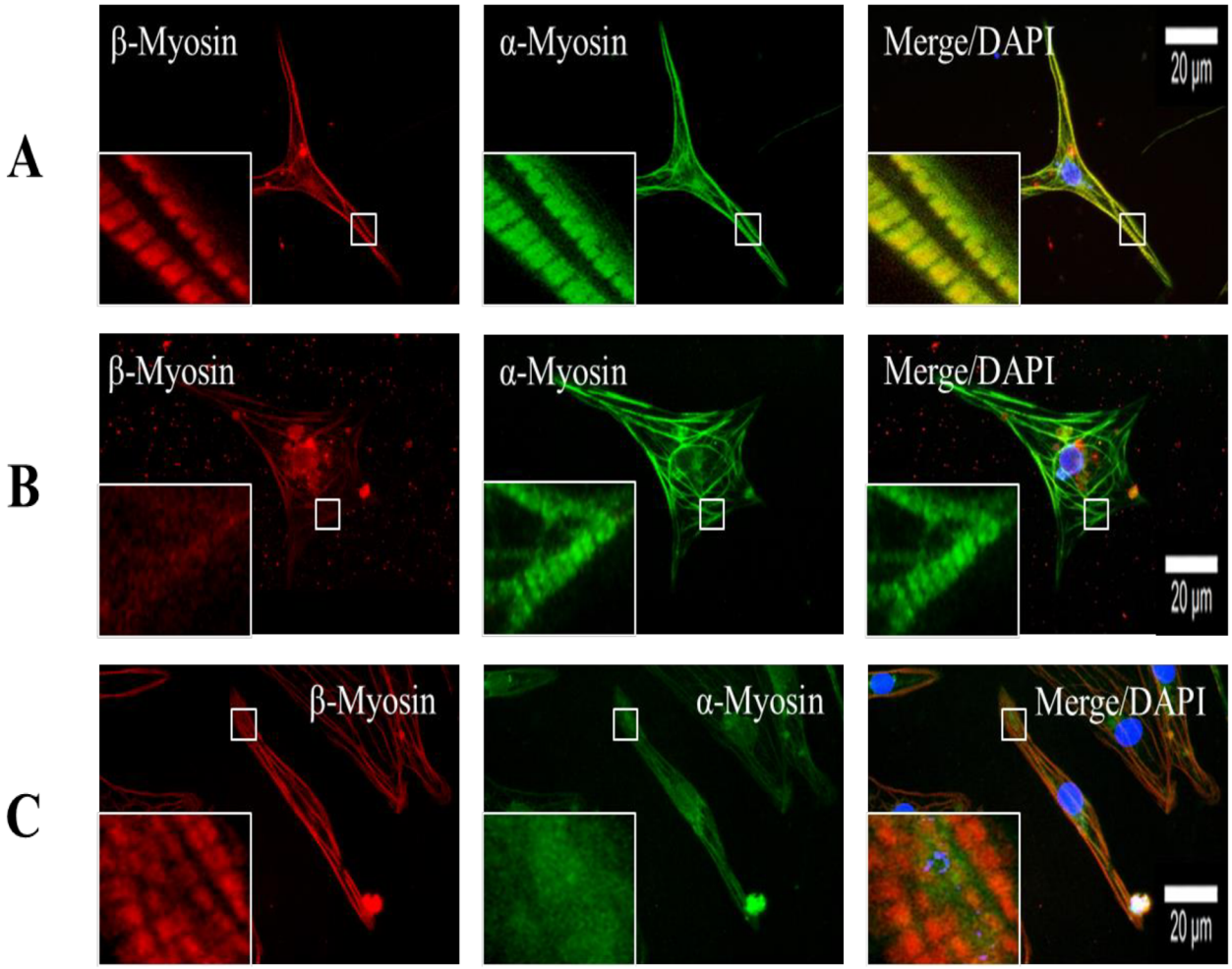
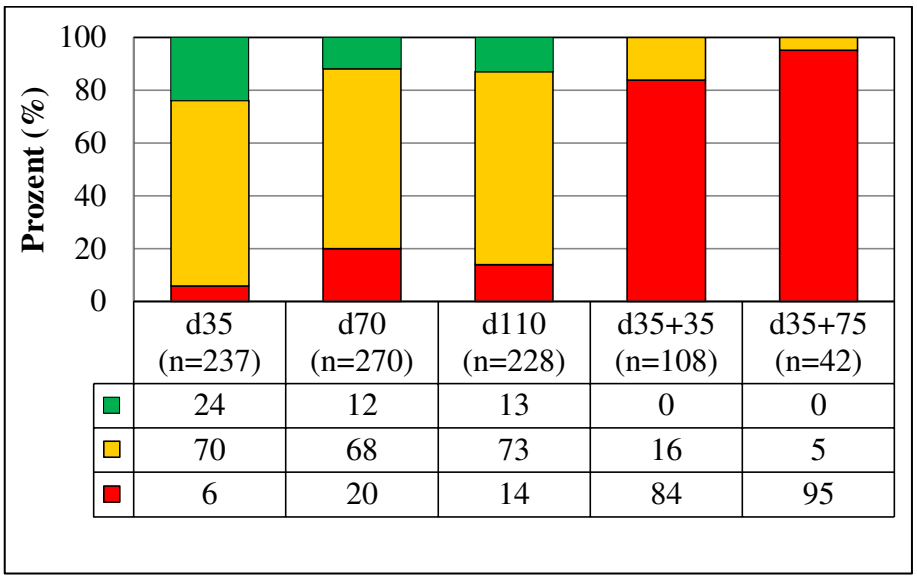


Abbildung 25: hESC-Kardiomyozyten mit gemischter α- und β-Myosin-Expression.
Darstellung von hESC-Kardiomyozyten nach der Färbung gegen α-Myosin, gegen β-Myosin und mit DAPI. (A) hESC-Kardiomyozyt, der ausschließlich gemischt α-Myosin und β-Myosin exprimierende Sarkomere aufweist. (B) hESC-Kardiomyozyt, der neben gemischt exprimierenden Sarkomeren auch rein α-Myosin positive Sarkomere besitzt. (C) hESC-Kardiomyozyt, der neben gemischt exprimierenden Sarkomeren auch rein β-positive Sarkomere zeigt.

Zusammenfassend konnten zwei Effekte durch die Kultivierung der hESC-Kardiomyozyten auf Laminin-beschichteten Deckgläsern gezeigt werden: Zum einen nahm auf den Deckgläsern der Anteil der hESC-Kardiomyozyten mit reiner β-Myosin-Expression im Vergleich zu den Zellen aus den *Cardiac Bodies* deutlich zu (s. 3.2.1). Zum anderen waren unter den gemischt α- und β-Myosin exprimierenden Zellen auf Deckgläsern vorzugsweise hESC-Kardiomyozyten nachzuweisen, die Gruppen von β-Myosin positiven Sarkomeren aufwiesen. Die genannten Resultate aus den Immunfluoreszenzfärbungen konnten zu jedem Untersuchungszeitpunkt mithilfe von institutsintern durchgeführten Western Blot-Analysen bestätigt werden (Meike Wendland in [213]).

Ein Nachteil von Western Blot-Analysen besteht darin, dass diese keine Informationen über die Verteilung der einzelnen Myosin-Isoformen in den Sarkomeren der hESC-Kardiomyozyten liefern. Mithilfe der spezifischen Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass Sarkomere nicht mosaikähnlich reine Myosin-Isoformen exprimieren, sondern in einem Sarkomer zugleich α-Myosin und β-Myosin exprimiert werden können (Abb. 25).



	d35 (n=237)	d70 (n=270)	d110 (n=228)	d35+35 (n=108)	d35+75 (n=42)
■	24	12	13	0	0
■	70	68	73	16	5
■	6	20	14	84	95

Abbildung 26: Unterteilung der gemischt α- und β-Myosin exprimierenden hESC-Kardiomyozyten.
Anteile der unterschiedlichen Typen gemischter hESC-Kardiomyozyten an der Gesamtzahl der gemischten hESC-Kardiomyozyten abhängig von Kultivierungsmethode und -dauer. Unterschieden wurden hESC-Kardiomyozyten, deren Sarkomere sämtlich beide Isoformen, α- und β- Myosin aufwiesen (Gelb), von gemischten hESC-Kardiomyozyten, die zusätzlich entweder Gruppen von rein α-Myosin positiven Sarkomeren (Grün) oder Gruppen von rein β-Myosin positiven Sarkomeren besaßen (Rot). Alle gemischten Zellen beider Zellchargen sind miteinbezogen.

3.2.3 Anzahl von hESC-Kardiomyozyten an der Gesamtzahl der Zellen auf Laminin-beschichteten Deckgläsern

In Anbetracht der Ergebnisse stellte sich die Frage nach der Ursache der Zunahme von rein β-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten auf den Deckgläsern. Die Expression des β-Myosins könnte einerseits einen Überlebensvorteil für hESC-Kardiomyozyten auf Deckgläsern dargestellt haben. Andererseits könnte innerhalb der Zellen selbst ein Wechsel der Myosin-Expression stattgefunden haben. Zur Klärung dieser Frage wurde die Zellzahl pro Deckglas für die Zeitpunkte d35, d35+35 und d35+75 und der Anteil der Kardiomyozyten unter diesen Zellen ermittelt (s. 2.3.4.2).

Die Untersuchungen zeigten, dass die Gesamtzahl der Zellen während 35 Tagen Kultivierung auf Laminin-beschichteten Deckgläsern um den Faktor 3, während weiteren 40 Tagen nochmals um

den Faktor 2,8 zunahm (Abb. 27). Somit stieg die ermittelte Zellzahl von 5544 (d35) zunächst auf 16574 (d35+35), dann auf 46461 Zellen pro Deckglas (d35+75). Die Zunahme der Zellzahl von d35 zu d35+35 und von d35+35 zu d35+75 war signifikant ($p<0,01$; t-Test).

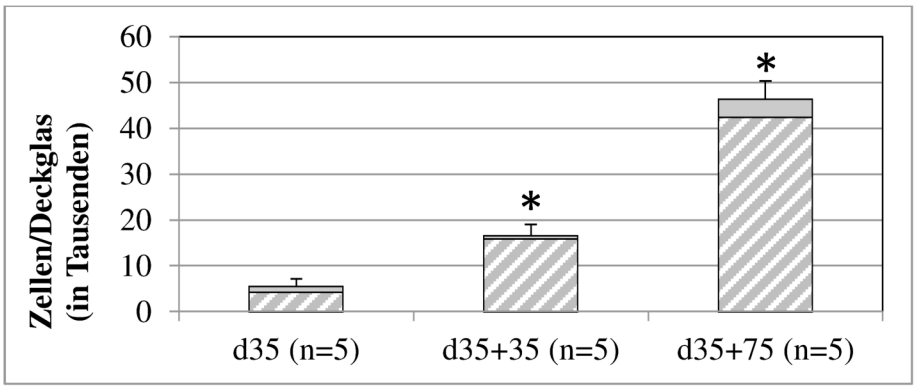


Abbildung 27: Zellzahl und Anteil von hESC-Kardiomyozyten auf Deckgläsern zu verschiedenen Zeitpunkten.
Neben der Gesamtzahl der Zellen auf Laminin-beschichteten Deckgläsern ist der Anteil der hESC-Kardiomyozyten unter diesen Zellen hervorgehoben (schraffierte Fläche). *$p<0,01$; t-Test. Analyse von n=5 Deckgläsern.

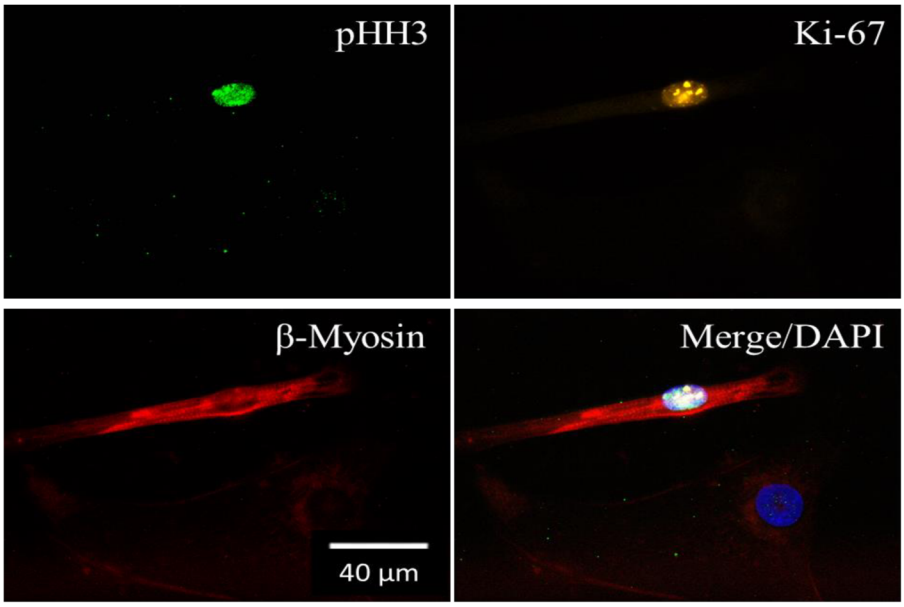


Abbildung 28: Analyse der Zellzyklusaktivität in hESC-Kardiomyozyten durch eine Immunfluoreszenzfärbung gegen pHH3, Ki-67, β-Myosin und mit DAPI. Quelle: [213]
Beispiel eines pHH3-, Ki-67- und β-Myosin-positiven hESC-Kardiomyozyten. Dieser hESC-Kardiomyozyt befindet sich in der aktiven Teilungsphase des Zellzyklus (M-Phase).

Nicht nur die Gesamtzahl der Zellen auf Laminin-beschichteten Deckgläsern, sondern auch der Anteil der hESC-Kardiomyozyten an dieser Gesamtzahl erhöhte sich im Verlauf der Kultivierung von 78% an d35 auf 96% an d35+35 und 91% an d35+75. Unter Einbezug der bisherigen

Ergebnisse zur Myosin-Expression konnten somit etwa 87 hESC-Kardiomyozyten am d35, 10411 am d35+35 und 36888 am d35+75 pro Deckglas gefunden werden, die reines β-Myosin exprimierten (s. 3.2.1).

Insgesamt zeigte sich eine deutlich Steigerung der Anzahl an hESC-Kardiomyozyten auf Deckgläsern, was die für hESC-Kardiomyozyten typische Teilungsfähigkeit illustriert. Immunfluoreszenzfärbungen gegen den Proliferationsmarker Ki-67 und den Marker der Mitosephase Phosphohiston-3 (pHH3) bestätigten eine Zellzyklusaktivität in rein β-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten ([213]; Abb. 28). Die deutliche Zunahme der Anzahl an rein β-Myosin exprimierenden hESC-Kardiomyozyten kann demnach sowohl durch einen Wechsel der Myosin-Isoform von α- zu β-Myosin als auch durch die Teilung der hES-Zellen erklärt werden (s. 4.2.1.).

3.2.4 Morphologie der hESC-Kardiomyozyten

Nach der Analyse der Expression von α- und β-Myosin wurden die hESC-Kardiomyozyten der unterschiedlichen Untersuchungsgruppen morphologisch charakterisiert. Die erfassten morphologischen Parameter der hESC-Kardiomyozyten sind in Tab. 1 dargestellt.

	d35	d70	d110	d35+35	d35+75	adulter Kardiomyozyt
Analysierte hESC-Kardiomyozyten	n=328	n=320	n=306	n=320	n=320	
Zellgröße (µm²)	2464 ±1383	2869 ±1291**	3734 ±1781**	1709 ±1132**	1109 ±707**	1800$^{\overline{+}}$
Länge (µm)	92,9 ±29,8	108,9 ±29,6**	120,3 ±27,7**	89,8 ±24,3	77,5 ±23,5**	107 ±7^{+}
Breite (µm)	48,1 ±19,8	49,1 ±19,4	56,8 ±19,9**	30,1 ±17,5**	23,2 ±14,1**	16,9 ±1,3^{+}
Zirkularitätsindex	0,55 ±0,23	0,49 ±0,22**	0,5 ±0,21*	0,38 ±0,26**	0,34 ±0,24**	0,16$^{\overline{+}}$
Mehrkernige Zellen	7%	2%	5%	5%	13%	25%$^{+}$
Sarkomerlänge (µm)	1,59 ±0,21	1,79 ±0,19**	1,81 ±0,2**	1,71 ±0,17**	1,64 ±0,2**	1,84 ±0,02^{+}

Tabelle 1: Morphologische Parameter im Vergleich.
Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zu den Zellen des d35 sind gekennzeichnet (*p<0.01, **p<0.001; t-Test). Als Vergleich sind in der rechten Spalte die Werte für adulte ventrikuläre Kardiomyozyten aus der Literatur angeführt. Mit „$^{+}$“ markierte Werte entstammen (5). Die in (5) genannten Zahlen wurden zur Berechnung der mit „$^{\overline{+}}$“ hervorgehobenen Werte herangezogen. Der Zirkularitätsindex wurde aus dem Quotienten der Zellbreite/Zelllänge berechnet.

Auch in diesem Fall wurden hESC-Kardiomyozyten aus unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen und zu den verschiedenen Zeitpunkten miteinander verglichen (s. 3.2.1). Anhand von beispielhaften Fluoreszenzaufnahmen wird im Folgenden die spezifische Morphologie der hESC-Kardiomyozyten zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten näher erläutert.

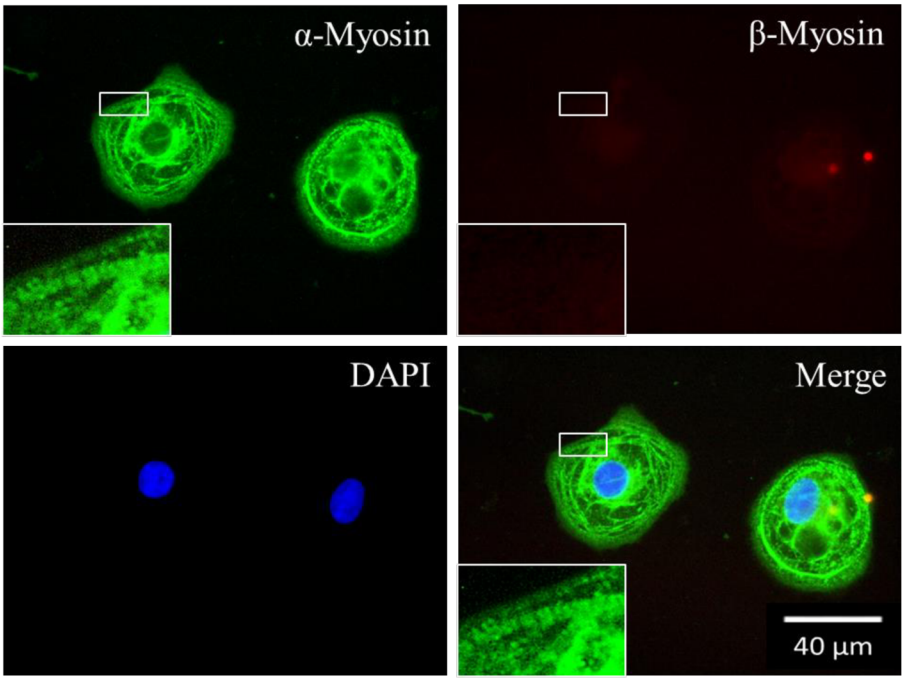


Abbildung 29: hESC-Kardiomyozyten an d35.
hESC-Kardiomyozyten gefärbt gegen α-, gegen β-Myosin und mit DAPI. Das spezifische α-Myosin-Fluoreszenzsignal in den den Myofibrillen ist in einer vergrößerten Darstellung demonstriert. Dargestellte Zellen sind ausschließlich α-Myosin positiv.

Nach Kultivierung in *Cardiac Bodies* für 35 Tage waren die hESC-Kardiomyozyten in ihrem Erscheinungsbild sehr variabel (Abb. 29). So wurde neben runden oder länglichen auch jede andere vorstellbare Form von Zellen gefunden. Diese Variabilität spiegelte sich auch in der Anordnung der Myofibrillen wieder. hESC-Kardiomyozyten an d35 wiesen zwar Sarkomere und Myofibrillen auf, es war aber keine strukturierte Organisation dieser Myofibrillen wie in adulten Kardiomyozyten zu erkennen. Die Myofibrillen waren meist netzartig zueinander ausgerichtet und nur in geringer Anzahl ausgebildet. Die höchste Dichte der Myofibrillen war randständig zu finden (Abb. 29). Hinsichtlich der erhobenen Parameter unterschieden sich die hESC-Kardiomyozyten des d35 in jedem analysierten Parameter deutlich von adulten ventrikulären Kardiomyozyten (Tab. 1). Unter Einbezug der Resultate aus 3.2.1 ähneln diese hESC-Kardiomyozyten am ehesten frühen Entwicklungsstufen humaner Kardiomyozyten.

Nach längerer Kultivierung in *Cardiac Bodies* (d70, d110) konnte keine wesentliche Veränderung der Morphologie in Richtung eines adulten Kardiomyozyten festgestellt werden. hESC-Kardiomyozyten an d70 und d110 wiesen ebenfalls eine erhebliche Variabilität ihrer Form auf (Abb. 30, 31). Typischerweise bildeten die hESC-Kardiomyozyten, die länger in *Cardiac Bodies* kultiviert worden waren, zelluläre Ausläufer, sodass unzählige interzelluläre Verbindungen entstehen konnten (Abb. 30, 31). Dies erschwerte sowohl die funktionellen als auch morphologischen Untersuchungen, da diese idealerweise nur an einzelnen Zellen erfolgten. Im Vergleich zu den hESC-Kardiomyozyten an d35 nahm die intrazelluläre Dichte an Myofibrillen an d70 und d110 zwar zu, aber eine strikte parallele Ordnung, wie sie in adulten Kardiomyozyten zu finden ist, war nicht zu erkennen. Myofibrillen durchzogen üblicherweise netzartig das Zellinnere (Abb. 30, 31).

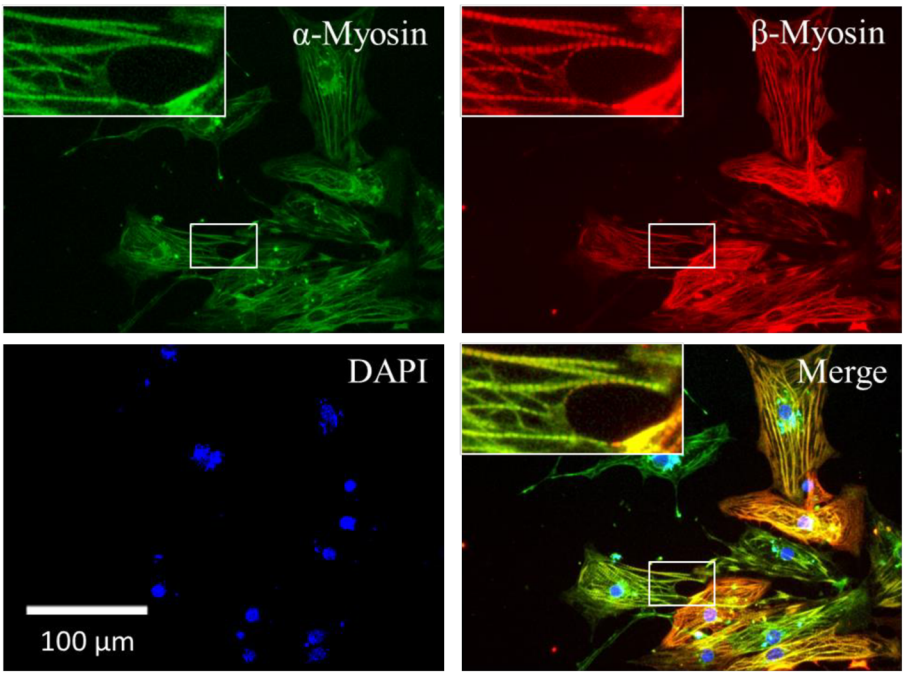


Abbildung 30: hESC-Kardiomyozyten aus Cardiac Bodies an d70.
hESC-Kardiomyozyten gefärbt gegen α-, gegen β-Myosin und mit DAPI. Typische zelluläre Ausläufer sind in einer vergrößerten Darstellung demonstriert. Gut zu erkennen ist ebenfalls die vorwiegend gemischte Expression von α- und β-Myosin in den meisten Zellen.

Auch die morphologischen Parameter der hESC-Kardiomyozyten an d70 und d110 unterschieden sich von adulten Kardiomyozyten. Die Größe der hESC-Kardiomyozyten nahm kontinuierlich zu, was auf eine Vergrößerung der Länge und der Breite zurückzuführen war (d70 und d110; Tab. 1). Durch den weitestgehend parallelen Anstieg dieser beiden Größen änderte sich der errechnete Zirkularitätsindex zwar signifikant, entsprach aber dennoch nicht dem eines adulten

Kardiomyozyten (Tab. 1). Im Gegensatz zu den bisher genannten strukturellen Parametern war die mittlere Sarkomerlänge mit 1,79±0,19µm (d70) und 1,81±0,2µm (d110) der eines adulten Kardiomyozyten ähnlich.

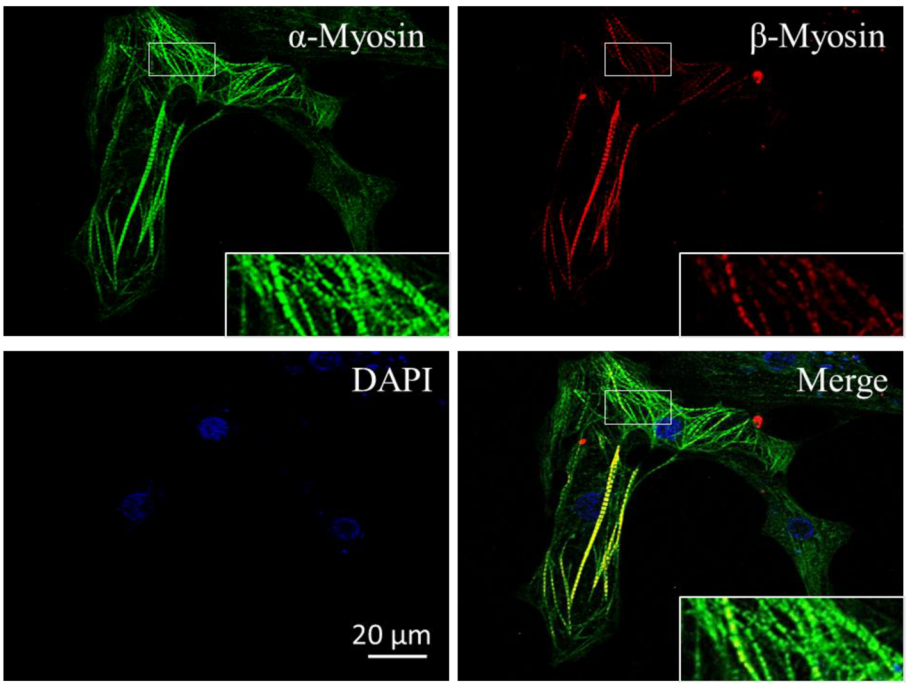


Abbildung 31: hESC-Kardiomyozyten aus Cardiac Bodies an d110.
hESC-Kardiomyozyten gefärbt gegen α-, gegen β-Myosin und mit DAPI. Die Anordnung der Myofibrillen ist in einer vergrößerten Darstellung demonstriert. Typisch sind die interzellulären Ausläufer und die vorwiegend gemischte α- und β-Myosin Expression der hESC-Kardiomyozyten.

Verglichen mit den hESC-Kardiomyozyten aus den *Cardiac Bodies* kam es in hESC-Kardiomyozyten, die 35 Tage auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren (d35+35), zu einer deutlichen Veränderung ihrer Morphologie. Zwar konnten auch nach Kultivierung auf Deckgläsern hESC-Kardiomyozyten jedweder Form nachgewiesen werden, der überwiegende Teil der Kardiomyozyten war jedoch länglich. Diese Entwicklung wurde durch eine Abnahme des Zirkularitäsindex bestätigt (Tab. 1). Außerdem bildeten hESC-Kardiomyozyten an d35+35, anders als die Zellen aus den *Cardiac Bodies*, kaum zelluläre Fortsätze. Es entwickelten sich Gruppierungen von zahlreichen eng zusammenliegenden Einzelzellen, die meist keinen Kontakt zueinander besaßen (Abb. 32). Somit lagen optimale Bedingungen für die durchzuführenden funktionellen Untersuchungen vor.

Auch die ermittelten morphologischen Parameter zeigten deutliche Unterschiede im Vergleich zu den hESC-Kardiomyozyten aus *Cardiac Bodies* des identischen Zeitpunktes. Die Zellgröße war signifikant kleiner, wodurch hESC-Kardiomyozyten an d35+35 der tatsächlichen Größe ei-

nes adulten Kardiomyozyten am nächsten kamen (Tab. 1). Da die Breite der hESC-Kardiomyozyten deutlicher abnahm als die Länge, sank der daraus berechnete Zirkularitätsindex signifikant ab. Die mittleren Sarkomerlängen der hESC-Kardiomyozyten, die auf Deckgläsern kultiviert worden waren, waren signifikant kürzer als die der gleichalten hESC-Kardiomyozyten aus den *Cardiac Bodies* (Tab. 1). Mit Sarkomerlängen von 1,71±0,17µm an d35+35 und 1,64±0,2µm an d35+75 unterschieden sich die auf Deckgläsern kultivierten hESC-Kardiomyozyten auch von adulten Kardiomyozyten mit 1,84±0,02µm Sarkomerlänge. Die Morphologie der hESC-Kardiomyozyten an d35+35 war jedoch der eines humanen adulten Kardiomyozyten am ähnlichsten. Parallel und in Längsrichtung angeordnete Myofibrillen, wie in adulten Kardiomyozyten, wurden in hESC-Kardiomyozyten nach 35 Tagen Kultivierung auf Deckgläsern gefunden. Auch die Zahl der Myofibrillen pro Zelle nahm bei Kultivierung auf Deckgläsern deutlich zu (Abb. 32).

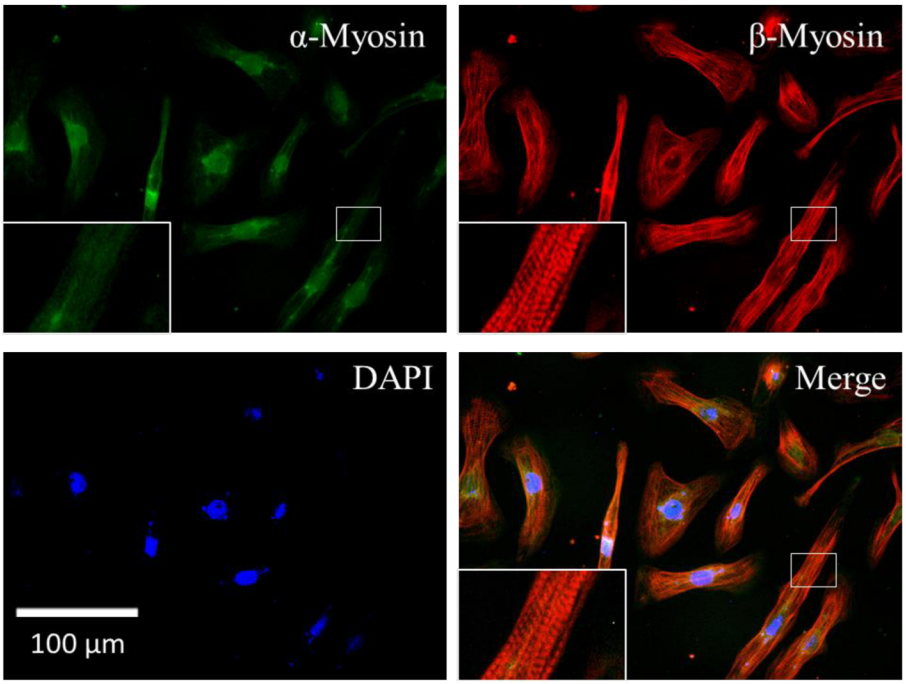


Abbildung 32: Auf Deckgläsern kultivierte hESC-Kardiomyozyten an d35+35.
hESC-Kardiomyozyten gefärbt gegen α-, gegen β-Myosin und mit DAPI. Die parallele Anordnung der Myofibrillen ist in einer vergrößerten Darstellung demonstriert. Das Bild zeigt ebenfalls die für diesen Zeitpunkt typische große Anzahl an hESC-Kardiomyozyten mit rein β-Myosin positiven Myofibrillen. In der Grünfluoreszenz (α-Myosin) ist lediglich ein unspezifisches Fluoreszenzsignal, also keine Sarkomere, zu erkennen.

Diese in den hESC-Kardiomyozyten beobachtete Entwicklung in Richtung eines adulten Phänotyps setzte sich in den darauffolgenden 40 Tagen der Kultivierung auf Deckgläsern nicht fort. So nahmen gegenüber den hESC-Kardiomyozyten an d35+35 die Zellgröße, Länge, Breite sowie

die mittlere Sarkomerlänge ab (Tab. 1). Lediglich im Hinblick auf den Zirkularitätsindex und dem Anteil an mehrkernigen Zellen kam es zu einer Annäherung an die Werte für adulte Kardiomyozyten (Tab. 1).

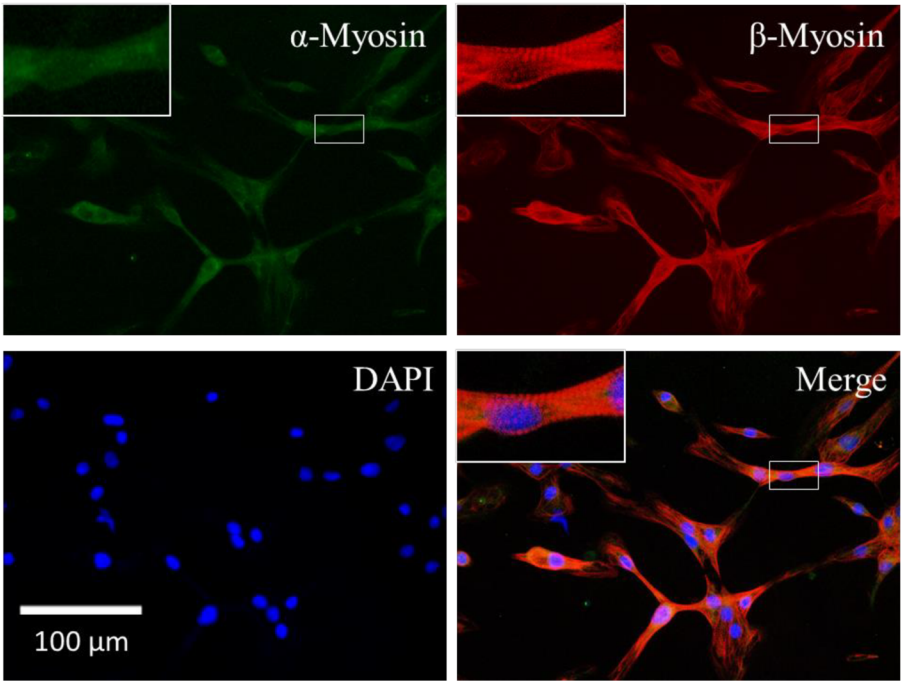


Abbildung 33: Auf Deckgläsern kultivierte hESC-Kardiomyozyten an d35+75.
hESC-Kardiomyozyten gefärbt gegen α-, gegen β-Myosin und mit DAPI. Die Anordnung der Myofibrillen ist in der vergrößerten Darstellung demonstriert. Typisch sind kleine, runde hESC-Kardiomyozyten und hESC-Kardiomyozyten, die Ausläufer und Netzwerke bilden.

Die weitere morphologische Analyse der hESC-Kardiomyozyten an d35+75 zeigte verzweigte Zellverbände und vergleichsweise kleine, runde Zellen (Abb. 33). Die hESC-Kardiomyozyten, die zum Messzeitpunkt d35+35 einzeln nebeneinander angeordnet waren, schienen Kontakt zueinander gefunden zu haben, sodass Geflechte von Zellen entstehen konnten. Dies erschwerte die funktionelle und morphologische Analyse dieser Zellen. Darüber hinaus veränderte sich auch die myofibrilläre Organisation entscheidend. In den netzartigen Zellkollektiven waren die Myofibrillen zwar kompakter, aber oft auch weniger parallel als an d35+35 (Abb. 33). Die eher runden hESC-Kardiomyozyten an d35+75 besaßen nur noch wenige und zugleich ungeordnete Myofibrillen.

Zusammengefasst zeigten die Daten, dass die hESC-Kardiomyozyten auf Deckgläsern an d35+35 neben einer hohen β-Myosin-Expression die größte morphologische Ähnlichkeit zu den adulten Kardiomyozyten aufwiesen. Hingegen wich die Morphologie der hESC-Kardiomyozyten nach längerer Kultivierungszeit auf Deckgläsern (d35+75) deutlich von der adulter Kardiomy-

ozyten ab. Die hESC-Kardiomyozyten, die in *Cardiac Bodies* kultiviert worden waren, wiesen zu keinem Zeitpunkt eine zu adulten Kardiomyozyten ähnliche Morphologie auf.

3.3 Kultivierung von hESC-Kardiomyozyten mit *T4*

3.3.1 Myosin-Expression in hESC-Kardiomyozyten unter Einfluss von *T4*

Die Effekte der Schilddrüsenhormone *T4* und *T3* auf adulte Kardiomyozyten sind umfassend beschrieben (s. 1.3). Neuere wissenschaftliche Untersuchungen an hiPS- und m/hESC-Kardiomyozyten konnten bestätigen, dass diese Zellen auf die Anwesenheit von *T3* ähnlich reagierten wie adulte humane Kardiomyozyten [113, 228].

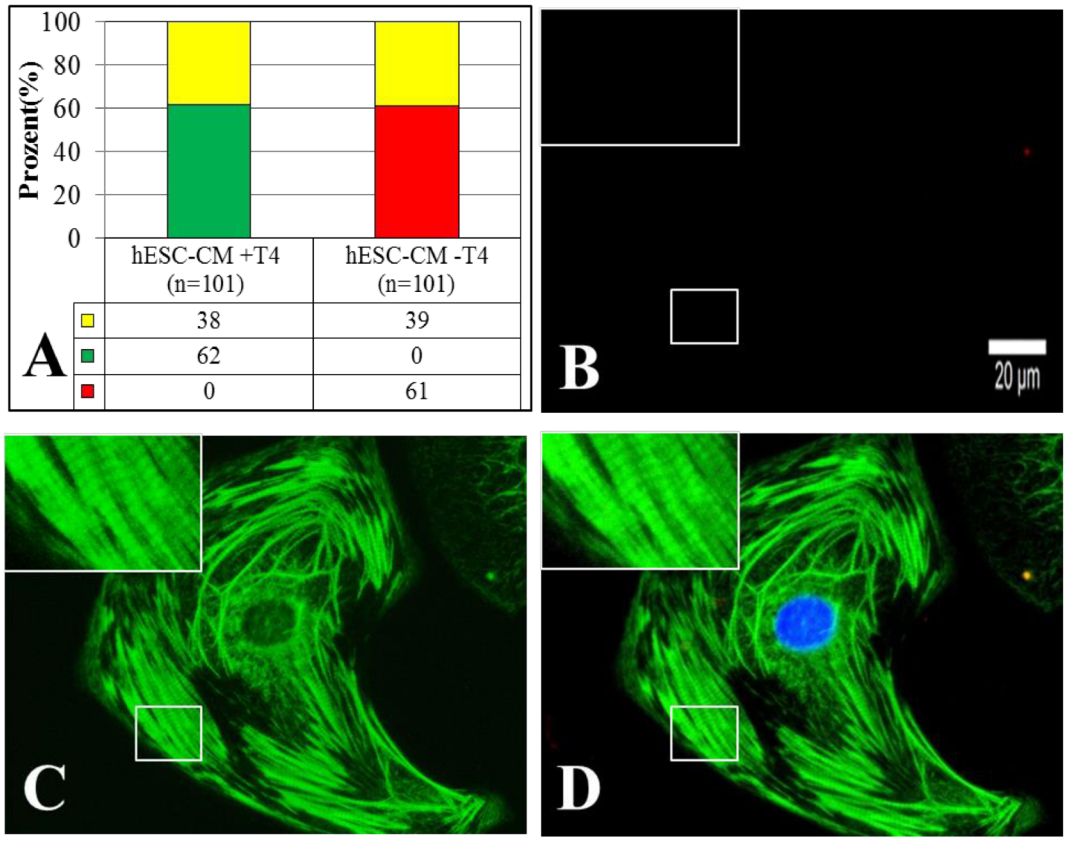


Abbildung 34: Myosin-Expression in hESC-Kardiomyozyten (hESC-CM) mit und ohne T4 Kultivierung.

(A) Prozentualer Anteil von hESC-Kardiomyozyten mit reiner α-Myosin- (grün), reiner β-Myosin- (rot) oder gemischter α- und β-Myosin-Expression (gelb). Die Myosin-Expression wurde zwischen hESC-Kardiomyozyten, die nach 19 Tagen Kultivierung auf Deckgläsern für 14 Tage mit *T4* inkubiert worden waren (hESC-CM +T4; d21+19+14), und hESC-Kardiomyozyten, die 40 Tage ohne *T4* auf Deckgläsern kultiviert worden waren (hESC-CM -T4; d21+40), verglichen. n=101 Einzelzellen wurden pro Untersuchungsgruppe analysiert. (B-D) Rein α-Myosin positiver hESC-Kardiomyozyt nach 14tägiger Kultivierung mit *T4*. Darstellung des hESC-Kardiomyozyten in der α-Myosin- (C), β-Myosin-Fluoreszenz (B) sowie im überlagerten Bild mit DAPI-Färbung (D).

Ziel der hier durchgeführten Experimente war es, die Auswirkungen von *T4* auf hESC-Kardiomyozyten zu untersuchen, die auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren. Dahinter stand unter anderem die Frage, inwieweit die Maturierung von hESC-Kardiomyozyten durch Stimulation mit Schilddrüsenhormen gefördert werden kann. Es wurde untersucht, wie die hESC-Kardiomyozyten, die einige Zeit auf Deckgläsern kultiviert worden waren, auf *T4* reagieren und ob ein Wechsel zu fast ausschließlicher Expression von α-Myosin sowie die hiermit verbundene funktionelle Veränderung der Zellen festgestellt werden können. Hierfür wurden hESC-Kardiomyozyten, die insgesamt 33 Tage, davon 14 Tage in einem *T4* haltigem Medium, auf Deckgläsern kultiviert worden waren, verglichen mit hESC-Kardiomyozyten der Kontrollgruppe, die insgesamt 40 Tage ohne *T4* auf Deckgläsern kultiviert worden waren (s. 2.2.2). Analysiert wurde die Expression von α- und β-Myosin, die Morphologie sowie die Funktion der unterschiedlich kultivierten hESC-Kardiomyozyten.

Eine Überprüfung der Myosin-Expression in den hESC-Kardiomyozyten nach 7 Tagen Kultivierung mit *T4* ergab, dass zwar ein Wechsel zu α-Myosin erkennbar war, aber zu diesem Zeitpunkt die Einzelzellen fast ausschließlich eine gemischte Expression von α- und β-Myosin aufwiesen (Daten hier nicht gezeigt). Nach einer weiteren Woche Kultivierung mit *T4* zeigten rund 62% der hESC-Kardiomyozyten eine Expression von ausschließlich α-Myosin (Abb. 34A). Die restlichen Zellen unter Einfluss von *T4* wiesen eine gemischte Expression von α- und β-Myosin in den Sarkomeren auf, wobei der Großteil dieser gemischten hESC-Kardiomyozyten zugleich Gruppen von rein α-Myosin positiven Sarkomeren aufwies. Die Myosin-Expression der ohne *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten war konform mit den Ergebnissen der Langzeitkultivierung auf Laminin-beschichteten Deckgläsern (s. 3.2.1; Abb. 23). Durch die Langzeitkultivierung der hESC-Kardiomyozyten auf Deckgläsern für 40 Tage waren 61% der hESC-Kardiomyozyten rein β-Myosin positiv (Abb. 34A).

Diese Resultate zeigten, dass durch Kultivierung mit *T4* die Expression von α-Myosin in hESC-Kardiomyozyten auf Laminin-beschichteten Deckgläsern induziert werden konnte.

3.3.2 Einfluss von *T4* auf die Morphologie von hESC-Kardiomyozyten

Neben dem Wechsel der Myosin-Expression initiierte *T4* in hESC-Kardiomyozyten eine deutliche Veränderung der Morphologie. Die erhobenen Daten zeigten, dass sich nahezu alle morphologischen Parameter der mit *T4* auf Deckgläsern kultivierten hESC-Kardiomyozyten von denen der Kontrollzellen unterschieden. Zellfläche, -kernfläche, -länge, -breite und Sarkomerlänge wurden durch die Einwirkung von *T4* signifikant größer (Tab. 2). Die große

Streuung der Zellgröße ist bedingt durch Heterogenität der hESC-Kardiomyozyten beider Gruppen. Die Spannweite der mit *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten lag bei 14799µm² (357,74µm² bis 15136,74µm²), der ohne T4 kultivierten bei 21852µm² (335,35µm² bis 22186,91µm²). Der Zirkularitätsindex veränderte sich nur wenig nach Kultivierung von *T4*, da Länge und Breite der hESC-Kardiomyozyten in einem ähnlichen Verhältnis zunahmen.

	hESC-Kardiomyozyten +*T4* (n=50)	**hESC-Kardiomyozyten -*T4* (n=50)**
Zellfläche (µm^2)	4966+/- 3246	2707+/-3826**
Zellkernfläche (µm^2)	185+/- 95	138+/- 92**
Zelllänge (µm)	126+/- 51	91+/- 40***
Zellbreite (µm)	62+/- 28	38+/- 28***
Zirkularitätsindex	0,52+/- 0,19	0,44+/- 0,25
Sarkomerlänge (µm)	1,73+/- 0,22	1,67+/- 0,17*

Tabelle 2: Morphologische Parameter von hESC-Kardiomyozyten mit und ohne T4-Behandlung.
Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Differenzen zwischen den hESC-Kardiomyozyten mit und ohne *T4*-Behandlung sind gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; t-Test). Der Zirkularitätsindex wurde aus dem Quotienten der Zellbreite und Zelllänge berechnet.

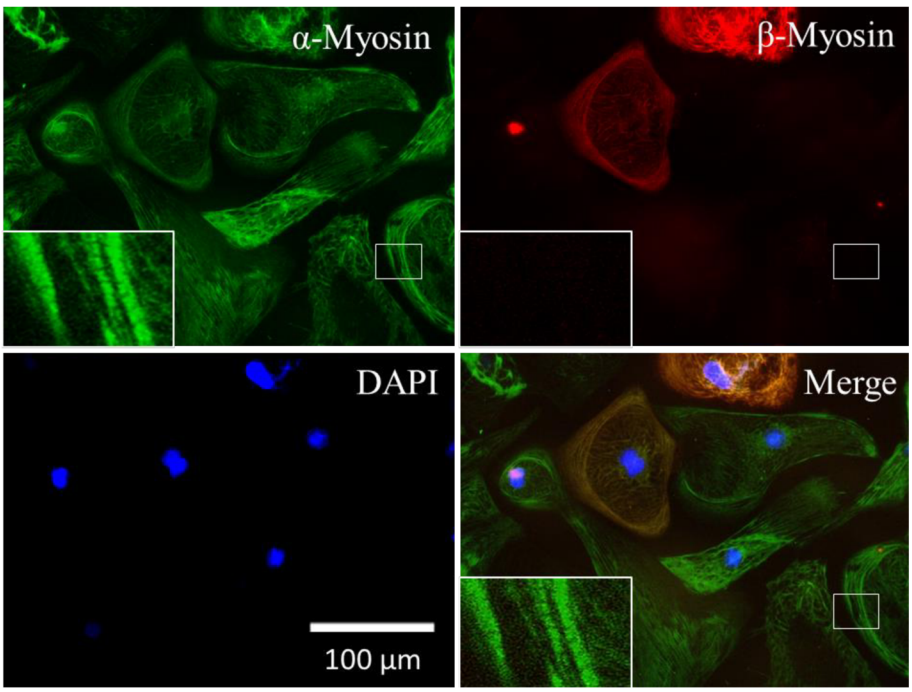


Abbildung 35: hESC-Kardiomyozyten (d21+19+14) nach zwei Wochen T4 Behandlung.
hESC-Kardiomyozyten gefärbt gegen α-, gegen β-Myosin und mit DAPI. Ausschnitt von hESC-Kardiomyozyten mit reiner α-Myosin-Expression in der Vergrößerung dargestellt.

Nicht nur die morphologischen Parameter unterschieden sich zwischen hESC-Kardiomyozyten mit und ohne *T4* Kultivierung deutlich, sondern auch die Zellanordnung und die Morphologie der Einzelzellen. hESC-Kardiomyozyten bildeten nach der Kultivierung mit *T4* zahlreiche Zellverbände, in denen nur wenige einzeln liegende hESC-Kardiomyozyten zu finden waren (Abb. 35). In diesen oft großen Zellverbänden waren die einzelnen hESC-Kardiomyozyten dicht nebeneinander gelagert und besaßen keine einheitliche Form. Auch einzeln liegende hESC-Kardiomyozyten zeigten nach der Kultivierung mit *T4* eine heterogene Morphologie. Darüber hinaus wiesen die hESC-Kardiomyozyten mit *T4* viele dicht gelagerte Myofibrillen auf, wodurch die Sarkomere häufig unscharf erschienen. Dies deutet auf eine unregelmäßige, nicht ganz parallele Anordnung der einzelnen Stränge hin.

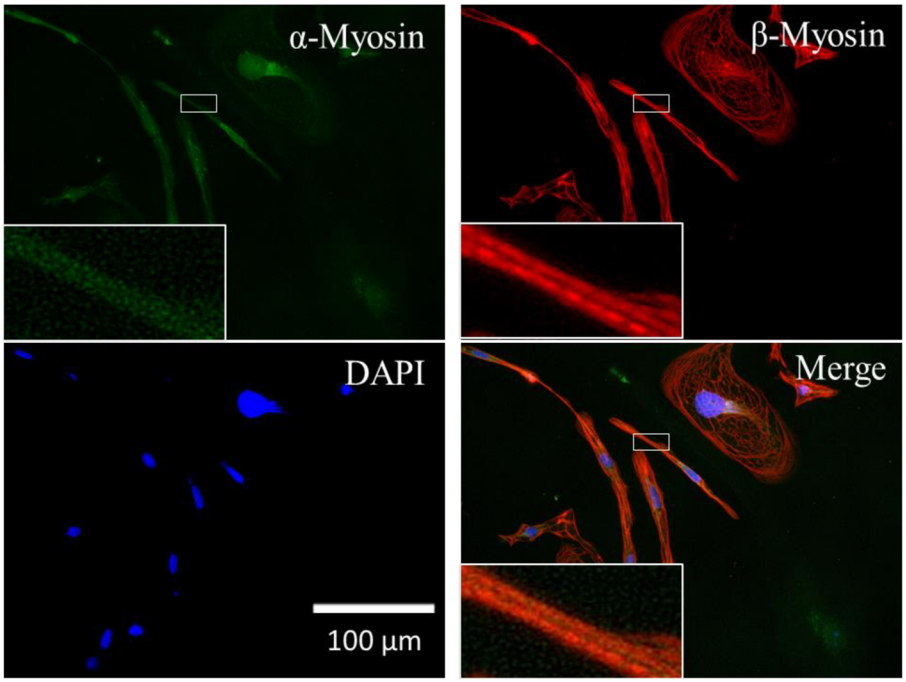


Abbildung 36: hESC-Kardiomyozyten (d21+40), die ohne T4 auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert wurden.
hESC-Kardiomyozyten gefärbt gegen α-, gegen β-Myosin und mit DAPI. Die Parallelität der Myofibrillen in vergrößerter Ansicht dargestellt.

Die hESC-Kardiomyozyten der Kontrollgruppe ohne *T4* ähnelten in ihrer Morphologie den hESC-Kardiomyozyten, die im Rahmen des ersten Experimentes 35 Tage auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren (d35+35; s. 3.2.4). Insbesondere die Anordnung der einzelnen Zellen sowie deren längliche Form und deren ausgeprägte myofibrilläre Ordnung waren vergleichbar (Abb. 36; vgl. Abb. 32). Demgegenüber bestanden hinsichtlich der erhobenen morphologischen Parameter Unterschiede. Die hESC-

Kardiomyozyten der Kontrollgruppe ohne *T4* waren demnach größer, runder und hatten etwas kürzere Sarkomere als die hESC-Kardiomyozyten an d35+35 (Tab. 2; vgl. Tab. 1).
Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass die Kultivierung mit *T4* einen erheblichen Einfluss auf die Morphologie von hESC-Kardiomyozyten besaß. Es erfolgte durch Kultivierung mit *T4* nicht nur ein Wechsel zu überwiegender α-Myosin Expression, sondern auch eine Hypertrophie und morphologische Veränderungen der hESC-Kardiomyozyten verglichen mit hESC-Kardiomyozyten ohne *T4* Behandlung. Insgesamt waren die hESC-Kardiomyozyten nach der Stimulation mit *T4* weit entfernt von einem adulten ventrikulären Phänotyp.

3.3.3 Einfluss von *T4* auf die Funktion von hESC-Kardiomyozyten

3.3.3.1 Spontane Kontraktionen der hESC-Kardiomyozyten

hESC-Kardiomyozyten besitzen im Gegensatz zu humanen adulten ventrikulären Kardiomyozyten die Fähigkeit, spontan zu kontrahieren [180] . Sowohl die mit *T4* als auch die ohne *T4* auf Deckgläsern kultivierten hESC-Kardiomyozyten konnten eigenständig Kontraktionen generieren. Dabei schlugen unter den funktionell charakterisierten hESC-Kardiomyozyten, die mit *T4* kultiviert worden waren, weniger Zellen spontan als unter den ohne *T4* kultivierten Zellen (38% +*T4* versus 44% -*T4*). Der Unterschied war nicht signifikant ($p>0,05$; χ^2-Test), was zeigt, dass die Anzahl der spontanen kontrahierenden Zellen unabhängig von der Kultivierungsmethode ist. Darüber hinaus kontrahierten die Zellen nach Kultivierung mit *T4* zwar mit geringfügig höherer Frequenz als die ohne *T4* kultivierten Zellen (0,24±0,28Hz +*T4* versus 0,21±0,29Hz -T4). Die Differenz war aber ebenfalls nicht signifikant ($p>0,05$; t-Test).

3.3.3.2 Effekt einer unvollständigen Umwaldung zu rein α-Myosin-positiven hESC-Kardiomyozyten auf die Kontraktionseigenschaften

Um den Einfluss von *T4* auf die kontraktilen Parameter von hESC-Kardiomyozyten charakterisieren zu können, wurden die Zellen elektrisch mit einer Frequenz von 0,5 und 1Hz untersucht. Als Kriterium für den Einfluss von *T4* auf hESC-Kardiomyozyten, die auf Deckgläsern kultiviert worden waren, galt der Wechsel der Myosin-Expression von überwiegend rein β-Myosin positiven zu rein α-Myosin positiven Zellen (s. 3.3.1). Die Bedeutung dieser Selektion innerhalb der Gruppe der mit *T4* kultivierten Zellen wurde durch den Vergleich von rein α-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten mit gemischt α- als β-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten deutlich. Die Charakterisierung der Myosin-Expression wurde nach der Immunfluoreszenzfärbung gegen

α- und gegen β-Myosin und anschließender Wiederfindung der funktionell untersuchten hESC-Kardiomyozyten durchgeführt.

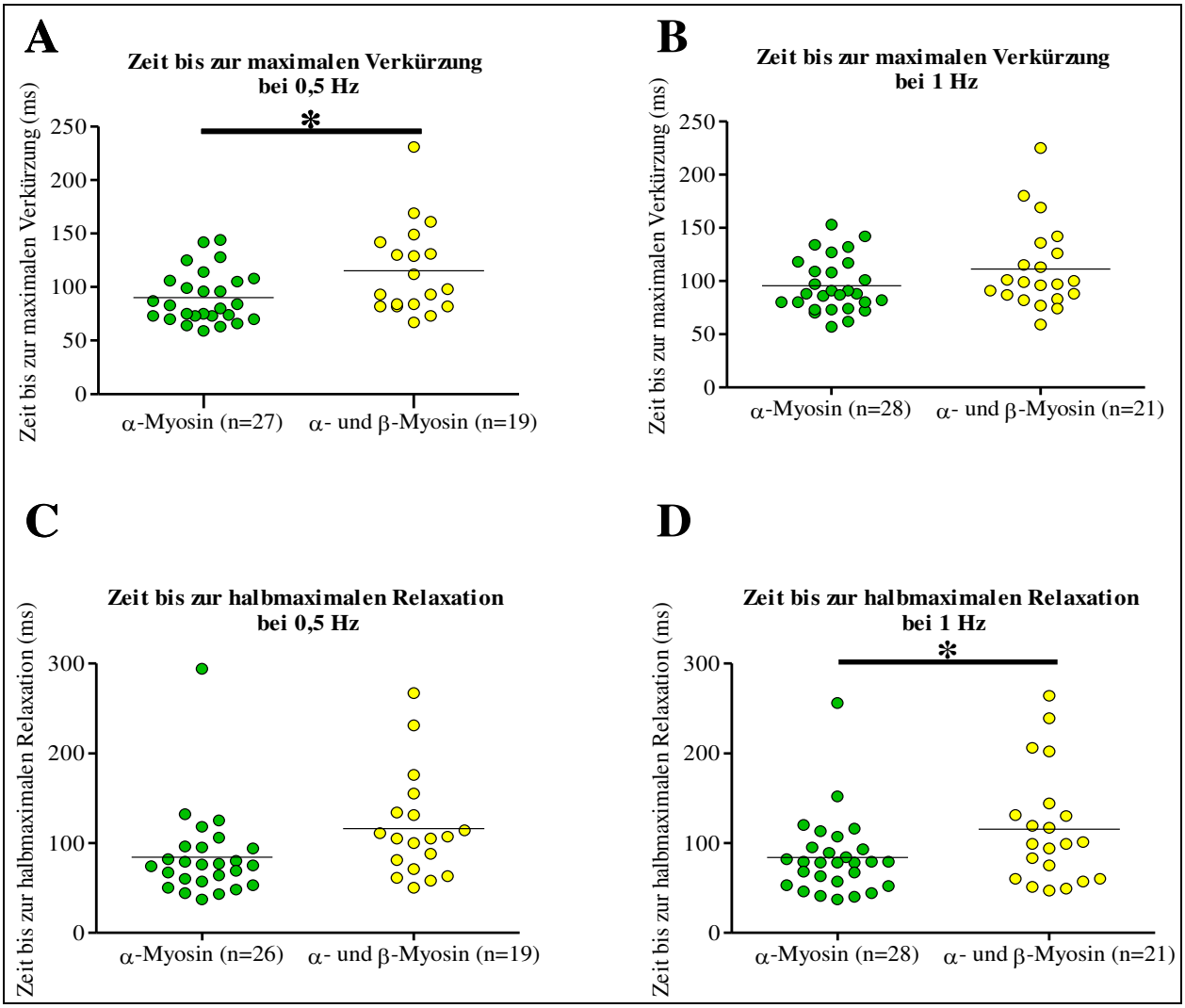


Abbildung 37: Kontraktile Parameter von rein α-Myosin sowie gemischt α- und β-Myosin exprimierenden hESC-Kardiomyozyten (hESC-CM) nach Kultivierung mit T4.
(A, B) Zeiten bis zur maximalen Verkürzung und (C, D) bis zur halbmaximalen Relaxation für rein α-Myosin (grüne Kreise) und gemischt (gelbe Kreise) exprimierende hESC-Kardiomyozyten. Beide Vergleichsgruppen wurden mit *T4* kultiviert. Stimulationsfrequenz 0,5Hz (A, C) und 1Hz (B, D). Horizontale Linie entspricht dem Mittelwert. *p<0,05; t-Test.

Die Zeit bis zur maximalen Verkürzung bei 0,5Hz Stimulationsfrequenz war für α-Myosin positive Zellen signifikant kürzer als für gemischt α- und β-Myosin positive Zellen. Sie betrug 90±24ms für rein α-Myosin positive und 115±36ms für gemischte Zellen (p<0,05, t-Test; Abb. 37A). Auch bei einer Stimulation mit 1Hz war die Zeit bis zur maximalen Verkürzung für rein α-Myosin exprimierende hESC-Kardiomyozyten kürzer als für gemischte hESC-Kardiomyozyten.

Sie lag bei 95±25ms für rein α-Myosin positive und 111±40ms für gemischte Zellen (p>0,05, t-Test; Abb. 37B).

Darüber hinaus war die Zeit bis zur halbmaximalen Relaxation der rein α-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten sowohl bei 0,5Hz (84±50ms für rein α-Myosin positive versus 116±55ms für gemischte Zellen; Abb. 37C) als auch bei 1Hz Stimulation (84±43ms für rein α-Myosin positive versus 116±64ms für gemischte Zellen; Abb. 37D) geringer als bei gemischten hESC-Kardiomyozyten. Dieser Unterschied war bei 1Hz Stimulation signifikant (p<0,05, t-Test). Die Gruppe der gemischt α- und β-Myosin exprimierenden hESC-Kardiomyozyten zeigte auch eine etwas größere Streuung der Messwerte, was vermutlich auf die hohe Heterogenität der Proteinexpression bei diesen hESC-Kardiomyozyten zurückzuführen ist (Abb. 37).

Zusammenfassend wiesen die rein α-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten, die mit *T4* kultiviert worden waren, eine schnellere Kinetik der Einzelzuckungen auf als die gemischten, mit *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten. Da neben dem Wechsel zu α-Myosin auch eine schnellere kontraktile Kinetik typisch für den Effekt von *T4* auf Kardiomyozyten ist, wurden für die weitere Charakterisierung der Effekte von *T4* auf hESC-Kardiomyozyten nur die rein α-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten ausgewählt (62).

3.3.3.3 Kontraktilität von α-Myosin-positiven hESC-Kardiomyozyten unter *T4*-Einfluss verglichen mit rein β-Myosin-positiven Zellen ohne *T4*-Einfluss

Um zu klären, wie sich *T4* auf die Funktion von hESC-Kardiomyozyten auswirkt, die für mindestens 19 Tage auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, wurde ein Teil der hESC-Kardiomyozyten für 14 Tage mit *T4* behandelt (d21+19+14), während der andere Teil ohne *T4* weiter kultiviert wurde (d21+40). Für die Analyse wurden *T4* behandelte, rein α-Myosin positive hESC-Kardiomyozyten mit hESC-Kardiomyozyten der Kontrollgruppe ohne *T4*, die ausschließlich β-Myosin exprimierten, verglichen.

Die Daten zeigten, dass bei 0,5Hz Stimulationsfrequenz die Zeit bis zur maximalen Verkürzung von mit *T4* kultivierten, rein α-Myosin positiven Zellen mit 90±24ms signifikant kürzer war als die der ohne *T4* kultivierten, rein β-Myosin positiven Zellen mit 116±51ms (p<0,05, t-Test; Abb. 38C). Auch die Zeit bis zu 90% der maximalen Verkürzung war für *T4* behandelte hESC-Kardiomyozyten signifikant kürzer als für ohne *T4* kultivierte Zellen (68±18ms +*T4* versus 87±39ms -*T4*; p<0,05, t-Test). Bei einer Stimulationsfrequenz von 1Hz war die Zeit bis zur maximalen Verkürzung für die mit *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten mit 95±25ms signifikant

kürzer als für die ohne *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten mit 124±57ms (p<0,05, t-Test; Abb. 38D).

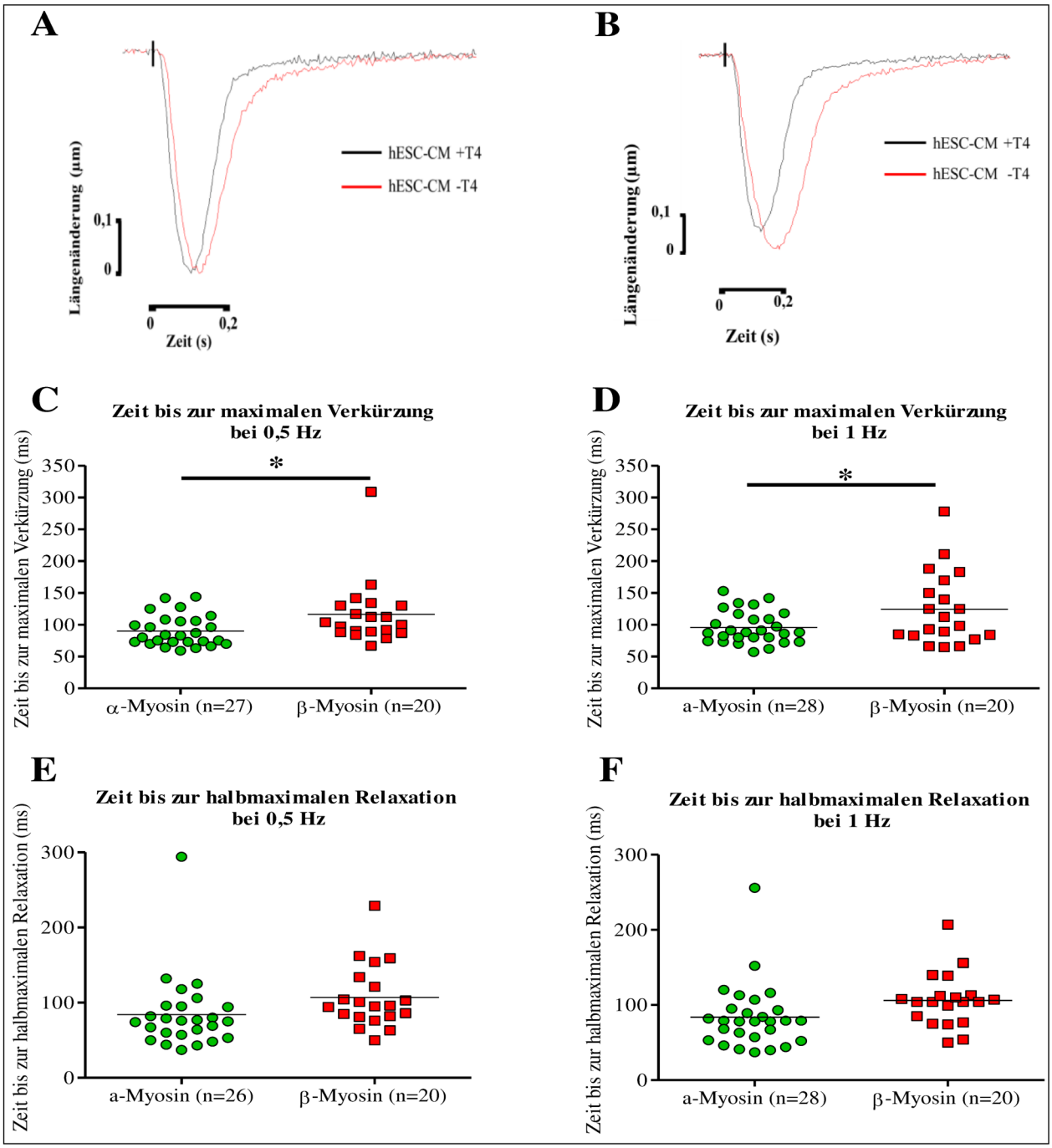


Abbildung 38: Kontraktile Parameter einzelner hESC-Kardiomyozyten nach Kultivierung mit und ohne T4.

Typische Registrierungen der Zellverkürzung bei 0,5 (A) und 1Hz (B) Stimulationsfrequenz. Die Registrierungen sind normiert auf die Ausgangslänge (*diastolische Länge*) der Zellen dargestellt. (C, D) Zeiten bis zur maximalen Verkürzung und (E, F) bis zur halbmaximalen Relaxation für hESC-Kardiomyozyten mit *T4*, die rein α-Myosin positiv waren (grüne Kreise), und ohne *T4* kultivierte, rein β-Myosin positive hESC-Kardiomyozyten (rote Vierecke). Stimulationsfrequenz 0,5Hz (C, E) und 1Hz (D, F). Horizontale Linie entspricht dem Mittelwert. *p<0,05; t-Test.

Die Zeiten bis zur halbmaximalen Relaxation waren bei beiden Stimulationsfrequenzen für die hESC-Kardiomyozyten nach Kultivierung mit *T4* kürzer als für die hESC-Kardiomyozyten ohne *T4*. Aber weder bei einer Stimulation mit 0,5Hz (84±50ms +*T4* versus 107±43ms -*T4*; p>0,05, t-Test; Abb. 38E) noch mit 1Hz (84±43ms +*T4* versus 106±36ms -*T4*; p>0,05, t-Test; Abb. 38F) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeiten bis zur halbmaximalen Relaxation der hESC-Kardiomyozyten mit und ohne *T4* nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigte sich, dass *T4* einen Einfluss auf die kontraktilen Parameter von hESC-Kardiomyozyten, die auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, hat. Neben dem Wechsel zu reiner α-Myosin-Expression in vielen hESC-Kardiomyozyten (s. 3.3.1) waren auch die Zeiten bis zur maximalen Verkürzung sowie bis zur halbmaximalen Relaxation kürzer für diese hESC-Kardiomyozyten als für die ohne *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten. Es stellte sich die Frage, inwieweit die schnelleren Kontraktionen von hESC-Kardiomyozyten nach Kultivierung mit *T4* durch den Wechsel der Myosin-Isoform von β-Myosin zu α-Myosin bedingt waren.

3.3.3.4 Effekt der Myosin-Isoform auf die Kontraktilität von hESC-Kardiomyozyten ohne Kultivierung mit *T4*

Die nachfolgenden Untersuchungen hatten zum Ziel, den Einfluss der Myosin-Isoform auf die funktionellen Parameter von hESC-Kardiomyozyten, die ohne *T4* auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, zu charakterisieren. Hierfür wurden die in 3.3.3.3 gezeigten Daten für ohne *T4* kultivierte, rein β-Myosin positive hESC-Kardiomyozyten mit den Daten von gemischt α- und β-Myosin exprimierenden und ebenfalls ohne *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten verglichen. Rein α-Myosin-positive hESC-Kardiomyozyten waren keine auf den Deckgläsern ohne *T4* detektiert worden.

Die rein β-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten verkürzten sich bei 0,5Hz Stimulation (109±52ms bei gemischten versus 116±51ms bei β-Myosin positiven Zellen; Abb. 39A) und 1Hz Stimulation (99±28ms bei gemischten versus 113±51ms bei rein β-Myosin positiven Zellen; Abb. 39B) langsamer als die gemischt α- und β-Myosin positiven Zellen, aber die Differenz war nicht signifikant (p>0,05, t-Test). Auch die Zeit bis zur halbmaximalen Relaxation zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden ohne *T4* kultivierten Zellkollektiven (p>0,05, t-Test). Die rein β-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten wiesen bei einer Stimulation mit 0,5Hz (98±51ms bei gemischten versus 107±43ms bei rein β-Myosin positive Zellen; Abb. 39C)

sowie 1Hz (87±29ms bei gemischten versus 101±39ms bei rein β-Myosin positive Zellen; Abb. 39D) eine nur geringfügig längere Zeit bis halbmaximalen Relaxation als die gemischten hESC-Kardiomyozyten auf.

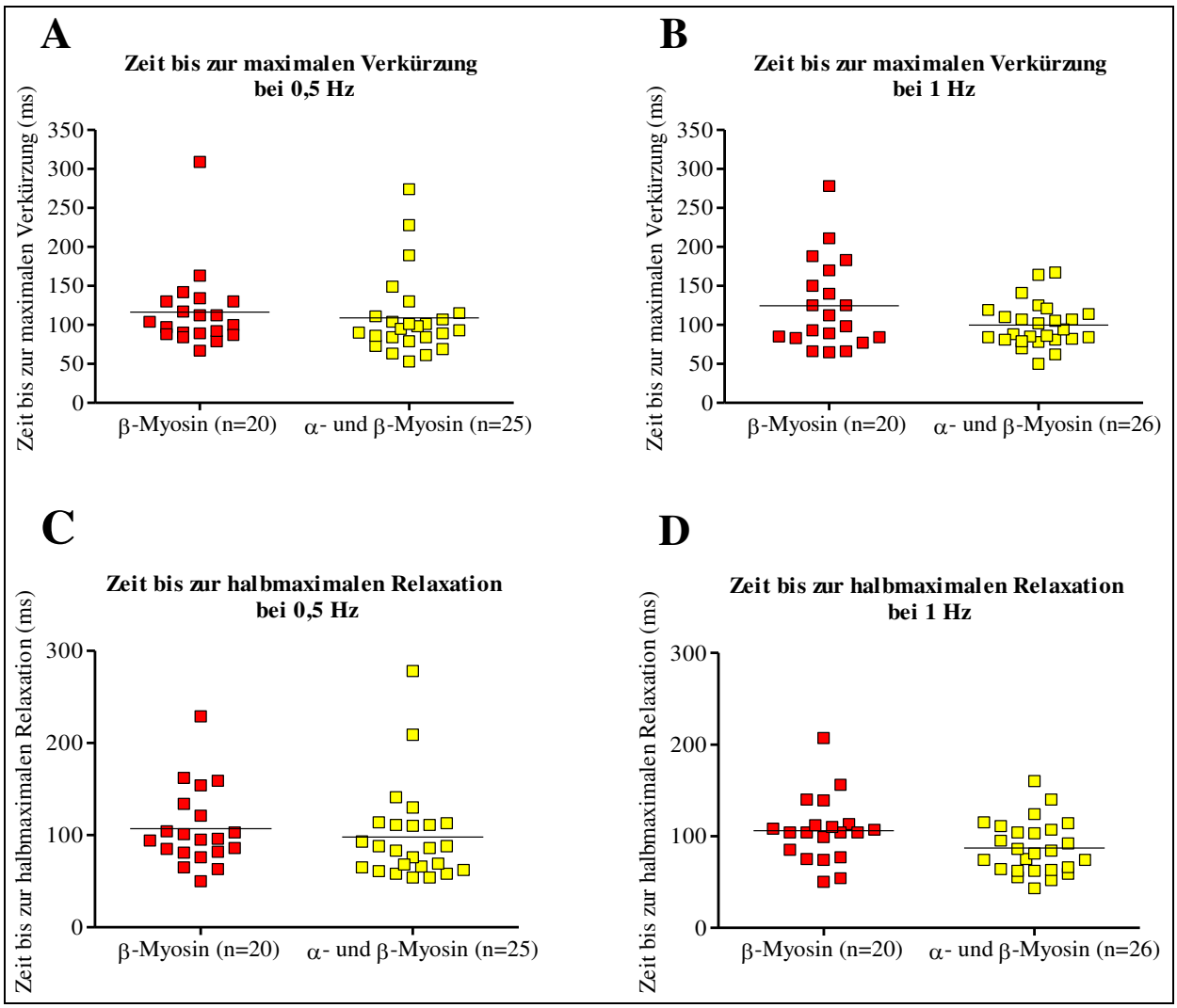


Abbildung 39: Kontraktile Parameter von gemischten und nur β-Myosin exprimierenden hESC-Kardiomyozyten (hESC-CM), die ohne T4 kultiviert worden waren.
(A, B) Zeiten bis zur maximalen Verkürzung und (C, D) bis zur halbmaximalen Relaxation für rein β-Myosin (rote Vierecke) sowie gemischt α- und β-Myosin (gelbe Vierecke) exprimierende hESC-Kardiomyozyten. Beide Vergleichsgruppen wurden ohne *T4* kultiviert. Stimulationsfrequenz 0,5Hz (A, C) und 1Hz (B, D). Horizontale Linie entspricht dem Mittelwert.

Insgesamt zeigten die rein β-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten unabhängig von der Stimulationsfrequenz etwas längere Zeiten bis zur maximalen Verkürzung und zur halbmaximalen Relaxation als die gemischten hESC-Kardiomyozyten. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Diese Beobachtung ist konsistent mit weiteren Untersuchungen kontraktiler Parameter von hESC-Kardiomyozyten, die ohne *T4* auf Deckgläsern kultiviert worden waren (71). Die-

se zeigten, dass rein α-Myosin exprimierende hESC-Kardiomyozyten nicht schneller kontrahieren und relaxieren als hESC-Kardiomyozyten mit reiner β-Myosin-Expression oder gemischter Expression. Daraus kann geschlossen werden, dass für die beobachteten Effekte von *T4* auf die Kontraktion von hESC-Kardiomyozyten nicht die exprimierte Myosin-Isoform entscheidend ist.

3.3.3.5 Calciumtransienten von hESC-Kardiomyozyten nach Kultivierung mit *T4*

Da die Myosin-Isoform der einzelnen hESC-Kardiomyozyten die Kontraktilitätsparameter kaum beeinflusste, wurde untersucht, welchen Effekt *T4* auf den Calciumtransienten hatte. Die Calciumtransienten von hESC-Kardiomyozyten auf Deckgläsern, die mit und ohne *T4* kultiviert worden waren, wurden mithilfe von FURA-2 als Calcium-Indikator registriert. Dabei wurde der FURA-2-Fluoreszenzfarbstoff mit zwei Wellenlängen angeregt und aus beiden Emissionswerten die Ratio gebildet. Diese Ratio steigt proportional zur intrazellulären Calciumkonzentration (s. 2.5.2). In die Analysen wurden alle registrierten hESC-Kardiomyozyten unabhängig von der Myosin-Isoform einbezogen.

Die Calciumtransienten der ohne *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten zeigten unabhängig von der Stimulationsfrequenz meist einen zweiphasigen Anstieg, der in eine initiale schnelle und darauffolgende langsame Phase unterteilt werden konnte (Abb. 40A und 41A). Dieser zweiphasige Anstieg der Calciumtransienten war in hESC-Kardiomyozyten, die mit *T4* kultiviert worden waren, weniger ausgeprägt bis kaum nachzuweisen (Abb. 40A und 41A).

Bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5Hz erreichten hESC-Kardiomyozyten, die mit *T4* kultiviert worden waren, schneller das Maximum des Calciumtransienten als die ohne *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten (252±202ms +*T4* versus 320±86ms -*T4*, Abb. 40E). Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p>0,05$, t-Test). Aufgrund des biphasischen Anstiegs des Calciumtransienten ist auch eine Analyse der verschiedenen Phasen relevant. Die mit *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten benötigten weniger Zeit bis zu 30% (17±11ms +*T4* versus 22±10ms -*T4*, Abb. 40B), bis zu 50% (33±22ms +*T4* versus 64±41ms -*T4*, Abb. 40C) sowie bis zu 90% des Maximums des Calciumtransienten (149±148ms +*T4* versus 225±68ms -*T4*, Abb. 40D). Der Unterschied für die Zeit bis zu 50% des maximalen Calciumtransienten war signifikant ($p<0,05$, t-Test). Hinsichtlich der Zeit bis zur Hälfte des Abfalls des Calciumtransienten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen hESC-Kardiomyozyten mit und ohne *T4* Kultivierung nachgewiesen werden, wenn auch die Kardiomyozyten mit *T4* Behandlung schneller relaxierten (438±190ms +*T4* versus 506±96ms -*T4*; $p>0,05$, t-Test; Abb. 40F). Die kleinere Zeitkonstante τ

für die mit *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten bestätigte den schnelleren Abfall der Calciumtransienten (0,77±0,42ms +*T4* versus 1,00±0,25ms -*T4*; p>0,05, t-Test).

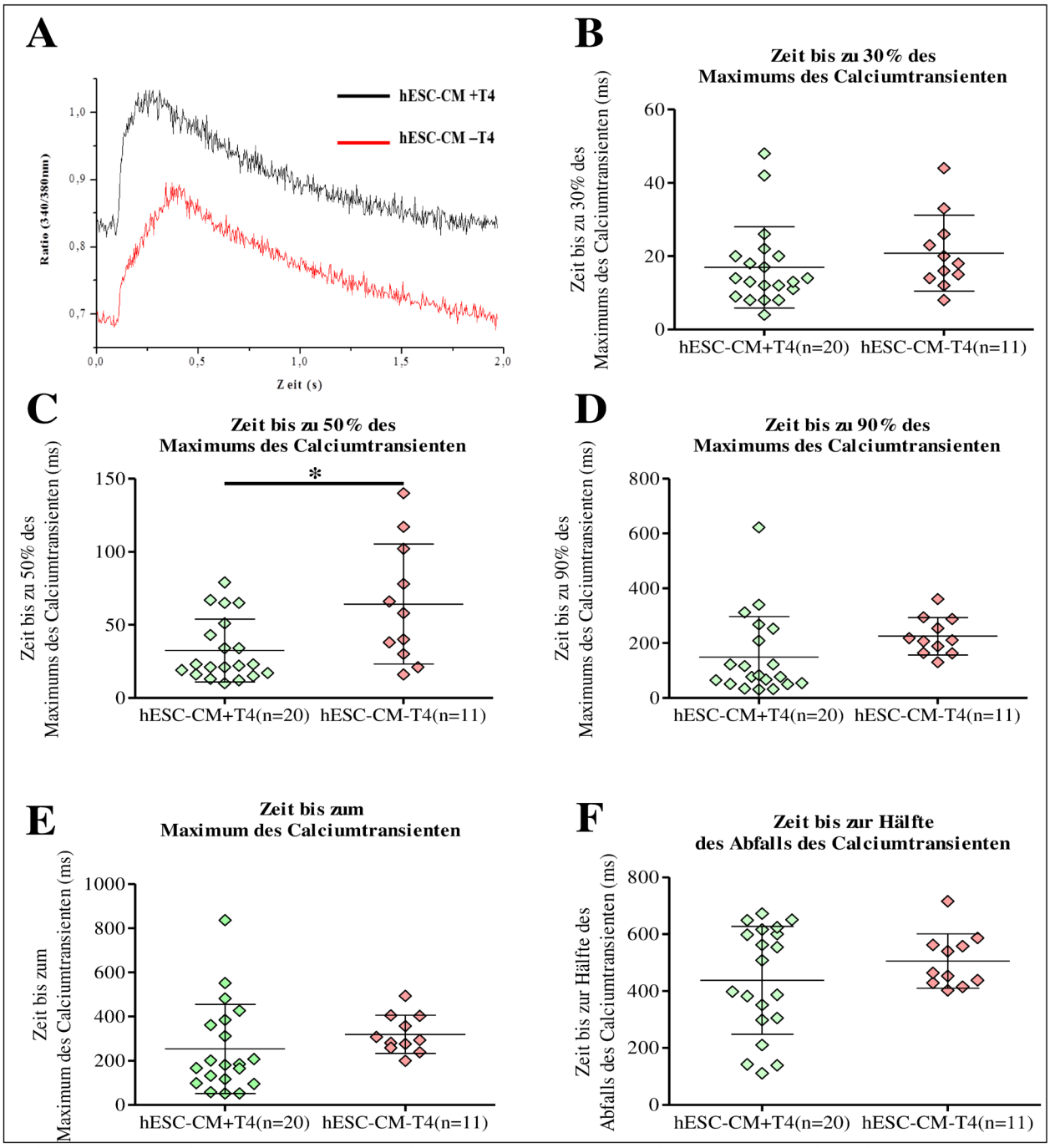


Abbildung 40: Calciumtransienten von hESC-Kardiomyozyten (hESC-CM) nach Kultivierung mit und ohne T4; Stimulationsfrequenz 0,5Hz.

(A) Typische Calciumtransienten aus den Untersuchungsgruppen. (B-E) Zeit bis zu 30%, 50% und 90% des Maximums des Calciumtransienten sowie (F) Zeit bis zur Hälfte des Abfalls des Calciumtransienten für hESC-Kardiomyozyten nach Kultivierung mit *T4* (grüne Vierecke) und ohne *T4* (rote Vierecke). Mittelwert und Standardabweichung für n=20 hESC-Kardiomyozyten mit *T4* und n=11 hESC-Kardiomyozyten ohne *T4* dargestellt. *p<0,05, t-Test.

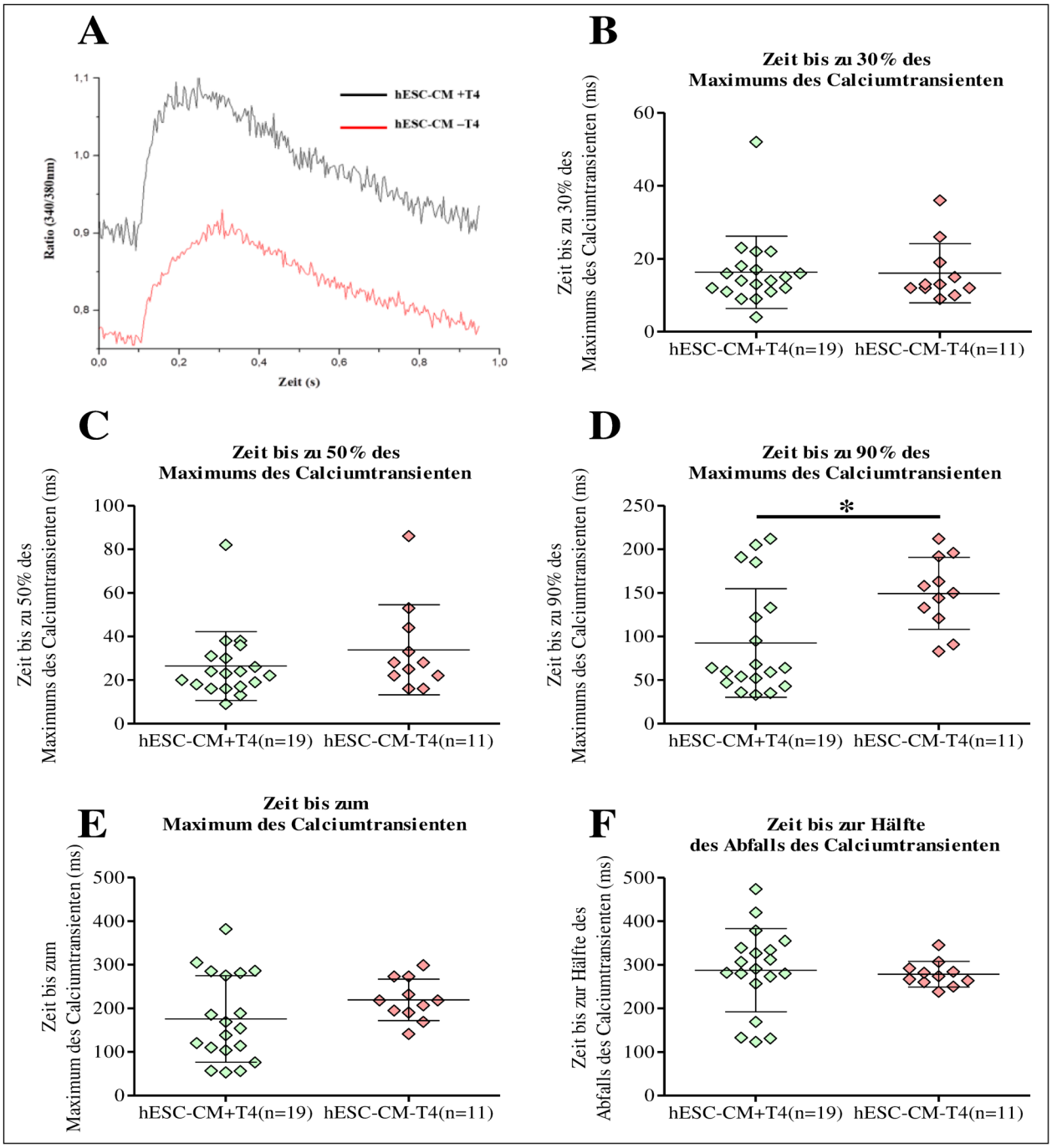


Abbildung 41: Calciumtransienten von hESC-Kardiomyozyten (hESC-CM) nach Kultivierung mit und ohne T4; Stimulationsfrequenz 1Hz.

(A) Typische Calciumtransienten aus den Untersuchungsgruppen mit und ohne *T4*. (B-E) Zeit bis zu 30%, 50% und 90% des Maximums des Calciumtransienten sowie (F) Zeit bis zur Hälfte des Abfalls des Calciumtransienten für hESC-Kardiomyozyten nach Kultivierung mit *T4* (grüne Vierecke) und ohne *T4* (rote Vierecke). Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. (**p<0,01, t-Test).

Darüber hinaus wurden die zeitlichen Parameter der Calciumtransienten bei einer Stimulationsfrequenz von 1Hz analysiert. Die Zeit bis zum Maximum des Calciumtransienten war für hESC-Kardiomyozyten, die mit *T4* kultiviert worden waren, kürzer als für die ohne *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten (175±99ms +*T4* versus 220±47ms -*T4*, Abb. 41E). Die mit *T4* kultivier-

ten hESC-Kardiomyozyten zeigten auch eine kürzere Zeit bis zu 50% (26±16ms +*T4* versus 34±21ms -*T4*, Abb. 41C) sowie bis zu 90% (85±55ms +*T4* versus 149±41ms -*T4*, Abb. 41D) des maximalen Calciumtransienten. Letztgenannte Differenz war signifikant ($p<0,01$, t-Test). Für die Zeit bis zu 30% des maximalen Calciumtransienten (17±10ms +*T4* versus 16±8ms -*T4*, Abb. 41B) und für die Zeit bis zur Hälfte des Abfalls des Calciumtransienten (289±95ms +*T4* versus 278±29ms -*T4*, Abb. 41F) zeigte sich kein Unterschied für die mit und ohne *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten ($p>0,05$, t-Test). Auch die Zeitkonstante τ der hESC-Kardiomyozyten mit und ohne *T4* Kultivierung war bei einer Stimulationsfrequenz von 1Hz annähernd gleich (0,50±0,20ms +*T4* versus 0,52±0,08ms -*T4*; $p>0,05$, t-Test)

Die erhobenen Daten zeigten, dass die Calciumtransienten von hESC-Kardiomyozyten auf Laminin-beschichteten Deckgläsern durch die Kultivierung mit *T4* schneller werden. Aufgrund der relativ geringen Zahl an analysierten Zellen waren die Unterscheiden meist nicht signifikant. Dennoch kann geschlossen werden, dass vermutlich die schnelleren Calciumtransienten Ursache für die beobachteten schnelleren Kontraktionskinetik der hESC-Kardiomyozyten unter Einfluss von *T4* sind (s. 3.3.3.3).

4 Diskussion

4.1 Kritische Diskussion der Methodik

4.1.1 Validierung der Antikörperspezifität

Die Charakterisierung der Myosin-Expression in hESC-Kardiomyozyten, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert worden waren, wurde durch die Etablierung einer Immunfluoreszenzdoppelfärbung ermöglicht (s. 3.1.1). Dabei stellte die Identifikation der kardialen Myosin-Isoformen hohe Anforderungen an die Spezifität der Antikörper, da beide Isoformen eine Sequenzhomologie von 93% aufweisen [104, 227, 232]. Ein spezifischer Antikörper gegen das β-Myosin war kommerziell erhältlich, wohingegen ein Antikörper gegen das α-Myosin zunächst generiert werden musste. Nach Vergleich der Sequenzen und der Molekularstruktur der α- und β-Myosin-Isoform wurde ein geeignetes Epitop an der Oberfläche der Kopfdomäne des α-Myosins für die Produktion eines Antikörpers ausgewählt ([119, 131]; s. 2.3.1).

Analog zu den Empfehlungen der Literatur wurde die Spezifität des neu entwickelten Antikörpers gegen das α-Myosin und des bereits erprobten Antikörpers gegen das β-Myosin in Immunfluoreszenzfärbungen von humanem atrialen Myokardgewebe sowie von hESC- und hiPS-Kardiomyozyten überprüft ([19, 213]; s. 3.1.1). In allen durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen zeigten die Kardiomyozyten spezifisch fluoreszenzmarkierte Sarkomere (Abb. S1 in [213]; s. 3.1.1). Auch im Western Blot gelang der spezifische Nachweis des aus humanen atrialen Kardiomyozyten isolierten α- und β-Myosins (Abb. S1 in [213]).
Weitere Untersuchungen könnten der Evaluation der Antikörperspezifität noch mehr Validität verleihen. Diesbezüglich wären Negativ-Kontrollfärbungen unter Einsatz von blockierenden α-Myosin analogen Peptiden oder von α- bzw. β-Myosin-Knock-Out hESC-Kardiomyozyten sinnvoll [18, 192]. Die Abwesenheit von fluoreszenzmarkierten Sarkomeren in diesen Kontrollfärbungen würde die Spezifität der Antikörper gegen α- und β-Myosin weiter untermauern.

4.1.2 Analyse des *Crosstalks*

Neben der Spezifität der Primärantikörper ist die Minimierung des *Crosstalks* bei Immunfluoreszenzdoppelfärbungen durch eine eindeutige spektrale Trennung der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe essentiell für die korrekte Auswertung. Nah beieinander liegende Maxima der Anregungs- oder Emissionswellenlängen von zwei Fluoreszenzfarbstoffen sind ursächlich für einen *Crosstalk* [50]. Der unerwünschte *Crosstalk* kann durch Fluoreszenzfarbstoffe, deren Anregungs- und Emissionsmaxima möglichst weit voneinander getrennt sind, und durch Fluoreszenz-

filter, deren Bandbreite möglichst exakt auf die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe abgestimmt sind, minimiert werden [20, 106]. Die separate Anregung und Aufzeichnung eines einzelnen Fluoreszenzfarbstoffes mit der passenden Wellenlänge stellt eine weitere Methode zur Erhöhung der Spezifität und Verringerung des *Crosstalks* dar [20, 30]. Hingegen führt die zeitgleiche Anregung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe durch eine einzige Wellenlänge zu mehr Backgroundfluoreszenz und *Crosstalk* [20, 31].

In den hier durchgeführten Experimenten an hESC-Kardiomyozyten wurden FITC und TRITC gekoppelte Sekundärantikörper zur Markierung der Primärantikörper verwendet. Vor der Charakterisierung der Myosin-Expression in den hESC-Kardiomyozyten musste der *Crosstalk* dieser Fluoreszenzfarbstoffe unter Verwendung der vorhandenen Filter überprüft werden. Für diesen Zweck wurden Einzelfärbungen gegen einerseits α-, andererseits β-Myosin analysiert ([203]; s. 2.4.3.1). Der *Crosstalk* der FITC-Fluoreszenz in den TRITC-Fluoreszenzkanal betrug 3%, der TRITC-Fluoreszenz in den FITC-Fluoreszenzkanal 7,5%. Dieser prozentual geringe *Crosstalk* war praktisch zu vernachlässigen, da bei der Aufzeichnung des jeweils anderen Fluoreszenzkanals (zum Beispiel der roten Fluoreszenz für β-Myosin, wenn die Sarkomere in der grünen Fluoreszenz für α-Myosin positiv waren) nur ein unspezifisches Fluoreszenzsignal, also keine spezifische Darstellung von fluoreszenzmarkierten Sarkomeren, beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 19).

Ein Austausch der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe FITC und TRITC durch Alexa-Fluoreszenzfarbstoffe könnte den *Crosstalk* weiter reduzieren. Die Alexa-Fluoreszenzfarbstoffe sind unempfindlicher gegenüber Ausbleichen und produzieren ein sehr helles Fluoreszenzsignal [149]. Aus diesem Grund sind die Alexa-Fluoreszenzfarbstoffe sowohl dem TRITC-Fluoreszenzfarbstoff, der nach Proteinbindung durch die Bildung nicht-fluoreszierender Aggregate an Helligkeit verlieren kann, als auch dem FITC-Fluoreszenzfarbstoff, der wenig resistent gegenüber Ausbleichen ist, überlegen [7, 162]. Durch ein Herabsetzen der Anregungsintensität bei Verwendung der Alexa-Fluoreszenzfarbstoffe könnte demnach der *Crosstalk* verringert werden, ohne das spezifische Fluoreszenzsignal zu verlieren.

4.1.3 Wiederfindung von Einzelzellen an verschiedenen Mikroskopen

Für die Korrelation der kontraktilen Funktion mit der Myosin-Expression wurden die funktionell gemessenen hESC-Kardiomyozyten fixiert, danach mit spezifischen Antikörpern gegen α- und

β-Myosin und mit DAPI gefärbt, auf den Deckgläsern relokalisiert und schließlich hinsichtlich der Myosin-Expression charakterisiert. Eine Immunfluoreszenzfärbung vor der Kontraktilitätsmessung war ausgeschlossen, da die Messungen an nativen, nicht fixierten hESC-Kardiomyozyten durchgeführt werden sollten. Auch die Immunfluoreszenzfärbung im Anschluss an die Kontraktilitätsmessung war nicht praktikabel, da die Messapparatur zu lange blockiert gewesen wäre. Somit musste die Charakterisierung der Proteinexpression nach der Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung an einem zweiten Mikroskop durchgeführt werden. Für die notwendige Wiederfindung der einzelnen, gemessenen hESC-Kardiomyozyten wurde deswegen eine spezielle Apparatur bestehend aus zwei Komponenten neu entwickelt (s. 2.4).
Unter Anwendung dieser Methode konnten insgesamt 61,3% aller funktionell gemessenen hESC-Kardiomyozyten wiedergefunden werden ([213]; s. 3.1.2). Mehrere methodische Schwierigkeiten verhinderten die Wiederfindung der übrigen hESC-Kardiomyozyten. Einige hESC-Kardiomyozyten wurden im Rahmen der Immunfluoreszenzfärbung zerstört oder lösten sich vom Deckglas ab. Auch eine unpräzise Dokumentation der Zellposition bei der funktionellen Messung sowie eine inkorrekte Lage des Deckglases auf dem Objektträger nach der Färbung machten das Wiederfinden unmöglich.

Zur Erhöhung der Präzision und Reproduzierbarkeit des Wiederfindens könnte eine Digitalisierung der Zellmarkierung sowie der anschließenden Wiederfindung beitragen. Digitale Sensoren könnten zunächst die Position des Mikroskoptisches festhalten und direkt an den Computer übertragen. Spezifische Halterungen könnten die Positionierung des Deckglases auf dem Objektträger am Ende der Immunfluoreszenzfärbung exakter gestalten. Mithilfe vorab gesetzter Markierungen auf dem Deckglas, z.B. fluoreszierender Kügelchen, könnte die Position des Deckglases auf dem Objektträger während der funktionellen Messung und nach der Immunfluoreszenzfärbung ermittelt und die neuen Koordinaten der Zellen berechnet werden.

Alternativ zu der entwickelten Apparatur für die Wiederfindung von hESC-Kardiomyozyten könnten Deckgläser verwendet werden, auf denen mithilfe von Ätzung oder durch Einsatz von Lasertechnik ein Raster aufgebracht worden ist [163]. Yechikov et al. nutzten mit durchnummerierten Rastern versehene Deckgläser, um die Expression von *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel 4* (*HCN4*-Kanal) und *Islet-1* (*Isl1*) in hiPS-Kardiomyozyten, deren Aktionspotenzial Schrittmacherzellen geähnelt hatte, zu analysieren [229]. Eine weitere Möglichkeit der Wiederfindung von Kardiomyozyten wäre die Verwendung von motorisierten

Tischen für die beiden eingesetzten Mikroskope [161]. Die Funktionsfähigkeit dieser Methode müsste durch eine exakte Programmierung und Kalibrierung der beiden eingesetzten Tische gewährleistet werden. Der Erwerb der motorisierten Tische und die nachfolgende komplexe Etablierung und Wartung der Technik wären ebenso wie die Anschaffung der mit Rastern versehenen Deckgläser äußerst kostenintensiv. Eine Senkung der Kosten könnte durch eine Wiederverwendung der Deckgläser nach Abschluss der Experimente erreicht werden.
Andere Arbeitsgruppen konnten mithilfe einer Selektion der hESC-Kardiomyozyten anhand der Expression von *GFP* durch einen aktiven *MYH6*-Promotor eine Korrelation zwischen funktionellen Eigenschaften und der Expression von α-Myosin herstellen [35, 77, 166]. Um die Expression des β-Myosins als auch des α-Myosins in einzelnen hESC-Kardiomyozyten vor der funktionellen Messung zu bestimmen, wäre das Einbringen eines zweiten ds-Red-Reportgens in den Promotor des *MYH7* denkbar [188]. Aufgrund einer möglichen Einflussnahme der fluoreszierenden Reporterproteine auf die Funktion des α- und β-Myosins und damit auf die kontraktilen Eigenschaften der Kardiomyozyten wurde diese Methode bei der Planung der durchgeführten Experimente jedoch ausgeschlossen.

4.2 Charakterisierung von hESC-Kardiomyozyten nach unterschiedlicher Kultivierung

4.2.1 Selektion oder tatsächlicher Wechsel der Myosin-Isoform?

Der Anteil der rein β-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten stieg durch die Langzeitkultivierung auf Laminin-beschichteten Deckgläsern auf 66% (d35+35) und dann 87% (d35+75). Demgegenüber zeigten nur 1% (d35), 8% (d70) und 10% (d110) der hESC-Kardiomyozyten, die für die gleiche Dauer in *Cardiac Bodies* kultiviert worden waren, ausschließlich β-Myosin. Bei dieser Kultivierungsmethode dominierten hESC-Kardiomyozyten, die gemischt α- und β-Myosin exprimierten (s. 3.2.1).

Die Zunahme des Anteils von rein β-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten infolge der Langzeitkultivierung auf Deckgläsern könnte verschiedene Gründe haben. Sowohl eine separate Proliferation der rein β-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten aufgrund eines Selektionsvorteils als auch ein tatsächlicher Wechsel der Myosin-Isoform in den hESC-Kardiomyozyten sind denkbar. Zur Klärung dieser Frage wurde neben einer näherungsweisen Bestimmung der Zellzahl für die Zeitpunkte d35, d35+35 und d35+75 auch eine Analyse der Zellzyklusaktivität durchgeführt ([213]; s. 2.3.4.2). Die Teilungsaktivität wurde dabei anhand des Ki-67-Index, dem

positiv gegen das Protein Ki-67 gefärbten Anteil der Zellen, beurteilt. Der Ki-67-Index wurde durch die Analyse einer Immunfluoreszenzfärbung der hESC-Kardiomyozyten des d35+35 gegen das Protein Ki-67, welches in allen Phasen außer der G_0-Phase des Zellzyklus nachgewiesen werden kann, sowie gegen das β-Myosin ermittelt [62, 213].
Der Ki-67-Index rein β-Myosin positiver hESC-Kardiomyozyten an d35+35 lag bei 5,2% [213]. Unter Einbezug der ermittelten Zahlen befanden sich also 541 β-Myosin positive hESC-Kardiomyozyten zu diesem Zeitpunkt im Zellzyklus. Da die Expression des Ki-67-Proteins nicht direkt mit der aktiven Teilung einer Zelle assoziiert werden kann, wurde außerdem eine Färbung gegen pHH3, einem Marker für die M-Phase, durchgeführt [84]. In 8% der Ki-67 positiven Zellen, also ungefähr 0,5% aller analysierten Zellen und dementsprechend in 52 β-Myosin positiven Zellen konnte pHH3 detektiert werden ([213]; Abb. 28). Die absolute Zahl der rein β-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten nahm von 87 (d35) auf 10411 (d35+35) und schließlich 36888 (d35+75; s. 3.2.2) zu.
Unter Anbetracht der immensen Erhöhung der Anzahl rein β-Myosin positiver hESC-Kardiomyozyten bei zugleich geringem Ki-67 Index und Anteil pHH3 positiver Zellen kann angenommen werden, dass der erhöhte Anteil rein β-Myosin positiver hESC-Kardiomyozyten infolge der Kultivierung auf Deckgläsern vorwiegend auf einem Wechsel der Myosin-Isoform beruht.

Im Hinblick auf die deutliche Zunahme der Zellzahl sowie den Nachweis sich teilender Zellen unterscheiden sich hESC-Kardiomyozyten von humanen adulten Kardiomyozyten. Entgegen der früheren Meinung, dass adulte Kardiomyozyten kein hyperplastisches Wachstum aufweisen [93], wurde in adulten Kardiomyozyten eine proliferative Aktivität infolge eines Infarktes oder eines Herzversagens nachgewiesen, wobei der Ki-67 Index jedoch weit unter dem der hESC-Kardiomyozyten lag (0,04% Post-Infarkt [6] versus 5,2% in hESC-Kardiomyozyten [213]). Andere Quellen bestätigten ebenfalls eine im Vergleich zu adulten Kardiomyozyten hohe Zellzyklusaktivität in hESC-Kardiomyozyten, wobei Ki-67-Indices von 15% [221] und 28±4% [222] ermittelt werden konnten.
Zukünftig können hESC-Kardiomyozyten eine vielversprechende Möglichkeit darstellen, ausreichend Gewebe für den regenerativen Zellersatz zu generieren. Zum jetzigen Zeitpunkt erscheint dieser regenerative Ansatz für den Einsatz im Patienten riskant, da ohne Kontrolle ihrer Teilungsfähigkeit die Gefahr des neoplastischen Wachstums besteht [33].

4.2.2 Einfluss anderer Kultivierungsmethoden auf die Myosin-Expression

Myosin-Moleküle sind enzymatisch aktive Hexamere, die aus zwei schweren und vier leichten Myosinketten aufgebaut sind [214]. In humanen adulten Kardiomyozyten werden zwei Isoformen der schweren Myosinkette exprimiert, die α- und β-Myosinkette. Die α-Myosinkette, welche eine wesentlich höhere ATPase-Aktivität und demzufolge eine schnellere Querbrückenkinetik besitzt [157], wird weit überwiegend in atrialen Kardiomyozyten, die ökonomischere β-Myosinkette vorwiegend in ventrikulären Kardiomyozyten exprimiert [67, 164]. Genmutationen im *MYH7* sind Ursache primärer Kardiomyopathien, wie der FHC oder DCM [41, 165]. Patientenspezifische hiPS-Kardiomyozyten mit einer *MYH7*-Mutation bieten eine vielversprechende Quelle für pathophysiologische Untersuchungen. Zur korrekten Beurteilung eines Effektes der *MYH7*-Mutation auf die Kontraktilität sollten hiPS-Kardiomyozyten reines β-Myosin auf Proteinebene exprimieren. Die zeitgleiche Expression von α-Myosin würde aufgrund nicht unerheblicher funktioneller Unterschiede zwischen den Myosin-Isoformen die Ergebnisse verfälschen [183].

Zahlreiche Einflussfaktoren unter verschiedensten Kultivierungsbedingungen wurden in den vergangenen zwei Jahrzehnten auf ihr Potential hin geprüft, eine ventrikuläre Maturierung von hESC- und hIPS-Kardiomyozyten und folglich die β-Myosin-Expression zu induzieren [231].
Unter Anbetracht der normalen Reifezeit von Kardiomyozyten, welche neben ca. 38 Wochen Schwangerschaft noch weitere Jahre nach der Geburt miteinschließt, schien die Langzeitkultivierung von hESC-Kardiomyozyten eine vielversprechende Methode zur Maturierung zu sein. So wurde mithilfe einer Langzeitkultivierung (bis zu 150 Tagen) von hESC- und hiPS-Kardiomyozyten auf Fibronektin- oder Polyethylenimin (PEI)-Gelatine-beschichteten Oberflächen ein Anstieg der α- und β-Myosin-mRNA erreicht [92, 126]. Im Gegensatz zu Kamakura et al. wiesen Lundy et al. mRNA-Level von α- und β-Myosin nach, die denen des adulten Myokards ähneln. Demzufolge besitzt auch die zur Kultivierung genutzte Oberfläche einen Einfluss auf die Expression in hESC-Kardiomyozyten.
Nach einer kurzzeitigen Kultivierung (bis zu 30 Tagen) von hESC- und hiPS-Kardiomyozyten auf unterschiedlichen Oberflächen, wie in *Cardiac Bodies* [96], auf mit *hESC qualified Matrix* beschichteten Wells [13] oder auf mit Gold beschichteten Mikrokugeln [112], konnte eine gesteigerte Expression der α- und β-Myosin-mRNA nachgewiesen werden, ohne dass Vergleiche mit adulten Kardiomyozyten angestellt wurden. Xu et al. wiesen ferner in cTnI positiven hESC-Kardiomyozyten, die zunächst 26 Tage in Suspension und anschließend zwei Tage auf Gelatin-

oder Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, mithilfe der Immunfluoreszenz β-Myosin auf Proteinebene nach [222]. Dies gelang ebenfalls Tulloch et al., die hESC- und hiPS-Kardiomyozyten in dreidimensionalen Typ1-Kollagen-Gerüsten kultiviert hatten [209]. Dabei wiesen hESC-Kardiomyozyten, deren Gerüste rhythmisch bewegt worden waren, mehr β-Myosin in der Immunfluoreszenz auf als die ohne mechanischen Stress kultivierten hESC-Kardiomyozyten.

Die Aussagekraft der aufgeführten Quellen hinsichtlich der Proteinexpression von α- und β-Myosin in einzelnen hESC-Kardiomyozyten ist jedoch limitiert. Gründe hierfür sind, dass keine Analysen auf Einzelzellebene durchgeführt wurden und dass auf Ebene vieler Zellen häufig ausschließlich die mRNA-Expression analysiert wurde, welche aufgrund der zahlreichen posttranskriptionalen Mechanismen keine direkte Auskunft über die Proteinexpression erlaubt [40]. Auch beschränkten sich die Immunfluoreszenzfärbungen von Zellkollektiven in der Regel auf den alleinigen Nachweis des β-Myosins, sodass eine zeitgleiche Expression des α-Myosins nicht miterfasst wurde. In der vorliegenden Arbeit gelang mithilfe der Immunfluoreszenzdoppelfärbung unter Verwendung der spezifischen Antikörper gegen α- und β-Myosin eine Charakterisierung der Myosinketten-Isoform in einzelnen hESC-Kardiomyozyten. Auf diese Weise konnte in einem Großteil der hESC-Kardiomyozyten, die für 35 oder 75 Tage auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, die alleinige Expression von β-Myosin nachgewiesen werden (s. 3.2.1). In diesem Punkt entsprachen diese hESC-Kardiomyozyten adulten ventrikulären Kardiomyozyten.

Inwieweit die Kultivierung mit weiteren exogenen Faktoren, wie Schwenkkulturen [206], elektrischen Stimuli [117] oder rhythmischen Elongationen auf dehnbaren Matrices [171], die β-Myosin-Expression von hESC-Kardiomyozyten fördert, sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Insbesondere die rhythmische Elongation während der Kultivierung scheint ein vielversprechender Ansatz zu sein, denn Ruan et al. zeigten einen Anstieg der β-Myosin-mRNA und einen Abfall der α-Myosin-mRNA unter diesen Bedingungen [171].

4.2.2.1 Die Mechanotransduction als Ursache des Wechsels der Myosin-Isoform?

Eine zentrale Frage für weiterführende Experimente ist, welche Mechanismen dem Wechsel der Myosin-Isoform zugrunde liegen. Da sich die Kultivierungsbedingungen der analysierten hESC-Kardiomyozyten lediglich hinsichtlich der Beschaffenheit der Kultivierungsoberfläche unter-

schieden, könnte die Induktion der β-Myosin-Expression über Signale des mechanosensorischen Systems der Zellen initiiert worden sein.

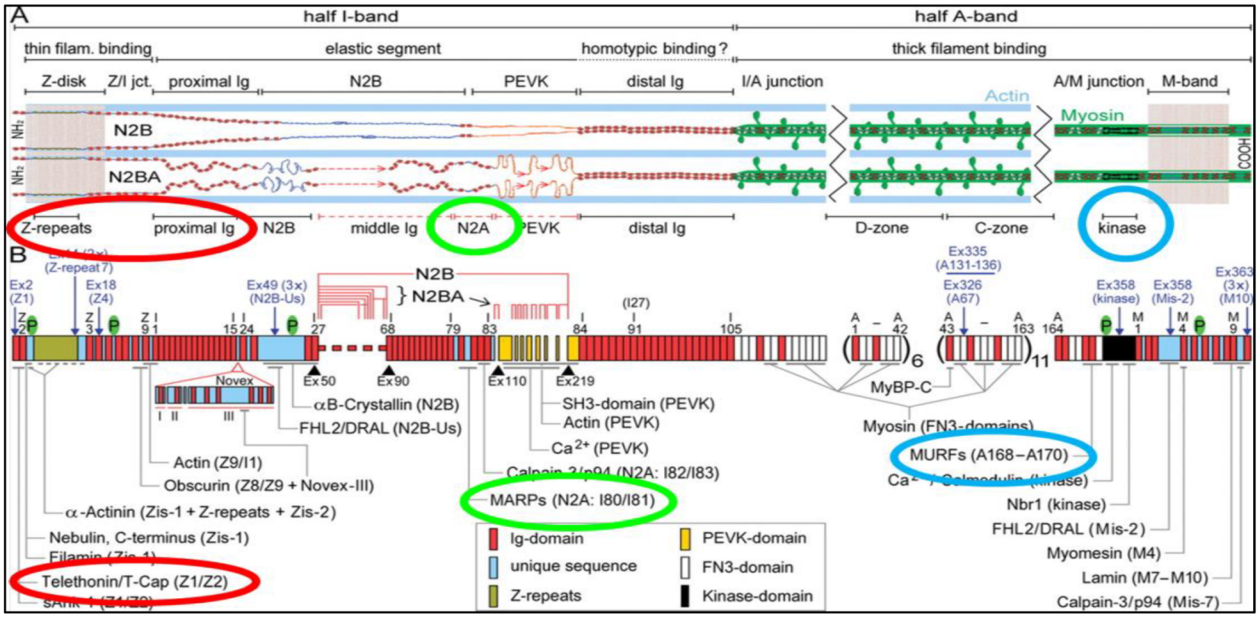


Abbildung 42: Aufbau der Kardialen Titinisoformen N2B und N2BA (A) und bekannte Bindungspartner der Domänen (B). Modifiziert nach [120]

Durch die Interaktion der Ig-Domänen Z1/Z2 mit Telethonin (roter Kreis), der N2A-Domäne mit MARPs (grüner Kreis) oder der Kinase-Domäne mit MURFs (blauer Kreis) infolge mechanischer Reizung könnten Signalwege aktiviert worden sein, die die β-Myosin-Expression in hESC-Kardiomyozyten induzieren.

Das über 1 µm lange Protein Titin, welches sich zwischen der Z-Scheibe und der M-Linie erstreckt, besitzt neben mechanischen auch mechanosensorische Funktionen, die von verschiedenen Domänen ausgeübt werden ([120]; Abb. 42). In der Z-Scheibe, die ebenfalls Bestandteil des mechanosensorischen Apparates ist, sind die Ig-Domänen Z1/Z2 des Titins an Telethonin (T-cap) gebunden [71]. Das T-cap dient einerseits der Fixierung des Titins in der Z-Scheibe und anderseits der Signaltransduktion, indem es mit zahlreichen Signalproteinen, wie den Calsarcinen oder Muskel LIM Proteinen (MLP), interagiert [81, 82, 182]. Calsarcine sind muskelspezifische, mit Calcineurin kolokalisierte und interagierende Proteine, die eine inhibitorische Wirkung auf die Phosphatase besitzen [58, 59]. In hESC-Kardiomyozyten, die auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, könnte der Titin/T-cap/Calsarcin-1-Signalweg zu einer Aktivierung von Calcineurin geführt haben, was die Initiierung eines Hypertrophie-Genprogramms und folglich eine höhere β-Myosin-Expression bedingt haben könnte [141]. Dabei könnte der Transkriptionsfaktor *nuclear factor of activated T-cells* 3 (*NF-AT3*) nach der Calcineurin-vermittelten Dephosphorylierung in den Zellkern gewandert sein und dort mit

einem weiteren Transkriptionsfaktor, dem Zinkfingerprotein GATA4, interagiert haben. Über die Bindung an ein GATA-Motiv in der Promotorregion von *MYH7* könnte die Expression des β-Myosins induziert worden sein ([80, 155]; Abb. 43). Dieser Signalweg scheint nur unter Anwesenheit der MLP vollständig zu funktionieren, denn Heineke et al. zeigten eine veränderte Lokalisation und reduzierte Aktivierbarkeit von Calcineurin in heterozygoten MLP-Knockout Mäusen [82].

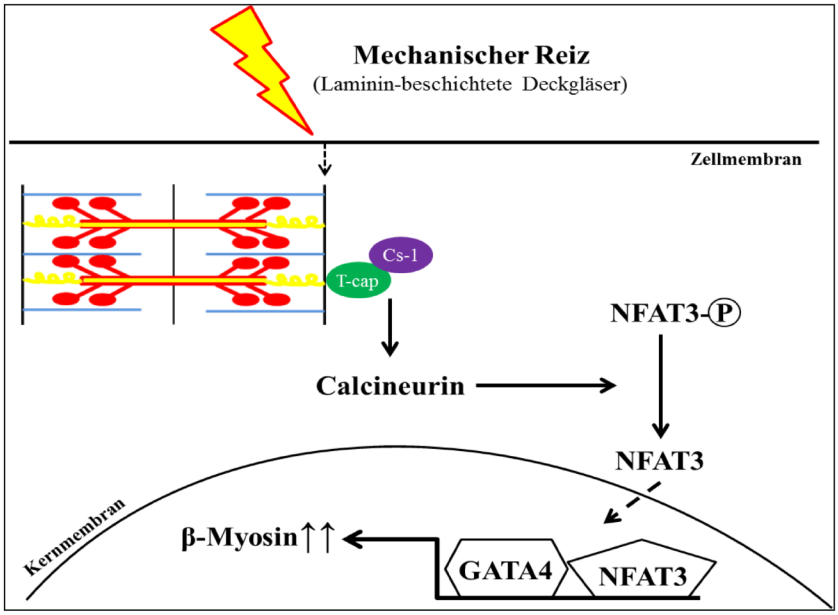


Abbildung 43: Ein hypothetisches Modell des Calcineurin-vermittelten Signalweges zur Induktion der β-Myosin-Expression infolge eines mechanischen Reizes.

Eine andere, mutmaßlich mechanosensorisch aktive Domäne des Titins, die Titin-Kinase, ist nahe der M-Linie lokalisiert. Diese Domäne besitzt Bindungsstellen für das Muskel Ring-finger Protein-1 (MuRF-1), einer E3-Ubiquitinligase, welche die Degradation einiger muskelspezifischer Proteine, wie T-cap, über Proteasome und damit deren Aktivität steuert [71, 216]. Außerdem phosphoryliert die Titin-Kinase, nachdem diese mittels Phosphorylierung eines Tyrosinrestes und der anschließenden Bindung von Ca^{2+}/Calmodulin aktiviert worden ist, das T-cap, was bedeutend für die reguläre Funktion des Proteins und die Myofibrillogenese zu sein scheint [29, 133].

Die N2A-Domäne ist eine weitere mechanosensorische Region des Titins und kann in der I-Bande mit den drei homologen Muskel Ankyrin-Repeat Proteinen (MARPs) interagieren [120, 140]. Mechanischer Stress und kardiale Hypertrophie sind mit einer erhöhten Expression dieser MARPs, wie des kardialen Ankyrin-Repeat Proteins (CARP), assoziiert [38, 217]. Diese Ergeb-

nisse implizieren, dass die MARPs vermeintlich Bestandteil von Signalwegen sind, welche die β-Myosin-Expression infolge mechanischer Reize steigern können.

Neben dem Titin vermitteln auch Transmembranproteine die Übertragung mechanischer Signale und initiieren somit intrazelluläre Signalkaskaden. Insbesondere die Integrine sind von zentraler Bedeutung [85]. Diese Heterodimere, bestehend aus einer α- und einer β-Untereinheit, verbinden an fokalen Adhäsionen die extrazelluläre Matrix mit den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts und regulieren auf diese Weise die Zelladhäsion sowie Phasen der Myofibrillogenese [53, 211]. Ross et al. und MacKenna et al. zeigten, dass Integrine bei der Signaltransduktion mechanischer Stimuli und der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie involviert sind, ohne den Mechanismus dahinter zu konkretisieren [128, 170]. Ein an der Integrin-vermittelten Mechanotransduktion beteiligtes Enzym ist die Fokale Adhäsionskinase (FAK). Nachdem diese Tyrosinkinase mithilfe der Adapterproteine Paxillin und Talin die zytoplasmatische Domäne des β1-Integrins gebunden hat, wird sie durch Autophosphorylierung aktiviert [176]. Diese Autophosphorylierung von FAK am Tyrosinrest Y_{397} nach mechanischen Reizen ist abhängig von der Steifheit der extrazellulären Matrix und wird von der Rho-Kinase beeinflusst [142, 207]. Die phosphorylierte FAK könnte mit der SH2-Domäne der Tyrosinkinase Src (c-SRC) interagiert haben und somit über Signalkaskaden die Expression von β-Myosin in hESC-Kardiomyozyten, die auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, gesteigert haben ([181, 190]; Abb. 44).

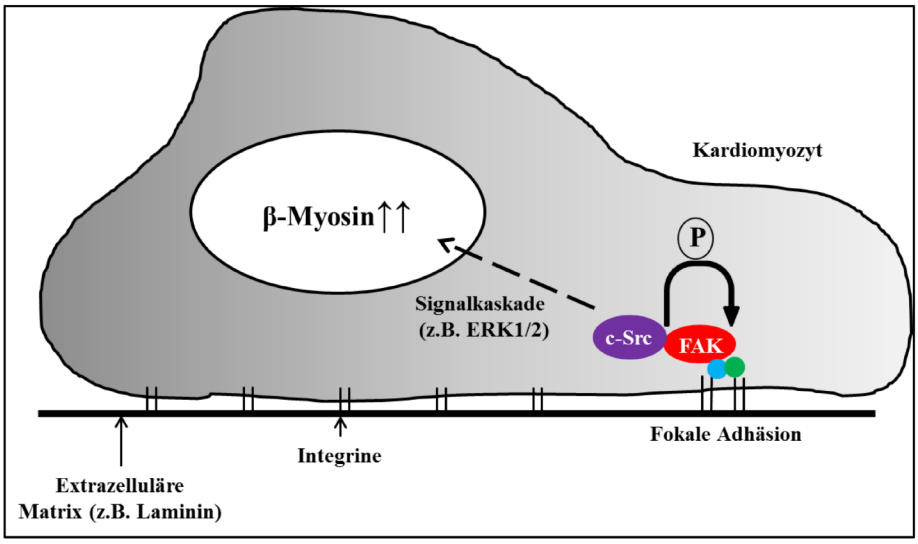


Abbildung 44: Integrin-vermittelte Aktivierung von Signalwegen zur Induktion der β-Myosin-Expression. Zentrales Signalmolekül ist die FAK, welche über Paxillin (Grün) und Talin (Blau) an die β1-Untereinheit der Integrine gebunden ist.

Im Bereich fokaler Adhäsionen findet sich außerdem die Integrin-linked Kinase (ILK), welche an die zytoplasmatische Domäne der β-Untereinheit der Integrine gebunden ist [78]. Traister et al. zeigten, dass durch eine Überexpression der ILK in fetalen humanen Kardiomyozyten die kardiale Differenzierung, inklusive der Expression von β-Myosin, stimuliert wird [208]. Mechanische Stimuli können eine ILK-vermittelte Phosphorylierung und Aktivierung der *extracellular-signal regulated kinase 1/2* (*ERK1/2*) bedingen [125, 219]. Die aktivierte *ERK1/2* könnte im Folgenden durch die Phosphorylierung von GATA4 am $Serin_{105}$ eine erhöhte Expression Hypertrophie assoziierter Gene, wie dem *MYH7*, initiiert haben [8, 202].

Die Bedeutung der dargestellten Signalwege für den Wechsel der Myosin-Isoform sollte mithilfe weiterführender Experimente erforscht werden. In diesem Zusammenhang wäre von Interesse, zunächst die Expression involvierter Proteine, wie Integrin-β1, FAK sowie Calcineurin, zwischen unterschiedlich kultivierten hESC-Kardiomyozyten und auch im zeitlichen Verlauf nach dem Ausplattieren auf Deckgläsern zu vergleichen. Eine Analyse der Proteinexpression in der gesamten Population mithilfe des Western Blot-Verfahrens und auf Einzelzellebene mithilfe einer Immunfluoreszenz-Dreifachfärbung gegen α-Myosin, β-Myosin und FAK oder Calcineurin wären sinnvoll. Durch letztere Methode könnte auch eine Korrelation zwischen der β-Myosin-Expression und der Expression der Signalmoleküle in einzelnen hESC-Kardiomyozyten realisiert werden. Im nächsten Schritt könnte die Bedeutung eines spezifischen Signalweges durch eine Aktivierung oder Inhibierung der beteiligten Signalmoleküle verifiziert werden. Denkbar wäre sowohl eine genetische oder pharmazeutische Aktivierung und Inhibition von Calcineurin und FAK, wie in hESC-Kardiomyozyten auf Laminin-beschichteten Deckgläsern [121, 187]. Die Erkenntnisse könnten nicht nur zur Aufklärung der Mechanismen hinter dem Myosin-Isoform-Wechsel beitragen, sondern auch genutzt werden, um die Expression von β-Myosin und damit die Maturierung von hESC-Kardiomyozyten zu beschleunigen. Dies wäre für die schnelle und effektive Produktion adulter hiPS-Kardiomyozyten zu regenerativen Zwecken bedeutend.

4.2.2.2 Regulation der Myosin-Expression durch miRNAs

An der posttranskriptionalen Regulation der Genexpression sind kurze, hochkonservierte und nichtcodierende Ribonukleinsäuren (RNAs), sogenannte microRNAs (miRNAs), beteiligt [111, 136]. Nach der Produktion und Prozessierung bilden die einzelsträngigen miRNAs gemeinsam mit Argonautenproteinen den *RNA-induced silencing complex* (*RISC*), der die Hemmung der Translation und anschließend die Degradation der Target-mRNA einleitet [95]. In Säugetieren

interagiert die miRNA innerhalb des RISC meist nur über eine kurze komplementäre Nukleotidsequenz am 5´-Ende, der *Seed-Sequence*, mit der Target-mRNA [114].

miRNA-1 und miRNA-133 sind von entscheidender Bedeutung für die reguläre Entwicklung von Kardiomyozyten und beeinflussen die Differenzierung von hESC- und hiPS-Kardiomyozyten in unterschiedlicher Art und Weise [87, 90]. Daher wurde auch in hESC-Kardiomyozyten, die auf Laminin-beschichteten Deckgläsern oder in *Cardiac Bodies* kultiviert worden waren, die Expression dieser miRNAs überprüft. Durch die Kultivierung auf Deckgläsern stieg die miRNA-1-Expression deutlich an, wohingegen eine erhöhte Expression der miRNA-133 ausblieb. Dies lässt auf einen positiven Einfluss der miRNA-1 auf die Differenzierung von hESC-Kardiomyozyten schließen [213].

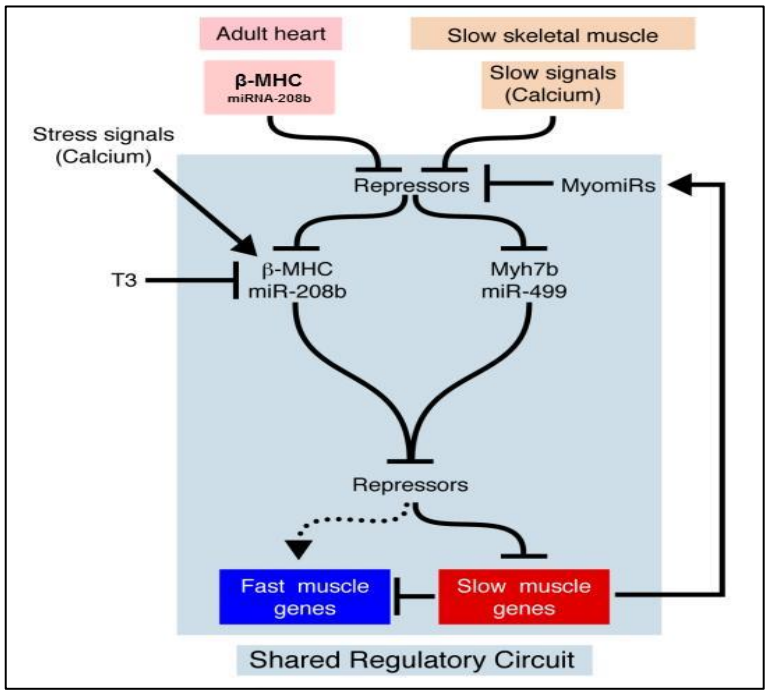


Abbildung 45: Regulation der Myosin-Expression durch miRNAs. Modifiziert nach [167]

Eine andere Familie von miRNAs, die miRNA-208a/-208b/-499, wird von Intronsequenzen der Myosingene codiert und reguliert deren Expression. Die miRNA-208a und -208b besitzen eine identische *Seed-Sequence* und unterscheiden sich nur um drei Nukleotide [122]. In Mäusen wirkt die prädominant exprimierte miRNA-208a, welche von dem Intron 29 des *MYH6* codiert wird, an der erhöhten Expression von β-Myosin/miRNA-208b infolge einer Schilddrüsenunterfunktion und mechanischem Stress mit. Dies wird über das Schilddrüsenhormonrezeptor assoziierte Protein 1 (THRAP1) und Myostatin vermittelt [28]. In analoger Weise kontrolliert die miRNA-208a

die Expression der miRNA-499, welche von dem Intron 20 des *MYH7b* codiert wird [167]. Adulte ventrikuläre Kardiomyozyten größerer Säugetiere weisen vorwiegend β-Myosin auf [67]. Van Rooij et al. nahmen deshalb an, dass die vom *MYH7* codierte miRNA-208b aufgrund ihrer identischen *Seed-Sequence* die Funktion der miRNA-208a in größeren Säugetieren erfüllen könnte ([167]; Abb. 45). Die verminderte Expression der miRNA-208a und die zugleich erhöhte Expression der miRNA-208b war demzufolge konform mit dem Nachweis von mehr rein β-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten bedingt durch Kultivierung auf Laminin-beschichteten Deckgläsern [213]. Auch die gesteigerte Expression der miRNA-499 in hESC-Kardiomyozyten, die auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, untermauerte die Hypothese von van Rooij et al. [167, 213]. Dazu passend wiesen weitere Quellen eine positive Wirkung der miRNA-499 auf die ventrikuläre Differenzierung und dementsprechend die β-Myosin-Expression nach [60, 193].

Die bisherigen Ergebnisse zeigten eine Korrelation zwischen der Expression der miRNA-208b und des β-Myosins in einer Population von hESC-Kardiomyozyten. Eine Kombination aus einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) der miRNA-208b und einer Immunfluoreszenzfärbung von α- und β-Myosin könnte klären, ob eine Korrelation der Expression auf Einzelzellebene besteht [37]. Das Ausmaß des Einflusses der microRNA-208b auf die β-Myosin-Expression könnte in weiteren Versuchen an transgenen hESC-Kardiomyozyten untersucht werden [28]. Eine Überexpression der microRNA-208b könnte den Wechsel der Myosin-Expression hin zu mehr rein β-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten beschleunigen und somit für regenerative Ansätze von Bedeutung sein.

4.2.3 Morphologische Entwicklung von hESC-Kardiomyozyten

4.2.3.1 Effekte unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen

Sowohl die morphologischen Parameter als auch die intrazelluläre Anordnung der Myofibrillen unterlagen in hESC-Kardiomyozyten einem von der Kultivierungszeit und -methode abhängigen Wandel. Auf der einen Seite besaßen die hESC-Kardiomyozyten, die über einen Zeitraum von 110 Tagen als *Cardiac Bodies* in Suspension kultiviert worden waren, eine eher rundliche Form und demzufolge einen konstant hohen Zirkularitätsindex. Außerdem nahmen die Zellfläche und die Sarkomerlänge über den Kultivierungszeitraum kontinuierlich zu, sodass die hESC-Kardiomyozyten des d110 den adulten Kardiomyozyten in Bezug auf die Sarkomerlänge am nächsten kamen [148]. In hESC-Kardiomyozyten, die über den identischen Zeitraum auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, wurde eine konträre Entwicklung der

morphologischen Paramater verzeichnet. Die auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultivierten hESC-Kardiomyozyten zeigten eine zunehmend länglichere Form, was mit dem abnehmenden Zirkularitätsindex übereinstimmt. Darüber hinaus verringerten sich sowohl die Zellfläche als auch die Sarkomerlänge über den Beobachtungszeitraum. Somit kamen die hESC-Kardiomyozyten an d35+35 den adulten Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Zellfläche am nächsten. Der Anteil der multinukleären hESC-Kardiomyozyten stieg zwar durch die Kultivierung auf Laminin-beschichteten Deckgläsern, blieb aber weit unter dem Niveau der adulten Kardiomyozyten ([148]; s. 3.2.3).
Die Anzahl und die Ordnung der Myofibrillen in hESC-Kardiomyozyten nahmen infolge der Kultivierung auf Laminin-beschichteten Deckgläsern zu (s. 3.2.3). Die parallele Anordnung der Myofibrillen in hESC-Kardiomyozyten erreichte dabei nach 35 Tagen, die Anzahl nach 75 Tagen Kultivierung auf Laminin-beschichteten Deckgläsern ihren Höhepunkt. Diese Ergebnisse zur Entwicklung der Myofibrillen stimmen weitestgehend mit den Untersuchungen von Chacko et al. an embryonalen Rattenkardiomyozyten überein [34]. Ultrastrukturelle Analysen des embryonalen Rattenmyokards zeigten eine zunehmende Proliferation und parallele Ausrichtung der Myofilamente im Verlauf der Myofibrillogenese. Die in *Cardiac Bodies* kultivierten hESC-Kardiomyozyten wiesen zu keiner Zeit eine regelrechte Ordnung der Myofibrillen auf und besaßen in der Regel netzartig oder randständig verlaufende Myofibrillen.

hESC-Kardiomyozyten aus anderen Kultivierungsansätzen in der Literatur wiesen morphologische Eigenschaften auf, die nahezu mit denen der hESC-Kardiomyozyten an d35 übereinstimmen [96, 126, 194]. Eine unzureichende Entwicklung myofibrillärer Strukturen sowie eine, im Vergleich zu hESC-Kardiomyozyten an d35, kleine Zellfläche kennzeichneten die hESC-Kardiomyozyten vergleichbaren Alters (90µm² [194] bzw. 480µm² [126] versus 2464µm² (d35)). In diesen Experimenten wurde die Entwicklung durch die Langzeitkultivierung von hESC-Kardiomyozyten in *Embryoid Bodies* oder von einzelnen hESC-Kardiomyozyten auf Gelatine- oder PEI-Gelatine-beschichteten Deckgläsern forciert. Im Gegensatz zu den hESC-Kardiomyozyten, die auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, war in diesen Experimenten eine Annäherung an den Phänotyp des adulten Kardiomyozyten mit einer deutlichen Größenzunahme verbunden (90 auf 180µm² [194] bzw. 480 auf 1716µm² [126] versus 2464 auf 1709 µm² (d35 und d35+35)). Auch die gemessenen Sarkomerlängen in hESC-Kardiomyozyten auf Laminin-beschichteten Deckgläsern waren zu beiden Zeitpunkten kürzer als

bei Lundy et al. und auch kürzer als in adulten Kardiomyozyten (1,65 auf 1,81µm [126] versus 1,59 (d35) auf 1,64 (d35+75)).

Die immensen Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Experimente illustrieren die Diversität der hES-Zellen und der daraus differenzierten hESC-Kardiomyozyten. Diese führt, ebenso wie die zahlreichen methodischen Unterschiede, zu einer eingeschränkten Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse. Zu den methodischen Unterschieden zählen die Nutzung verschiedener hESC-Klone (H9.2 [194] bzw. H7 und RuES-2 [126] versus HES-3 in diesen Experimenten [213]), Differenzierungsmedien und -umgebungen, Kultivierungsflächen (Gelatine [194] bzw. PEI-Gelatine [126] versus Laminin in diesen Experimenten [213]) und nicht zuletzt Fixierungsmethoden der hESC-Kardiomyozyten vor der Immunfluoreszenzfärbung. So führten Snir et al. nach der Fixierung mit 10% PFA über Nacht (im Vergleich 4% PFA für 20 Minuten, s. 2.3.2) eine Paraffinierung spontan schlagender Bereiche von *Embryoid Bodies* durch [194]. Diese Einbettungsmethode kann eine deutliche Zellschrumpfung von bis zu 30% bedingen [169]. Ein Defizit der vorliegenden Arbeit bezüglich der Bestimmung der Sarkomerlänge ist, dass nur die Länge von wenigen einzelnen Sarkomeren bestimmt wurde und nicht jeweils der Mittelwert einer langen Reihe von Sarkomeren an mehreren Stellen in der Zelle.

4.2.3.2 Mechanismen für eine Veränderung der Morphologie

Integrine könnten nicht nur für die Erhöhung der β-Myosin-Expression, sondern auch für die Entwicklung einer adulten Morphologie in hESC-Kardiomyozyten von Bedeutung zu sein.

Die Relevanz des Integrin-Signalweges für die Entwicklung eines länglichen Phänotyps und die ordnungsgemäße Myofibrillogenese konnte in Untersuchungen an neonatalen Rattenkardiomyozyten gezeigt werden [86, 191]. Die Kultivierung mit anti-β1- und anti-α1-Antikörpern sowie die Blockade von Integrin-Bindungsstellen auf der Kultivierungsmatrix reduzierten die myofibrilläre Organisation sowie die Elongation der Rattenkardiomyozyten. Neuere Untersuchungen wiesen in hiPS-Kardiomyozyten, die auf Polydimethylsiloxan (PDMS)-Membranen kultiviert worden waren, eine erhöhte Expression von *integrin subunit β1* (*ITGB1*), das für die β1-Untereinheit des Integrins codiert, und von *protein tyrosine kinase 2* (*PTK2*), welches für die FAK codiert, nach [85]. Darüber hinaus reduzierte die Kultivierung mit einem anti-β1-Integrin-Antikörper oder dem FAK-Inhibtor-14 in hiPS-Kardiomyozyten die FAK-Aktivierung und dadurch die Expression von β-Myosin sowie die Zellgröße [85].

Auch miRNAs könnten an der morphologischen Entwicklung von Kardiomyozyten beteiligt sein und konnten mit Pathologien im kardiovaskulären System in Verbindung gebracht werden [123]. Eine erhöhte Expression einiger miRNAs, wie miRNA-125b und -199a, konnte bei der Herzhypertrophie und der Herzinsuffizienz nachgewiesen werden, sodass diesen miRNAs ein Einfluss auf die Morphologie von Kardiomyozyten unterstellt wurde [168]. Auf Grundlage dieser Hypothese untersuchten Lee et al. die Entwicklung der Morphologie von mESC- und hESC-Kardiomyozyten nach einer Transfektion mit den miRNAs-125b, -199a, -221 und -222 [109]. Sowohl mESC- als auch hESC-Kardiomyozyten zeigten nach der Transfektion eine größere Zellfläche, eine länglichere Zellform und eine sichtliche Verbesserung der myofibrillären Ordnung. Diese morphologischen Veränderungen konnten selbst nach einmaliger Transfektion und der darauffolgenden Kultivierung der hESC-Kardiomyozyten für zwei Monate nachgewiesen werden [109]. Aufgrund der nachgewiesenen Bedeutung der Integrine und miRNAs für die Entwicklung einer adulten Morphologie von hESC-Kardiomyozyten stellen diese Targets interessante Angriffspunkte für zukünftige experimentelle Ansätze dar.

Im Hinblick auf eine mechanische Beeinflussung der hESC-Kardiomyozyten zur Förderung einer adulten Morphologie erprobten bisherige Kultivierungsversuche eine Vielzahl unterschiedlicher Strukturen. Meist wurde die Wirkung einer einzelnen physiologischen Variable, wie der für Kardiomyozyten üblichen mechanischen Arbeit, getestet [189, 231]. Die einzelnen Variablen nahmen dabei gezielten Einfluss auf bestimmte morphologische Eigenschaften der hESC-Kardiomyozyten, wie die myofibrilläre Ordnung oder die Zellform und -fläche. Insbesondere die Imitation mechanischer Arbeit [189], eine kollagenhaltige extrazelluläre Matrix [226], eine herzähnliche Steifheit der extrazellulären Matrix [49, 85], zwei- oder dreidimensionale Mikrostrukturen [174] und die elektrische Stimulation [36, 117] unterstützten hESC-Kardiomyozyten in der partiellen Entwicklung einer adulten Morphologie. Durch die Kombination mehrerer dieser Variablen könnte möglicherweise eine Addition der positiven Effekte und damit die nahezu vollständige Entwicklung einer adulten Morphologie in hESC-Kardiomyozyten realisiert werden.

4.3 Maturierung von hESC-Kardiomyozyten durch *T4*?

4.3.1 Veränderungen der Myosin-Isoform und Morphologie

In hESC-Kardiomyozyten, die auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, induzierte das Schilddrüsenhormon *T4* deutliche Veränderungen der Genexpression, Morphologie und Funktion. Nach insgesamt 14 Tagen Kultivierung mit *T4* zeigten 62% der hESC-Kardiomyozyten ausschließlich α-Myosin in der Immunfluoreszenz. Hingegen wiesen 61% der

hESC-Kardiomyozyten, die ohne *T4* auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, ausschließlich β-Myosin auf (s. 3.3.1). Diese Beobachtung stimmte mit den Ergebnissen des vorangegangenen Experiments, in dem 66% der hESC-Kardiomyozyten an d35+35 ausschließlich β-Myosin zeigten, überein (s. 3.2.1)
Eine deutliche Zunahme der Zellgröße und Sarkomerlänge unter Einfluss von *T4* wurde verzeichnet, während die Zellform und folglich der Zirkularitätsindex weitestgehend unverändert blieben (s. 3.3.2). Darüber hinaus konnte in hESC-Kardiomyozyten, die mit *T4* auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, eine Zunahme der Dichte bei gleichzeitiger Reduktion der parallelen Anordnung der Myofibrillen festgestellt werden. Die Schilddrüsenhormone sind in physiologischer Konzentration von Bedeutung für eine reguläre Myofibrillogenese, wohingegen permanent erhöhte Konzentrationen einen myofibrillären Disarray verursachen können [1]. In hESC-Kardiomyozyten, die ohne *T4* auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, nahm hingegen sowohl die Dichte als auch die Parallelität der Anordnung der Myofibrillen zu, vergleichbar mit den hESC-Kardiomyozyten an d35+35 (s. 3.2.3 und 3.3.2).

Die zahlreichen Wirkungen des Schilddrüsenhormons *T4* und seiner wirksamen Form *T3* auf Kardiomyozyten werden durch nukleäre Rezeptoren und extranukleäre Prozesse vermittelt [91]. Der TRα1 kann infolge der Interaktion mit *T3* als Transkriptionsfaktor spezifische TRE der DNA binden und auf diese Weise die Expression zahlreicher Gene erhöhen ([75, 91, 108]; Abb. 3). Untersuchungen an embryonalen Rattenkardiomyozyten zeigten, dass auch die alleinige Kultivierung mit *T4* die Expression von α-Myosin erhöhte [143]. Dies wurde durch die Expression der D2 ermöglicht, die intrazellulär für die enzymatische Umwandlung von *T4* in *T3* und dementsprechend für die Anpassung der Schilddrüsenhormonwirkung an den gewebsspezifischen Bedarf verantwortlich ist [175]. In der vorliegenden Arbeit zeigte der sehr hohe Anteil an rein α-Myosin exprimierenden hESC-Kardiomyozyten infolge der Kultivierung mit *T4*, dass diese Zellen in regulärer Weise auf das Schilddrüsenhormon reagierten. Daraus kann geschlossen werden, dass D2 in hESC-Kardiomyozyten exprimiert wird. Durch weiterführende Untersuchungen mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Echtzeit-PCR) und Western Blot-Analysen könnte dies überprüft werden.
Durch die Verwendung von *T3* wurden in anderen Untersuchungen mit hiPS- und hESC-Kardiomyozyten stärkere Veränderungen der α-Myosin-Expression nachgewiesen [113, 213, 228]. Nicht nur ein deutlicherer Anstieg der relativen Expression von α-Myosin (3fach [113]; 7,3fach [228]), sondern auch eine größere Zunahme des Anteils rein α-Myosin positiver Zellen

(95% [213] versus 61,16% α-Myosin positive hESC-Kardiomyozyten (s. 3.3.1)) in einem kürzerem Zeitraum (7 Tage [213] versus 14 Tage (s. 3.3.1)) wurden festgestellt. Der weniger vollständige und zusätzliche langsamere Wechsel der Myosin-Isoform in hESC-Kardiomyozyten bei der Kultivierung mit *T4* könnte durch geringe Expression der D2 in einigen hESC-Kardiomyozyten sowie die notwendige enzymatische Umwandlung von *T4* zu *T3* verursacht sein. Dies müsste durch eine Wiederholung des Experiments und eine Analyse der D2-Expression in einzelnen hESC-Kardiomyozyten, analog zu Versuchen an adulten Kardiomyozyten, überprüft werden [22].

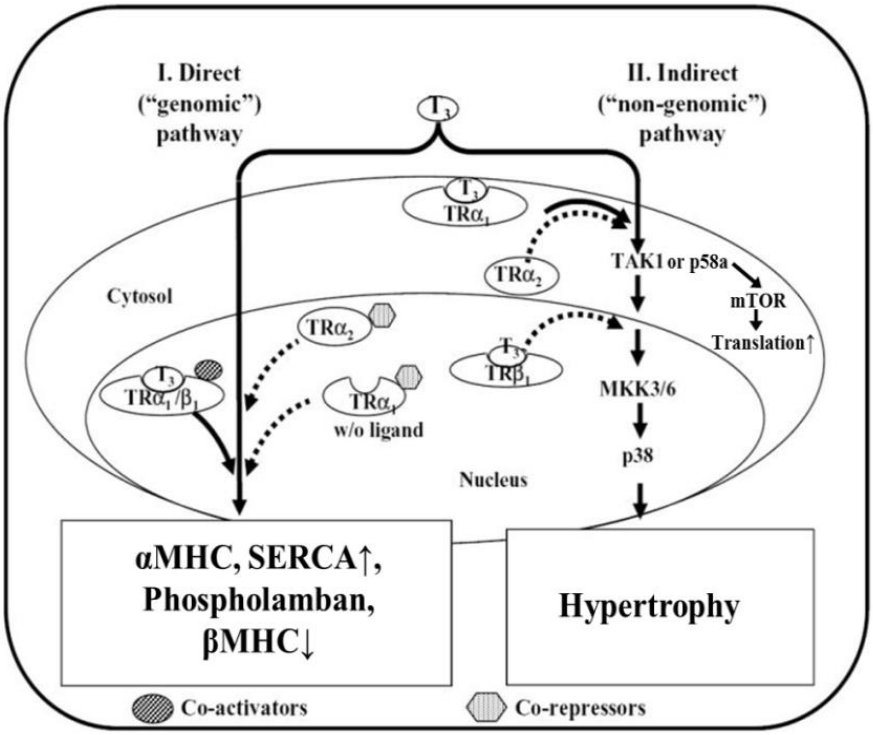


Abbildung 46: Hypothetisches Schema einiger genomischer und nicht genomischer Wirkungen von T3 in Kardiomyozyten. Modifiziert nach [100]

Neben der beschriebenen Erhöhung der α-Myosin-Expression nehmen die Schilddrüsenhormone Einfluss auf die Morphologie von Kardiomyozyten. In Rattenkardiomyozyten riefen pathologisch hohe Konzentrationen von *T4* oder *T3* eine Hypertrophie in Rattenkardiomyozyten hervor [100, 102]. Die Entwicklung dieser Hypertrophie scheint primär durch nicht direkt genomische Wirkungen des T3 vermittelt zu werden. Durch die verstärkte Aktivierung der *Transforming Growth Factor beta-activated Kinase 1* (*TAK1*) und der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) infolge der Interaktion mit der zytosolischen Komponente des TRα1 werden Signalwege initiiert, die mittels der Aktivierung von MAPK und der Proteinkinase B (PKB oder Akt) eine kardiale Hy-

pertrophie bedingen können ([98]; Abb. 46). Darüber hinaus wird der membranständigen Natrium-Kalium-ATPase, deren Expression durch *T3* gesteigert wird, eine Rolle als Signalmolekül beigemessen [94, 220].

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zeigten die, auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultivierten, hESC-Kardiomyozyten unter dem Einfluss von *T4* eine Zunahme der Zellfläche und Sarkomerlänge (s. 3.3.2). Eine identische Veränderung dieser Parameter konnte überdies in hiPS-Kardiomyozyten infolge der Kultivierung mit *T3* nachgewiesen werden (Zellfläche von 604 auf 991µm², Sarkomerlänge von 1,67 auf 1,73µm [228]). Die Reduktion des Zirkularitätsindex (eher längliche Zellen) in hiPS-Kardiomyozyten unter Einfluss von *T3* stand hingegen im Gegensatz zu der Zunahme des Zirkularitätsindex (eher rundliche Zellen) in hESC-Kardiomyozyten, die mit *T4* auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren (0,66 auf 0,54 [228] versus 0,44 auf 0,52 (s. 3.3.2)).

4.3.2 Spontane Kontraktionen von hESC-Kardiomyozyten

Die Fähigkeit, autonom Aktionspotenziale und somit Kontraktionen zu generieren, wurde nicht selten als ein Marker der Differenzierung von hES-Zellen zu hESC-Kardiomyozyten verwendet [96]. Der *HCN4*-Kanal, ein spezieller Ionenkanal der Membran von Schrittmacherzellen, ist für die langsame diastolische Depolarsation der Kardiomyozyten des Sinusknotens und damit für die spontane, autonome Generierung von Aktionspotentialen im Herzen verantwortlich [15, 44]. Analog zu den Schrittmacherzellen des Herzens wird die spontane Kontraktion in hESC-Kardiomyozyten möglicherweise auch über einen Kationeneinstrom (I_f) durch *HCN*-Kanäle initiiert [172, 178]. Demgegenüber führten Satin et al. die spontane Depolarisation der hESC-Kardiomyozyten auf einen Natriumeinstrom über Natriumionenkanäle (*$Na_v1.5$*) zurück [180]. Die Aktivierung der Natriumkanäle wurde durch eine mangelnde Expression an Kaliumkanälen (*Kir2.1*), die in adulten humanen Kardiomyozyten das Ruhemembranpotenzial stabilisieren, ermöglicht [137, 180]. Die Unterbindung spontaner Kontraktionen in hESC-Kardiomyozyten durch eine forcierte Expression von *Kir2.1* (K_{ir}) bestätigte die Beteiligung des Kaliumkanals an der Entwicklung der spontanen Aktivität von hESC-Kardiomyozyten [117].

In der vorliegenden Arbeit wiesen die hESC-Kardiomyozyten beider Untersuchungsgruppen (mit und ohne *T4*) spontane Kontraktionen auf, was vermutlich auf einer erhöhten Expression von *HCN4*-Kanälen beruht ([213]; s. 3.3.3.1). Die Zunahme der spontanen Kontraktionsfrequenz in den hESC-Kardiomyozyten, die mit *T4* auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, die den Effekt von *T3*

auf mESC- und hESC-Kardiomyozyten untersucht haben ([156]; s. 3.3.3.1). Eine *T3*-bedingte Induktion der *HCN4*-Expression könnte für die Frequenzzunahme verantwortlich sein, ebenso eine verminderte Expression von *Kir2.1* [65, 180]. Eine Analyse der Ionenkanalexpression, wie von *HCN4*, $Na_v1.5$ und *Kir2.1* auf mRNA- und Proteinebene, könnte diese Frage beantworten.
Ein funktionelles Charakteristikum von adulten ventrikulären Kardiomyozyten ist das Fehlen der spontanen Kontraktionsfähigkeit [45]. Deshalb ist die Nutzung dieser Eigenschaft lediglich als Marker der Differenzierung, nicht aber als Marker der Maturierung von hESC-Kardiomyozyten geeignet. Die Kultivierung mit *T4* erzielte in dieser Hinsicht keine Maturierung der hESC-Kardiomyozyten, da ein Großteil der hESC-Kardiomyozyten weiterhin spontane Kontraktionen zeigte.

4.3.3 Einfluss von *T4* auf die Kontraktion und Calciumtransienten

Für die Charakterisierung der Effekte von *T4* auf die kontraktile Funktion von hESC-Kardiomyozyten auf Laminin-beschichteten Deckgläsern wurden lediglich α-Myosin positive hESC-Kardiomyozyten berücksichtigt, da die α-Myosin-Expression in diesen Zellen als Indikator für den Effekt von *T4* gewertet wurde. Die Analyse der kontraktilen Parameter zeigte, dass *T4* nicht nur einen Wechsel der Myosin-Isoform hin zu mehr α-Myosin positiven Zellen induzierte, sondern auch die Geschwindigkeit der Kontraktion steigerte (s. 3.3.3.2). Im Vergleich zu β-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten, die ohne *T4* auf Deckgläsern kultiviert worden waren, waren die Zeiten bis zur maximalen Verkürzung und bis zur halbmaximalen Relaxation der α-Myosin positiven Zellen unabhängig von der Stimulationsfrequenz kürzer (s. 3.3.3.3). Es stellte sich die Frage, was der Grund für die schnellere Kontraktion der Kardiomyozyten nach *T4* sein könnte. Im Vordergrund stehen dabei einerseits die Aktivität der Myosinköpfe (die Querbrücken-Turnover-Kinetik [21]) und andererseits die Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration während der Kontraktion.
Die Turnover-Kinetik des Querbrückenzyklus wird maßgeblich durch die Myosin-Isoform beeinflusst. Schon lange ist bekannt, dass die ATPase-Aktivität von Myosin-Molekülen, die aus zwei α-Myosin-Ketten bestehen, höher ist als die von Myosin-Molekülen, die aus zwei β-Myosin-Ketten aufgebaut sind [157, 186]. Dies führt zu einer schnelleren Querbrückenkinetik des α-Myosins im Vergleich zum β-Myosin. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an isolierten Myofibrillen aus hESC-Kardiomyozyten konnten die Ergebnisse auch für diese Zellen bestätigen. Die Geschwindigkeitskonstanten für den Kraftwiederanstieg (k_{tr}) und die isometrische Relaxation (k_{lin}) waren für hESC-Kardiomyozyten, die partiell oder rein α-Myosin exprimierten, signifikant

schneller [213].
Überraschenderweise waren aber die kontraktilen Parameter der Kontraktion von hESC-Kardiomyozyten mit reiner α-Myosin, reiner β-Myosin oder gemischter Myosin-Isoform-Expression praktisch identisch [213]. Dies führte zu der Annahme, dass die kontraktilen Parameter in einzelnen hESC-Kardiomyozyten nicht von der Myosin-Isoform dominiert werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls der Einfluss der Myosin-Isoform auf die Twitch-Kontraktion von hESC-Kardiomyozyten durch den Vergleich von rein β-Myosin und gemischt α- und β-Myosin positiven hESC-Kardiomyozyten ohne *T4* untersucht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Weber et al. zeigten auch diese hESC-Kardiomyozyten nahezu identische Zeiten bis zur maximalen Verkürzung und bis zur halbmaximalen Relaxation ([213]; s. 3.3.3.4). Die Myosin-Isoform scheint demnach keine wesentliche Rolle für die beobachteten Effekte von *T4* auf die Kontraktion der hESC-Kardiomyozyten zu spielen.

Andere Parameter, die die Kinetik der Twich-Kontraktion beeinflussen, sind der Anstieg und Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration in den Kardiomyozyten. Nach der Ausbreitung eines Aktionspotenzials über die T-Tubuli in die Tiefe der Zelle, kommt es durch die Öffnung spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanäle zu einem Einstrom von Calciumionen in das Zytoplasma. Die weitaus größere Calciumfreisetzung in das Zytoplasma erfolgt durch die anschließende Calcium-induzierte Calciumfreisetzung aus dem SR über den RyR2. Durch Bindung von Calciumionen an TnC und eine Umlagerung des Troponin-Tropomyosin-Komplexes wird der Querbrückenzyklus initiiert. Der Abfall der zytoplasmatischen Calciumkonzentration beendet die Kontraktion. Hierfür sind Kanäle der Membran, wie PMCA und NCX, sowie SERCA verantwortlich [150].
Schilddrüsenhormone beeinflussen die Expression der Proteine, die am Calciumzyklus beteiligt sind, und beschleunigen auf diese Weise die Calciumtransienten sowie die Kontraktion in Kardiomyozyten [3]. Insbesondere die erhöhte Expression von RyR2, L-Typ-Calciumkanälen und SERCA sowie eine negative Regulierung von Phospholamban sind Ursache der schnelleren Kontraktion und Relaxation [3, 68, 101]. Phospholamban ist ein SERCA-regulierendes Protein in Herzmuskelzellen, das im dephosphorylierten Zustand die Aktivität der Calciumpumpe hemmt [76]. Schilddrüsenhormone führen durch eine verminderte Expression und einen höheren Phosphorylierungsrad von Phospholamban zu einer höheren SERCA-Aktivität und damit zu schnelleren Calciumtransienten [147]. Hingegen konnte ein Einfluss von Schilddrüsenhormonen auf Calsequestrin (CSQ), ein Calcium-bindendes Protein des SR, und auf Calreticulin (CALR),

ein Regulator der Calciumhomoöstase, nicht gezeigt werden [3, 138, 145].
Ein Vergleich der Calciumtransienten von mit und ohne *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten sollte klären, ob veränderte Calciumtransienten für die schnelleren kontraktilen Parameter verantwortlich waren. Die Calciumtransienten der ohne *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten zeigten unabhängig von der Stimulationsfrequenz einen biphasischen Anstieg, der dem eines adulten ventrikulären, nicht aber dem eines atrialen Kardiomyozyten ähnelt ([12, 24]; s. 3.3.3.5). hESC-Kardiomyozyten, die mit *T4* kultiviert worden waren, wiesen einen eher monophasischen Anstieg der Calciumtransienten auf. Darüber hinaus hatten die mit *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten kürzere Zeiten bis zum Maximum und bis zur Hälfte des Abfalls des Calciumtransienten als die Kardiomyozyten ohne *T4* (s. 3.3.3.5). Höchstwahrscheinlich sind überwiegend die schnelleren Calciumtransienten unter Einfluss von *T4* verantwortlich für die Veränderung der kontraktilen Parameter der hESC-Kardiomyozyten.
Dies wird bestätigt durch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die in m/hESC- und hiPS-Kardiomyozyten nach Kultivierung mit *T3* nicht nur schnellere Calciumtransienten, sondern auch eine erhöhte Expression von SERCA, NCX und RyR2 zeigten [113, 228]. Weitere Klarheit auch für die hier untersuchten hESC-Kardiomyozyten auf Deckgläsern mit und ohne *T4* könnten Expressionsanalysen von am Calciumzyklus beteiligten Proteine, wie SERCA, RyR2, Phosholamban, CSQ und CALR schaffen.

Die T-Tubuli sind bedeutsam für die elektromechanische Kopplung und sichern eine räumlich sowie zeitlich synchrone Calciumfreisetzung auch in die Tiefe der Kardiomyozyten [23]. T-Tubuli entwickeln sich aus nanometergroßen, sackförmigen Einbuchtungen der Membran, den Caveolae [56]. Caveolin-3 scheint die Entwicklung der T-Tubuli zu steuern, wohingegen die Erhaltung der T-Tubuli vorwiegend durch Amphiphysin-2, auch *bridging integrator-1* (*BIN1*) genannt, erfolgt [27, 153]. Die Entwicklung T-Tubuli-ähnlicher Strukturen in hESC-Kardiomyozyten ist folglich ein entscheidender Faktor für die Synchronisation und Geschwindigkeit des Calciumzyklus.
Immunfluoreszenzfärbungen mit dem spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoff *pyridinium, 4-[2-[6-(dioctylamino)-2-naphthalenyl]ethenyl]-1-(3-sulfopropyl), inner salt* (*Di-8-ANEPPS*) und ultrastrukturelle Analysen ergaben, dass in hESC- und hiPS-Kardiomyozyten T-Tubuli sowie assoziierte Proteine, wie Caveolin-3 und Amphiphysin-2, fehlen [5, 63, 118]. Das Fehlen von T-Tubuli konnte auch von Weber et al. für hESC-Kardiomyoyzten auf Laminin-beschichteten Deckgläsern ohne *T4* gezeigt werden [213]. Kardiomyozyten ohne T-Tubuli weisen eine nicht

gleichmäßige Calciumfreisetzung in das Zytoplasma mit Maximum in der Zellperipherie auf [23]. Demgegenüber zeigten Satin et al. elektronenmikroskopisch wenige mit T-Tubuli vereinbare Strukturen in hESC-Kardiomyozyten [179]. Auch diese Kardiomyozyten wiesen jedoch ungleichmäßige Calciumfreisetzung auf.

Im Hinblick auf die Maturierung der hESC-Kardiomyozyten zu einem Phänotyp ähnlich wie adulte Kardiomyozyten wäre es von großem Interesse, die Entwicklung von T-Tubuli zu fördern. Denkbar wäre hier ein Einfluss von Schilddrüsenhormonen, der bisher jedoch nicht gezeigt werden konnte. *T3* beeinflusste die Expression von Caveolin-3 nicht [160]. Mechanische Stimulation, wie die Kultivierung auf Laminin-beschichteten Deckgläsern, induzierte hingegen über die Integrin-FAK-Signalkaskade die Expression von Caveolin-3 und könnte so die Tubulogenese fördern [159]. hESC-Kardiomyozyten, die 22 Tage auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert worden waren, zeigten dennoch keine T-Tubuli-ähnlichen Strukturen [213]. Möglicherweise könnte hier die Kultivierung in dreidimensionalen Gerüsten unter elektrischer Stimulation förderlich wirken [14].

4.3.4 Maturierung von hESC-Kardiomyozyten durch T4

Unter Anbetracht aller Ergebnisse brachte die Kultivierung mit *T4* die Maturierung von hESC-Kardiomyozyten zu adulten ventrikulären Kardiomyozyten nicht voran. Weder die hohe α-Myosin-Expression, noch die zelluläre Hypertrophie der hESC-Kardiomyozyten sind vereinbar mit dem physiologischen Phänotyp eines ventrikulären Kardiomyozyten [67]. Mit *T4* kultivierte hESC-Kardiomyozyten ähneln eher atrialen Kardiomyozyten, Kardiomyozyten aus Patienten mit Herzinsuffizienz oder adulten ventrikulären Maus- oder Rattenkardiomyozyten [67, 127]. Letztere weisen eine hauptsächlich reine α-Myosin-Expression auf [54]. Die Maturierung von tierischen Kardiomyozyten für die Nutzung als Krankheitsmodell kann durch die Kultivierung mit *T4* beschleunigt werden. Bei der Bewertung morphologischer Untersuchungen muss sicherlich die induzierte Hypertrophie miteinbezogen werden, da die genannten tierischen Kardiomyozyten im Normalfall kleiner sind (Rattenkardiomyozyten ca. 1800 µm²; [73]). Lediglich der Calciumzyklus und somit die Kontraktilität wurden, mit Einschränkungen, positiv durch *T4* beeinflusst. Entgegen der in der Literatur propagierten Auffassung [113, 228] erscheinen hESC-Kardiomyozyten nach Kultivierung mit *T4* nicht als zelluläres Krankheitsmodell oder als Testsystem für Medikamentenstudien geeignet.

4.4 Ausblick

Für eine weitergehende Charakterisierung der hier kultivierten hESC-Kardiomyozyten sind zusätzliche Immunfluoreszenzanalysen auf Einzelzellebene notwendig, wie die Untersuchung der Expression der leichten Myosinketten MLC-2a/v oder der T-Tubuli. Western Blot-Analysen zeigten einen zu β-Myosin parallelen Anstieg der MLC-2v-Expression in der Gesamtpopulation der hESC-Kardiomyozyten bei der Kultivierung auf Deckgläsern [213]. Aufgrund der funktionellen Ungleichheit der MLC-Isoformen ist jedoch eine Charakterisierung der MLC-2a- und MLC-2v-Expression in einzelnen hESC-Kardiomyozyten nach einer Immunfluoreszenzdoppelfärbung erforderlich [154]. T-Tubuli konnten bislang in hESC-Kardiomyozyten, die auf Deckgläsern kultiviert worden waren, sowohl in ultrastrukturellen Analysen als auch in Immunfluoreszenzfärbungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Di-8-ANEPPS* nicht nachgewiesen werden [213]. Erste Hinweise auf Gründe für das Fehlen von T-Tubuli könnten Immunfluoreszenzfärbungen sowie Western Blot-Analysen von Caveolin-3 und Amphiphysin-2, die von entscheidender Bedeutung für die Tubulogenese sind, liefern.

Von besonderem Interesse ist auch die Aufklärung der Mechanismen, die zur hier beobachteten Entwicklung der hESC-Kardiomyozyten auf Deckgläsern zu einem in etlichen Aspekten ventrikulären Phänotyp führen. In diesem Zusammenhang sollten der Calcineurin- und Integrin-FAK-Signalweg sowie die beteiligten Signalmoleküle, wie *NFAT* und *ERK*, untersucht werden. Zunächst könnten Western Blot-Analysen Auskunft über die Expression von Calcineurin und FAK in hESC-Kardiomyozyten auf Laminin-beschichteten Deckgläsern und in *Cardiac Bodies* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Vereinzelung geben. Zudem kann mithilfe spezifischer Assays die Aktivität dieser Enzyme direkt analysiert werden [83]. Mit Immunfluoreszenzfärbungen gegen α-, β-Myosin und FAK kann eine Koexpression von β-Myosin und FAK auf Einzelzellebene überprüft werden. Weitere Experimente mit Inhibition und Überexpression beteiligter Signalmoleküle sind notwendig für die detaillierte Analyse der beteiligten Signalwege.
Auch miRNAs scheinen an der Entwicklung des mehr ventrikulären Phänotyps der hESC-Kardiomyozyten beteiligt zu sein. Bisherige Analysen unserer Arbeitsgruppe zeigten eine erhöhte Expression der miRNA-208b, -1 und -499 parallel zur β-Myosin-Expression. In anderen Arbeiten wurden positive Einflüsse der miRNA-1 und -499 auf die elektrophysiologischen Eigenschaften und die ventrikuläre Differenzierung nachgewiesen [60]. Ähnliche Effekte wurden durch die Kultivierung mit den miRNAs-125b, -199a, -221 und -222 erreicht [110]. Die spezifischen Auswirkungen einzelner miRNAs auf Struktur und Funktion von hESC-Kardiomyozyten

auf Einzelzellebene wurden bisher nicht untersucht. Eine gezielte Überexpression oder Inhibition einzelner miRNAs, wie miRNA-208b, könnte hier neue Erkenntnisse bringen.

Höchstwahrscheinlich ist das koordinierte Zusammenspiel mehrerer Signalwege und miRNAs für den mehr ventrikulären Phänotyp von hESC-Kardiomyozyten auf Laminin-beschichteten Deckgläsern verantwortlich.

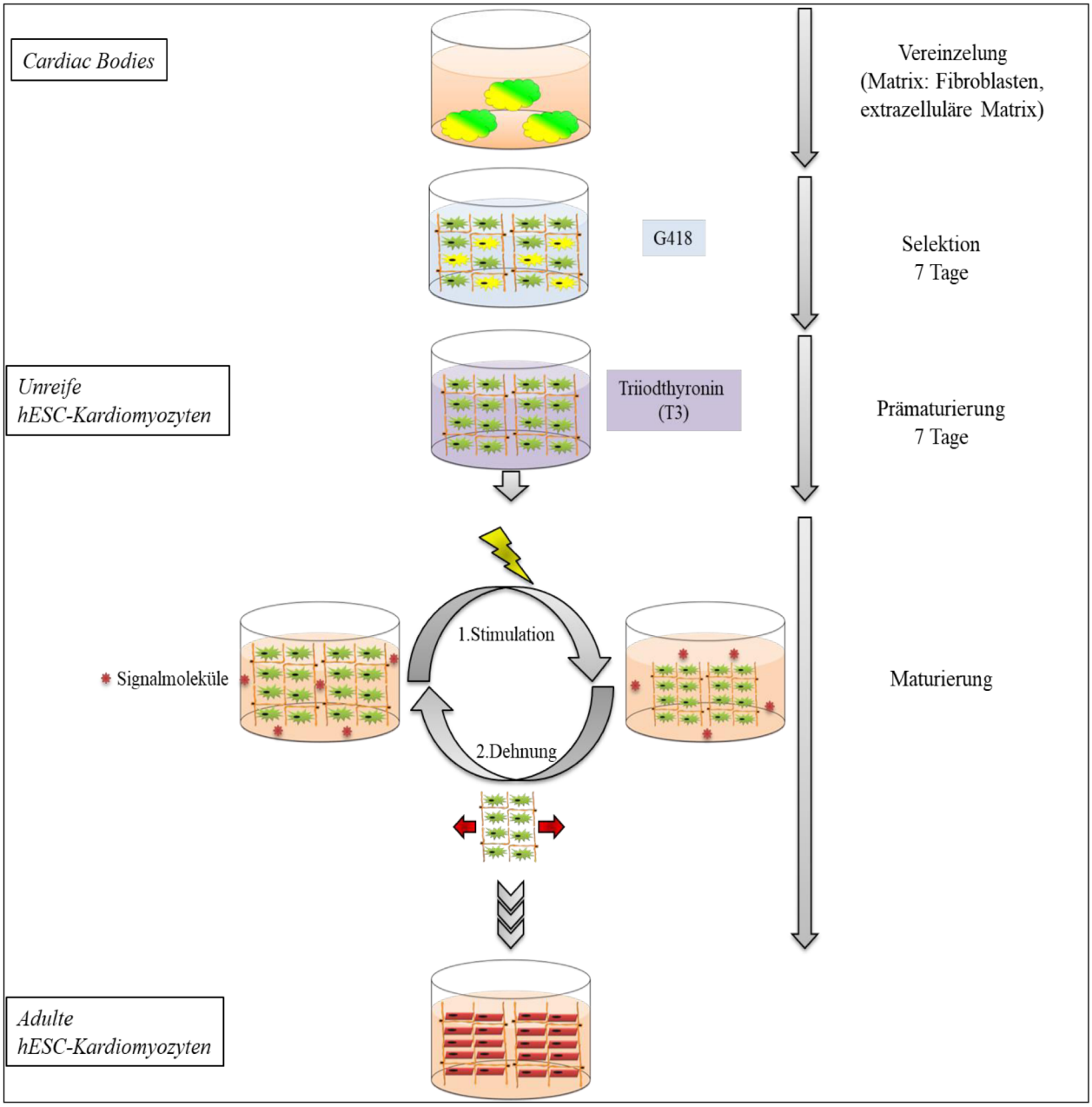


Abbildung 47: Schema einer sequenziellen multimodalen Kultivierungsmethode zur Maturierung von hESC-Kardiomyozyten.

Obwohl hESC-Kardiomyozyten durch die Kultivierung auf Laminin-beschichteten Deckgläsern strukturelle und funktionelle Charakteristika adulter ventrikulärer Kardiomyozyten entwickelten,

blieben dennoch Unterschiede zu diesen adulten Zellen. Hierzu zählten das Fehlen funktionsfähiger T-Tubuli, die Expression nicht-ventrikulärer Proteinisoformen sowie das Fortbestehen der spontanen Kontraktionsfähigkeit. Die genutzte Kultivierungsmethode scheint aufgrund der Komplexität der humanen Kardiogenese zur vollständigen Maturierung nicht auszureichen.

Durch einen sequenziellen multimodalen Kultivierungsansatz können die positiven Effekte verschiedener erprobter Kultivierungsmethoden kombiniert und möglicherweise eine vollständige Maturierung realisiert werden (Abb. 47). Laminin-beschichtete Deckgläser oder andere steife Oberflächen zeigten günstige Auswirkungen auf die Maturierung von hESC-Kardiomyoyzten. Eine dehnbare Matrix bestehend aus Nicht-Kardiomyozyten, wie Fibroblasten/-zyten und extrazellulärer Matrix, mit einer ähnlichen Steifigkeit könnte die physiologischen Begebenheiten exakter simulieren [99]. Die initiale Selektion von hESC-Kardiomyozyten mit G418 müsste optimiert werden. Aufgrund der langen Diffusionsstrecke in *Cardiac Bodies* ist nicht sichergestellt, dass alle Zellen der Selektion unterzogen werden. Durch die Selektion nach Ausplattierung der hESC-Kardiomyozyten könnten alle Zellen erreicht werden. Weiterhin ist die Codierung der Antibiotika-Resistenz im *MYH6*-Promotor nicht optimal, da auch rein β-Myosin-positive hESC-Kardiomyozyten zerstört werden. Die Nutzung alternativer Promotoren, wie *MYH7* oder *MYL2* [17], zur Codierung der Antibiotika-Resistenz könnte die Maturierung beschleunigen, ohne die Selektion zu beeinträchtigen.

Analog zur Kardiogenese *in vivo* könnte der kurzzeitige Einsatz des Schilddrüsenhormons *T3* im Anschluss an die Selektion die Entwicklung der Kontraktionseigenschaften, des Calciumzyklus und der Elektrophysiologie von hESC-Kardiomyozyten initiieren [215]. Während der folgenden Langzeitkultivierung in der dehnbaren Nicht-Kardiomyozyten-Matrix sollten die Phasen der physiologischen Herzaktion, Systole und Diastole, imitiert werden. Die elektrische Stimulation der hESC-Kardiomyozyten soll dabei die Kontraktion während der Systole [36], die anschließende Dehnung die Füllung während der Diastole nachahmen [139]. Diese abwechselnde Stimulation und Dehnung sollte mit einer Frequenz von 60-80 Hz durchgeführt werden.

Nach einer differenzierten Aufklärung der Mechanismen, die der Entwicklung eines eher ventrikulären Phänotyps von hESC-Kardiomyozyten auf Laminin-beschichteten Deckgläsern zugrunde liegen, könnten die relevanten Signalwege gezielt beeinflusst werden, um den Maturierungsprozess weiter zu beschleunigen. Die spezifische Beeinflussung von Molekülen am Ende der Signalkette wäre diesbezüglich günstiger als Eingriffe an zentralen Signalmolekülen, wie FAK und Calcineurin, da diese weitreichende zelluläre Adaptationsprozesse nach sich ziehen würden.

5 Zusammenfassung

Humane embryonale und humane induzierte pluripotente Stammzellen (hES- und hiPS-Zellen) bieten eine nahezu unbegrenzte Quelle für den regenerativen Zellersatz und *in vitro* Krankheitsmodelle. Seit der erfolgreichen Generierung und Differenzierung von hESC- und hiPS-Kardiomyozyten stellt die Entwicklung homogener Populationen von Kardiomyozyten mit einem Phänotyp, der adulten ventrikulären Herzmuskelzellen gleicht, eine Herausforderung dar. Diese Maturierung ist für den Einsatz solcher Zellen in der regenerativen Therapie, in validen Krankheitsmodellen oder zur Erprobung neuer Pharmaka von zentraler Bedeutung.

Ziel dieser Dissertation war, den Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen auf die Maturierung von einzelnen hESC-Kardiomyozyten insbesondere im Hinblick auf die Expression der Myosin-Isoformen und die Morphologie zu analysieren. Für die zukünftige Etablierung eines Krankheitsmodells für die Hypertrophe Kardiomyopathie sollten auf Einzelzellebene hESC-Kardiomyozyten mit reiner Expression der ventrikulären β-Myosin-Isoform und einer den adulten Kardiomyozyten möglichst ähnlichen Morphologie generiert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden zwei Ansätze mit unterschiedlichen Substratsteifigkeiten gewählt: Einerseits wurden hESC-Kardiomyozyten in schwimmenden Aggregaten, den *Cardiac Bodies*, und andererseits ausplattiert auf Laminin-beschichteten Deckgläsern kultiviert. Der Versuchszeitraum erstreckte sich auf insgesamt 110 Tage. Nach 35 Tagen in *Cardiac Bodies* wurde ein Teil der hESC-Kardiomyozyten vereinzelt und für weitere 35 (d35+35) bzw. 75 (d35+75) Tage auf Deckgläsern kultiviert. An verschiedenen Zeitpunkten, d35, d70 und d110 für Zellen aus *Cardiac Bodies* sowie d35+35 und d35+75 für Zellen auf Deckgläsern, wurden die Myosin-Expression auf Proteinebene und morphologische Parameter einer großen Zahl von einzelnen hESC-Kardiomyozyten analysiert. Hierfür wurde eine hochspezifische Immunfluoreszenzdoppelfärbung gegen α- und β-Myosin etabliert.

Eine weitere Frage war, wie sich das Schilddrüsenhormon *T4* auf die Maturierung der Kardiomyozyten auswirkt. Zur Untersuchung der Effekte von *T4* wurden hESC-Kardiomyozyten auf Laminin-beschichteten Deckgläsern für 14 Tage mit *T4* kultiviert und mit hESC-Kardiomyozyten, die für den gesamten Zeitraum (40 Tage) ohne *T4* kultiviert worden waren, verglichen. Es wurden die α- und β-Myosin-Expression und die Morphologie sowie funktionelle Eigenschaften, wie die zeitlichen Parameter der Kontraktion und der Calciumtransienten von einzelnen hESC-Kardiomyozyten, untersucht. Nach Fixierung und Immunfluoreszenzdoppelfärbung wurden die zuvor gemessenen kontraktilen Parameter der einzelnen hESC-Kardiomyozyten

mit der jeweiligen Myosin-Expression korreliert. Dies war möglich durch Konstruktion einer neuartigen Apparatur zur Wiederfindung der funktionell gemessenen Zellen nach der Färbung.
Die Einzelzellanalyse ergab, dass die Langzeitkultivierung auf Laminin-beschichteten Deckgläsern einen mit der Zeit deutlich ansteigenden Anteil rein β-Myosin exprimierender hESC-Kardiomyozyten induzierte. An d35+35 waren 66% der Kardiomyozyten rein β-Myosin positiv, an d35+75 waren es 87%. Im Gegensatz dazu zeigten die in *Cardiac Bodies* kultivierten hESC-Kardiomyozyten hauptsächlich eine gemischte Expression von α- und β-Myosin. Der höchste Anteil rein β-Myosin-positiver Kardiomyozyten in *Cardiac Bodies* wurde mit 10% an d110 erreicht. Außerdem zeigte die Morphologie der auf Deckgläsern kultivierten hESC-Kardiomyozyten eine Annäherung an den Phänotyp adulter Kardiomyozyten. Die größte Ähnlichkeit hinsichtlich der Zellfläche, der Zellform sowie der myofibrillären Ordnung wurde nach 35 Tagen Kultivierung auf Deckgläsern beobachtet. Die in *Cardiac Bodies* kultivierten hESC-Kardiomyozyten wiesen zu keinem Zeitpunkt morphologische Parameter auf, die mit adulten Kardiomyozyten wirklich vergleichbar sind.
Die Stimulation der hESC-Kardiomyozyten mit *T4* initiierte einen Wechsel der Myosin-Isoform zu 62% rein α-Myosin exprimierenden Zellen. Darüber hinaus entwickelten sich mit *T4* eine Hypertrophie und eine weniger längliche Morphologie der Kardiomyozyten. Die funktionellen Einzelzell-Analysen zeigten nach Korrelation mit der Myosin-Expression, dass mit *T4* kultivierte, rein α-Myosin positive hESC-Kardiomyozyten schneller kontrahierten und relaxierten als rein β-Myosin positive hESC-Kardiomyozyten, die ohne *T4* kultiviert worden waren. Die weitere funktionelle Charakterisierung der ohne *T4* kultivierten hESC-Kardiomyozyten ergab, dass nicht die Myosin-Isoform die Unterschiede der kontraktilen Parameter bedingt, sondern höchstwahrscheinlich eine *T4*-induzierte Veränderung der Calciumtransienten. Die Analyse der Calciumtransienten zeigte für hESC-Kardiomyozyten, die mit *T4* kultiviert worden waren, einen schnelleren Anstieg und schnelleren Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration, was die schnellere Kontraktionskinetik erklärt.
Insgesamt zeigt die Arbeit, dass durch Kultivierung von hESC-Kardiomyozyten auf einer Laminin-beschichteten starren Oberfläche eine Maturierung im Hinblick auf die Expression der ventrikulären β-Myosin-Isoform und bezüglich der Zellmorphologie erreicht werden kann. Die Stimulation mit *T4* hebt diese Effekte wieder auf und ist somit nicht für die Induktion eines den adulten humanen ventrikulären Kardiomyozyten ähnlichen Phänotyps geeignet. Insgesamt stellen die auf starrer Oberfläche kultivierten hESC-Kardiomyozyten eine gute Grundlage für ein *in vitro* Modellsystem zur funktionellen Einzelzell-Analyse kardialer Erkrankungen dar.

6 Literaturverzeichnis

1. Abinder AA, Paukov VS, Rom-Bugoslavskaia ES [Contractile function of the myocardium of the right ventricle in thyrotoxicosis]. Probl Endokrinol (Mosk) 21:22–7.
2. Amezcua R, Shirolkar A, Fraze C, Stout D (2016) Nanomaterials for Cardiac Myocyte Tissue Engineering. Nanomaterials 6:133. doi: 10.3390/nano6070133
3. Arai M, Otsu K, MacLennan DH, Alpert NR, Periasamy M (1991) Effect of Thyroid Hormone on the Expression of mRNA Endocoding Sarcoplasmic Reticulum Proteins. CircRes 69:266–276.
4. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development on SOX2 function. Genes Dev 17:126–140. doi: 10.1101/gad.224503
5. Beach JM, McGahren ED, Xia J, Duling BR (1996) Ratiometric measurement of endothelial depolarization in arterioles with a potential-sensitive dye. Am J Physiol 270:H2216-27.
6. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan S-M, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P (2001) Evidence That Human Cardiac Myocytes Divide after Myocardial Infarction. N Engl J Med 344:1750–1757. doi: 10.1056/NEJM200106073442303
7. Benchaib M, Delorme R, Pluvinage M, Bryon PA, Souchier C (1996) Evaluation of five green fluorescence-emitting streptavidin-conjugated fluorochromes for use in immunofluorescence microscopy. Histochem Cell Biol 106:253–6.
8. van Berlo JH, Elrod JW, Aronow BJ, Pu WT, Molkentin JD (2011) Serine 105 phosphorylation of transcription factor GATA4 is necessary for stress-induced cardiac hypertrophy in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 108:12331–6. doi: 10.1073/pnas.1104499108
9. Bernstein HS, Srivastava D (2012) Stem cell therapy for cardiac disease. Pediatr Res 71:491–499. doi: 10.1038/pr.2011.61
10. Berry MJ, Larsen PR (1992) The role of selenium in thyroid hormone action. Endocr Rev 13:207–219. doi: 10.1210/edrv-13-2-207
11. Bers DM (2002) Cardiac excitation–contraction coupling. Nature 415:198–205. doi: 10.1038/415198a
12. Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E (1992) Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. Circulation 85:1046–1055. doi: 10.1161/01.CIR.85.3.1046
13. Bhattacharya S, Burridge PW, Kropp EM, Chuppa SL, Kwok W-M, Wu JC, Boheler KR, Gundry RL (2014) High Efficiency Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes and Characterization by Flow Cytometry. J Vis Exp 1–12. doi: 10.3791/52010
14. Bian W, Badie N, Himel HD, Bursac N (2014) Robust T-tubulation and maturation of cardiomyocytes using tissue-engineered epicardial mimetics. Biomaterials 35:3819–3828. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.045
15. Biel M, Schneider A, Wahl C (2002) Cardiac HCN channels: Structure, function, and modulation. Trends Cardiovasc Med 12:206–213. doi: 10.1016/S1050-1738(02)00162-7

16. Binah O, Dolnikov K, Sadan O, Shilkrut M, Zeevi-Levin N, Amit M, Danon A, Itskovitz-Eldor J (2007) Functional and developmental properties of human embryonic stem cells-derived cardiomyocytes. J Electrocardiol 40:192–196. doi: 10.1016/j.jelectrocard.2007.05.035

17. Bizy A, Guerrero-Serna G, Hu B, Ponce-Balbuena D, Willis C, Zarzoso M, Ramizer RJ, Jalife J (2013) Myosin light chain 2-based selection of human iPSC-derived early vnetricular cardiac myocytes. Stem Cell Res 11:1335–1347. doi: 10.1016/j.scr.2013.09.003.Myosin

18. Boraas LC, Ahsan T (2016) Lack of vimentin impairs endothelial differentiation of embryonic stem cells. Sci Rep 6:30814. doi: 10.1038/srep30814

19. Bordeaux J, Welsh AW, Agarwal S, Killiam E, Baquero MT, Hanna JA, Anagnostou VK, Rimm DL (2010) Antibody validation. Biotechniques 48:197–209. doi: 10.2144/000113382

20. Brelje TC, Wessendorf MW, Sorenson RL (1993) Multicolor laser scanning confocal immunofluorescence microscopy: practical application and limitations. Methods Cell Biol 38:97–181.

21. Brenner B (1988) Effect of Ca2+ on cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fibers: implications for regulation of muscle contraction. Proc Natl Acad Sci U S A 85:3265–9.

22. Brenner B, Seebohm B, Tripathi S, Montag J, Kraft T (2014) Familial hypertrophic cardiomyopathy: Functional variance among individual cardiomyocytes as a trigger of fhc-phenotype development. Front Physiol 5:1–15. doi: 10.3389/fphys.2014.00392

23. Brette F, Orchard C (2003) T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. Circ Res 92:1182–1192. doi: 10.1161/01.RES.0000074908.17214.FD

24. Brixius K, Pietsch M, Hoischen S, Müller-Ehmsen J, Schwinger RH (1997) Effect of inotropic interventions on contraction and Ca2+ transients in the human heart. J Appl Physiol 83:652–660.

25. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) (2015) Nationale Versorgungsleitlinie Chronische KHK Langfassung. Der Nephrol 4. Auflage:1–158. doi: 10.6101/AZQ/000147

26. Cadigan KM, Nusse R (1997) Wnt signalling: a common theme in animal development. Genes Dev 11:3286–3305. doi: 10.1101/gad.11.24.3286

27. Caldwell JL, Smith CER, Taylor RF, Kitmitto A, Eisner DA, Dibb KM, Trafford AW (2014) Dependence of cardiac transverse tubules on the BAR domain protein amphiphysin II (BIN-1). Circ Res 115:986–996. doi: 10.1161/CIRCRESAHA. 116.303448/-/DC1

28. Callis TE, Pandya K, Hee YS, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, Chen JF, Deng Z, Gunn B, Shumate J, Willis MS, Selzman CH, Wang DZ (2009) MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. J Clin Invest 119:2772–2786. doi: 10.1172/JCI36154

29. Candasamy AJ, Haworth RS, Cuello F, Ibrahim M, Aravamudhan S, Krüger M, Holt MR, Terracciano CMN, Mayr M, Gautel M, Avkiran M (2014) Phosphoregulation of the titin-cap protein telethonin in cardiac myocytes. J Biol Chem 289:1282–93. doi: 10.1074/jbc.M113.479030

30. CARLSSON K, LILJEBORG A (1997) Confocal fluorescence microscopy using spectral and lifetime information to simultaneously record four fluorophores with high channel separation. J Microsc 185:37–46. doi: 10.1046/j.1365-2818.1997.1450705.x

31. Carlsson K, Mossberg K (1992) Reduction of cross-talk between fluorescent labels in scanning laser microscopy. J Microsc 167:23–37. doi: 10.1111/j.1365-2818.1992.tb03216.x

32. Cartwright P (2005) LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. Development 132:885–896. doi: 10.1242/dev.01670

33. Caspi O, Huber I, Kehat I, Habib M, Arbel G, Gepstein A, Yankelson L, Aronson D, Beyar R, Gepstein L (2007) Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. J Am Coll Cardiol 50:1884–93. doi: 10.1016/j.jacc.2007.07.054

34. Chacko KJ (1976) Observations on the ultrastructure of developing myocardium of rat embryos. J Morphol 150:681–709. doi: 10.1002/jmor.1051500305

35. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263:802–5.

36. Chan Y-C, Ting S, Lee Y-K, Ng K-M, Zhang J, Chen Z, Siu C-W, Oh SKW, Tse H-F (2013) Electrical Stimulation Promotes Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Embryonic Stem Cells. J Cardiovasc Transl Res 6:989–999. doi: 10.1007/s12265-013-9510-z

37. Chaudhuri AD, Yelamanchili S V., Fox HS (2013) Combined fluorescent in situ hybridization for detection of microRNAs and immunofluorescent labeling for cell-type markers. Front Cell Neurosci 7:1–8. doi: 10.3389/fncel.2013.00160

38. Chen C, Shen L, Cao S, Li X, Xuan W, Zhang J, Huang X, Bin J, Xu D, Li G, Kitakaze M, Liao Y (2014) Cytosolic CARP promotes angiotensin II- or pressure overload-induced cardiomyocyte hypertrophy through calcineurin accumulation. PLoS One. doi: 10.1371/journal.pone.0104040

39. Cossart R, Ikegaya Y, Yuste R (2005) Calcium imaging of cortical networks dynamics. Cell Calcium 37:451–457. doi: 10.1016/j.ceca.2005.01.013

40. Coumans J V, Yeoh T, Seeto RK, Keogh A, Brennan K, Gunning P, Hardeman E, dos Remedios CG (1997) Variations in the relative mRNA levels of actins and myosin heavy chains do not produce corresponding differences in their proteins in the adult human heart. J Mol Cell Cardiol 29:895–905. doi: 10.1006/jmcc.1996.0317

41. Daehmlow S, Erdmann J, Knueppel T, Gille C, Froemmel C, Hummel M, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V (2002) Novel mutations in sarcomeric protein genes in dilated cardiomyopathy. Biochem Biophys Res Commun 298:116–120. doi: 10.1016/S0006-291X(02)02374-4

42. Davis PJ, Davis FB (1993) Acute cellular actions of thyroid hormone and myocardial function. Ann Thorac Surg 56:S16-23.

43. Deller T, Kummer W, Welsch U (2014) Lehrbuch Histologie. Elsevier, Urban et Fischer

44. DiFrancesco D (1981) A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. J Physiol 314:359–76.

45. DiFrancesco D (1993) Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. Annu Rev Physiol

55:455–472. doi: 10.1146/annurev.physiol.55.1.455

46. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J Embryol Exp Morphol 87:27–45. doi: 10.1263/jbb.103.389

47. Dolnikov K, Shilkrut M, Zeevi-Levin N, Danon A, Gerecht-Nir S, Itskovitz-Eldor J, Binah O (2005) Functional properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. Ann N Y Acad Sci 1047:66–75. doi: 10.1196/annals.1341.006

48. Drukker M, Katchman H, Katz G, Even-Tov Friedman S, Shezen E, Hornstein E, Mandelboim O, Reisner Y, Benvenisty N (2006) Human Embryonic Stem Cells and Their Differentiated Derivatives Are Less Susceptible to Immune Rejection Than Adult Cells. Stem Cells 24:221–229. doi: 10.1634/stemcells.2005-0188

49. Engler AJ, Carag-Krieger C, Johnson CP, Raab M, Tang H-Y, Speicher DW, Sanger JW, Sanger JM, Discher DE (2008) Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating. J Cell Sci 121:3794–3802. doi: 10.1242/jcs.029678

50. Entwistle A, Noble M (1992) The use of Lucifer yellow, bodipy, FITC, TRITC, RITC and Texas red for dual immunofluorescence visualized with a confocal scanning laser microscope. J Microsc 168:219–238. doi: 10.1111/j.1365-2818.1992.tb03265.x

51. Epstein FH, Klein I, Ojamaa K (2001) Thyroid Hormone and the Cardiovascular System. N Engl J Med 344:501–509. doi: 10.1056/NEJM200102153440707

52. Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292:154–156. doi: 10.1038/292154a0

53. Fässler R, Rohwedel J, Maltsev V, Bloch W, Lentini S, Guan K, Gullberg D, Hescheler J, Addicks K, Wobus a M (1996) Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin. J Cell Sci 109 (Pt 1:2989–2999.

54. Fitzsimons DP, Patel JR, Moss RL (1998) Role of myosin heavy chain composition in kinetics of force development and relaxation in rat myocardium. J Physiol 513 (Pt 1):171–83.

55. Fonoudi H, Ansari H, Abbasalizadeh S, Larijani MR, Kiani S, Hashemizadeh S, Zarchi AS, Bosman A, Blue GM, Pahlavan S, Perry M, Orr Y, Mayorchak Y, Vandenberg J, Talkhabi M, Winlaw DS, Harvey RP, Aghdami N, Baharvand H (2015) A Universal and Robust Integrated Platform for the Scalable Production of Human Cardiomyocytes From Pluripotent Stem Cells. Stem Cells Transl Med 4:1482–94. doi: 10.5966/sctm.2014-0275

56. Forbes MS, Hawkey LA, Sperelakis N (1984) The transverse???axial tubular system (tats) of mouse myocardium: Its morphology in the developing and adult animal. Am J Anat 170:143–162. doi: 10.1002/aja.1001700203

57. Forfar JC, Muir AL, Sawers SA, Toft AD (1982) Abnormal left ventricular function in hyperthyroidism: evidence for a possible reversible cardiomyopathy. N Engl J Med 307:1165–70. doi: 10.1056/NEJM198211043071901

58. Frey N, Barrientos T, Shelton JM, Frank D, Rütten H, Gehring D, Kuhn C, Lutz M, Rothermel B, Bassel-Duby R, Richardson JA, Katus HA, Hill JA, Olson EN (2004) Mice lacking calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress. Nat Med 10:1336–43.

doi: 10.1038/nm1132

59. Frey N, Richardson JA, Olson EN (2000) Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 97:14632–7. doi: 10.1073/pnas.260501097

60. Fu J-D, Rushing SN, Lieu DK, Chan CW, Kong C-W, Geng L, Wilson KD, Chiamvimonvat N, Boheler KR, Wu JC, Keller G, Hajjar RJ, Li RA (2011) Distinct Roles of MicroRNA-1 and -499 in Ventricular Specification and Functional Maturation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. PLoS One 6:e27417. doi: 10.1371/journal.pone.0027417

61. Garcia J, Schneider MF (1993) Calcium transients and calcium release in rat fast-twitch skeletal muscle fibres. J Physiol 463:709–28.

62. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer 31:13–20. doi: 10.1002/ijc.2910310104

63. Gherghiceanu M, Barad L, Novak A, Reiter I, Itskovitz-Eldor J, Binah O, Popescu LM (2011) Cardiomyocytes derived from human embryonic and induced pluripotent stem cells: Comparative ultrastructure. J Cell Mol Med 15:2539–2551. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01417.x

64. Glass CK, Holloway JM (1990) Regulation of gene expression by the thyroid hormone receptor. Biochim Biophys Acta 1032:157–76.

65. Gloss B, Trost SU, Bluhm WF, Swanson EA, Clark R, Winkfein R, Janzen KM, Giles W, Chassande O, Samarut J, Dillmann WH (2001) Cardiac Ion Channel Expression and Contractile Function in Mice with Deletion of Thyroid Hormone Receptor α or β [1]. Endocrinology 142:544–550. doi: 10.1210/endo.142.2.7935

66. Gonzalez R, Lee JW, Schultz PG (2011) Stepwise chemically induced cardiomyocyte specification of human embryonic stem cells. Angew Chemie - Int Ed 50:11181–11185. doi: 10.1002/anie.201103909

67. Gorza L, Mercadier JJ, Schwartz K, Thornell LE, Sartore S, Schiaffino S (1984) Myosin types in the human heart. An immunofluorescence study of normal and hypertrophied atrial and ventricular myocardium. Circ Res 54:694–702. doi: 10.1161/01.RES.54.6.694

68. Gotzsche LB (1994) L-triiodothyronine acutely increases Ca2+ uptake in the isolated, perfused rat heart. Changes in L-type Ca2+ channels and beta-receptors during short- and long-term hyper- and hypothyroidism. Eur J Endocrinol 130:171–179.

69. Grandi E, Pandit S V., Voigt N, Workman AJ, Dobrev D, Jalife J, Bers DM (2011) Human Atrial Action Potential and Ca2+ Model: Sinus Rhythm and Chronic Atrial Fibrillation. Circ Res 109:1055–1066. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.253955

70. Graves RJ (1835) Newly observed affection of the thyroid gland in females. London Med Surg J 7:516–517.

71. Gregorio CC, Trombitás K, Centner T, Kolmerer B, Stier G, Kunke K, Suzuki K, Obermayr F, Herrmann B, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S (1998) The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: Its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. J Cell Biol 143:1013–1027. doi: 10.1083/jcb.143.4.1013

72. Gross J, Pitt-Rivers R (1952) The identification of 3:5:3'-L-triiodothyronine in human plasma. Lancet (London, England) 1:439–41.

73. Gruson D, Ginion A, Decroly N, Lause P, Vanoverschelde J-L, Ketelslegers J-M, Bertrand L, Thissen J-P (2012) Urocortin-induced cardiomyocytes hypertrophy is associated with regulation of the GSK-3β pathway. Heart Vessels 27:202–207. doi: 10.1007/s00380-011-0141-5

74. Guo J, Mitsuiye T, Noma A (1997) The sustained inward current in sino-atrial node cells of guinea-pig heart. Pfl?gers Arch Eur J Physiol 433:390–396. doi: 10.1007/s004240050293

75. Gustafson TA, Bahl JJ, Markham BE, Roeske WR, Morkin E (1987) Hormonal regulation of myosin heavy chain and alpha-actin gene expression in cultured fetal rat heart myocytes. J Biol Chem 262:13316–22.

76. Haghighi K, Bidwell P, Kranias EG (2014) Phospholamban interactome in cardiac contractility and survival: A new vision of an old friend. J Mol Cell Cardiol 77:160–7. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.10.005

77. Hannes T, Wolff M, Doss MX, Pfannkuche K, Haustein M, Müller-Ehmsen J, Sachinidis A, Hescheler J, Khalil M, Halbach M (2015) Electrophysiological characteristics of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes are cell line-dependent. Cell Physiol Biochem 35:305–314. doi: 10.1159/000369697

78. Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S (1996) Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. Nature 379:91–6. doi: 10.1038/379091a0

79. Harvey CB, Williams GR (2002) Mechanism of Thyroid Hormone Action. Thyroid 12:441–446. doi: 10.1089/105072502760143791

80. Hasegawa K, Lee SJ, Jobe SM, Markham BE, Kitsis RN (1997) cis-Acting sequences that mediate induction of beta-myosin heavy chain gene expression during left ventricular hypertrophy due to aortic constriction. Circulation 96:3943–53.

81. Hayashi T, Arimura T, Itoh-Satoh M, Ueda K, Hohda S, Inagaki N, Takahashi M, Hori H, Yasunami M, Nishi H, Koga Y, Nakamura H, Matsuzaki M, Choi BY, Bae SW, You CW, Han KH, Park JE, Kn??ll R, Hoshijima M, Chien KR, Kimura A (2004) Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol 44:2192–2201. doi: 10.1016/j.jacc.2004.08.058

82. Heineke J, Ruetten H, Willenbockel C, Gross SC, Naguib M, Schaefer A, Kempf T, Hilfiker-Kleiner D, Caroni P, Kraft T, Kaiser RA, Molkentin JD, Drexler H, Wollert KC (2005) Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc. Proc Natl Acad Sci U S A 102:1655–60. doi: 10.1073/pnas.0405488102

83. Hemmings KM, Daniel ZCTR, Buttery PJ, Parr T, Brameld JM (2015) Differential effects of short-term β agonist and growth hormone treatments on expression of myosin heavy chain IIB and associated metabolic genes in sheep muscle. animal 9:285–294. doi: 10.1017/S175173111400233X

84. Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. Chromosoma 106:348–60.

85. Herron TJ, Da Rocha AM, Campbell KF, Ponce-Balbuena D, Willis BC, Guerrero-Serna G, Liu Q, Klos M, Musa H, Zarzoso M, Bizy A, Furness J, Anumonwo J, Mironov S,

Jalife J (2016) Extracellular matrix-mediated maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiac monolayer structure and electrophysiological function. Circ Arrhythmia Electrophysiol. doi: 10.1161/CIRCEP.113.003638

86. Hilenski LL, Xuehui M, Vinson N, Terracio L, Borg TK (1992) The role of ??1 integrin in spreading and myofibrillogenesis in neonatal rat cardiomyocytes in vitro. Cell Motil Cytoskeleton 21:87–100. doi: 10.1002/cm.970210202

87. Hodgkinson CP, Kang MH, Dal-Pra S, Mirotsou M, Dzau VJ (2015) MicroRNAs and cardiac regeneration. Circ Res 116:1700–1711. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304377

88. 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: 10859025

89. Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Zwi-Dantsis L, Caspi O, Winterstern A, Feldman O, Gepstein A, Arbel G, Hammerman H, Boulos M, Gepstein L (2011) Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. Nature 471:225–229. doi: 10.1038/nature09747

90. Ivey KN, Muth A, Arnold J, King FW, Yeh RF, Fish JE, Hsiao EC, Schwartz RJ, Conklin BR, Bernstein HS, Srivastava D (2008) MicroRNA Regulation of Cell Lineages in Mouse and Human Embryonic Stem Cells. Cell Stem Cell 2:219–229. doi: 10.1016/j.stem.2008.01.016

91. Kahaly GJ, Dillmann WH (2005) Thyroid hormone action in the heart. Endocr Rev 26:704–728. doi: 10.1210/er.2003-0033

92. 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

93. Karsner HT, Saphir O, Todd TW (1925) The State of the Cardiac Muscle in Hypertrophy and Atrophy*. Am J Pathol 1:351–372.1. doi: 10.1016/S0002-8703(25)90020-8

94. Kasturi S, Ismail-Beigi F (2008) Effect of thyroid hormone on the distribution and activity of Na, K-ATPase in ventricular myocardium. Arch Biochem Biophys 475:121–7. doi: 10.1016/j.abb.2008.04.019

95. Kawamata T, Seitz H, Tomari Y (2009) Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. Nat Struct Mol Biol 16:953–60. doi: 10.1038/nsmb.1630

96. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L (2001) Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. J Clin Invest 108:407–414. doi: 10.1172/JCI12131

97. Kempf H, Olmer R, Kropp C, R?ckert M, Jara-Avaca M, Robles-Diaz D, Franke A, Elliott DA, Wojciechowski D, Fischer M, Roa Lara A, Kensah G, Gruh I, Haverich A, Martin U, Zweigerdt R (2014) Controlling expansion and cardiomyogenic differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture. Stem Cell Reports 3:1132–1146. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.09.017

98. Kenessey A, Ojamaa K (2006) Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways. J Biol Chem

281:20666–20672. doi: 10.1074/jbc.M512671200

99. Kim C, Majdi M, Xia P, Wei KA, Talantova M, Spiering S, Nelson B, Mercola M, Chen HV (2010) Non-Cardiomyocytes Influence the Electrophysiological Maturation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes During Differentiation. Stem Cells Dev 19:783–795. doi: 10.1089/scd.2009.0349

100. Kinugawa K, Jeong MY, Bristow MR, Long CS (2005) Thyroid hormone induces cardiac myocyte hypertrophy in a thyroid hormone receptor alpha1-specific manner that requires TAK1 and p38 mitogen-activated protein kinase. Mol Endocrinol 19:1618–1628. doi: 10.1210/me.2004-0503

101. Kiss E, Jakab G, Kranias EG, Edes I (1994) Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban protein expression. Regulatory effects on sarcoplasmic reticulum Ca2+ transport and myocardial relaxation. Circ Res 75:245–251. doi: 10.1161/01.RES.75.2.245

102. Klein I, Hong C (1986) Effects of thyroid hormone on cardiac size and myosin content of the heterotopically transplanted rat heart. J Clin Invest 77:1694–1698. doi: 10.1172/JCI112488

103. Klein MG, Simon BJ, Szucs G, Schneider MF (1988) Simultaneous recording of calcium transients in skeletal muscle using high- and low-affinity calcium indicators. Biophys J 53:971–88. doi: 10.1016/S0006-3495(88)83178-3

104. Klos M, Mundada L, Banerjee I, Morgenstern S, Myers S, Leone M, Kleid M, Herron T, Devaney E (2017) Altered myocyte contractility and calcium homeostasis in alpha-myosin heavy chain point mutations linked to familial dilated cardiomyopathy. Arch Biochem Biophys 615:53–60. doi: 10.1016/j.abb.2016.12.007

105. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ (1996) Genetically Selected Cardiomyocytes from Differentiating Embryonic Stem Cells Form Stable Intracardiac Grafts.

106. Kumar RK, Chapple CC, Hunter N (1999) Improved Double Immunofluorescence for Confocal Laser Scanning Microscopy. 47:1213–1217.

107. Lan F, Lee AS, Liang P, Sanchez-Freire V, Nguyen PK, Wang L, Han L, Yen M, Wang Y, Sun N, Abilez OJ, Hu S, Ebert AD, Navarrete EG, Simmons CS, Wheeler M, Pruitt B, Lewis R, Yamaguchi Y, Ashley EA, Bers DM, Robbins RC, Longaker MT, Wu JC (2013) Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 12:101–13. doi: 10.1016/j.stem.2012.10.010

108. Lazar MA (2016) Thyroid Hormone Receptors : Multiple Forms , Multiple Possibilities *. 14:184–193.

109. Lee DS, Chen J, Lundy DJ, Liu C, Hwang S, Pabon L, Shieh R, Chen C, Wu S, Yan Y, Lee S, Chiang P Defined MicroRNAs Induce Aspects of Maturation in Mouse and Human Embryonic-Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes. 1–12.

110. Lee DS, Chen JH, Lundy DJ, Liu CH, Hwang SM, Pabon L, Shieh RC, Chen CC, Wu SN, Yan YT, Lee ST, Chiang PM, Chien S, Murry CE, Hsieh PCH (2015) Defined MicroRNAs Induce Aspects of Maturation in Mouse and Human Embryonic-Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes. Cell Rep 12:1960–1967. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.042

111. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 75:843–54.

112. Lee T-J, Kang S, Jeong G-J, Yoon J-K, Bhang SH, Oh J, Kim B-S (2015) Incorporation of

Gold-Coated Microspheres into Embryoid Body of Human Embryonic Stem Cells for Cardiomyogenic Differentiation. Tissue Eng Part A 21:374–381. doi: 10.1089/ten.tea.2014.0015

113. Lee Y-K, Ng K-M, Chan Y-C, Lai W-H, Au K-W, Ho C-YJ, Wong L-Y, Lau C-P, Tse H-F, Siu C-W (2010) Triiodothyronine Promotes Cardiac Differentiation and Maturation of Embryonic Stem Cells via the Classical Genomic Pathway. Mol Endocrinol 24:1728–1736. doi: 10.1210/me.2010-0032

114. Lewis BP, Shih I, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003) 33-Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. Cell 115:787–798. doi: 10.1016/S0092-8674(03)01018-3

115. Li M, Iismaa SE, Naqvi N, Nicks A, Husain A, Graham RM (2014) Thyroid hormone action in postnatal heart development. Stem Cell Res 13:582–591. doi: 10.1016/j.scr.2014.07.001

116. Li Y, Mcclintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ (2005) Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. Evaluation 105:635–637. doi: 10.1182/blood-2004-07-2681.Supported

117. Lieu D, Fu J (2013) Mechanism-Based Facilitated Maturation of Human Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes. Circ … 6:191–201. doi: 10.1161/CIRCEP.111.973420.Mechanism-based

118. Lieu DK, Liu J, Siu C-W, McNerney GP, Tse H-F, Abu-Khalil A, Huser T, Li RA (2009) Absence of Transverse Tubules Contributes to Non-Uniform Ca $^{2+}$ Wavefronts in Mouse and Human Embryonic Stem Cell–Derived Cardiomyocytes. Stem Cells Dev 18:1493–1500. doi: 10.1089/scd.2009.0052

119. Liew CC, Sole MJ, Yamauchi-Takihara K, Kellam B, Anderson DH, Lin LP, Liew JC (1990) Complete sequence and organization of the human cardiac beta-myosin heavy chain gene. Nucleic Acids Res 18:3647–3651.

120. Linke WA (2008) Sense and stretchability: The role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. Cardiovasc Res 77:637–648. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.03.029

121. Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. Cell 66:807–15.

122. Liu N, Olson EN (2010) MicroRNA Regulatory Networks in Cardiovascular Development. Dev Cell 18:510–525. doi: 10.1016/j.devcel.2010.03.010

123. Liu N, Olson EN (2010) MicroRNA Regulatory Networks in Cardiovascular Development. Dev Cell 18:510–525. doi: 10.1016/j.devcel.2010.03.010

124. Lowey S, Lesko LM, Rovner AS, Hodges AR, White SL, Low RB, Rincon M, Gulick J, Robbins J (2008) Functional effects of the hypertrophic cardiomyopathy R403Q mutation are different in an α- or β-myosin heavy chain backbone. J Biol Chem 283:20579–20589. doi: 10.1074/jbc.M800554200

125. Lu H, Fedak PWM, Dai X, Du C, Zhou YQ, Henkelman M, Mongroo PS, Lau A, Yamabi H, Hinek A, Husain M, Hannigan G, Coles JG (2006) Integrin-linked kinase expression is elevated in human cardiac hypertrophy and induces hypertrophy in transgenic mice. Circulation 114:2271–2279. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.642330

126. 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

127. Lyon RC, Zanella F, Omens JH, Sheikh F (2015) Mechanotransduction in cardiac hypertrophy and failure. Circ Res 116:1462–1476. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304937

128. MacKenna D a, Dolfi F, Vuori K, Ruoslahti E (1998) Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts. J Clin Invest 101:301–310. doi: 10.1172/JCI1026

129. Mangoni ME, Nargeot J (2008) Genesis and Regulation of the Heart Automaticity. Physiol Rev 88:919–982. doi: 10.1152/physrev.00018.2007

130. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE (1995) Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. Circulation 92:785–9.

131. Matsuoka R, Beisel KW, Furutani M, Arai S, Takao A (1991) Complete sequence of human cardiac alpha-myosin heavy chain gene and amino acid comparison to other myosins based on structural and functional differences. Am J Med Genet 41:537–47. doi: 10.1002/ajmg.1320410435

132. Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, Neef S, Katsirntaki K, Maier LS, Nguemo F, Menke S, Haustein M, Hescheler J, Hasenfuss G, Martin U (2008) Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. Circulation 118:507–517. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.778795

133. Mayans O, van der Ven PF, Wilm M, Mues A, Young P, Fürst DO, Wilmanns M, Gautel M (1998) Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. Nature 395:863–9. doi: 10.1038/27603

134. McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, B?hm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, K?ber L, Lip GYH, Maggioni A Pietro, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, R?nnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Popescu BA, Reiner ?eljko, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, McDonagh T, Sechtem U, Bonet LA, Avraamides P, Ben Lamin HA, Brignole M, Coca A, Cowburn P, Dargie H, Elliott P, Flachskampf FA, Guida GF, Hardman S, Iung B, Merkely B, Mueller C, Nanas JN, Nielsen OW, ?rn S, Parissis JT, Ponikowski P, Ponikowski P, ESC Committee for Practice Guidelines (2012) ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. Eur J Heart Fail 14:803–869. doi: 10.1093/eurjhf/hfs105

135. Mehra M, Kobashigawa J, Starling R, Russell S, Uber P, Parameshwar J, Mohacsi P, Augustine S, Aaronson K, Barr M (2006) Listing Criteria for Heart Transplantation: International Society for Heart and Lung Transplantation Guidelines for the Care of Cardiac Transplant Candidates—2006. J Hear Lung Transplant 25:1024–1042. doi: 10.1016/j.healun.2006.06.008

136. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T (2004) Human

Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. Mol Cell 15:185–197. doi: 10.1016/j.molcel.2004.07.007

137. Miake J, Marbán E, Nuss HB (2003) Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression. J Clin Invest 111:1529–1536. doi: 10.1172/JCI200317959

138. Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M (1999) Calreticulin: one protein, one gene, many functions. Biochem J 344 Pt 2:281–92. doi: 10.1042/BJ3440281

139. Mihic A, Li J, Miyagi Y, Gagliardi M, Li S-H, Zu J, Weisel RD, Keller G, Li R-K (2014) The effect of cyclic stretch on maturation and 3D tissue formation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. Biomaterials 35:2798–2808. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.052

140. Miller MK, Bang M-L, Witt CC, Labeit D, Trombitas C, Watanabe K, Granzier H, McElhinny AS, Gregorio CC, Labeit S (2003) The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. J Mol Biol 333:951–64.

141. Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. Cell 93:215–28.

142. N Z, Dubrovskyi O, Birukov K (2012) Focal adhesion kinase regulation of mechanotransduction and its impact on endothelial cell functions. Microvasc Res 83:71–81. doi: 10.1016/j.mvr.2011.06.007.Focal

143. Nag AC, Cheng M (1984) Expression of myosin isoenzymes in cardiac-muscle cells in culture. Biochem J 221:21–26.

144. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo dependes on the POU transcription factor Oct4. Cell 95:379–391. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81769-9

145. Novák P, Soukup T (2011) Calsequestrin distribution, structure and function, its role in normal and pathological situations and the effect of thyroid hormones. Physiol Res 60:439–452.

146. Ojamaa K, Balkman C, Klein IL (1993) Acute effects of triiodothyronine on arterial smooth muscle cells. Ann Thorac Surg 56:S61-6-7.

147. Ojamaa K, Kenessey a, Klein I (2000) Thyroid hormone regulation of phospholamban phosphorylation in the rat heart. Endocrinology 141:2139–2144. doi: 10.1210/endo.141.6.7514

148. Olivetti G (1996) Aging, Cardiac Hypertrophy and Ischemic Cardiomyopathy Do Not Affect the Proportion of Mononucleated and Multinucleated Myocytes in the Human Heart. J Mol Cell Cardiol 28:1463–1477. doi: 10.1006/jmcc.1996.0137

149. Panchuk-Voloshina N, Haugland RP, Bishop-Stewart J, Bhalgat MK, Millard PJ, Mao F, Leung W-Y, Haugland RP (1999) Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. J Histochem Cytochem 47:1179–1188. doi: 10.1177/002215549904700910

150. Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S (2014) Physiologie. Thieme

151. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD (2008) Chemical calcium indicators. Methods 46:143–151. doi: 10.1016/j.ymeth.2008.09.025

152. Parry CH (1825) Enlargement of the thyroid gland in connection with enlargement or palpitation of the heart. In: Collect. from Unpubl. Pap. leta Caleb Hillier Parry. S 111–125

153. Parton RG, Way M, Zorzi N, Stang E (1997) Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. J Cell Biol 136:137–154. doi: 10.1083/jcb.136.1.137

154. Pawloski-Dahm CM, Song G, Kirkpatrick DL, Palermo J, Gulick J, Dorn GW, Robbins J, Walsh R a (1998) Effects of total replacement of atrial myosin light chain-2 with the ventricular isoform in atrial myocytes of transgenic mice. Circulation

155. Pikkarainen S, Tokola H, Kerkelä R, Ruskoaho H (2004) GATA transcription factors in the developing and adult heart. Cardiovasc Res 63:196–207. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.03.025

156. Poon E, Keung W, Liang Y, Ramalingam R, Yan B, Zhang S, Chopra A, Moore J, Herren A, Lieu DK, Wong HS, Weng Z, Wong OT, Lam YW, Tomaselli GF, Chen C, Boheler KR, Li RA (2015) Proteomic Analysis of Human Pluripotent Stem Cell-Derived, Fetal, and Adult Ventricular Cardiomyocytes Reveals Pathways Crucial for Cardiac Metabolism and Maturation. Circ Cardiovasc Genet 8:427–436. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.114.000918

157. Pope B, Hoh JFY, Weeds A (1980) The ATPase activities of rat cardiac myosin isoenzymes. FEBS Lett 118:205–208. doi: 10.1016/0014-5793(80)80219-5

158. Price KM, Littler WA, Cummins P (1980) Human atrial and ventricular myosin light-chain subunits in the adult and during development. Biochem J 191:571–580.

159. Quach NL, Biressi S, Reichardt LF, Keller C, Rando TA (2009) Focal Adhesion Kinase Signaling Regulates the Expression of Caveolin 3 and β1 Integrin, Genes Essential for Normal Myoblast Fusion. Mol Biol Cell 20:3422–3435. doi: 10.1091/mbc.E09-02-0175

160. Ratajczak P, Oliviéro P, Marotte F, Kolar F, Ostadal B, Samuel J-L (2005) Expression and localization of caveolins during postnatal development in rat heart: implication of thyroid hormone. J Appl Physiol 99:244–251. doi: 10.1152/japplphysiol.01292.2004

161. Ratto GM, Usai C (1991) Computer aided tracing and encoding of axonal arborizations. J Neurosci Methods 36:33–43.

162. Ravdin P, Axelrod D (1977) Fluorescent tetramethyl rhodamine derivatives of alpha-bungarotoxin: preparation, separation, and characterization. Anal Biochem 80:585–92.

163. Reddick LE, Alto NM (2012) Correlative Light and Electron Microscopy (CLEM) as a Tool to Visualize Microinjected Molecules and their Eukaryotic Sub-cellular Targets. J Vis Exp 2–7. doi: 10.3791/3650

164. Reiser PJ, Portman M a, Ning XH, Schomisch Moravec C (2001) Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles. Am J Physiol Heart Circ Physiol 280:H1814–H1820.

165. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burban M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M (2003) Hypertrophic cardiomyopathy: Distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. Circulation 107:2227–2232. doi: 10.1161/01.CIR.0000066323.15244.54

166. Ritner C, Wong SSY, King FW, Mihardja SS, Liszewski W, Erle DJ, Lee RJ, Bernstein HS (2011) An engineered cardiac reporter cell line identifies human embryonic stem cell-derived myocardial precursors carissa ritner. PLoS One. doi: 10.1371/journal.pone.0016004

167. van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Kelm RJ, Olson EN (2009) A Family of microRNAs Encoded by Myosin Genes Governs Myosin Expression and Muscle Performance. Dev Cell 17:662–673. doi: 10.1016/j.devcel.2009.10.013

168. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN (2006) A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. Proc Natl Acad Sci 103:18255–18260. doi: 10.1073/pnas.0608791103

169. Ross K (1953) Cell Shrinkage caused by fixatives and paraffin-wax embedding in ordinary cytological preparations. Q J Microsc Sci 94:125–139.

170. Ross RS, Pham C, Shai SY, Goldhaber JI, Fenczik C, Glembotski CC, Ginsberg MH, Loftus JC (1998) Beta1 integrins participate in the hypertrophic response of rat ventricular myocytes. Circ Res 82:1160–1172. doi: 10.1161/01.RES.82.11.1160

171. Ruan J-L, Tulloch NL, Saiget M, Paige SL, Razumova M V, Regnier M, Tung KC, Keller G, Pabon L, Reinecke H, Murry CE (2015) Mechanical Stress Promotes Maturation of Human Myocardium From Pluripotent Stem Cell-Derived Progenitors. Stem Cells 33:2148–57. doi: 10.1002/stem.2036

172. Saito Y, Nakamura K, Yoshida M, Sugiyama H, Ohe T, Kurokawa J, Furukawa T, Takano M, Nagase S, Morita H, Kusano KF, Ito H (2015) Enhancement of spontaneous activity by hcn4 overexpression in mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes - a possible biological pacemaker. PLoS One 10:1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0138193

173. Sakaguchi Y, Cui G, Sen L (1996) Acute effects of thyroid hormone on inward rectifier potassium channel currents in guinea pig ventricular myocytes. Endocrinology 137:4744–51. doi: 10.1210/endo.137.11.8895342

174. Salick MR, Napiwocki BN, Sha J, Knight GT, Chindhy SA, Kamp TJ, Ashton RS, Crone WC (2014) Micropattern width dependent sarcomere development in human ESC-derived cardiomyocytes. Biomaterials 35:4454–4464. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.02.001

175. Salvatore D, Bartha T, Harney JW, Larsen PR (1996) Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. Endocrinology 137:3308–15. doi: 10.1210/endo.137.8.8754756

176. Samarel AM (2014) Focal adhesion signaling in heart failure. Pflugers Arch Eur J Physiol 466:1101–1111. doi: 10.1007/s00424-014-1456-8

177. Sanger JW, Sanger JW, Chowrashi P, Chowrashi P, Shaner NC, Shaner NC, Spalthoff S, Spalthoff S, Wang J, Wang J, Freeman NL, Freeman NL, Sanger JM, Sanger JM (2002) Myo brillogenesis in Skeletal Muscle Cells. Clin Orthop Relat Res 153–162. doi: 10.1097/01.blo.0000031973.69509.21

178. Sartiani L, Bettiol E, Stillitano F, Mugelli A, Cerbai E, Jaconi ME (2007) Developmental Changes in Cardiomyocytes Differentiated from Human Embryonic Stem Cells: A Molecular and Electrophysiological Approach. Stem Cells 25:1136–1144. doi: 10.1634/stemcells.2006-0466

179. Satin J, Itzhaki I, Rapoport S, Schroder EA, Izu L, Arbel G, Beyar R, Balke CW, Schiller J, Gepstein L (2008) Calcium Handling in Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. Stem Cells 26:1961–1972. doi: 10.1634/stemcells.2007-0591

180. Satin J, Kehat I, Caspi O, Huber I, Arbel G, Itzhaki I, Magyar J, Schroder EA, Perlman I, Gepstein L (2004) Mechanism of spontaneous excitability in human embryonic stem cell derived cardiomyocytes. J Physiol 559:479–496. doi: 10.1113/jphysiol.2004.068213

181. Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT (1994) Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. Mol Cell Biol 14:1680–1688. doi: 10.1128/MCB.14.3.1680.Updated

182. Schallus T, Feh?r K, Ulrich AS, Stier G, Muhle-Goll C (2009) Structure and dynamics of the human muscle LIM protein. FEBS Lett 583:1017–1022. doi: 10.1016/j.febslet.2009.02.021

183. Schiaffino S, Reggiani C (1996) Molecular diversity of myofibrillar proteins: Gene regulation and functional significance. Physiol Rev 76:371–423.

184. Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S (2002) Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. Circ Res 90:939–950. doi: 10.1161/01.RES.0000018627.89528.6F

185. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N (2000) Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 97:11307–12. doi: 10.1073/pnas.97.21.11307

186. Schwartz K, Lecarpentier Y, Martin JL, Lompré AM, Mercadier JJ, Swynghedauw B (1981) Myosin isoenzymic distribution correlates with speed of myocardial contraction. J Mol Cell Cardiol 13:1071–5.

187. Shi Q, Hjelmeland AB, Keir ST, Song L, Wickman S, Jackson D, Ohmori O, Bigner DD, Friedman HS, Rich JN (2007) A novel low-molecular weight inhibitor of focal adhesion kinase, TAE226, inhibits glioma growth. Mol Carcinog 46:488–96. doi: 10.1002/mc.20297

188. Shimizu A, Shimizu N (2013) Dual promoter expression system with insulator ensures a stringent tissue-specific regulation of two reporter genes in the transgenic fish. Transgenic Res 22:435–444. doi: 10.1007/s11248-012-9653-8

189. Shimko V, Claycomb W (2008) Effect of mechanical loading on three-dimensional cultures of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. Tissue Eng Part A 14:49–58. doi: 10.1089/ten.2007.0092.Effect

190. Shyy JYJ, Chien S (1997) Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. Curr Opin Cell Biol 9:707–713. doi: 10.1016/S0955-0674(97)80125-1

191. Simpson DG, Terracio L, Terracio M, Price RL, Turner DC, Borg TK (1994) Modulation of Cardiac Myocyte Phenotype In-Vitro by the Composition and Orientation of the Extracellular-Matrix. J Cell Physiol 161:89–105.

192. Skliris GP, Rowan BG, Al-Dhaheri M, Williams C, Troup S, Begic S, Parisien M, Watson PH, Murphy LC (2009) Immunohistochemical validation of multiple phospho-specific epitopes for estrogen receptor alpha (ERalpha) in tissue microarrays of ERalpha positive human breast carcinomas. Breast Cancer Res Treat 118:443–53. doi: 10.1007/s10549-008-0267-z

193. Sluijter JPG, Van Mil A, Van Vliet P, Metz CHG, Liu J, Doevendans PA, Goumans MJ

(2010) MicroRNA-1 and-499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 30:859–868. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.197434

194. Snir M, Kehat I, Gepstein A, Coleman R, Itskovitz-Eldor J, Livne E, Gepstein L (2003) Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. Am J Physiol - Hear Circ Physiol 285:H2355–H2363. doi: 10.1152/ajpheart.00020.2003

195. Sumi T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N, Suemori H (2007) Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc. Oncogene 26:5564–5576. doi: 10.1038/sj.onc.1210353

196. Sumi T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N, Suemori H (2008) Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/ -catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. Development 135:2969–2979. doi: 10.1242/dev.021121

197. Sun N, Yazawa M, Liu J, Han L, Sanchez-Freire V, Abilez OJ, Navarrete EG, Hu S, Wang L, Lee A, Pavlovic A, Lin S, Chen R, Hajjar RJ, Snyder MP, Dolmetsch RE, Butte MJ, Ashley EA, Longaker MT, Robbins RC, Wu JC (2012) Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. Sci Transl Med 4:130ra47. doi: 10.1126/scitranslmed.3003552

198. Suurmeijer AJH, Clément S, Francesconi A, Bocchi L, Angelini A, Van Veldhuisen DJ, Spagnoli LG, Gabbiani G, Orlandi A (2003) α-Actin isoform distribution in normal and failing human heart: A morphological, morphometric, and biochemical study. J Pathol 199:387–397. doi: 10.1002/path.1311

199. 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

200. 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

201. Talkhabi M, Aghdami N, Baharvand H (2016) Human cardiomyocyte generation from pluripotent stem cells: A state-of-art. Life Sci 145:98–113. doi: 10.1016/j.lfs.2015.12.023

202. Tenhunen O, Sármán B, Kerkelä R, Szokodi I, Papp L, Tóth M, Ruskoaho H (2004) Mitogen-activated protein kinases p38 and ERK 1/2 mediate the wall stress-induced activation of GATA-4 binding in adult heart. J Biol Chem 279:24852–60. doi: 10.1074/jbc.M314317200

203. Testa I, Wurm CA, Medda R, Rothermel E, Von Middendorf C, Fölling J, Jakobs S, Schönle A, Hell SW, Eggeling C (2010) Multicolor fluorescence nanoscopy in fixed and living cells by exciting conventional fluorophores with a single wavelength. Biophys J 99:2686–2694. doi: 10.1016/j.bpj.2010.08.012

204. Thomson JA et. al. (1998) Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. Science (80-) 282:1145–1147. doi: 10.1126/science.282.5391.1145

205. Thuringer D, Lauribe P, Escande D (1992) A hyperpolarization-activated inward current in human myocardial cells. J Mol Cell Cardiol 24:451–5.

206. Ting S, Chen A, Reuveny S, Oh S (2014) An intermittent rocking platform for integrated

expansion and differentiation of human pluripotent stem cells to cardiomyocytes in suspended microcarrier cultures. Stem Cell Res 13:202–213. doi: 10.1016/j.scr.2014.06.002

207. Torsoni AS (2005) RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. AJP Hear Circ Physiol 289:H1488–H1496. doi: 10.1152/ajpheart.00692.2004

208. Traister A, Aafaqi S, Masse S, Dai X, Li M, Hinek A, Nanthakumar K, Hannigan G, Coles JG (2012) ILK induces cardiomyogenesis in the human heart. PLoS One. doi: 10.1371/journal.pone.0037802

209. Tulloch NL, Muskheli V, Razumova M V, Korte FS, Regnier M, Hauch KD, Pabon L, Reinecke H, Murry CE (2011) Growth of engineered human myocardium with mechanical loading and vascular coculture. Circ Res 109:47–59. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.237206

210. van der Velden J, Klein LJ, Zaremba R, Boontje NM, Huybregts MAJM, Stooker W, Eijsman L, de Jong JW, Visser CA, Visser FC, Stienen GJM (2001) Effects of Calcium, Inorganic Phosphate, and pH on Isometric Force in Single Skinned Cardiomyocytes From Donor and Failing Human Hearts. Circulation 104:1140–1146. doi: 10.1161/hc3501.095485

211. Volk T, Fessler LI, Fessler JH (1990) A role for integrin in the formation of sarcomeric cytoarchitecture. Cell 63:525–36.

212. Wang Z, Yue L, White M, Pelletier G, Nattel S (1998) Differential distribution of inward rectifier potassium channel transcripts in human atrium versus ventricle. Circulation 98:2422–8.

213. Weber N, Schwanke K, Greten S, Wendland M, Iorga B, Fischer M, Geers-Kn??rr C, Hegermann J, Wrede C, Fiedler J, Kempf H, Franke A, Piep B, Pfanne A, Thum T, Martin U, Brenner B, Zweigerdt R, Kraft T (2016) Stiff matrix induces switch to pure ??-cardiac myosin heavy chain expression in human ESC-derived cardiomyocytes. Basic Res Cardiol. doi: 10.1007/s00395-016-0587-9

214. Weiss A, Leinwand LA (1996) THE MAMMALIAN MYOSIN HEAVY CHAIN GENE FAMILY. Annu Rev Cell Dev Biol 12:417–439. doi: 10.1146/annurev.cellbio.12.1.417

215. White P (2001) Developmental expression analysis of thyroid hormone receptor isoforms reveals new insights into their essential functions in cardiac and skeletal muscles. Faseb J 15:1–10.

216. Witt SH, Granzier H, Witt CC, Labeit S (2005) MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: Towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. J Mol Biol 350:713–722. doi: 10.1016/j.jmb.2005.05.021

217. Witt SH, Labeit D, Granzier H, Labeit S, Witt CC (2005) Dimerization of the cardiac ankyrin protein CARP: Implications for MARP titin-based signaling. J Muscle Res Cell Motil 26:401–408. doi: 10.1007/s10974-005-9022-9

218. Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J (1991) Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca2+ channel blockers. Differentiation 48:173–182. doi: 10.1111/j.1432-0436.1991.tb00255.x

219. Wu C, Dedhar S (2001) Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm

for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. J Cell Biol 155:505–510. doi: 10.1083/jcb.200108077

220. Xie Z, Askari A (2002) Na+/K+-ATPase as a signal transducer. Eur J Biochem 269:2434–2439. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.02910.x

221. Xu C, Police S, Hassanipour M, Li Y, Chen Y, Priest C, O?Sullivan C, Laflamme MA, Zhu W-Z, Van Biber B, Hegerova L, Yang J, Delavan-Boorsma K, Davies A, Lebkowski J, Gold JD (2011) Efficient generation and cryopreservation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Regen Med 6:53–66. doi: 10.2217/rme.10.91

222. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK (2002) Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Circ Res 91:501–508. doi: 10.1161/01.RES.0000035254.80718.91

223. Xu XQ, Graichen R, Soo SY, Balakrishnan T, Bte Rahmat SN, Sieh S, Tham SC, Freund C, Moore J, Mummery C, Colman A, Zweigerdt R, Davidson BP (2008) Chemically defined medium supporting cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. Differentiation 76:958–970. doi: 10.1111/j.1432-0436.2008.00284.x

224. Xu XQ, Zweigerdt R, Soo SY, Ngoh ZX, Tham SC, Wang ST, Graichen R, Davidson B, Colman A, Sun W (2008) Highly enriched cardiomyocytes from human embryonic stem cells. Cytotherapy 10:376–389. doi: 10.1080/14653240802105307

225. Yamanaka S (2007) Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell 1:39–49. doi: 10.1016/j.stem.2007.05.012

226. Yang H, Borg TK, Liu H, Gao BZ (2015) Interactive relationship between basement-membrane development and sarcomerogenesis in single cardiomyocytes. Exp Cell Res 330:222–232. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.08.020

227. Yang X, Boehm JS, Yang X, Salehi-Ashtiani K, Hao T, Shen Y, Lubonja R, Thomas SR, Alkan O, Bhimdi T, Green TM, Johannessen CM, Silver SJ, Nguyen C, Murray RR, Hieronymus H, Balcha D, Fan C, Lin C, Ghamsari L, Vidal M, Hahn WC, Hill DE, Root DE (2011) A public genome-scale lentiviral expression library of human ORFs. Nat Methods 8:659–61. doi: 10.1038/nmeth.1638

228. Yang X, Rodriguez M, Pabon L, Fischer KA, Reinecke H, Regnier M, Sniadecki NJ, Ruohola-Baker H, Murry CE (2014) Tri-iodo-l-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. J Mol Cell Cardiol 72:296–304. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.04.005

229. Yechikov S, Copaciu R, Gluck JM, Deng W, Chiamvimonvat N, Chan JW, Lieu DK (2016) Same-Single-Cell Analysis of Pacemaker-Specific Markers in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Subtypes Classified by Electrophysiology. Stem Cells 34:2670–2680. doi: 10.1002/stem.2466

230. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2007) Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. Science (80-) 318:1917–1920. doi: 10.1126/science.1151526

231. Zhu R, Blazeski A, Poon E, Costa KD, Tung L, Boheler KR (2014) Physical developmental cues for the maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Stem Cell Res Ther 5:117. doi: 10.1186/scrt507

232. Protein BLAST: search protein databases using a protein query.

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome. Accessed 8 Aug 2017

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nr. 6 und 7 der Promotionsordnung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Auswirkungen verschiedener Kultivierungsbedingungen auf die strukturellen und funktionellen Charakteristika von Kardiomyozyten abgeleitet aus humanen embryonalen Stammzellen“ im Institut für Molekular- und Zellphysiologie unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Theresia Kraft mit der Unterstützung durch Dr. rer. nat. Robert Zweigerdt ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.
Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe. Ergebnisse der Dissertation wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Originalpublikationen:

Weber N, Schwanke K, **Greten S**, Wendland M, Iorga B, Fischer M et al. *Stiff matrix induces switch to pure beta-cardiac myosin heavy chain expression in human ESC-derived cardiomyocytes*. Basic research in cardiology 2016; 111(6):68.

Poster und Abstracts:

Gellrich F, Mutig N, Wendland M, **Greten S**, Schwanke K, Zweigerdt R, Brenner B, Kraft T *Functional characterization of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes.* Symposium der Jungen Physiologen 2014, Bonn, Germany, 25.09.-26.09.2014

Weber N, Iorga B, **Greten S**, Wendland M, Schwanke K, Martin U, Brenner B, Zweigerdt R, Kraft T *Expression of fast vs. slow cardiac myosin heavy chain in human embryonic stem-cell derived cardiomyocytes: Effects on force generation, tension cost and tome course of twitches.* Acta Physiologica, Vol.213, Suppl.699, pg.113-114, 94th Annual Meeting of the German Physiological Society 2015, Magdeburg, Germany, 05.03.-07.03.2015

Iorga B, Weber N, Wendland M, **Greten S**, Schwanke K, Martin U, Brenner B, Zweigerdt R, Kraft T *New approach to assess contractile function of sarcomeres within human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes.* Journal of Muscle Research and Cell Motility, Vol.36 (6), pg.535-605, DOI: 10.1007/s10974-015-9429-x, 44th European Muscle Conference 2015, Warschau, Polen, 21.09.-25.09.2015

Weber N, Wendland M, **Greten S**, Schwanke K, Iorga B, Fischer M, Geers-Knörr C, Hegermann J, Wrede C, Martin U, Brenner B, Zweigerdt R, Kraft T *Maturation towards pure β-myosin protein expression and corresponding functional properties of individual hESC-cardiomyocytes.* Biophysical Journal, Vol.110, Issue 3, Supp.1, p294a, DOI:10.1016/j.bpj.2015.11.1586, 60th Annual Meeting of Biophysical Society 2016, Los Angeles, USA, 27.02.-02.03.2016

Iorga B, Wendland M, Weber N, **Greten S**, Schwanke K, Martin U, Zweigerdt R, Kraft T, Brenner B *Contractile function of permeabilized human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes with defined myosin protein isoform expression.* Biophysical Journal, Vol.110, Issue 3, Supp.1, p294a, DOI: 10.1016/j.bpj.2015.11.1588, 60th Annual Meeting of Biophysical Society 2016, Los Angeles, USA, 27.02.-02.03.2016

Wendland M, Weber N, **Greten S**, Schwanke K, Iorga B, Fischer M, Geers-Knörr C, Wrede C, Hegermann J, Martin U, Brenner B, Zweigerdt R, Kraft T *Human Embryonic stem-cell derived cardiomyocytes: Maturation on stiff matrix induces pure β-myosin protein expression and adult-like functional properties at the single-cell level.* Acta Physiologica, Vol.216, Suppl.S707, pg.216, 95th Annual Meeting of the German Physiological Society 2016, Lückeck, Germany, 03.03.-05.03.2016

Iorga B, Wendland M, Schwanke K, **Greten S**, Weber N, Martin U, Zweigerdt R, Brenner B, Kraft T *Contractile function of myofibrils within human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes with known cardiac myosin isoform composition using a novel micromechanical approach.* Acta Physiologica, Vol.216, Suppl.S707, pg.59, 95th Annual Meeting of the German Physiological Society 2016, Lückeck, Germany, 03.03.-05.03.2016

Iorga B, Weber N, Schwanke K, Piep B, Wendland M, **Greten S**, Martin U, Zweigerdt R, Brenner B, Kraft T *Does the contractile function of sarcomers differ between human ESC-derived cardiomyocytes and adult human ventricular myofibrills?* German Stem Cell Network 2017, Jena, Germany, 11.09.-13.09.2017

Hannover, den

Stephan Greten

Danksagung

An erster Stelle möchte ich sowohl Prof. Dr. rer. nat. Theresia Kraft als auch Prof. Dr. med. Bernhard Brenner meinen Dank für die Realisierung dieser Arbeit ausprechen. Insbesondere die intensive Betreuung und die stets konstruktive Kritik haben das Niveau der durchgeführten Experimente sowie der Ausarbeitung dieser Dissertation um ein Vielfaches gesteigert. Diese Erfahrungen haben immens zur Steigerung meiner wissenschaftlichen Kompetenz beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Dr. med. Natalie Weber. Das häufig positive Feedback und die angenehme Atmosphäre stärkten meine Motivation auch in schwierigen und strapaziösen Zeiten. Erst durch deine Fachexpertise und Tricks konnte ich die Methodik adäquat erlernen.

Herr Dr. rer. nat. Robert Zweigerdt und Frau Dr. rer. nat. Kristin Schwanke danke ich für die herausragende Kooperation und ständige Bereitstellung von hESC-Kardiomyozyten. Auch Frau Dr. rer. nat. Meike Wendland möchte ich für die Kulitivierung der hESC-Kardiomyozyten danken. Ein derartig angelegtes Experiment verlangt große Geduld und Präzision, die ihr über einen langen Zeitraum aufgebracht habt.

Frau Birgit Piep danke ich für die Unterstützung und Supervision bei dem Erlernen und der Durchführung der Arbeitstechniken. Auch danke ich Herrn Alexander Lingk für den erfinderischen Geist und dessen Realisierung und Herrn Torsten Beier für die Instandhaltung unserer Gerätschaften.

Im Besonderen möchte ich mich bei meinen Eltern Irmgard und Martin Greten bedanken, die mich jederzeit in all meinen Vorhaben unterstützten. Mein Ehrgeiz und Wissensdrang entsprang eurer herausragenden Erziehung.

Zuletzt danke ich meiner Freundin Imke Ostermann, die mir ein hohes Maß an Geduld entgegenbrachte und jederzeit ein starker Rückhalt war. Für den Erfolg dieser Arbeit waren die Menschen meines täglichen Lebens nicht weniger verantwortlich als ich.