

AUS DER ABTEILUNG DER HERZCHIRURGIE UND DER
INTERDISZIPLINÄREN FAKULTÄT (DEPARTMENT LEBEN, LICHT & MATERIE)

MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR SARKOMERSTRUKTUR VON STAMMZELLDERIVIERTEN KARDIOMYOZYTEN

INAUGURALDISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

GUTACHTER:

PROF. DR. RER. NAT. ROBERT DAVID, UNIVERSITÄT ROSTOCK

PROF. DR. RER. NAT. KATJA SCHENKE-LAYLAND, UNIVERSITÄT TÜBINGEN

PROF. DR. MED. STEFAN BRUNNER, UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORGELEGT VON

LISA BARBARA KATHARINA JOHANN | GEB. AM 05.08.1994 IN SPEYER

EINREICHUNG | OKTOBER 2023

VERTEIDIGUNG | FEBRUAR 2024

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004720

INHALTSVERZEICHNIS

I.	ZUSAMMENFASSUNG	1
II.	Einleitung	2
2.1	BEDEUTUNG DER HERSTELLUNG VON KARDIOMYOZYTEN <i>IN VITRO</i>	2
2.2	STRUKTURELLER AUFBAU VON KARDIOMYOZYTEN	4
2.3	REIFEPROBLEMATIK DER KARDIOMYOZYTEN	5
2.4	PLURIPOTENTE STAMMZELLEN.....	7
2.5	INDUZIERTE PLURIPOTENTE STAMMZELLEN – KARDIALE DIFFERENZIERUNG	10
2.6	SUPER-RESOLUTION-MIKROSKOPIE	12
2.6.1	3D SIM – 3D <i>STRUCTURED ILLUMINATION MICROSCOPY</i>	14
2.6.2	PALM – <i>PHOTOACTIVATED LOCALIZATION MICROSCOPY</i>	16
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	18
3.1	ZELLKULTUREN.....	22
3.1.1	W4 ALPHA MHC – MURINE EMBRYONALE STAMMZELLEN.....	22
3.1.1.1	ZELLINIE.....	22
3.1.1.2	KULTIVIERUNG	24
3.1.1.3	DIFFERENZIERUNG.....	25
3.1.1.4	FIXIERUNG	28
3.1.2	H9 – HUMANE VORDIFFERENZIERTE EMBRYONALE STAMMZELLDERIVATE	28
3.1.2.1	ZELLINIE.....	28
3.1.2.2	KULTIVIERUNG	29
3.1.2.3	FIXIERUNG	30
3.1.3	hiPSCs – HUMANE INDUZIERTE PLURIPOTENTE STAMMZELLEN	30
3.1.3.1	ZELLINIE.....	30
3.1.3.2	KULTIVIERUNG UND DIFFERENZIERUNG	30
3.1.3.3	FIXIERUNG	30
3.1.4	KARDIOMYOZYTEN NEONATALER UND ADULTER MÄUSE.....	30
3.2	FIXIERUNG UND FÄRBUNG.....	31

3.3	MIKROSKOPIE	33
3.3.1	PALM – <i>PHOTOACTIVATED LOCALIZATION MICROSCOPY</i>	33
3.3.2	3D SIM – <i>3D STRUCTURED ILLUMINATION MICROSCOPY</i>	35
3.4	REKONSTRUKTION	36
3.4.1	REKONSTRUKTION DER PALM-DATEIEN	36
3.4.2	REKONSTRUKTION DER 3D SIM-DATEIEN	42
3.5	DATENAUSWERTUNG	42
3.5.1	PALM	42
3.5.1.1	SARKOMERLÄNGE	42
3.5.1.2	Z-STREIFENBREITE	44
3.5.2	3D SIM	45
3.5.2.1	SARKOMERAUSRICHTUNG	45
3.5.2.2	ZELLFLÄCHE UND SARKOMERDICHTEN	47
3.6	STATISTISCHE ANALYSE	48
IV.	ERGEBNISSE	49
4.1	ZELLMORPHOLOGIE	50
4.1.1	RUNDHEIT	51
4.1.2	ZIRKULARITÄT	52
4.1.3	SEITENVERHÄLTNIS	53
4.2	SARKOMERDICHTEN	54
4.3	SARKOMERAUSRICHTUNG	57
4.4	Z-SCHEIBENBREITE	61
4.5	SARKOMERLÄNGE	62
V.	DISKUSSION	64
VI.	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	67
VII.	PUBLIKATIONEN	70
VIII.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	71
IX.	DANKSAGUNG	71
X.	LITERATURVERZEICHNIS	72



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1. STRUKTURELLER AUFBAU EINES SARKOMERS.	5
ABBILDUNG 2. SARKOMERAUSRICHTUNG IN ADULTEN UND IPSC-DERIVIERTEN KM.	6
ABBILDUNG 3. STAMMZELLARTEN UND IHRE AUFGABEN.	7
ABBILDUNG 4. HERKUNFT PLURIPOTENTER STAMMZELLEN.	8
ABBILDUNG 5. REPROGRAMMIERUNG VON KÖRPERZELLEN.	10
ABBILDUNG 6. KARDIALE DIFFERENZIERUNG UND KANONISCHER WNT-SIGNALWEG.	11
ABBILDUNG 7. PRINZIP UND AUFBAU DER FLUORESCENZMIKROSKOPIE.	14
ABBILDUNG 8. MOIRÉ-EFFEKT DURCH INTERFERENZ.	15
ABBILDUNG 9. ENTSTEHUNG EINES SIM-BILDES.	16
ABBILDUNG 10. PRINZIP VON PALM.	17
ABBILDUNG 11. ZEITSTRAHL DER MESC KM (W4 ALPHA MHC).	23
ABBILDUNG 12. KUGELMEIER <i>SPHERICALPLATES</i> 5D.	26
ABBILDUNG 13. ZEITSTRAHL DER H9 KM.	29
ABBILDUNG 14. <i>CAMERA SETUPS</i> BEI DER BEARBEITUNG VON PALM-DATEIEN.	37
ABBILDUNG 15. <i>RUN ANALYSIS SETUPS</i> BEI DER BEARBEITUNG VON PALM-DATEIEN.	38
ABBILDUNG 16. <i>THUNDERSTORM RESULTS</i> BEI DER BEARBEITUNG VON PALM-DATEIEN.	39
ABBILDUNG 17. ROI FILTER BEI DER BEARBEITUNG VON PALM-DATEIEN.	40
ABBILDUNG 18. <i>FILTER COMMAND BOX</i> BEI DER BEARBEITUNG VON PALM-DATEIEN.	40
ABBILDUNG 19. <i>DRIFT CORRECTION</i> BEI DER BEARBEITUNG VON PALM-DATEIEN.	41
ABBILDUNG 20. <i>VISUALIZATION SETUPS</i> BEI DER BEARBEITUNG VON PALM-DATEIEN.	41
ABBILDUNG 21. MANUELLE MARKIERUNG DER SARKOMERABSTÄNDE BEI DER AUSWERTUNG VON PALM-DATEIEN.	43
ABBILDUNG 22. MANUELLE MESSUNG DER SARKOMERLÄNGE BEI DER AUSWERTUNG VON PALM-DATEIEN.	44
ABBILDUNG 23. <i>RIDGE DETECTION PLUGIN</i> ZUR BESTIMMUNG DER Z-STREIFENBREITE BEI DER AUSWERTUNG VON PALM-DATEIEN.	45
ABBILDUNG 24. <i>ROTATION SETUPS</i> BEI DER AUSWERTUNG DER SARKOMERAUSRICHTUNG VON SIM-DATEIEN.	46
ABBILDUNG 25. <i>DIRECTIONALITY ANALYSIS PLUGIN</i> ZUR ERMITTLUNG DER SARKOMERAUSRICHTUNG BEI DER AUSWERTUNG VON SIM-DATEIEN.	46
ABBILDUNG 26. <i>RIDGE DETECTION PLUGIN</i> ZUR BEURTEILUNG DER SARKOMERISIERUNG BEI DER AUSWERTUNG VON SIM-DATEIEN.	48
ABBILDUNG 27. ZELLMORPHOLOGIE.	51
ABBILDUNG 28. RUNDHEIT.	52
ABBILDUNG 29. ZIRKULARITÄT.	53

ABBILDUNG 30. SEITENVERHÄLTNIS.	54
ABBILDUNG 31. SARKOMERISIERUNG/ZELLFLÄCHE [%].....	55
ABBILDUNG 32. QUALITÄT DER SARKOMERDICHTE.	56
ABBILDUNG 33. DARSTELLUNG DER SARKOMERDICHTE ANHAND DER ALPHA-AKTININ MARKIERTEN ZELLEN.	56
ABBILDUNG 34. AUSRICHTUNG [°] DER FILAMENTE.	57
ABBILDUNG 35. QUALITÄT DER SARKOMERAUSRICHTUNG.....	61
ABBILDUNG 36. Z-SCHEIBENBREITE.	62
ABBILDUNG 37. SARKOMERLÄNGE.....	63

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1. TODESURSACHEN NACH KRANKHEITSARTEN IN PROZENT [%] (2021).....	3
TABELLE 2. STERBEFÄLLE INSGESAMT NACH DEN 10 HÄUFIGSTEN TODESURSACHEN DER ICD-10 (2021).....	3
TABELLE 3. LISTE DER ZELLINIEN, CHEMIKALIEN, MATERIALIEN UND GERÄTE, WELCHE FÜR DIE EXPERIMENTE MIT DEN ZELLKULTUREN VERWENDET WURDEN.	18
TABELLE 4. CHEMIEKALIENLISTE FÜR DAS W4 ALPHA MHC KULTURMEDIUM (500 ML).	24
TABELLE 5. CHEMIEKALIENLISTE FÜR DAS W4 ALPHA MHC DIFFERENZIERUNGSMEDIUM (500 ML)..	25
TABELLE 6. CHEMIEKALIENLISTE FÜR DAS H9 KULTURMEDIUM (50,5 ML).	29
TABELLE 7. CHEMIKALIEN FÜR DIE FIXIERUNG UND FÄRBUNG DER ZELLEN.	31
TABELLE 8. CHEMIEKALIENLISTE BASIC BUFFER (CA. 50 ML).....	33
TABELLE 9. CHEMIEKALIENLISTE PALM IMAGING BUFFER (500 ML).	33
TABELLE 10. EINSTELLUNGEN IM RIDGE DETECTION PLUGIN ZUR ERMITTLUNG DER Z-STREIFEN- BREITE	44
TABELLE 11. EINSTELLUNGEN IM RIDGE DETECTION PLUGIN ZUR ERMITTLUNG DER ZELLFLÄCHE UND SARKOMERDICHTE	47
TABELLE 12. ANZAHL DER IN DIE ANALYSE EINBEZOGENEN ZELLEN.	49
TABELLE 13. FARBKODIERTE DARSTELLUNG DER FILAMENTAUSRICHTUNG MIT HISTOGRAMM.	58

ABKÜRZUNGEN

AK	Antikörper
AP	Aktionspotential
BMP	Engl. <i>Bone morphogenetic protein</i> = Knochenmorphogenetisches Proteine
BSA	Bovines Serumalbumin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EB	Engl. <i>Embryoid body</i> = Embryonale Körperchen
(m)ESC	Engl. <i>(Murine) embryonic stem cell</i> = (Murine) embryonale Stammzelle
FCS	Engl. <i>Fetal calf serum</i> = Fötales Rindereserum
FGF	Engl. <i>Fibroblast growth factor</i> = Fibroblasten-Wachstumsfaktor
HCl	Chlorwasserstoffsäure/Salzsäure
(h)iPSC	Engl. <i>(Human) induced pluripotent stem cell</i> = (Humane) induzierte pluripotente Stammzelle
KM	Kardiomyozyt
LIF	Engl. <i>Leukemia inhibitory facor</i> = Leukämiehemmender Faktor
MHC	Engl. <i>Myosin heavy chain</i> = Schwere Myosinkette
NaCl	Natriumchlorid

NHP	Engl. <i>Non-human primates</i> = Nicht menschliche Primaten
OSKM	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc
PA-FP	Engl. <i>Photoactivatable fluorescent protein</i> = Photoaktivierbares fluoreszierendes Protein
PALM	Engl. <i>Photoactivated localization microscopy</i> = Lokalisationsmikroskopie nach Photoaktivierung
PBS	Engl. <i>Phosphate-buffered saline</i> = Phosphatgepufferte Salzlösung
ROCK	Engl. <i>Rho-associated kinase</i> = Rho-assoziierte Proteinkinase
ROI	Engl. <i>Region of interest</i> = Interessenbereich
RPMI	Engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SIM	Engl. <i>Structured illumination microscopy</i> = Super-Resolution-Fluoreszenzmikroskopie mit strukturierter Beleuchtung
TGF- β	Engl. <i>Transforming growth factor-β</i> = Transformierender Wachstumsfaktor- β
VEGF	Engl. <i>Vascular endothelial growth factor</i> = Endothelwachstumsfaktor
Wnt	Engl. <i>Wingless-related integration site</i>

I. ZUSAMMENFASSUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie Herzinfarkte oder Kardiomyopathien stellen in der westlichen Welt die häufigste Todesursache dar. Allein in Deutschland sind 14% der Todesfälle auf Koronare Herzerkrankungen (KHK) zurückzuführen. Die Lebenszeitprävalenz beträgt 9,3% für 40-79 Jährige und damit ist die KHK eine der wichtigsten Volkskrankheiten in Deutschland. Das menschliche Herz besitzt ca. 4 Milliarden Herzmuskelzellen, jedoch nur eine geringfügige Regenerationskapazität. Dadurch gewinnen Strategien zur Rekonvaleszenz nach kardiovaskulären Erkrankungen enorm an Bedeutung. Dies beinhaltet Zellersatztherapien, um verlorene Kardiomyozyten (KM) auszutauschen, genauso wie die Entwicklung von neuen Medikamenten zur effektiven und sicheren pharmakologischen Intervention.

Die *in vitro* Kardiomyogenese in der Kultur differenzierender Stammzellen wurde als unbegrenzte Quelle von Herzmuskelzellen zur Transplantation in der Ersatztherapie des irreversibel geschädigten Herzgewebes vorgeschlagen. Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) schienen eine vielversprechende Möglichkeit zu sein. Nicht nur für die therapeutische Anwendung zum Ersatz von Gewebe beziehungsweise die Generation von Gewebestücken *in vitro* (*Bioengineering*), sondern auch für pharmakologische Tests auf toxische Substanzen, zur Wirkstofftestung, embryotoxikologische Effekte und Austestung von Faktoren zur Zellproliferation und Differenzierung. Die Wirkstofftestung wurde zum Beispiel durch die CiPA-Initiative, die zur Bewertung des proarrhythmischen Risikos neuartiger Kardiotherapeutika ins Leben gerufen wurde, erfolgreich demonstriert. Obwohl reichlich Protokolle zur Differenzierung gerade von iPSCs zu KM existieren, sind phänotypische und funktionelle Aspekte vorhanden, welche die *in vivo* und *in vitro* Applikation noch nicht ermöglichen. Neben elektrophysiologischen, metabolischen und molekularen Veränderungen schließt der Reifungsprozess die strukturelle Organisation der Sarkomere mit ein, welche die fundamentale Einheit der Kraftentwicklung sowie der Kontraktion darstellen. Während reife KM einen gut organisierten Kontraktionsapparat aufweisen, findet man bei iPSC KM meist ungeordnete Sarkomerfilamente vor. Dies führt zu einer reduzierten Kontraktionsfähigkeit sowie einer veränderten Kontraktionsdynamik. Seit 2016 ist bekannt, dass im Vergleich zu reifen KM, welche eine uniaxiale Kontraktionsstruktur aufweisen, differenzierte KM aufgrund ihrer ungeordneten Struktur radial kontrahieren beziehungsweise fokale Kontraktionszentren ausbilden. Um die kardiale Reifung voranzutreiben, wurden verschiedene Methoden angewandt. Darunter 3D Zellkulturen, elektrische und mechanische Stimulation sowie die Verwendung von extrazellulären Matritzen, welche *in vivo* Bedingungen nachahmen.

Auch diese Arbeit widmet sich der Frage nach einem optimalen Differenzierungsprotokoll für Stammzellen unterschiedlicher Herkunft, welche sich zu KM mit adultem Phänotyp entwickeln

sollen. Wir untersuchten murine embryonale Stammzellen (mESCs) und humane vordifferenzierte embryonale Stammzellderivate und legten ein besonderes Augenmerk auf die Bewertung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen (hiPSCs). Daher wurde bei diesen die Kultivierungsdauer variiert und ein spezieller Objektträger mit mikrostrukturierter Oberfläche verwendet. Zellen aus adultem und neonatalem murinem Herzgewebe dienten als Kontrolle. Da sich diese Arbeit auf den Reifegrad des Sarkomernetzwerkes der Zellen konzentriert, wurden Kontrollparameter gewählt, die es erlauben, die Filamentstruktur der KM genau zu beurteilen: Zellmorphologie, Z-Streifenbreite, Sarkomerlänge und -hauptausrichtung sowie Dichte des Sarkomernetzwerkes. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass dies angemessene Parameter darstellen, um die Herzreife zu beurteilen.

Um die verschiedenen Zelltypen und die unterschiedlichen Kulturbedingungen miteinander vergleichen zu können, sind Techniken von Nöten, welche den Strukturierungsgrad der Sarkomere zeigen und beurteilbar machen. Im Gegensatz zu herkömmlicher Mikroskopie ist die Auflösung bei der hier verwendeten Super-Resolution-Mikroskopie etwa zehn Mal höher. Diese Technik ermöglicht genauere Analysen, da auch kleinste Veränderungen der zellulären Struktur sichtbar gemacht werden können.

Generell zeigen sich die murinen und humanen vordifferenzierten ESC KM eher mit unreifer Sarkomerisierung. Unsere Bildanalyse zeigt eine Verbesserung der Sarkomerdichte und der Filamentausrichtung, wenn iPSC KM auf strukturierten, linienförmigen Oberflächen kultiviert werden. Ebenso wirkt sich eine längere Kultivierungsdauer positiv auf die strukturelle Reifung aus und führt zu einem eher adulten Phänotyp.

Das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll kann die Entwicklung neuartiger Differenzierungsprotokolle unterstützen, da es eine quantitative Kontrolle des Phänotyps von KM ermöglicht.

II. EINLEITUNG

2.1 BEDEUTUNG DER HERSTELLUNG VON KARDIOMYOZYTEN *IN VITRO*

Das Robert-Koch-Institut schreibt unter der Rubrik „Sterblichkeit und Todesursachen“ Folgendes: „Seit den 1970er Jahren ist die Lebenserwartung in Deutschland gestiegen: Bei Frauen um neun auf 82,6 Jahre, bei Männern um zehn auf 77,5 Jahre. Mit dem Wandel des Krankheitsspektrums der - immer älter werdenden - Bevölkerung verändert sich auch das Spektrum der Todesursachen. Zu den häufigsten Todesursachen zählen sowohl bei Frauen als auch bei

Männern Herz-Kreislauf- und Krebserkrankungen.“ [1]. Dies zeigt auch das statistische Bundesamt mit den 2023 veröffentlichten Daten bezüglich der Todesursachen im Jahr 2021 (siehe Tabelle 1). Ein Drittel der gesamten deutschen Bevölkerung ist demnach an einer Erkrankung des Kreislaufsystems verstorben.

TABELLE 1. TODESURSACHEN NACH KRANKHEITSARTEN IN PROZENT [%] (2021).

Krankheiten des Kreislaufsystems	33,3
Bösartigen Neubildungen (Krebs)	22,4
Covid-19	7
Psychische und Verhaltensstörungen	5,9
Krankheiten des Atmungssystems	5,6
Krankheiten des Verdauungssystems	4,3
Verletzungen und Vergiftungen	4,2
Sonstige	17,4

QUELLE: TODESURSACHEN NACH KRANKHEITSARTEN 2021 IN % (STATISTISCHES BUNDESAMT (DESTATIS), 2023) [2].

Diese Daten wurden nochmals untergliedert und somit wird klar, dass sich zwei Drittel (61,9%) der genannten Kreislaufkrankungen auf das Herz beziehen (siehe Tabelle 2).

TABELLE 2. STERBEFÄLLE INSGESAMT NACH DEN 10 HÄUFIGSTEN TODESURSACHEN DER ICD-10 (2021).

ICD-10 Positionsnummer	Todesursache	Gestorbene ¹	Anteil in %
I25	Chronische ischämische Herzkrankheit	74 485	21,9
I21	Akuter Myokardinfarkt (Herzinfarkt)	45 181	13,3
I50	Herzinsuffizienz	35 131	10,3
I11	Hypertensive Herzkrankheit	23 363	6,9
I48	Vorhofflattern und Vorhofflimmern	21 719	6,4
I63	Hirninfarkt	15 177	4,5
I69	Folgen einer zerebrovaskulären Krankheit	12 584	3,7
I64	Schlaganfall, nicht als Blutung oder Infarkt bezeichnet	10 629	3,1
I35	Nichtreumatische Aortenklappenkrankheiten	10 616	3,1
I10	Essentielle (primäre) Hypertonie	10 432	3,1

1: Ohne Totgeborene und ohne gerichtliche Todeserklärungen.

Die Tabelle zum Thema „Sterbefälle insgesamt nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10“ mit weiteren Informationen findet sich auch im Informationssystem der Gesundheitsberichterstattung.

QUELLE: STERBEFÄLLE INSGESAMT NACH DEN 10 HÄUFIGSTEN TODESURSACHEN DER ICD-10 (STATISTISCHES BUNDESAMT (DESTATIS), 2022) [3].

Allein durch diese Zahlen wird deutlich, wie wichtig die Forschung im kardiologischen Bereich ist. Aufgrund des enormen Wissenszuwachses der letzten Jahrzehnte entstand eine Vielzahl an Strategien zur Rekonvaleszenz nach kardiovaskulären Erkrankungen. Egal ob Zellersatztherapie, *Bioengineering* oder pharmakologische Tests, KM mit adultem Phänotyp bilden für all dies die Forschungsgrundlage. Um dieser wissenschaftlichen Pflicht ohne ethische Bedenken nachgehen zu können, werden Kultivierungsprotokolle für iPSCs benötigt, die die Entstehung von reifen KM garantieren, die in ihrem Phänotyp nativen KM gleichen.

2.2 STRUKTURELLER AUFBAU VON KARDIOMYOZYTEN

Die Herzmuskulatur besteht aus hoch spezialisierten Zellen, den KM. Es werden zwei Arten von Herzmuskelzellen unterschieden. Dabei handelt es sich einerseits um KM der Erregungsweiterleitung und andererseits um KM der Arbeitsmuskulatur. Letztere werden in dieser Arbeit primär thematisiert. Sie enthalten einen oder mehrere mittelständige Zellkerne und sind über Glanzstreifen beziehungsweise *Gap junctions* mit benachbarten Zellen verbunden. Der sogenannte Sarkoplasmahof ist der myofibrillenfreie Raum, der den Zellkern umgibt und Glykogen, Fett und Lipofuszin enthält [4]. Der erwachsene KM ist stäbchenförmig mit einer Länge von etwa 150 μm , einer Breite von 20 μm , einer Höhe von 15 μm und einem Volumen von 40.000 μm^3 [5]. Eine der wichtigsten Eigenschaften dieser Zellen ist ihre Kontraktilität. Diese erhalten sie durch die regelmäßige Anordnung der kontraktilen Myofilamente Aktin und Myosin sowie Regulator-, Struktur- und Zytoskelettproteine. Durch unterschiedliche optische Eigenschaften und der besonderen Anordnung entstehen histologisch alternierend helle und dunkle Banden, was als Streifung bezeichnet wird. Dies wird in der Einteilung der Myofilamente nochmals deutlich. Die dicken Myosinfilamente bilden die A-Banden (anisotrop), wohingegen die dünnen Aktinfilamente die hellen I-Banden (isotrop) bilden. In der Mitte der I-Banden liegt die Z-Scheibe. Der Bereich zwischen den zwei Z-Streifen wird Sarkomer genannt. Dies ist mit ca. 2 μm die kleinste kontraktile Einheit des KM [6]. Die Aktinfilamente sind endständig durch α -Aktinin an den Z-Scheiben verankert [7].

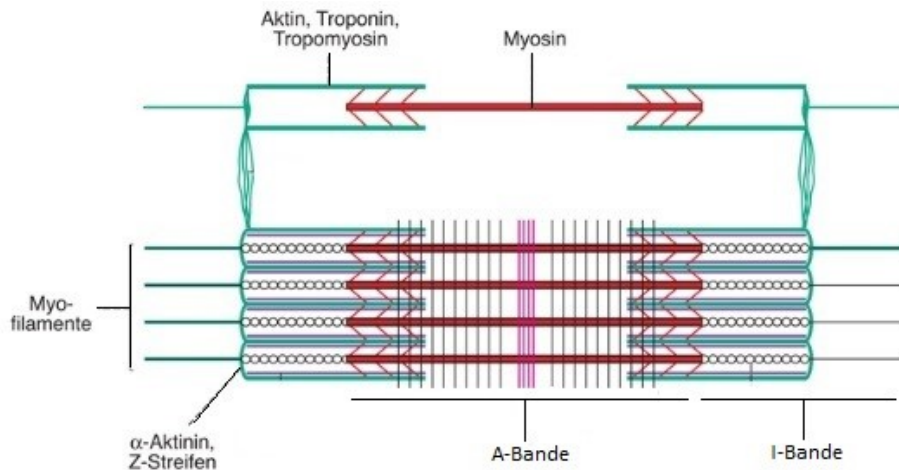


ABBILDUNG 1. STRUKTURELLER AUFBAU EINES SARKOMERS.

DIE REGELMÄßIGE ANORDNUNG DER MYOFILAMENTE AKTIN UND MYOSIN SOWIE DER REGULATOR-, STRUKTUR- UND ZYTOSKELETTPROTEINE GEWÄHRLEISTEN DIE HOHE KONTRAKTILITÄT DES MYOKARDS. DIE DICKEN MYOSINFILAMENTE, HIER ROT DARGESTELLT, BILDEN SOGENANNTA A-BANDEN (ANISOTOP) WOHINGEGEN DIE DÜNNEN AKTINFILAMENTE, HIER GRÜN DARGESTELLT, DIE HELLEN I-BANDEN (ISOTOP) BILDEN. IN DER MITTE DER I-BANDEN LIEGEN DIE Z-STREIFEN. DER BEREICH ZWISCHEN DEN ZWEI Z-STREIFEN WIRD SARKOMER GENANNT. DIE AKTINFILAMENTE SIND ENDSTÄNDIG DURCH ALPHA-AKTININ AN DEN Z-SCHEIBEN VERANKERT. QUELLE: IN ANLEHNUNG AN MOTORISCHES SYSTEM. QUERGESTREIFTE MUSKULATUR (HESCHELER, 2019) [7].

2.3 REIFEPROBLEMATIK DER KARDIOMYOZYTEN

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte bei der Etablierung, Kontrolle und Verbesserung der Differenzierung von KM aus Stammzellen erzielt. Trotzdem gleichen die Herzmuskelzellen, welche aus iPSCs generiert werden, transkriptionell, strukturell und funktionell eher embryonalen KM. Einen wesentlichen Grund dafür liefert die Tatsache, dass die fetale Reifung der KM während der Spätschwangerschaft bis heute kaum verstanden ist [8]. Das Wissen bezieht sich überwiegend auf Erkenntnisse aus Tiermodellen oder die postpartale Kardiomyozytenentwicklung, da es noch nicht gelungen ist, die hämodynamischen, elektrochemischen und räumlichen Umstände nach Abschluss der Herzformation *in vitro* nachzustellen. Jedoch spielen diese Komponenten eine wichtige Rolle in dem Differenzierungsprozess [9]. Der unreife Phänotyp der iPSC KM stellt eine große Einschränkung für ihre präklinische und klinische Verwendung dar [10] [9]. Die kardiogene Reifung umfasst verschiedene Veränderungen der Zellphysiologie, darunter morphologische und elektrophysiologische Veränderungen, die metabolische Reifung und die Etablierung einer geeigneten Kontraktionsmaschinerie [9]. Die Entwicklung einer ausreichenden Kontraktionskapazität hängt stark vom Sarkomergehalt und der richtigen Organisation der Myofilamente ab. In adulten KM beträgt die Sarkomerlänge ~2 μm

und die entsprechenden Filamente sind senkrecht zur Längsachse ausgerichtet. Im Gegensatz dazu weisen iPSC KM häufig eine reduzierte Sarkomerlänge und desorganisierte Filamente auf, die über das gesamte Zytoplasma verstreut sind [11].

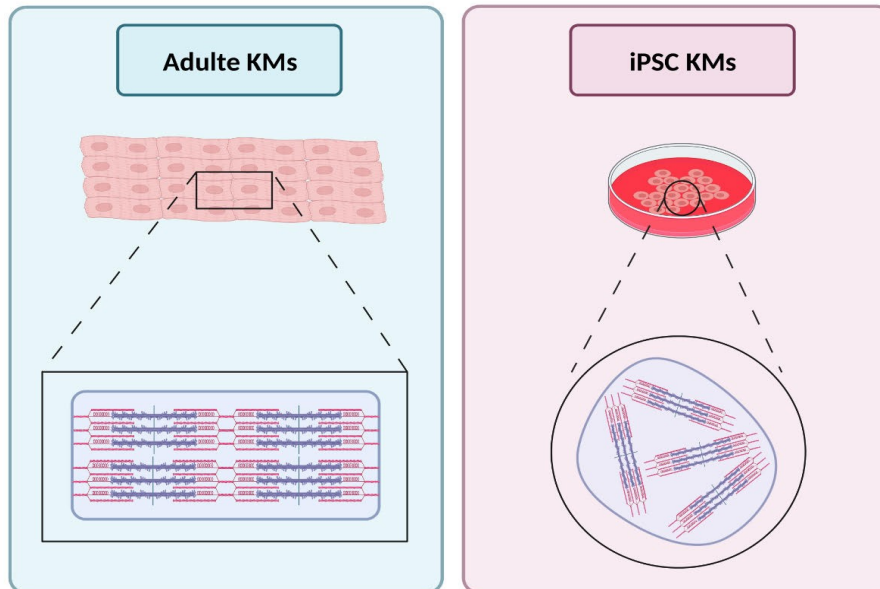


ABBILDUNG 2. SARKOMERAUSRICHTUNG IN ADULTEN UND iPSC-DERIVierten KM.

DIE SARKOMERLÄNGE IST IN iPSC KM DEUTLICH KÜRZER ALS IN ADULTEN HERZMUSKELZELLEN. EBENFALLS SIND IN DEN REIFEN KM DIE SARKOMERFILAMENTE SENKRECHT ZUR LÄNGSACHSE DER ZELLE AUSGERICHTET, WOHINGEGEN DIE iPSC KM EINE DESORGANISIERTE SARKOMERISIERUNG AUFWEISEN. QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG ERSTELLT MIT BIORENDER.COM [12].

Darüber hinaus ist für die Entstehung eines korrekten Kontraktionsapparats eine Änderung in der Genexpression nötig. Während fetale KM vorzugsweise langsames kardiales Skelett-Troponin I (TNNI1) exprimieren, wird kardiales Troponin I (TNNI3) hauptsächlich in reifen KM nachgewiesen [10] [13]. Ebenfalls wurden Spleißmodifikationen für Titin und die regulatorische Leichtkette von Myosin gefunden [10] [14].

Dies bildete die Grundlage für viele Arbeitsgruppen, Protokolle zu entwickeln, welche einen reiferen Phänotyp bei iPSC KM zum Ziel hatten. Es zeigte sich, dass die Kultivierung in einer 3D-Mikrogewebeumgebung, die mechanische Stimulation, das Editieren von kontraktionsbezogenen Genen oder ein optimiertes Medium, das oxidative Substrate enthält, die Reifung des Sarkomernetzwerks und die Zellkontraktion fördern [15] [16] [17] [18]. Um den Erfolg einer neu etablierten Technik zu prüfen, ist eine Methode nötig, welche Parameter bewertet, die den Grad der Sarkomerreifung beschreiben. So können die Differenzierungsbedingungen, die für den Aufbau eines funktionellen Sarkomernetzwerks erforderlich sind, kontrolliert und verbessert werden. In mehreren früheren Studien wurden einige Aspekte der Sarkomerorganisation, wie z. B. die Orientierung und die Länge der Sarkomere, mit Hilfe konventioneller konfokaler Bilder und verschiedener Softwaretools analysiert [19] [20] [21].

2.4 PLURIPOTENTE STAMMZELLEN

Es gibt diverse Arten von pluripotenten Stammzellen, jedoch sind für diese Arbeit nur Folgende relevant: embryonale Stammzellen (ESC) und induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC). Der Begriff „Potenz“ definiert dabei in der Entwicklungsbiologie die Fähigkeit von Zellen, sich differenzieren zu können. Das Differenzierungspotential wird umso kleiner, desto weiter die Spezialisierung der Zelle vorangeschritten ist (totipotent > pluripotent > multipotent > oligopotent > unipotent) [22]. Pluripotente Stammzellen verlieren ihre Teilungsfähigkeit nicht, wobei die Tochterzellen die gleichen Eigenschaften wie die Vorläuferzelle aufweisen. Dies entspricht hier der Fähigkeit, sich in alle Zellarten des Körpers zu differenzieren: Endoderm (Magen-Darm-Trakt, Lunge), Mesoderm (Muskel, Knochen, Blut, Urogenitaltrakt) oder Ektoderm (Epidermisgewebe und Nervensystem) [23].

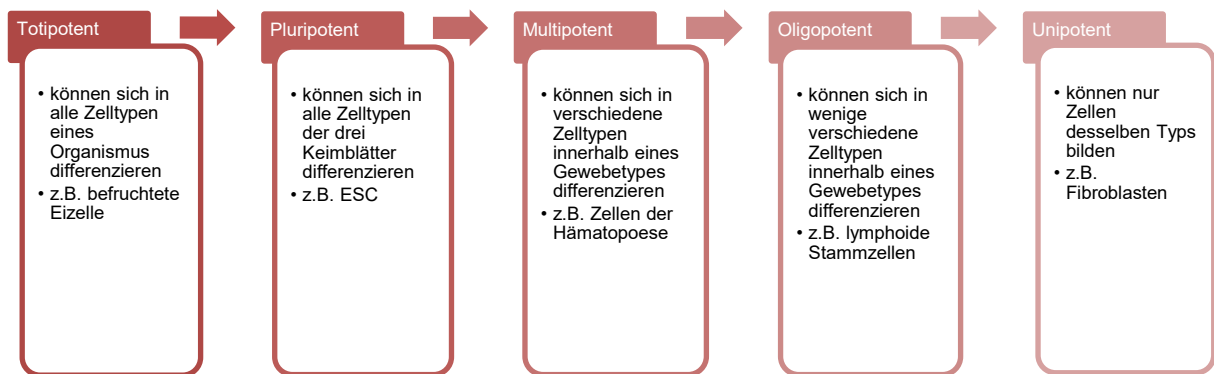


ABBILDUNG 3. STAMMZELLARTEN UND IHRE AUFGABEN.

QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

Ende des 20. Jahrhunderts gelang es den ersten Wissenschaftlern, Stammzellen in einer Kultur zu halten [24]. Das Kultivierungsverfahren wurde 1981 an Zellen aus Mäuseembryonen entwickelt, die aus der inneren Zellmasse von Blastozysten isoliert wurden [25]. Papatsenko *et al.* beschreiben in ihrer Zusammenfassung die Möglichkeit der Aufrechterhaltung des embryologischen Entwicklungspotenzials der Zellen über viele Passagen hinweg durch ein Netzwerk von Signal-, Transkriptions- und epigenetischen regulatorischen Interaktionen, das als pluripotentes Genregulationsnetzwerk (PGRN) bezeichnet wird [26].

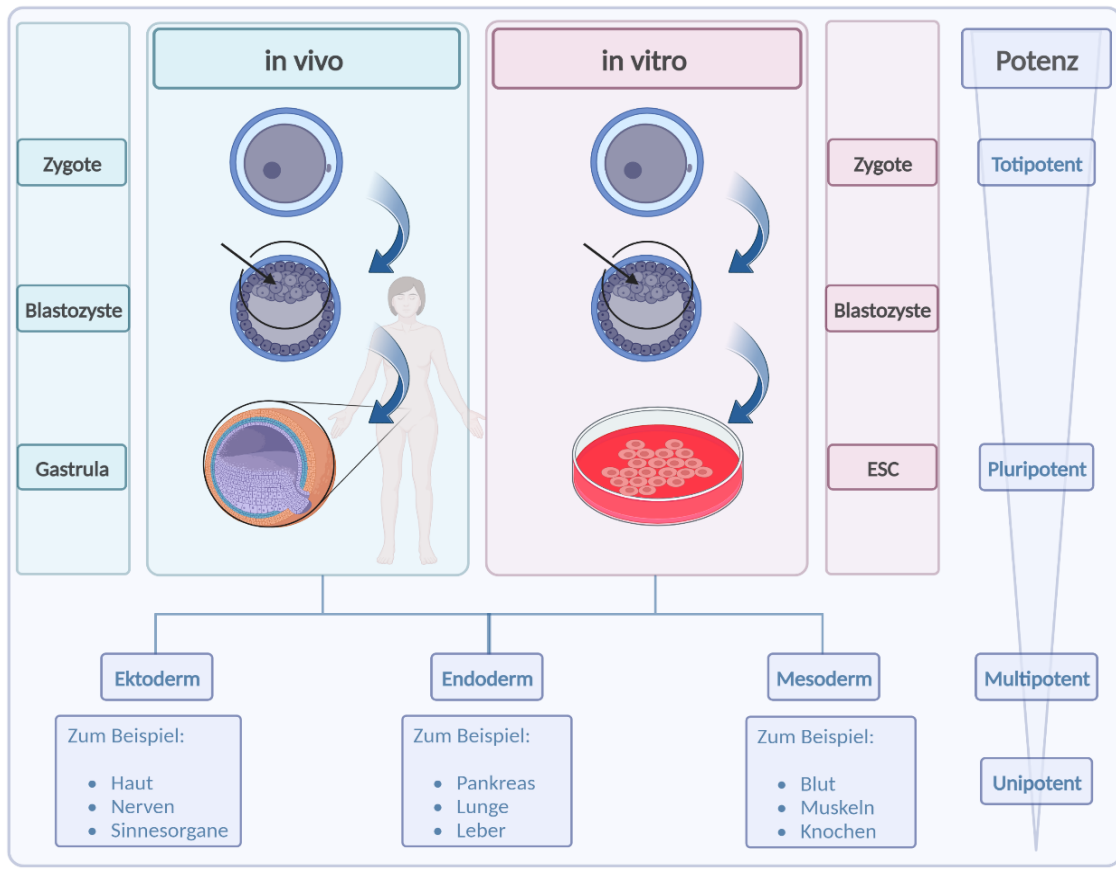


ABBILDUNG 4. HERKUNFT PLURIPOTENTER STAMMZELLEN.

DAS DIFFERENZIERUNGSPOTENTIAL WIRD UMSO KLEINER, DESTO WEITER DIE SPEZIALISIERUNG DER ZELLE VORANGESCHRITTEN IST. IN VIVO KOMMEN PLURIPOTENTE STAMMZELLEN IN EINER FRÜHEN EMBRYONALPHASE VOR, DER BLASTOZYTE. HIER BILDEN SIE DIE INNERE ZELLMASSE (SCHWARZ GEKENNZEICHNET). IN VITRO KÖNNEN DIE ZELLEN DER INNEREN ZELLMASSE SICH TEILEN UND DAUERHAFT UNDIFFERENZIERT PROLIFERIEREN. QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG ERSTELLT MIT BIORENDER.COM [12].

Die ersten humanen embryonalen Stammzelllinien wurden 1998 von Thomson *et al.* gewonnen. Sie beschreiben fünf pluripotente Zelllinien aus menschlichen Blastozysten, die einen normalen Karyotyp (H1, H13, H 14 XY-Karyotyp und H7, H9 XX-Karyotyp) und eine hohe Telomeraseaktivität aufweisen und Zelloberflächenmarker exprimieren, die nur für embryonale Stammzellen von Primaten charakteristisch sind. Diese wurden aus menschlichen Embryonen, welche durch die *In-vitro*-Fertilisation (IVF) für klinische Zwecke erzeugt worden waren, isoliert. Auch nach vier bis fünf Monaten *in vitro* Proliferation behielten diese Zellen das Entwicklungspotenzial, um Trophoblasten und Derivate aller drei embryonalen Keimschichten zu bilden [27]. Seit dem wurden *in vivo* und *in vitro* Differenzierungen zu verschiedenen Vorläuferzellen als auch zu ausdifferenzierten Zellen generiert. Die Zuordnung zu einer Gewebe-Gruppe erfolgt dabei durch die von der Zelle gebildeten Oberflächenmoleküle. Ebenfalls wurden die gewonnenen Vorläuferzellen in Modellorganismen, zum Beispiel Affen oder Ratten,

transplantiert, wodurch nachgewiesen werden konnte, dass sich diese an den Gewebeverbänden funktionell beteiligen [28]. Die Gewinnung von und Forschung an humanen embryonalen Stammzellen (hESCs) löste durch die Notwendigkeit des Verbrauchs menschlicher Embryonen gravierende ethische Bedenken aus. Daher ist die Forschung an hESCs in Deutschland nach derzeitiger Rechtslage verboten und nur in Ausnahmefällen nach dem Deutschen Stammzellgesetz möglich [22].

Im Gegensatz dazu wurde 2006 von Takahashi und Yamanaka die Möglichkeit der Zellreprogrammierung vorgestellt und somit die induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) eingeführt [29]. Seit 2007 können auch aus menschlichen Hautzellen iPSCs hergestellt werden, womit eine ethisch unbedenkliche Methode zur Stammzellgewinnung zur Verfügung steht [22]. 2012 wurde Shin'ya Yamanaka zusammen mit dem Briten John B. Gurdon dafür der Nobelpreis für Medizin verliehen. Zwischen den preisgekrönten Veröffentlichungen der beiden Wissenschaftler liegen mehr als vier Jahrzehnte [30] [31] [32]. Schon 1962 zeigte John Gurdon mit seinem Experiment an Kaulquappen, dass die Fähigkeit der Zellen zur Pluripotenz auch während ihrer Entwicklung in eine spezialisierte Zelle nicht verloren geht [32]. Es sollten jedoch noch 44 Jahre vergehen, bis die Schalter der Reprogrammierung von Yamanaka gefunden wurden. Durch die retrovirale Einbringung von stammzellspezifischen Transkriptionsfaktoren, Oct3/4, Sox2, Klf4 und c-Myc (OSKM), konnten adulte Mausfibroblasten in den pluripotenten Stammzellzustand zurückversetzt werden [33].

In späteren Versuchen wurde das als Onkogen bekannte c-Myc durch Nanog ersetzt. Neuerdings findet die Kombination Oct4/Sox2/Nanog/LIN28 Verwendung, da Nanog und LIN28 synergistisch wirken und dadurch die OSKM-vermittelte Reprogrammierung um das ~76-fache verbessern und die Reprogrammierungslatenz um mindestens eine Woche verkürzen [34]. Ursprünglich wurden für die Zellreprogrammierung genomintegrierende retrovirale oder lentivirale Vektoren verwendet. In Anbetracht der möglichen Insertionsmutagenese und des immunogenen Potenzials könnte die Verwendung viraler Transfektion in der Zelltransplantation zu riskant sein [35] [36] [37] [38]. Daher werden integrationsfreie Methoden für die Induktion verwendet, wozu zum Beispiel Plasmide, Sendai-Viren, Adenoviren, synthetische mRNA und Proteine gehören [39] [40] [41] [42] [43]. Am häufigsten finden episomale Plasmide Anwendung, da es sich hierbei um eine technisch einfache und günstige Methode handelt [39] [44]. Die Reprogrammierung ist also keine genetische Transformation, sondern ein epigenetischer Prozess, was bedeutet, dass das Genom der iPSCs beziehungsweise der daraus differenzierten Zellen unverändert bleibt und somit mit den Ursprungszellen des Spenders identisch ist [22]. iPSCs können heutzutage von Zellbanken bezogen werden, die viele verschiedene iPSC-Zelllinien von Gesunden, aber auch von Patienten mit ausgewählten Krankheitsbildern angelegt haben.

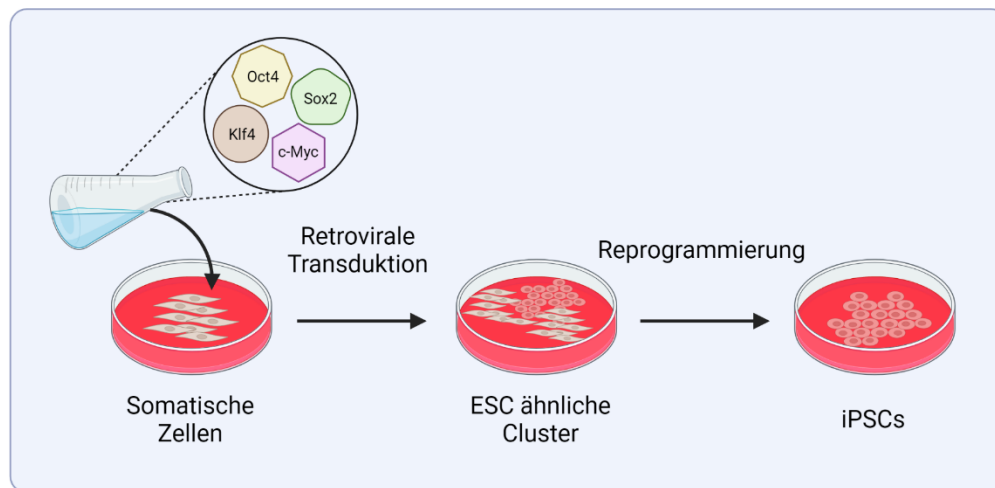


ABBILDUNG 5. REPROGRAMMIERUNG VON KÖRPERZELLEN.

DIE ERSTMALIGE ERZEUGUNG VON iPSCs 2006 WAR EIN MEILENSTEIN IN DER STAMMZELLFORSCHUNG. MITILFFE DER KÜNSTLICHEN REPROGRAMMIERUNG VON NICHT PLURIPOTENTEN SOMATISCHEN ZELLEN IST DIE ERZEUGUNG FAST ALLER ZELLTYPEN MÖGLICH. DURCH DIE TRANSFEKTION VON STAMMZELL-SPEZIFISCHEN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN ZUM BEISPIEL OCT3/4, SOX2, KLF4 UND C-MYC (OSKM), KÖNNEN BEISPIELSWEISE FIBROBLASTEN IN DEN PLURIPOTENTEN STAMMZELLZUSTAND ZURÜCKVERSETZT WERDEN. QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG ERSTELLT MIT BIORENDER.COM [12].

2.5 INDUZIERTE PLURIPOTENTE STAMMZELLEN – KARDIALE DIFFERENZIERUNG

Die Differenzierung hiPSCs zu reifen Herzmuskelzellen kann durch eine Nachahmung der embryonalen Herzentwicklung herbeigeführt werden. Da Herzzellen der mesodermalen Keimschicht der inneren Zellmasse der Blastozyste entstammen, sind die Protokolle grundsätzlich in zwei aufeinanderfolgende Schritte unterteilt: Die mesodermale und die kardiale Spezifizierung [45] [46]. Diese werden durch verschiedene extrazelluläre Signalmoleküle gesteuert.

1. Mesodermale Differenzierung durch die Zugabe von CHIR99021 als Wnt-Signalweg-Aktivator (engl. *wingless-related integration site*). Ebenfalls fördern BMP-4 (engl. *Bone morphogenetic protein-4*) und/oder Aktivin-A die Differenzierung von hiPSCs in mesodermale Vorläuferzellen [47] [48] [49].
2. Kardiale Differenzierung durch Inhibitoren des Wnt-Signalwegs [50] wie zum Beispiel IWR1 oder IWP2 [48] [39] [51]. Zusätzlich fördern Wachstumsfaktoren wie FGF2 (engl. *Fibroblast growth factor*), VEGF (engl. *Vascular endothelial growth factor*), IGF1 (engl. *Insulin like growth factor*) und/oder die Zugabe von Zytokinen wie Insulin

die Spezifizierung [52] [53]. VEGF fördert hierbei die Angiogenese, die für die Entwicklung der KM *in vitro* erforderlich ist. Ascorbinsäure steigert die Proliferation kardialer Vorläuferzellen und verbessert die Sarkomerorganisation [54].

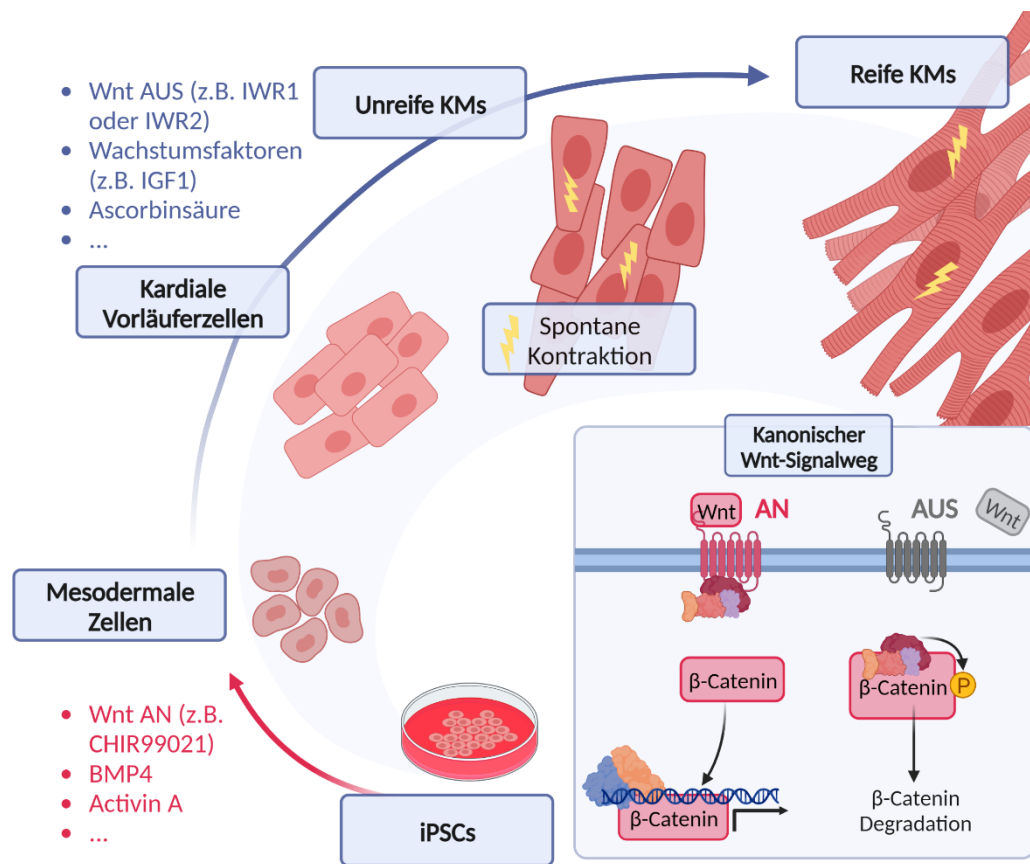


ABBILDUNG 6. KARDIALE DIFFERENZIERUNG UND KANONISCHER WNT-SIGNALWEG.

DIE DIFFERENZIERUNG WIRD IN 2 SCHRITTE UNTERTEILT: DIE MESODERMALE UND DIE KARDIALE DIFFERENZIERUNG. ES KOMMEN VERSCHIEDENE, ÜBER DAS MEDIUM APPLIZIERTE, WACHSTUMSFAKTOREN UND SMALL MOLECULES ZUM EINSATZ. DER WNT-SIGNALWEG SPIELT HIER EINE SCHLÜSSELROLLE UND MUSS ZUERST AKTIVIERT UND SPÄTER INHIBIERT WERDEN. QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG ERSTELLT MIT BIORENDER.COM. ANGELEHNT AN *WNT SIGNALING DURING CARDIOMYOCYTE DIFFERENTIATION* (PARANHOS, 2014) [12].

Der Wnt-Signalweg stellt einen der wichtigsten Faktoren der Kardiogenese dar. Historisch werden die Wnt-Liganden in zwei Gruppen unterteilt. Der kanonische Wnt-Signalweg löst eine Kaskade aus, welche zur Stabilisierung und Akkumulation des Proteins β -Catenin führt. Dieses gelangt in den Zellkern und reguliert zusammen mit TCF/Lef-Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen [55] [56]. Im Gegensatz dazu sind die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege unabhängig von β -Catenin und hemmen sogar die kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalgebung [57]. Hinsichtlich der Spezifizierung der embryonalen Zellen hat der Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine biphasische Wirkung. In der frühen Embryonalphase stimuliert der Wnt/ β -Catenin-Signalweg die Induktion des Mesoderms. Gleichzeitig wird eine negative Rückkopplungsschleife aktiviert, die den Wnt-Signalweg hemmt, was zu einer verstärkten

kardialen Differenzierung führt [58]. Demnach hat der Wnt-Signalweg spezifische Aufgaben, je nach Stadium der vorliegenden Embryonalentwicklung. Er wirkt sich biphasisch und antagonistisch auf die Kardiogenese aus, da er die Bildung von KM in frühen Entwicklungsstadien fördert und sie später hemmt, wenn der Wnt-Signalweg nicht inaktiviert wird [59].

BMP und Aktivin gehören zur TGF- β -Superfamilie (engl. *Transforming growth factors- β*), welche an zahlreichen zellulären Prozessen wie Proliferation, Apoptose und Herzdifferenzierung beteiligt sind [60]. BMP fungiert in der Spätphase der Herzentwicklung als Wnt/ β -Catenin-Inhibitor, was zu einer Verstärkung der kardiomyogenen Differenzierung führt [61]. In hiPSC-Differenzierungsprotokollen wurde BMP4 zusammen mit Aktivin A eingesetzt, um die mesodermale Induktion für die Ableitung von KM zu unterstützen [35]. Darüber hinaus können Aktivin und BMP mit den kanonischen Wnt-Signalen interagieren, um die Gastrula während der frühen Entwicklung in synergetischer Weise zu strukturieren, indem sie unabhängig von Wnt-Liganden eine β -Catenin-Reaktion auslösen [62].

Bis heute gibt es kein einheitliches Standardprotokoll für die Differenzierung von humanen iPSCs zu KM. Die Differenzierungsbedingungen können stets von verschiedenen Faktoren wie Zelllinie, Kulturbedingungen und Kulturdauer beeinflusst werden, weshalb die Protokolle optimiert und validiert werden sollten, um eine effiziente und spezifische Differenzierung zu gewährleisten.

2.6 SUPER-RESOLUTION-MIKROSKOPIE

Im täglichen Sprachgebrauch wird als Licht der Anteil der elektromagnetischen Strahlung bezeichnet, den wir mit bloßem Auge sehen können (ca. 400-750 nm). Die für uns erkennbaren Farben entstehen durch die unterschiedlichen Wellenlängen. In der Lichtmikroskopie werden zusätzlich die angrenzenden Spektren aus dem infraroten (bis 1200 nm) und ultravioletten Bereich (200–380 nm) verwendet, die dann über geeignete Detektoren wie z. B. CCD Kameras (engl. *Charge-coupled device*) aufgenommen und somit für uns sichtbar gemacht werden [63]. Die beste Auflösung, die mit beugungsbegrenzten konventionellen optischen Techniken erreicht werden kann, ist jedoch um zwei Größenordnungen gröber als die molekulare Ebene [64]. Wenn die Wissenschaft Strukturen unterhalb der 1873 von Ernst Abbe errechneten Auflösungsgrenze von 200 nm darstellen wollte, war sie lange Zeit allein auf das Elektronenmikroskop angewiesen. Dieses ist jedoch sehr teuer, nur von erfahrenem Personal bedienbar, liefert ausschließlich schwarz-weiß Bilder und es kann nur fixiertes und speziell präpariertes Probenmaterial verwendet werden [65]. Lange blieb daher das Ziel, eine Fluoreszenztechnik zu entwickeln, die eine Auflösung des Molekularbereichs möglich machen sollte. Große Fort-

schritte wurden mit der Super-Resolution-Mikroskopie erzielt, die über die Abbe Auflösungsgrenze hinausgehen, wie zum Beispiel die Rasternahfeldmikroskopie (Dieter Pohl, 1981) [66] oder die RESOLFT-Mikroskopie (engl. *Reversible saturable optical fluorescence transition*), zu der auch die STED-Mikroskopie (engl. *Stimulated emission depletion*) (Stefan Hell, 1994) zählt [67] [68] [65] [69]. Stefan Hell, Eric Betzig und William E. Moerner erhielten für ihre Pionierarbeit auf dem Gebiet der ultrahochoauflösenden Fluoreszenzmikroskopie 2014 den Nobelpreis für Chemie [70].

Generell werden bei der Fluoreszenzmikroskopie kurzwellige Strahlen für die Anregung von Fluorophoren verwendet [63]. Das vom Molekül ausgesendete Licht hat dabei eine größere Wellenlänge als das anregende Licht. Diese Wellenlängenverschiebung wird nach ihrem Entdecker Sir George Stokes auch als *Stokes' Shift* bezeichnet [63]. Diese kann sehr unterschiedlich sein. Zum Beispiel hat Fluorescein eine Stokes-Verschiebung von nur 25 nm, wohingegen die Differenz bei Acridin mehr als 100 nm beträgt [71].

Die physikalischen Grundlagen wurden 1935 von Alexander Jablonski beschrieben und bauen auf dem Bohrschen Atommodell [72] auf. Die Elektronen der Fluorophore springen durch das Anregungslicht aus ihrem Grundzustand in eine energiereichere und weiter vom Zellkern entfernte Kreisbahn. Während der Verweildauer im angeregten Zustand kommt es zum Energieverlust durch Wärme und Schwingung [71]. Beim Zurückfallen in ihren Ursprungszustand emittieren sie den Rest der zuvor aufgenommenen Energie als längerwelliges Licht. Dies bedeutet, Fluorophore absorbieren Photonen einer bestimmten Energie und emittieren Photonen einer geringeren Energie. Dieser Effekt kann genutzt werden, um einen hervorragenden Kontrast herzustellen, denn jedes fluoreszierende Molekül wird dabei als Lichtquelle erkannt [73]. Liegt die Fluoreszenz dieses Moleküls über der Nachweisgrenze, können somit auch Strukturen nachgewiesen werden, die kleiner als die Auflösungsgrenze des Mikroskops sind. Die Auflösungsgrenze wird hier trotzdem nicht überwunden, da keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob das Signal von einer oder mehreren Strukturen kommt [69].

Das Fluoreszenzmikroskop enthält also eine zusätzliche Lichtquelle für die Anregung der Elektronen und damit die Erzeugung der Fluoreszenz. Das Objektiv erfüllt hier eine doppelte Funktion. Einmal fungiert es als Kondensator für die Fokussierung des Anregungslichtes und ist bildgebend durch Aufnahme und Weiterleitung des Emissionslichtes. Der Filterblock vereint Emissions- und Exzitationsfilter sowie einen dichromatischen Spiegel in sich. Durch den Exzitationsfilter kann die Anregungswellenlänge bestimmt werden und durch den Emissionsfilter der Wellenlängenbereich, der detektiert werden soll. Der dichromatische Spiegel reflektiert das Anregungslicht und lässt somit nur das langwelligere Emissionslicht passieren [71].

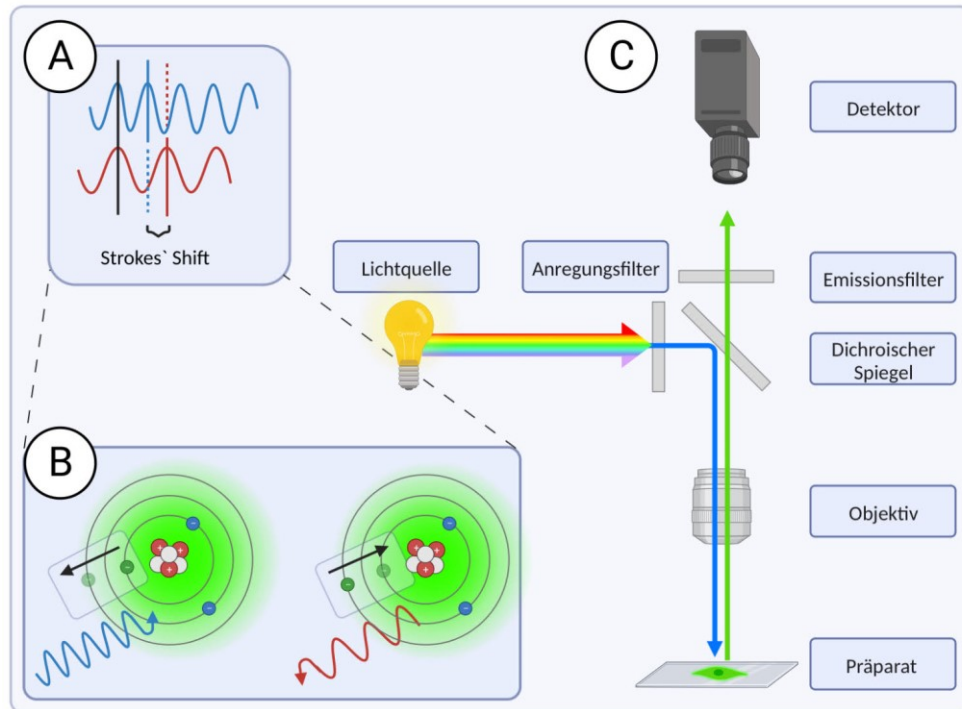


ABBILDUNG 7. PRINZIP UND AUFBAU DER FLUORESZENZMIKROSKOPIE.

A) DER STOKES' SHIFT IST DIE WELLENLÄNGENVERSCHIEBUNG ZWISCHEN ANREGENDEM UND AUSGESENDETEM LICHT.

B) GENERELL WERDEN BEI DER FLUORESZENZMIKROSKOPIE KURZWELIGE STRAHLEN (HIER BLAU DARGESTELLT) FÜR DIE ANREGUNG VON FLUOROPHOREN VERWENDET. DADURCH GELANGT DAS ELEKTRON AUF EINE ENERGIEREICHERE BAHN UND VERLIERT ÜBER ZUM BEISPIEL WÄRME ENERGIE. DADURCH IST DIE WELLENLÄNGE BEIM ZURÜCKFALLEN AUF DIE AUSGANGSBAHN LÄNGER, ALSO ENERGIEÄRMER (HIER ROT DARGESTELLT). C) AUFBAU EINES FLUORESZENZMIKROSKOPS. QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG ERSTELLT MIT BIORENDER.COM [12].

Obwohl sich nun die Möglichkeit bietet einzelne Moleküle darzustellen, unterliegt die Fluoreszenzmikroskopie mehreren Beschränkungen: 1. Begrenzte Eindringtiefe aufgrund der Lichtstreuung, 2. Autofluoreszenz von endogenen Chromophoren und 3. die schon erwähnte vorhandene Auflösungsgrenze [69]. Im Folgenden werden Lösungsansätze für diese Probleme besprochen, welche auch in dieser Doktorarbeit Anwendung fanden.

2.6.1 3D SIM – 3D STRUCTURED ILLUMINATION MICROSCOPY

Die engl. *Structured Illumination Microscopy* arbeitet mit strukturierter Beleuchtung, wodurch Interferenzmuster entstehen. Der sogenannte Moiré-Effekt liegt vor. Durch eine Gitterprojektion in die Fokusebene, welche auf das Objekt und die Anregungswellenlänge präzise abgestimmt ist, entsteht ein Interferenzmuster [74]. Da das verwendete Gittermuster bekannt ist, kann das entstandene Moiré-Muster durch spezielle Kamerasysteme (EMCCD, engl. *Electron-*

multiplying charge-coupled device) Informationen über die unbekannte Probe liefern. Die Berechnung der unbekanntenen Probe aus dem detektierten Moiré-Muster liefert eine höhere räumliche Auflösung als die herkömmliche beugungsbegrenzte Lichtmikroskopie [65].

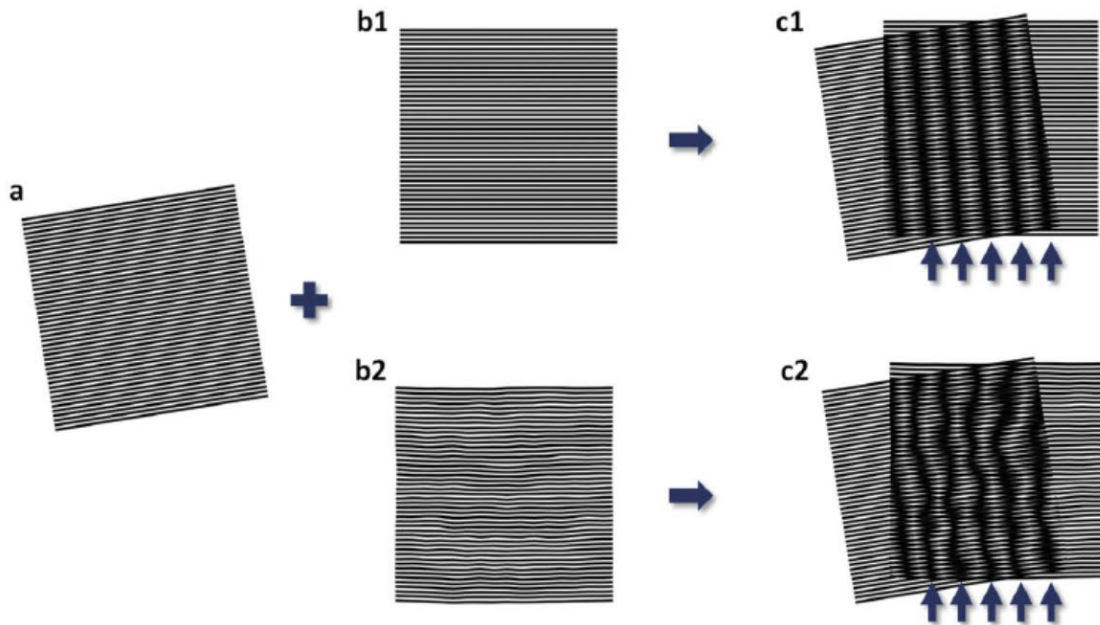


ABBILDUNG 8. MOIRÉ-EFFEKT DURCH INTERFERENZ.

DIE ÜBERLAGERUNGEN ZWEIER HOCHFREQUENTER RASTER A) UND B) ERGEBEN TIEFERFREQUENTE MOIRÉ-MUSTER (C, PFEILE). DIE ÜBERLAGERUNG ZWEIER GERADLINIGER RASTER (A UND B1) ERGIBT AUCH GERADLINIGE MOIRÉ-MUSTER (C1). WENN EINE ÜBERLAGERUNGSKOMPONENTE ZUM BEISPIEL UNREGELMÄßIG GEWELLT IST (B2), VERÄNDERN SICH DIE MOIRÉ-MUSTER ENTSPRECHEND (C2). IST, WIE BEI DER SIM-MIKROSKOPIE, DIE KOMPONENTE A) BEKANNT, KANN MAN AUS DEN TIEFEREN FREQUENZEN DES AUFGENOMMENEN BILDES (C) DIE HOHEN FREQUENZEN (FEINERE DETAILS) DER PROBE MATHEMATISCH BERECHNEN. QUELLE: HOCHAUFLÖSENDE MIKROSKOPIE (ROMEIS. MIKROSKOPISCHE TECHNIK, 2015) [65].

Für die Aufnahme eines SIM-Bildes wird das Gitter in mehreren Ebenen über das Sichtfeld verschoben und zusätzlich in jeder Ebene in verschiedene Orientierungen positioniert [65].

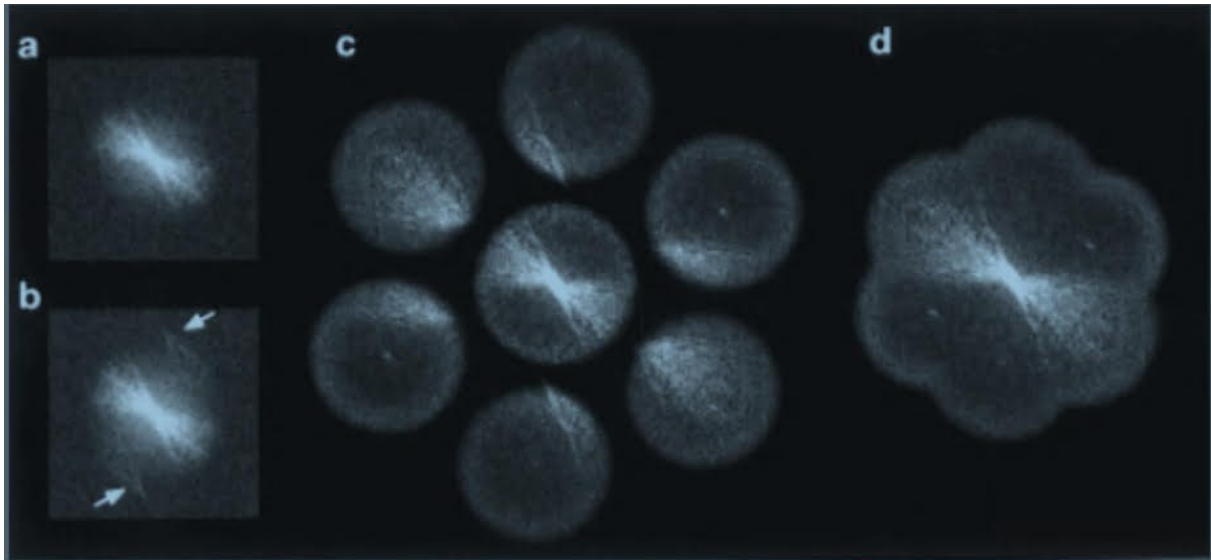


ABBILDUNG 9. ENTSTEHUNG EINES SIM-BILDES.

A) BEUGUNGSBEGRENZTES BILD. B) FINALES, AUS ALLEN BILDERN IN C) ZUSAMMENGESETZTES SIM-BILD. C) UND D) ERWEITERUNG DES FREQUENZSPEKTRUMS DURCH INTERFERENZBILDER. QUELLE: *SURPASSING THE LATERAL RESOLUTION LIMIT BY A FACTOR OF TWO USING STRUCTURED ILLUMINATION MICROSCOPY* (GUSTAFSSON, 2000) [74].

2.6.2 PALM – PHOTOACTIVATED LOCALIZATION MICROSCOPY

Bei der engl. *Photoactivated localization microscopy* (PALM) können die mit Fluoreszenz markierten Moleküle lichtgesteuert an- und ausgeschaltet werden, wodurch einzelne Moleküle in hoher Dichte (bis zu $10^5 / \mu\text{m}^2$) isoliert betrachtet werden können. Durch eine anschließende Computerberechnung können intrazelluläre Proteine mit räumlicher Auflösung im Nanometerbereich ermittelt werden [64].

Die engl. *Photoactive fluorescent proteins* (PA-FPs) transformierten viele Wissenschaftsbereiche. Diese fluoreszierenden Proteine sind in ihrem Grundzustand dunkel oder emittieren in einem nicht sichtbaren Spektralbereich. Die Fluoreszenzeigenschaften von photoaktivierbaren Proteinen sind durch die Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, Intensität und Dauer kontrollierbar [75] [76]. Werden die PA-FPs für einen relativ kurzen Zeitraum angeregt, aktiviert dies nur einen kleinen Anteil der in der Probe enthaltenen Moleküle und so können sie voneinander isoliert betrachtet werden. Ihre Zentren werden bestimmt und aufgezeichnet. Bei weiterer Beleuchtung bleichen diese aus und eine neue Gruppe von Molekülen wird aktiviert, indem ein neuer Lichtimpuls gesendet wird [77]. Dieser Prozess der Photoaktivierung, Messung und Bleichung wird dann für viele Zyklen über 10^4 bis $>10^5$ Bilder (je nach Expressionsniveau und räumlicher Verteilung der PA-FPs) wiederholt, bis die Koordinaten jedes Moleküls in der Probe bestimmt sind. Die gesamte Positionsinformation aller Untergruppen wird dann zu einem Super-Resolution-Bild zusammengesetzt [64].

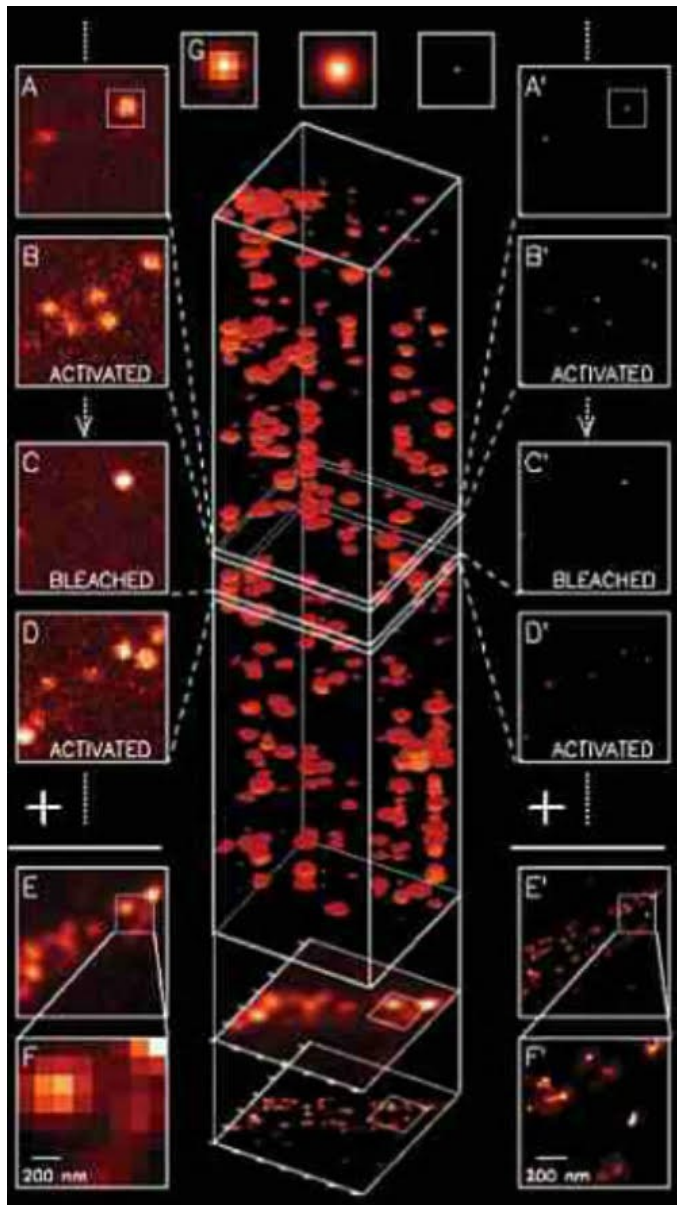


ABBILDUNG 10. PRINZIP VON PALM.

QUELLE: ABBILDUNG UND ABBILDUNGSBESCHRIFTUNG ANGELEHNT AN *IMAGING INTRACELLULAR FLUORESCENT PROTEINS AT NANOMETER RESOLUTION* (HARMERS ET AL., 2006) [84].

Teilmengen von photoaktivierbaren fluoreszierenden Proteinmolekülen werden mit einem Laserimpuls bei $\lambda_{act}=405$ nm aktiviert (A und B) und dann bei $\lambda_{exc}=561$ nm abgebildet, bis die meisten ausgebleicht sind (C). Dieser Vorgang wird so oft wiederholt (C und D), bis die Population der inaktivierten, ungebleichten Moleküle erschöpft ist. Die Summierung aller Molekülbilder ergibt ein beugungsbegrenztes Bild (E und F). Bestimmt man jedoch zunächst die Position jedes Moleküls, indem man das erwartete Molekülbild, das durch die engl. *Point spread function* (PSF) des Mikroskops gegeben ist [(G), Mitte], an das tatsächliche Molekülbild anpasst [(G), links], so kann das Molekül [(G), rechts] als Gaußkurve dargestellt werden. Wenn man die Moleküle in allen Einzelbildern (A' bis D') abbildet und die Ergebnisse addiert, erhält man ein Super-Resolution-Bild (E' und F'). Dabei ist die Helligkeit proportional zur Wahrscheinlichkeit, dass ein PA-FP-Molekül an einer bestimmten Stelle gefunden werden kann [64].

III. MATERIAL UND METHODEN

Alle Materialien, welche für die Experimente mit den Zellkulturen verwendet wurden, sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

TABELLE 3. LISTE DER ZELLINIEN, CHEMIKALIEN, MATERIALIEN UND GERÄTE, WELCHE FÜR DIE EXPERIMENTE MIT DEN ZELLKULTUREN VERWENDET WURDEN.

Produkt	Hersteller	Katalog-/ Bestellnummer
ZELLINIEN		
Cellartis humane iPSC Line 22 (ChiPSC22) Kit	Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan	Y00325
H9 humane ESC-Derivate	Arbeitsgruppe Alexandre Cola, Kalifornien, USA	
W4 αMHC ESC		
CHEMIKALIEN		
FCS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	S0615-500ML
Zellshield	Minerva Biolabs GmbH, Berlin, Deutschland	13-0150
DMEM mit Glukose (4,5 g/l) und stabilem L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland	FG0435
Nicht essentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland	K0293
LIF (10 ⁷ U/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	ESG1107
β-Mercaptoethanol (50mM)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany	31350-010
Isocove Basal Medium	Biochrom GmbH, Berlin, Germany	F0465
1-Thioglycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	M6145-25ML
Ascorbinsäure (221 mM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	A8960

Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	035K0166
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	A7906-100G
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	035K1609
1.AK (Anti-Sarkomer α -Aktinin)	Abcam, ab9465, USA	GR3246106-5
2.AK (Ziege Anti-Maus AlexaFlour647)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland	A-21237
10% Glucose	ICN Biomedicals, Eschwege, Deutschland	194024
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	3957.1
Tris-HCL	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	T6066-100G
Katalase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	C40-1G
Pyranoseoxidase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	P4234-250UN
Cysteamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	30070-10g
Cyclooctatetraen	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	138924-1G
Puromycin	Gentaur Molecular Products BVBA InvivoGen, Kampenhout, Belgien	ant-pr
Mounting Medium Fluoroshield mit DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	F6057
Matrigel	Discovery Labware, Inc Bedford, USA	356231
Destilliertes Wasser (Nukleasefrei)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	T143.3

Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-103-922
Akkutase	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	SCR005
Gelatine	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	G9391-100G
Hygromycin	Gentaur Molecular Products BVBA InvivoGen, Kampenhout, Belgien	ant-hg
PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	PAN - Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland	P04-36500
Trypanblau Farbstoff, 0,4%	Life Technologies, Waltham, MA, USA	15250-061
RPMI 1640, Glutamax	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland	61870-010
Cardiac supplement	Zur Verfügung gestellt durch die Arbeitsgruppe Alexandre Cola, Kalifornien, USA	
B27 Supplement ohne Insulin	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland	A1895601
STEMdiff Cardiomyocyte Dissociation Kit	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Canada	05025
MATERIALIEN		
Serologische Pipette, 2 ml	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz	94002
Serologische Pipette, 5 ml	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz	94005
Serologische Pipette, 10 ml	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz	94010

Serologische Pipette, 25 ml	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz	94025
Zellkulturflasche, 25 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	690170
Zellkulturflasche, 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	658175
Zentrifugiertube, 15 ml	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz	91015
Zentrifugiertube, 50 ml	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz	91050
6-Loch-Zellkulturplatte	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz	92006
12-Loch-Zellkulturplatte	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz	92012
24-Loch-Zellkulturplatte	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz	92024
48-Loch-Zellkulturplatte	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz	92048
Glasobjektträger mit 8 Kammerunterteilung	Ibidi, Martinsried, Deutschland	80827
Parafilm M Verschlussfolie	Hecht-Assistent, Sondheim vor der Rhön, Deutschland	120221
Sphericalplate 5D	Kugelmeiers Ltd., Erlenbach, Schweiz	
Mikrostrukturierte Objektträger (Micropatterned Coverslips for immunofluorescence observation), 24 mm, Linien	4Dcell, Montreuil, Frankreich	Custom-made

GERÄTE		
Mikroskop Zeiss LSM 780 - ELYRA PS.1 + Öl	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany	1006010
Bildanalyseprogramm ImageJ		https://imagej.nih.gov/ij/
Automated cell counter TC20	Bio-Rad Laboratories, Inc., Munich, Germany	508BR03130
Dual chamber für automatischen Zellzähler	Bio-Rad Laboratories, Inc., Munich, Germany	145-0011
Multifuge 1S-R, Heraeus	Thermo Electron Corporation, Osterode, Germany	75004331
Waver W-150	VWR International, Radnor, USA	444-7011

QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

3.1 ZELLKULTUREN

Alle Schritte dieses Protokolls erfolgten nach den Richtlinien der Ethikkommission des Rostocker Universitätsklinikums.

Ebenfalls erfolgte die Durchführung der Zellexperimente unter streng sterilen Bedingungen.

3.1.1 W4 ALPHA MHC – MURINE EMBRYONALE STAMMZELLEN

3.1.1.1 ZELLINIE

Die W4 α MHC Zelllinie wurde aus murinen embryonalen Stammzellen generiert und genetisch so verändert, dass während der Differenzierung nach Zugabe des Antibiotikums Puromycin eine Selektion der gewünschten KM stattfindet. Dafür weisen diese Zellen eine Puromycin-Resistenz unter der Kontrolle des herzspezifischen α MHC Promotors auf. Unter einem Promotor versteht man eine DNA-Sequenz, die vor dem Gen, sprich stromaufwärts des Startcodons, liegt und die Transkription reguliert. Er ist die Bindestelle für die RNA-Polymerase beim Transkriptionsstart [78]. Kommt es also zur herzspezifischen Zellausreifung durch den α MHC-Promotor, wird zusätzlich die Puromycin-Resistenz transkribiert. Somit können innerhalb von

12-24 Stunden bis zu 99% der undifferenzierten Zellen sowie Zellen anderer Gewebetypen abgetötet werden.

Die Zellen wurden kryokonserviert und bei einer konstanten Temperatur von $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff gelagert.

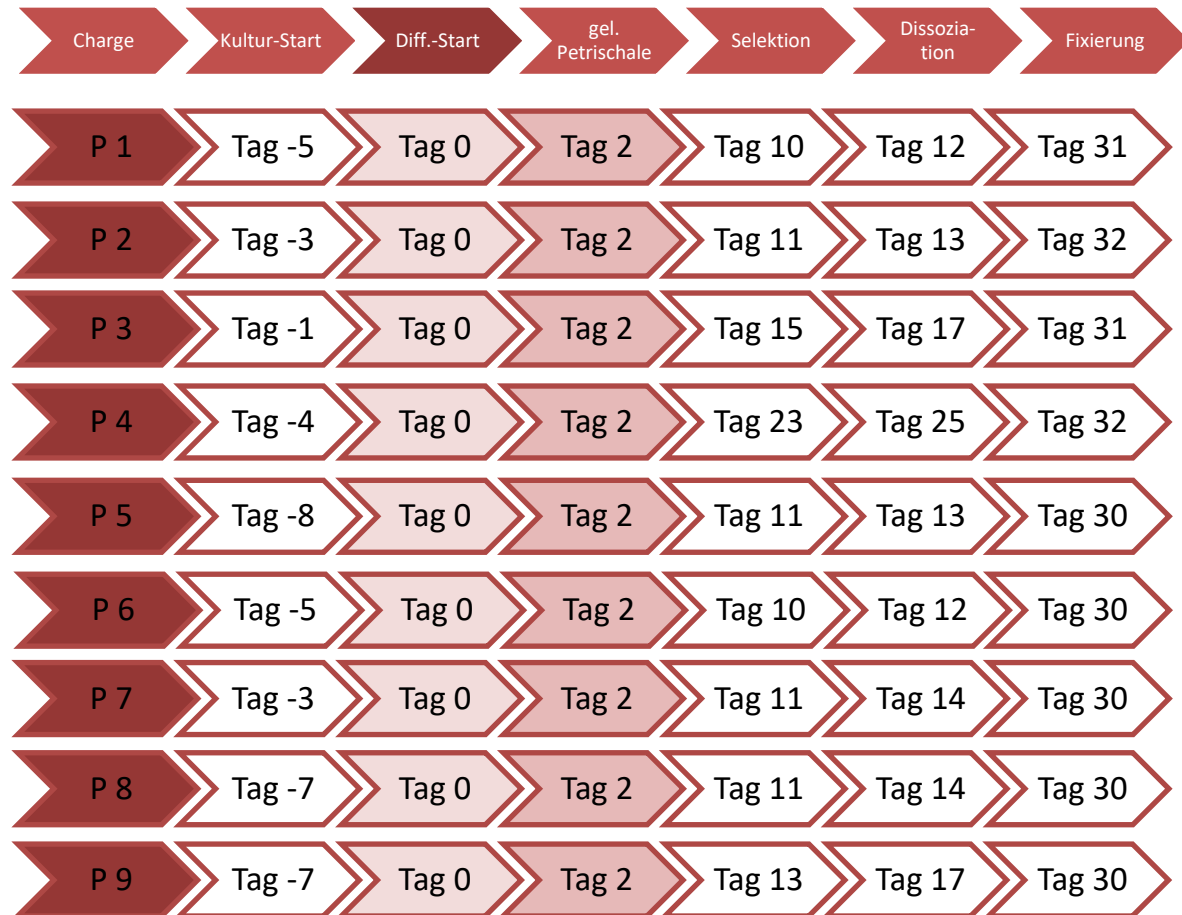


ABBILDUNG 11. ZEITSTRAHL DER MESC KM (W4 ALPHA MHC).

FÜR DEN DIFFERENZIERUNGSSTART, DIE SELEKTION UND DIE DISSOZIATION GAB ES KEINEN FESTGELEGTE ZEITPUNKT. NACH EINER LICHTMIKROSKOPISCHEN KONTROLLE WURDE SICH CHARGENINDIVIDUELL FÜR ODER GEGEN DEN NÄCHSTEN SCHRITT ENTSCHEIDEN (JE NACH KONFLUENZ, KONTRAKTIONSAKTIVITÄT, ABLÖSEN DES ZELLRASENS VON DER PETRISCHALE ETC.). QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

3.1.1.2 KULTIVIERUNG

TABELLE 4. CHEMIEKALIENLISTE FÜR DAS W4 ALPHA MHC KULTURMEDIUM (500 ML).

Chemikalien	Konzentration	Verwendetes Volumen
DMEM mit Glukose (4,5g/l) und stabilem L-Glutamin		415 ml
FCS (fötales Rinderserum)	15 %	75 ml
Zellshield	1 %	5 ml
Nicht essentielle Aminosäuren (100x)	100 µM	5 ml
LIF (Leukemia inhibitory factor) (10 ⁷ U/ml)	1000 U/ml	50 µl
β-Mercaptoethanol (50mM)	100 µM	1 ml

QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

Zum Auftauen der Zellsuspension wurde das Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C geschwenkt. Der Kern sollte dabei noch gefroren bleiben. Die Suspension wurde in 5 ml Kulturmedium gelöst und 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Um die Anzahl der vitalen Zellen in der Suspension zu bestimmen, wurde die Trypanblau-Färbungsmethode angewandt [79]. Trypanblau durchdringt die perforierte Membran von abgestorbenen Zellen und färbt diese somit blau an. Von lebenden Zellen hingegen wird der Farbstoff nicht aufgenommen. Dadurch ist eine Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen möglich. Hierzu wird die Stammzellsuspension in einem 0,5 ml Mikroreaktionsröhrchen im Verhältnis 1:1 und einem Zielvolumen von 20 µl mit Trypanblau verdünnt. Die Lösung wurde nun durch den Automated Cell Counter (Bio-Rad) auf vitale Zellen überprüft.

Für die Primärkultur wurden die Stammzellen mit einer Dichte von 15.000 Zellen/cm² beziehungsweise 20.000 Zellen/cm², angepasst an den gewünschten Zeitpunkt der Ernte, direkt auf 25 ml Zellkulturflaschen überimpft. Hinzugefügt wurden 2,5 µl Hygromycin/ml Kulturmedium. Das Beimengen von Hygromycin zum Kulturmedium wurde ab diesem Zeitpunkt beibehalten. Sobald die Zellen Subkonfluenz (ca. 80% Konfluenz) erreichten, wurden sie in die nächsthöhere Passage überführt. Bei diesem Schritt wurde meist eine weitere Differenzierung gestartet. Die Ablesung der Platten erfolgte folglich nach 3 bis 8 Tagen Bebrütung bei 37°C und 5% CO₂ (siehe Abbildung 11). Je nach Zellüberstand wurde täglich oder jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel beziehungsweise ein halber Mediumwechsel durchgeführt. Generell erfolgte am ersten Tag nach dem Aussäen stets ein Mediumwechsel, bei dem immer mit PBS gespült wurde.

3.1.1.3 DIFFERENZIERUNG

DIFFERENZIERUNG – START

TABELLE 5. CHEMIEKALIENLISTE FÜR DAS W4 ALPHA MHC DIFFERENZIERUNGSMEDIUM (500 ML).

Chemikalien	Konzentration	Verwendetes Volumen
Isocove Basal Medium		438 ml
FCS	10 %	50 ml
Zellshield	1 %	5 ml
Nicht essentielle Aminosäuren (100x)	100 µM	5 ml
Thioglycerol (80 µl in 1920 µl Medium, sterile Filtration)	450 µM	500 µl
Ascorbinsäure	734 µM	1,66 ml

QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

Ein wichtiger initialer Schritt bei der direkten Differenzierung von Stammzellen ist die Herstellung von Embryoid Bodies (EB). Dies sind Zellaggregate, welche gebildet werden, wenn Stammzellen ohne Oberflächenkontakt kultiviert werden. Diese zeigen einen gewissen Grad an Selbstorganisation, was Aspekte der frühen embryonalen Entwicklung nachahmt [80]. Die Generierung der EB erfolgte lange Zeit bevorzugt mit der Methodik des "hängenden Tropfens" [81]. Hier werden sogenannte *Sphericalplates* 5D von der Firma Kugelmeier (siehe Abbildung 12) verwendet. Diese reproduzieren durch die exakt ermittelte Größe und Form der *Microwells* eine physiologische Umgebung und verhindern durch eine spezielle Nanobeschichtung das Anheften von Zellen an der Oberfläche.



ABBILDUNG 12. KUGELMEIER *SPHERICALPLATES* 5D.

DIE *SPHERICALPLATES* REPRODUZIEREN DURCH DIE GRÖÖE UND FORM IHRER MICROWELLS EINE PHYSIOLOGISCHE UMGEBUNG UND VERHINDERN DURCH EINE NANOBESCHICHTUNG DAS ANHEFTEN VON ZELLEN. QUELLE: KUGELMEIER *SPHERICALPLATES* 5D (KUGELMEIERS) [82].

Die benötigte Anzahl der Wells in der Kugelmeier-Platte wurden mit PBS benetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dies begünstigt, dass beim Beimpfen der Platte keine Luftblasen das Verteilen der Stammzellen in den Vertiefungen verhindert.

Das Kulturmedium in den Zellkulturflaschen wurde abgenommen. Nun wurde der Zellrasen zum enzymatischen Ablösen mit Akkutase bedeckt und für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Akkutase-Reaktion wurde durch das Hinzufügen der doppelten Menge an Kulturmedium gestoppt. Die Zellsuspension einer Kulturflasche wurde in ein 15 ml Flacon überführt und für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml Differenzierungsmedium aufgenommen. Anschließend wurde die vitale Zellzahl mittels dem Automated Cell Counter (Bio-Rad) bestimmt und die benötigte Zellsuspension hergestellt.

Ein Well der *Sphericalplates* 5D besitzt 750 Vertiefungen, in der sich jeweils ein EB bilden sollte. Pro Vertiefung, sprich pro EB, wurden 400 Zellen ausgesät. Hierzu wurde eine Lösung mit Differenzierungsmedium angefertigt, welche 300.000 Zellen pro Well (750x400) garantierte, wenn man dieses mit 2 ml Lösung befüllte (150.000 Zellen/ml).

DIFFERENZIERUNG – KONTRAKTION

Die *Sphericalplate* 5D wurde zwei Tage bei 37°C bebrütet. Während des ersten Differenzierungstages wurde eine 10 cm² Petrischale mit 7 ml einer 0,2 % Gelatine beschichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Tag zwei wurden die EB auf die gelatierte Platte übertragen.

Hierzu wurde die Kugelmeier-Platte angeschrägt und das vorhandene Medium mit einer 10ml-Pipette vorsichtig über die Vertiefungen gespült, um die EB aus diesen zu lösen. Die Suspension wurde in einen 15 ml Flacon überführt. Das geleerte Well wurde mehrmals mit PBS nachgespült (ebenfalls in den Flacon) und lichtmikroskopisch auf ein eventuelles Verbleiben von EB geprüft, um diese noch in den Flacon zu übertragen. Nach zehn Minuten Standzeit haben sich die EB am Flaconboden abgesetzt. Die Zellen wurden nach Abzug des Überstandes mit PBS gewaschen und nochmals zum Absetzen der EB stehen gelassen. Der PBS-Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 10 ml Differenzierungsmedium resuspendiert.

Die Gelatine-Lösung der Petrischale wurde dekantiert. Zu Beginn, bei den Passagen P1 und P2, wurden die 10 ml Zellsuspension noch auf zwei gelatierte Petrischalen aufgeteilt. Ab Passage P3 wurden die EB eines Kugelmeier-Well jedoch auf nur noch eine gelatierte Petrischale übertragen. Dies gewährleistete einen dichteren Zellrasen sowie eine stärker ausgeprägte Kontraktionsaktivität.

Während der weiteren Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte ein Differenzierungsmediumwechsel, nach Bedarf inklusive Waschung mit PBS, alle zwei bis drei Tage. Nach ca. sieben Tagen begannen die Zellen vereinzelt zu schlagen. Die Aktivität wurde täglich unter dem Lichtmikroskop geprüft und es konnte beobachtet werden, wie sich ein Zellrasen ausbildete. Nach zehn- (bei zwei Passagen), elf- (bei vier Passagen), 13-, 15- beziehungsweise 23-tägiger (jeweils bei einer Passage) Kultur kontrahierten die EB fast vollständig (siehe Abbildung 11). Lichtmikroskopisch waren mehrere Kontraktionszentren pro Petrischale zu erkennen. Die Areale schlugen ungerichtet.

SELEKTION

Nachdem der Zellrasen einer Petrischale fast komplett schlug, wurde dem Differenzierungsmedium 2 µl Puromycin/ml Medium hinzugefügt. Dies diente der Antibiotika basierten Selektion. Ab diesem Zeitpunkt war nur noch ein halber Mediumwechsel (immer mit Puromycinzusatz) möglich, da sich die Zellen durch die Kontraktion und den induzierten Zelltod von der Petrischale ablösten. Der Zellauswuchs, der die schlagenden Cluster umgab, wurde zunehmend kleiner und die Schlagintensität selbst hatte sich intensiviert. Zu beachten war, dass die Zellen erst drei bis vier Stunden nach Mediumwechsel wieder zu schlagen begannen.

DISSOZIATION

Die Vereinzelung der Zellen erfolgte zwei bis vier Tage nach der initialen Puromycin-Gabe nach dem Protokoll des STEMdiff Cardiomyocyte Dissociation Kit. Einzelne Änderungen wurden vorgenommen. Diese werden im Folgenden beschrieben:

1. Im zweiten Schritt Zusatz von 1,5 ml Cardiomyocyte Dissociation Medium (Original 1ml/Well)
2. Anschließende Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für 14 Minuten (Original 10-12 Minuten)
3. Hinzufügen von 3 ml Cardiomyocyte Support Medium (Original 2 ml)
4. Anwendung eines 40µm-Filters, der vorher mit PBS benetzt wurde (Original mit 10ml-Pipette auf- und abpipettieren)
5. 5 Minuten bei 200 g für 5 Minuten zentrifugieren (Original 300 g)
6. Bei Schritt 7 das Pellet in 1-2 ml Differenzierungsmedium aufnehmen (Original in Cardiomyocyte Support Medium)

Dem Medium wurden zusätzlich 0,5 µl ROCK Inhibitor/ml hinzugefügt, welcher das Überleben der dissoziierten Zellen verbesserte [83].

Die vereinzelt Zellen wurden bis zu ihrer Fixierung weitere 14 bis 20 Tage kultiviert, um 30 bis 32 Tage nach Differenzierungs-Start fixiert zu werden. Die unterschiedliche Kultivierungsdauer ergab sich aus den verschiedenen Zeitpunkten der einsetzenden Kontraktion der Zellen sowie deren Aktivität. Ein Mediumwechsel, stets mit 2 µg Puromycin/ml, erfolgte nach Bedarf.

3.1.1.4 FIXIERUNG

30 bis 32 Tage nach Differenzierungs-Start wurden die Zellen, wie im späteren Protokollverlauf dokumentiert, fixiert. Wegweisend für die Terminierung war die vorhandene Kontraktion der Einzelzellen.

3.1.2 H9 – HUMANE VORDIFFERENZIERTER EMBRYONALE STAMMZELLDERIVATE

3.1.2.1 ZELLINIE

Die humane Zelllinie H9 wurde unserer Forschungsgruppe von der Arbeitsgruppe unter Alexandre Cola aus Kalifornien geschenkt. Diese wurden stammzellgesetzeskonform im Ausland erzeugt.



ABBILDUNG 13. ZEITSTRAHL DER H9 KM.

QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

3.1.2.2 KULTIVIERUNG

KULTUR – START

TABELLE 6. CHEMIEKALIENLISTE FÜR DAS H9 KULTURMEDIUM (50,5 ML).

Chemikalien	Konzentration	Verwendetes Volumen
RPMI 1640 + Glutamine		49 ml
Zellshield	1%	0,5 ml
Cardiac Supplement		0,5 ml
B27 minus Insulin		0,5 ml

QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

Die Zellen wurden im Wasserbad aufgetaut, in 3 ml vorgewärmtem Kulturmedium gelöst und anschließend bei 200 g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Zellpellet mit Kulturmedium auf ein Endvolumen von 2 ml und einmaligem Zusatz von 0,5 µl/ml ROCK Inhibitor resuspendiert. Die Zählung der vitalen Zellen erfolgte mittels Trypanblaufärbung im Verhältnis 1:1 mit dem automatischen Zellzähler. Die Kammern einer 12-Well-Platte wurden vorher mit Matrigel (Verhältnis 1:50) beschichtet und ein bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit 300.000 beziehungsweise 500.000 Zellen/Well beimpft. Nach Bedarf wurde ein Mediumwechsel mit eventueller Waschung mit PBS durchgeführt.

DISSOZIATION

An Tag sieben, zwei Tage nachdem der Zellrasen begann komplett zu kontrahieren, wurden die Zellen mit dem STEMdiff Cardiomyocyte Dissociation Kit vereinzelt. Auch hier wurden die schon genannten Änderungen des Protokolls (siehe Seite 28) angewandt. Im siebten Schritt wurde das Pellet in 1-2 ml Kulturmedium mit Zusatz von 0,5 µl ROCK Inhibitor/ml aufgenommen (Original in Cardiomyocyte Support Medium). Die dissoziierten Zellen wurden auf ibidi-Glasobjektträger und 48-Well-Deckgläschen, welche zuvor mit Matrigel beschichtet wurden, in unterschiedlicher Dichte (50.000, 75.000, 100.000/Well) ausgesät.

3.1.2.3 FIXIERUNG

Zwei Tage nach der Vereinzelnung wurden die Zellen, wie im späteren Protokollverlauf dokumentiert, fixiert. Länger sollte damit nicht gewartet werden, da sich sonst die Zellen vom Objektträger lösen und es während der Fixierung zur Bildung von Zelllagen und somit zu Artefakten kommt.

3.1.3 hiPSCs – HUMANE INDUZIERTE PLURIPOTENTE STAMMZELLEN

3.1.3.1 ZELLINIE

Die ausdifferenzierten, fixierten Zellen wurden mir von Dr. rer. nat. Heiko Lemcke zur Verfügung gestellt.

3.1.3.2 KULTIVIERUNG UND DIFFERENZIERUNG

Die hiPSC-Linie ChiPSC22 stammt von Takara Bio Europe AB (Göteborg, Schweden). Für die Reprogrammierung dieser Zelllinie zu PSCs wird ein retroviraler Vektor verwendet. Die PSCs wurden in iPS Brew (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) kultiviert, welches mit Zellshield ergänzt wurde. Das allgemeine Verfahren der kardialen Differenzierung wurde aus dem zuvor veröffentlichten Protokoll übernommen. Alle weitere Informationen zur Durchführung der Differenzierung speziell in diesem Versuch sind im Manuskript nachzuschlagen [84]. Die hiPSCs wurden nach 25 bzw. 40 Tagen Differenzierung mit dem Dissociation Kit vereinzelt.

3.1.3.3 FIXIERUNG

Anschließend wurden sie nochmals drei bis fünf Tage in einem 8-Well-ibidi beziehungsweise einem 4Dcell-Objektträger mit spezialisierter Oberflächentopografie mit linearen Vertiefungen von 20 µm Breite kultiviert, bevor sie, wie im späteren Protokollverlauf dokumentiert, fixiert wurden.

3.1.4 KARDIOMYOZYTEN NEONATALER UND ADULTER MÄUSE

Die Daten der adulten und neonatalen murinen KM, welche hier als Kontrollzellen dienen, wurden mir von Dr. rer. nat. Heiko Lemcke zur Verfügung gestellt.

Alle Forschungsschritte, welche neonatale und adulte Mäuse beinhalten, wurden gemäß den ethischen Richtlinien für die Tierhaltung der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt.

Die Isolierung und Kultivierung adulter Mäuse KM wurde, wie an anderer Stelle beschrieben durchgeführt [85]. Nach Injektion von Kollagenase 2/4-Lösung (Sigma Aldrich) in die linke Herzkammer wurde das Herzgewebe in kleine Stücke geschnitten und einzelne Zellen wurden mit einer 1-ml-Pipette gewonnen. Isolierte KM wurden auf kollagenbeschichteten Oberflächen ausgesät und einer Fluoreszenzmarkierung unterzogen.

Die Isolierung der neonatalen KM wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt [86].

Die isolierten Zellen wurden auf einen mit Gelatine beschichtete 8-Well-ibidi oder Glasdeckgläser ausgesät und in DMEM kultiviert, das mit 10 % FBS und 1 % Zellshield ergänzt wurde.

3.2 FIXIERUNG UND FÄRBUNG

Die Fixierung und Färbung aller untersuchten Zelllinien wurden auf die gleiche Art und Weise durchgeführt.

FIXIERUNG

TABELLE 7. CHEMIKALIEN FÜR DIE FIXIERUNG UND FÄRBUNG DER ZELLEN.

Chemikalien	Konzentration
PBS (Phosphate buffered saline) ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	
Triton X-100	0,2% (benötigte Konzentration immer neu mit PBS ansetzen)
BSA (Bovine Serum Albumin)	0,2 % (benötigte Konzentration immer neu mit PBS ansetzen) 10% (benötigte Konzentration immer neu mit PBS ansetzen)
Paraformaldehyde	4%
1.AK (Anti-Sarkomer α -Aktinin)	1:200 ibidi-Chamberslides und Deckgläser
2.AK (Ziege Anti-Maus AlexaFlour647)	1:100 ibidi-Chamberslides 1:300 Deckgläser
Mounting Medium Fluoroshield mit DAPI	

QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

Um ein optimales Ergebnis mit dieser Methode zu erzielen empfiehlt es sich, einen Tag vor Fixierung einen Mediumwechsel durchzuführen. Zur Fixation wurde auf 37°C erwärmtes Paraformaldehyd (4%) im Verhältnis 1:1 zum schon vorhandenen Medium vorsichtig am Rand in das Well pipettiert. Die finale PFA Konzentration entsprach somit 2%. Die Zellen wurden nun bei 37°C und 5% CO₂ für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und durch zwei Waschschrirte mit PBS (jeweils 5 Minuten auf dem Tischrüttler) sollten die nicht fixierten Zellen möglichst vollständig eliminiert werden.

FÄRBUNG

Nach der Fixierung folgte eine Inkubation mit 0,2% Triton-X 100 für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) zur Permeabilisation der Zellmembran. Danach wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen (jeweils 5 Minuten auf dem Tischrüttler). Darauf folgend mit 1% BSA für eine Stunde auf dem Tischrüttler bei RT inkubiert.

Der erste Antikörper (Anti-Sarkomer α -Aktinin) wurde im Verhältnis 1:200 mit 1% BSA gemischt. Für ein Deckgläschen der 48-Loch-Zellkulturplatte wurden 25 μ l und für eine der acht Kammern des Glasobjektträgers jeweils 150-200 μ l primäre Antikörperlösung verwendet. Die Lösung wurde direkt in die ibidi-Chamberslides pipettiert. Für die Deckgläschen wurde eine Pipettenspitzenhalterungsbox mit Parafilm so präpariert, dass 25 μ l der Antikörper-Lösung darauf pipettiert wurden und das Deckglas mit der beschichteten Seite auf den Tropfen gelegt wurde. Der Deckel wurde zur Abdunkelung mit Alufolie verkleidet. Nun folgte eine Inkubation bei RT für eine Stunde, nach der die Zellen zwei Mal mit 0,2% BSA gewaschen wurden (jeweils 5 Minuten auf dem Tischrüttler). Für die Waschung wurden die Deckgläschen wieder in die 48-Loch-Zellkulturplatte überführt.

Nun wurde die gleiche Menge Antikörperlösung mit dem sekundären Ziege-Anti-Maus Alexa 647 Antikörper im Verhältnis 1:300 für die Deckgläschen und 1:100 für die ibidi-Slides mit 1% BSA hergestellt. Die Färbung mit dem sekundären Antikörper erfolgte nach dem gleichen Schema wie die Färbung mit dem primären Antikörper. Nach der Inkubationszeit und den Waschschrirten wurden die Zellen zusätzlich noch zwei Mal mit PBS gewaschen (jeweils 5 Minuten auf dem Tischrüttler). Die fixierten Zellen in den ibidi-Glaskammerobjektträgern wurden mit PBS bedeckt und die Deckgläser mit Fluorshield mit DAPI auf Glasobjektträgern befestigt. Die Aufbewahrung bis zur Mikroskopie erfolgte bei Dunkelheit und 4°C.

3.3 MIKROSKOPIE

3.3.1 PALM – PHOTOACTIVATED LOCALIZATION MICROSCOPY

PALM IMAGING BUFFER

TABELLE 8. CHEMIEKALIENLISTE BASIC BUFFER (CA. 50 ML).

Chemikalie	Konzentration	Verwendete Menge
RNAse freies destilliertes Wasser		50 ml
Tris-HCl	50 mM	0,303 g
Glukose	10 %	5 g
Natriumchlorid	10 mM	500 µl
HCl	10 M	~ pH 8 einstellen

QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

TABELLE 9. CHEMIEKALIENLISTE PALM IMAGING BUFFER (500 ML).

Chemikalie	Konzentration	Verwendete Menge
Basic Buffer (siehe Tabelle 8)		500 µl
Pyranoseoxidase	0,6 mg Pyranoseoxidase in 316,5 µl Basic Buffer entspricht ca. 7,5 U bei 250 U/20 mg Stockkonzentration	0,6 mg
Katalase	7 mg Katalase in 500 µl Basic Buffer entspricht ca 140 U/ µl 10.000 U/mg Stockkonzentration	7 mg
Cysteamin (MEA)	100 mM	50 µl
Cyclooctatetraen	2 mM	5 µl
β-Mercaptoethanol	100 mM	3,5 µl
Glukose	50 %	100 µl

QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

Für verwertbare Ergebnisse muss der PALM Imaging Buffer vor jedem Experiment frisch hergestellt werden [87].

Für den Basic Buffer wurden 40 ml destilliertes Wasser in einen Glasbehälter gefüllt. Die in Tabelle 8 angegebenen Mengen von Tris-HCl, 10%iger Glucose und NaCl wurden hinzugefügt und durch den Einsatz eines Magnetfisches gelöst. Mit Hilfe von HCl wurde der pH-Wert der Lösung auf ca. 8 gesenkt. Die Salzsäure wurde langsam in die Lösung getropft. Der gewünschte pH-Wert wurde bei etwa 200 µl hinzugegebenem HCl erreicht. Die Lösung wurde nun in ein Zentrifugierröhrchen überführt und mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt.

Zur Herstellung der benötigten Pyranoseoxidase-Lösung wurden 0,6 mg Pyranoseoxidase in 316,5 µl Basic Buffer gelöst. Ebenso wurden 7 mg Katalase in 500 µl Basic Buffer gegeben und gevortext. Die Katalase-Lösung kann bei 4°C für mehrere Tage gelagert werden. 25 µl dieser Katalase-Lösung wurden dann der Pyranoseoxidase-Lösung beigemischt. Eben diesem Mikroreaktionsröhrchen wurden anschließend 50 µl Cysteamin, 5 µl Cyclooctatetraen, 3,5 µl β-Mercaptoethanol und zuletzt unverzüglich vor der Bildgebung 100 µl Glukose, da diese die Enzymaktivität startet, beigefügt. Die finale katalytische Aktivität der Pyranoseoxidase und der Katalase müssen 7,5 U beziehungsweise 35 U sein.

Der PALM Imaging Buffer garantiert optimale Bedingungen für 3-5 Stunden. Sobald die Blinkkapazität der fluoreszierenden Färbung nachlässt, sollte neuer Buffer verwendet werden.

PALM – EINSTELLUNGEN

Das Mikroskop wurde mindestens 3 Stunden vor Benutzung eingeschaltet. Der Inkubator wurde auf 30°C temperiert und es wurde gewährleistet, dass die zu mikroskopierende Probe bereits Raumtemperatur besaß.

Das Objektiv (100x) und die Unterseite des ibidi-8-Kammer-Glasobjektträgers wurden mit Alkohol gereinigt. Das PBS wurde aus der gewünschten Kammer abgezogen und diese mit 300 µl PALM Imaging Buffer aufgefüllt. Der Slide wurde nach Auftragung des Immersionsöls in die Piezo-Vorrichtung des Mikroskops eingesetzt.

Anschließend wurden die PALM Image Parameter eingestellt:

- 1,57 N.A. 100x Öl-Objektiv
- PALM Modus
- Aktivierung der TIRF Einstellungen
- gewünschte Anzahl der Bilder zwischen 5.000 und 10.000

! Achtung: Die Anzahl der benötigten Bilder hängt von der Färbungseffizienz sowie der Blinkkapazität der Fluoreszenz ab. Dies macht benutzerabhängiges Justieren unerlässlich.

- Filter: 655
- Format: 512x512

PALM – DURCHFÜHRUNG

Die UV-Laser Power wurde auf 0,1 % und die des 647er Lasers auf 0,2 % reduziert. Das Gain Level wurde färbungsspezifisch zwischen 20 und maximal 100 angesetzt. Dieses kann erhöht werden, falls die Signal Intensität nicht ausreicht.

Um einen geeigneten Bildausschnitt zu finden, wurde die Laserbeleuchtung verwendet (*Continuous-Button*). In diesem Schritt wurde ebenfalls der Focus (*Manually-Button, Stop-Button*) sowie die Stage (*Stop-Button*) eingestellt.

Nach Beenden der Zellsuche wurde das Gain Level auf 0 reduziert und die Power des Lasers (647) auf 100% erhöht. Durch die Betätigung des *Continuous-Button* wurde der Bildausschnitt für ca. 3 Sekunden gebleicht (*Stop-Button*).

Zum Aufnehmen des Bildausschnittes wurde das Gain-Level auf 30 erhöht und der *Start Experiment-Button* betätigt. Das Gain-Level wurde während der Aufnahme fortlaufend angepasst, um eine ausreichende Signalintensivität zu erhalten. Reduzierte sich diese, musste das Gain Level erhöht werden. Übersättigte Pixel wurden jedoch ebenfalls vermieden.

Optional wurde nach Erreichen des maximalen Gain-Levels von 250 kontinuierlich die UV Laser Power erhöht, um die Signalintensität zu verbessern. Dabei wurden 10% nicht überschritten.

3.3.2 3D SIM – 3D STRUCTURED ILLUMINATION MICROSCOPY

3D SIM – EINSTELLUNGEN

Das Mikroskop wurde mindestens 30 Minuten vor Benutzung eingeschaltet.

Das Objektiv (40x) und die Oberseite des Objektträgers wurden mit Alkohol gereinigt. Der Slide wurde nach Auftragung des Immersionsöls in die Piezo-Vorrichtung des Mikroskops eingesetzt.

Nun wurde die Mikroskopieebene lokalisiert (*Locate*). Dafür wurde die Einstellung *Transmitted light (Ph1)* verwendet. Die Suche wurde erleichtert, indem der Joystick des Mikroskops leicht bewegt wurde. Nachdem Zellen gefunden wurden, wurde die Durchleuchtung beendet (*Lights off*).

Im *Acquisition*-Programm wurden die 3D SIM Image Parameter eingestellt:

- Laser: 633

- Grading: 51 μm GS
- Filter: LP 655 dunkelrot
- SIM
- Frame: 1004x1002
- Averaging: 4 oder 1
- Bit Depth: 16 Bit
- 5 Rotations

3D SIM – DURCHFÜHRUNG

Average wurde auf eins gestellt und der *Continuous* Button betätigt. Nun wurde eine geeignete Zelle lokalisiert. Hierfür sollte die *Laserpower* zwischen zwei und zehn liegen sowie das *Gain* Level 30 nicht überschreiten. Für die korrekte Einstellung der Belichtung wurde der *Rage Indicator* verwendet. Um das gewünschte Areal einzustellen wurde in das *z-Stack* Menü gewechselt. So wurde sichergestellt, dass die zu mikroskopierende Zelle vollständig auf der Aufnahme abgebildet wird (*Z-Stack* \rightarrow *Set first* \rightarrow *Set last*). Werte zwischen ca. 9 und 15 μm wurden verwendet. Die Beleuchtung wurde gestoppt (*Stop*) und *Average* auf vier erhöht, bevor die Aufnahme gestartet wurde (*Start Experiment*).

3.4 REKONSTRUKTION

3.4.1 REKONSTRUKTION DER PALM-DATEIEN

Die Rekonstruktion und Nachbearbeitung erfolgte mit der Software *ImageJ* und dem *Thunderstorm Plugin* [88].

ImageJ wurde geöffnet und die PALM Datei importiert. Nach dem Öffnen des *Thunderstorm Plugins* wurde der Button *Run analysis* betätigt (*Plugin* \rightarrow *Thunderstorm* \rightarrow *Run analysis*). Zur Überprüfung der Kameraeinstellungen wurde das *Camera setup* Fenster geöffnet (*Plugin* \rightarrow *Thunderstorm* \rightarrow *Camera setup*). Die Pixelgröße verlief sich auf 100 nm, da ein 100x Objektiv und eine Magnificatin-Standardlinse (1,6x Vergrößerung) zur Aufnahme verwendet wurden. Generell hängt die Pixelgröße jedoch von den Hardware Einstellungen des Mikroskops und der Kamera ab. Da ein Gain-Level von 250 bei jeder Bildaufnahme angestrebt wurde, konnte dieser Wert hier übernommen werden. Eine Kontrolle erfolgte mit den Metadaten.

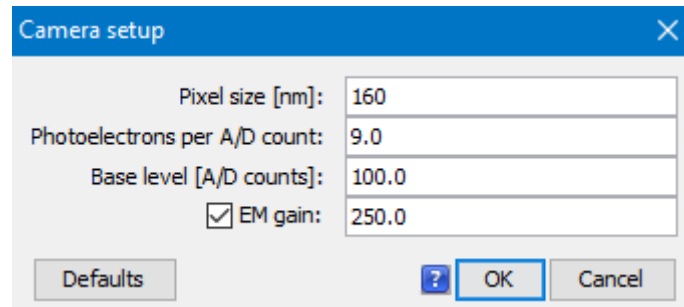


ABBILDUNG 14. CAMERA SETUPS BEI DER BEARBEITUNG VON PALM-DATEIEN.

DIE PIXELGRÖSSE HÄNGT VON DEN HARDWARE EINSTELLUNGEN DES MIKROSKOPS UND DER KAMERA AB. DIE GAIN-EINSTELLUNG VON 250 KANN HIER ÜBERNOMMEN WERDEN. QUELLE: BILDANALYSEPROGRAMM IMAGEJ [89].

Im Run analysis-Menü wurden folgende Parameter eingestellt:

- B-spine order: 3
- B-spine scale: 2
- Peak intensity threshold: `std(Wave.F1)`
- Fitting radius [px]: 3
- Initial sigma [px]: 1,6
- Magnification: 5
- Update frequency [frames]: 50
- Lateral shifts: 2

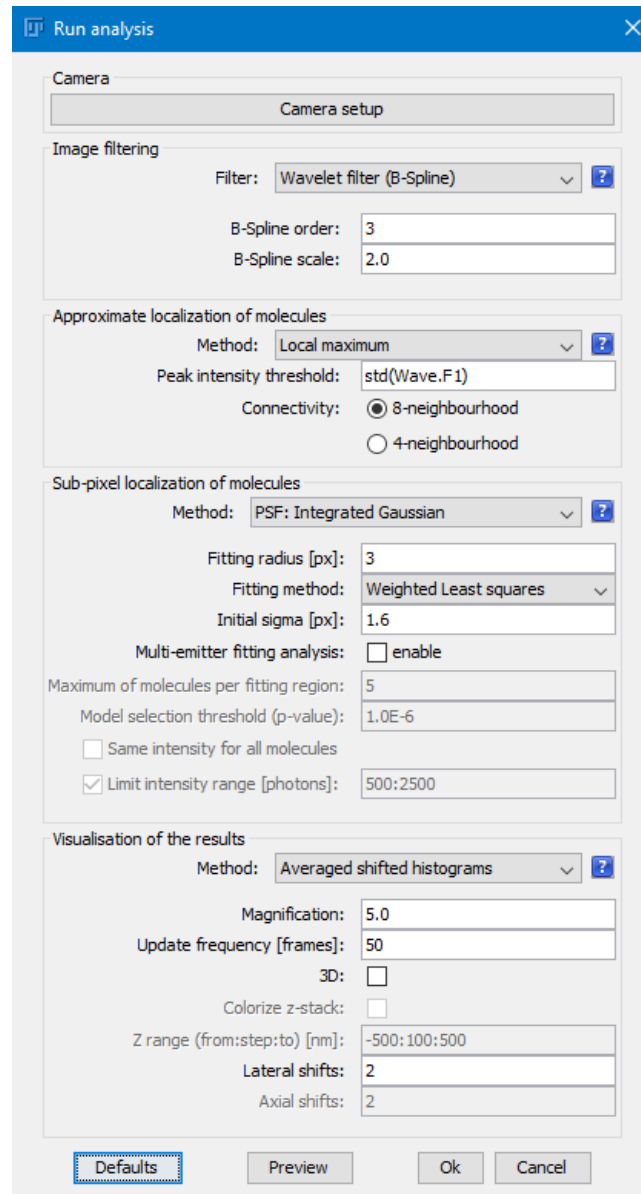


ABBILDUNG 15. RUN ANALYSIS SETUPS BEI DER BEARBEITUNG VON PALM-DATEIEN.

QUELLE: BILDANALYSEPROGRAMM IMAGEJ [89].

Die Eintragungen wurden mit *OK* bestätigt und die rekonstruierte Datei als csv File gespeichert.

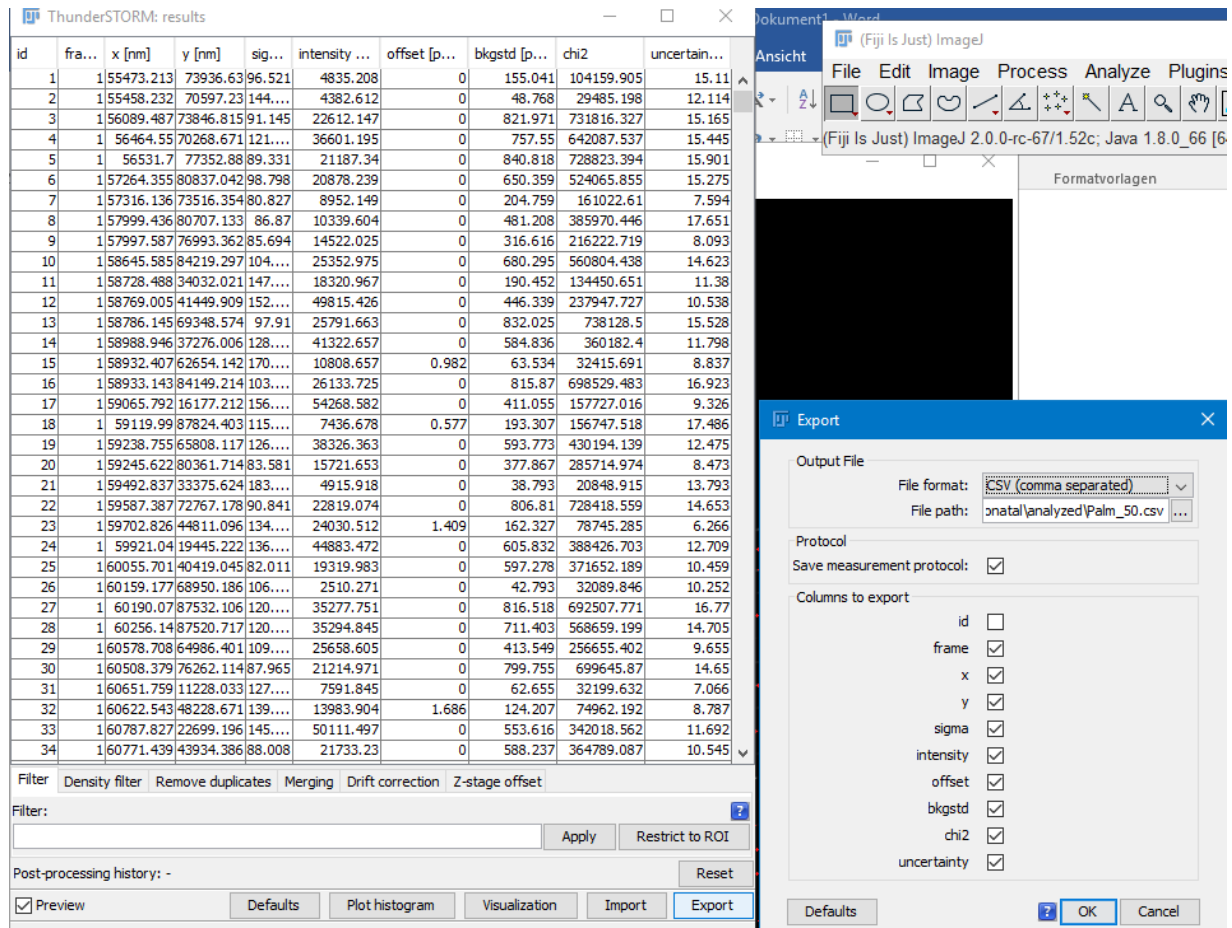


ABBILDUNG 16. THUNDERSTORM RESULTS BEI DER BEARBEITUNG VON PALM-DATEIEN.

DIE REKONSTRUIERTE DATEI WIRD ALS CSV FILE GESPEICHERT. QUELLE: BILDANALYSEPROGRAMM IMAGEJ [89].

Zur Nachbearbeitung wurde im *Plot histogram* Menü der Parameter *Sigma* ausgewählt (*Plot histogram* → *select parameter* → *sigma*). Um eine engl. *Region of interest* (ROI) zu markieren, wurde das *Rectangle Tool* verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, Artefakte auszuschließen (ROI → *Apply ROI to filter*).

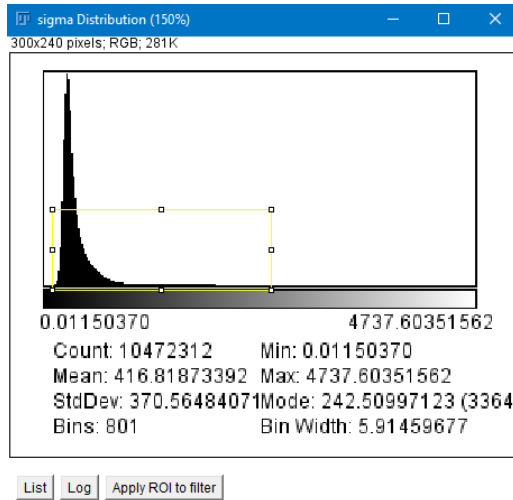


ABBILDUNG 17. ROI FILTER BEI DER BEARBEITUNG VON PALM-DATEIEN.

UM ARTEFAKTE ZU VERHINDERN, WIRD IN DIESER APPLIKATION EIN INTERESSENBEREICH AUSGEWÄHLT. QUELLE: BILDANALYSEPROGRAMM IMAGEJ [89].

Die ROI Werte erscheinen in der Filter Command Box.

id	fra...	x [nm]	y [nm]	sig...	intensity ...	offset [p...	bkgstd [p...	chi2	uncertain...
1	1	11191.827	32059.189	170...	166437.179	112731.552	2947.364	411.895	16.154
2	1	12508.013	6514.936	175...	194180806...	0	3822.847	336.981	1.894
3	1	13128.673	2228.79	204...	200568840...	0	4724.012	649.699	3.078
4	1	13082.955	2812.217	754...	6985613.246	160017.259	3968.478	435.318	10.15
5	1	13060.31	8204.812	161...	209372573...	0	5700.098	573.774	2.236
6	1	13488.769	6167.61	157...	176673854...	0	8260.11	1364.639	3.618
7	1	13817.998	5699.748	161...	185178923...	0	7234.343	1065.398	3.203
8	1	14282.458	7882.654	159...	226544209...	0	7762.215	938.77	2.723
9	1	14419.075	3250.301	141...	132615231...	0	7092.148	1116.631	3.377
10	1	14803.79	6936.3	141...	182532227...	0	9007.174	1279.644	3.086
11	1	14969.088	4196.609	161...	184458686...	0	5724.474	666.605	2.553
12	1	15070.972	3168.299	370...	2411025.049	238050.218	5555.652	615.431	9.898
13	1	15320.308	5824.713	493...	5593495.541	278428.996	8529.544	1184.308	11.624
14	1	15487.507	8575.152	163...	276848113...	0	8975.206	1073.19	2.703
15	1	15761.611	16306.024	126...	147303645...	222626.965	7100.138	493.116	2.426
16	1	16160.549	11817.334	991...	28579966...	409386.364	4576.419	222.879	4.932
17	1	16037.663	4746.282	225...	1422860.016	303534.072	10855.46	1974.495	12.134
18	1	16234.797	13158.617	875...	36199673.85	388862.596	8058.626	636.174	5.347
19	1	16357.342	7254.729	350...	2396242.02	379011.067	10226.547	1387.357	16.412
20	1	16320.935	3782.382	634...	5849536.852	231039.778	9756.998	1911.004	21.025
21	1	16728.463	1413.631	582...	7724457.855	182062.518	8048.289	1388.811	11.065
22	1	16751.809	14432.703	474...	2209891.293	551488.384	7406.823	524.08	23.665
23	1	17007.894	17509.941	518...	3029830.858	542991.306	6442.409	402.619	17.927
24	1	16701.212	940.877	383...	2293069.728	204382.979	10572.83	2453.608	21.297
25	1	16714.826	10638.401	161.06	438364.769	498204.465	10418.785	1163.843	19.32
26	1	16873.999	6439.49	270...	2108807.619	369706.674	12153.672	1944.212	13.201
27	1	17319.754	17005.859	309...	139570936...	0	5666.993	306.047	1.222
28	1	17261.207	9158.38	761.44	23563585...	343957.459	10994.607	1380.678	8.478
29	1	17609.308	8346.282	118...	62505967...	292510.991	7328.277	667.447	5.179
30	1	17597.765	19240.072	510...	3164408.107	543257.377	4880.058	227.375	12.603
31	1	17671.012	11522.336	194...	528699426...	0.008	12879.987	1644.259	2.898
32	1	17717.991	2310.184	278...	1431320.55	250773.24	11617.465	2714.61	19.705
33	1	17984.271	3475.172	218...	737460.551	298134.154	14814.04	3534.105	30.124
34	1	17943.476	6758.336	769...	28099927...	242567.718	11368.187	1723.901	7.515

ABBILDUNG 18. FILTER COMMAND BOX BEI DER BEARBEITUNG VON PALM-DATEIEN.

QUELLE: BILDANALYSEPROGRAMM IMAGEJ [89].

In das Filterfeld wurde der Zusatz *& uncertainty <25* hinzugefügt und mit *Apply* bestätigt. Folgende Parameter wurden nun zusätzlich eingetragen:

- *Remove duplicates*: 10 (→ *Apply*)
- *Merging*: Maximum distance: 20
Maximum frames per molecule: 0
Maximum of frames: 1
(→ *Apply*)
- *Drift correction*: Cross correlation → Number of bins: 5
Magnification: 5
(→ *Apply*)

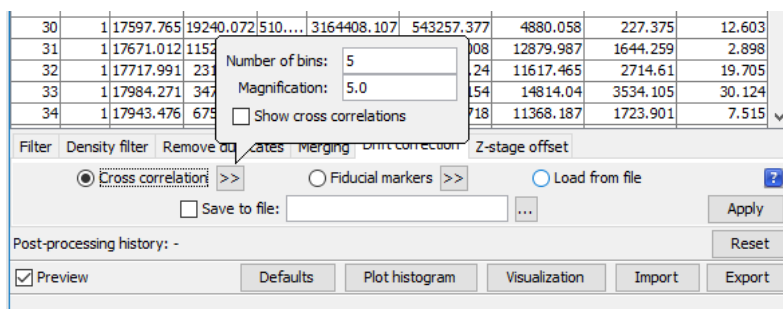


ABBILDUNG 19. *DRIFT CORRECTION* BEI DER BEARBEITUNG VON PALM-DATEIEN.

QUELLE: BILDANALYSEPROGRAMM IMAGEJ [89].

Die fertige PALM Datei wurde nun als Tiff Datei gespeichert. Hierfür wurde der *Visualization* Button gedrückt und *Magnification* auf 5 gestellt.

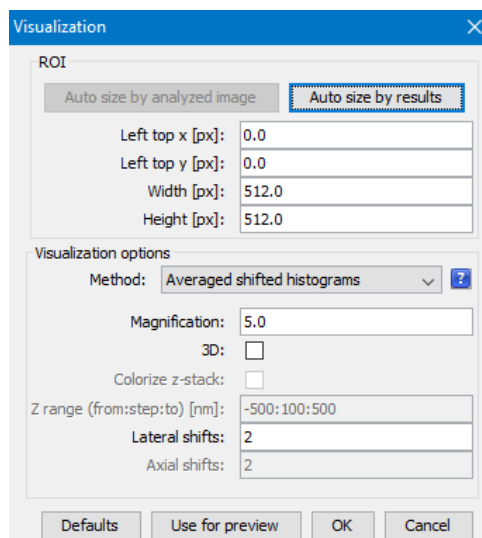


ABBILDUNG 20. *VISUALIZATION SETUPS* BEI DER BEARBEITUNG VON PALM-DATEIEN.

DIE *MAGNIFICATION* MUSS HIER AUF 5 GEÄNDERT WERDEN. QUELLE: BILDANALYSEPROGRAMM IMAGEJ [89].

3.4.2 REKONSTRUKTION DER 3D SIM-DATEIEN

Die Rekonstruktion der SIM-Dateien erfolgte mit der Mikroskop-Software von Zeiss.

Der *Processing* Button wurde ausgewählt und mit *Structured Illumination* fortgefahren (*Processing* → *Structured Illumination* → *Structured Illumination* → *Select*). *Processing* wurde hier auf *Manual* umgestellt, um den *Auto Noise Filter*-Haken zu entfernen. Anschließend wurde so der *Noise Filter* auf -3 justiert und bestätigt (*Manual* → ~~*Auto Noise Filter*~~ → *Noise Filter: -3* → *Apply*).

3.5 DATENAUSWERTUNG

3.5.1 PALM

3.5.1.1 SARKOMERLÄNGE

Um die Sarkomerlänge zu ermitteln wurde die rekonstruierte PALM Datei in ImageJ geöffnet. Mit der Einstellung *Segmented line* wurden zwischen 20 und 30 Sarkomerabstände in verschiedenen Arealen des Bildausschnittes manuell markiert. Hierbei wurde darauf geachtet, die Linie senkrecht zu den Z-Streifen auszurichten, um die kürzeste Distanz zwischen den Aktinin-Filamenten zu erhalten.

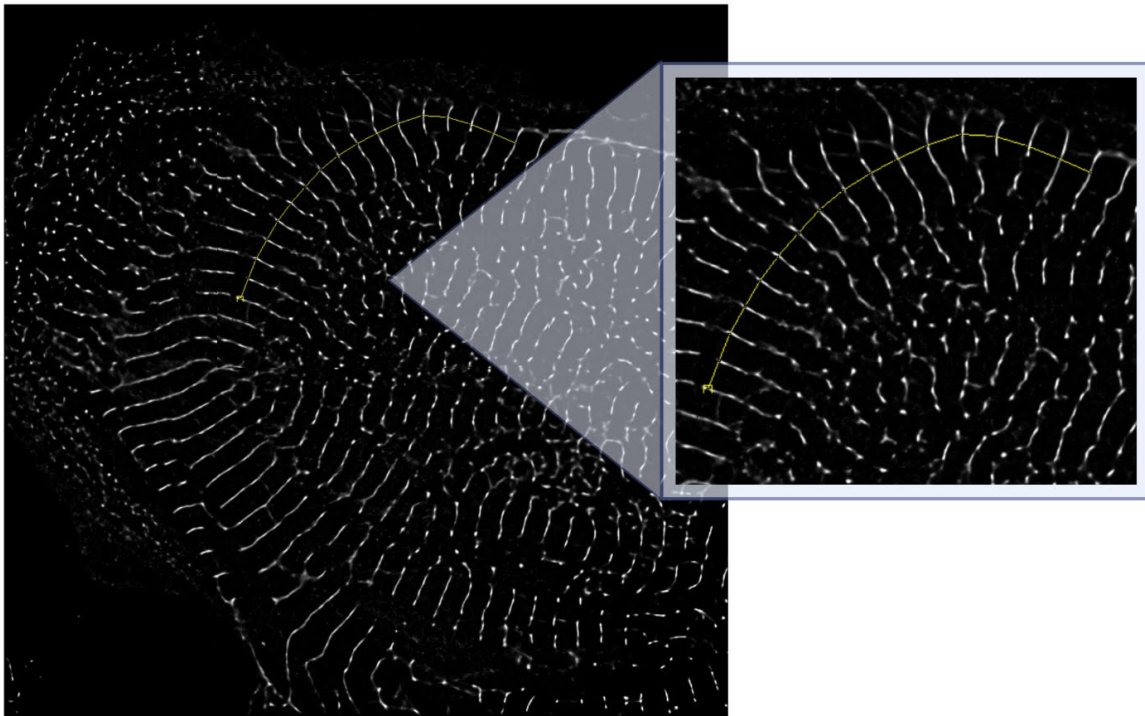


ABBILDUNG 21. MANUELLE MARKIERUNG DER SARKOMERABSTÄNDE BEI DER AUSWERTUNG VON PALM-DATEIEN.

HIERBEI MUSS DARAUF GEACHTET WERDEN, DIE LINIE ZWISCHEN DEN AKTININ-FILAMENTEN SENKRECHT ZU DEN Z-STREIFEN AUSZURICHTEN, UM DIE KÜRZESTE DISTANZ ZU ERHALTEN. QUELLE: BILDANALYSEPROGRAMM IMAGEJ [89] ERSTELLT MIT BIO-RENDER.COM [12].

Anschließend wurden diese Daten durch den *Analyze*-Button und die *Plot profile*-Einstellung in ein Periodensystem überführt (*Analyze* → *Plot profile*). Der Abstand zwischen zwei Spitzen wurde nun erneut manuell mit der Einstellung *Straight line* gemessen. Dabei wurde die *Shift*-Taste der Tastatur gedrückt gehalten und abschließend die Daten in den ROI Manager überführt (*Tools* → *ROI Manager* beziehungsweise *M*-Taste auf Tastatur). Eine Tabelle mit den Messdaten wurde generiert.

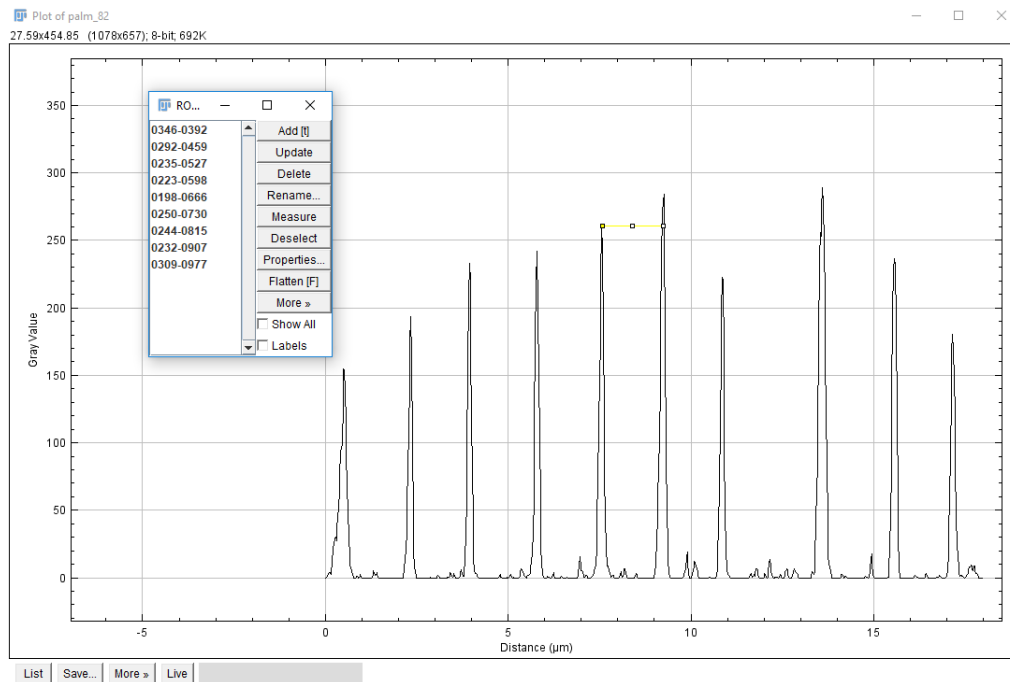


ABBILDUNG 22. MANUELLE MESSUNG DER SARKOMERLÄNGE BEI DER AUSWERTUNG VON PALM-DATEIEN.

MIT DER EINSTELLUNG *STRAIGHT LINE* UND GEDRÜCKTER *SHIFT*-TASTE WIRD DIE MESSUNG VORGENOMMEN. ANSCHLIEßEND WERDEN DIE DATEIEN IN DEN *ROI MANAGER* ÜBERFÜHRT. QUELLE: BILDANALYSEPROGRAMM IMAGEJ [89].

3.5.1.2 Z-STREIFENBREITE

Um die Z-Streifenbreite zu ermitteln wurde die rekonstruierte PALM Datei in ImageJ geöffnet und in eine 8-bit Datei konvertiert (*Image* → *Type* → *8bit*). Der *Ridge Detection Plugin* wurde geöffnet um folgende Einstellungen vorzunehmen (*Plugin* → *Ridge detection*):

TABELLE 10. EINSTELLUNGEN IM RIDGE DETECTION PLUGIN ZUR ERMITTLUNG DER Z-STREIFENBREITE

Optional_parameters	Mandatory_parameters
Line Width: 20	Sigma: 0,79
High Contrast: 230	Lower Threshold: 1,02
Low Contrast: 10	Upper Threshold: 25,84
	Minimum Line Length: 20
	Maximum Line Length: 0

QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG

- Estimate width
- Extended line
- DisplayResults

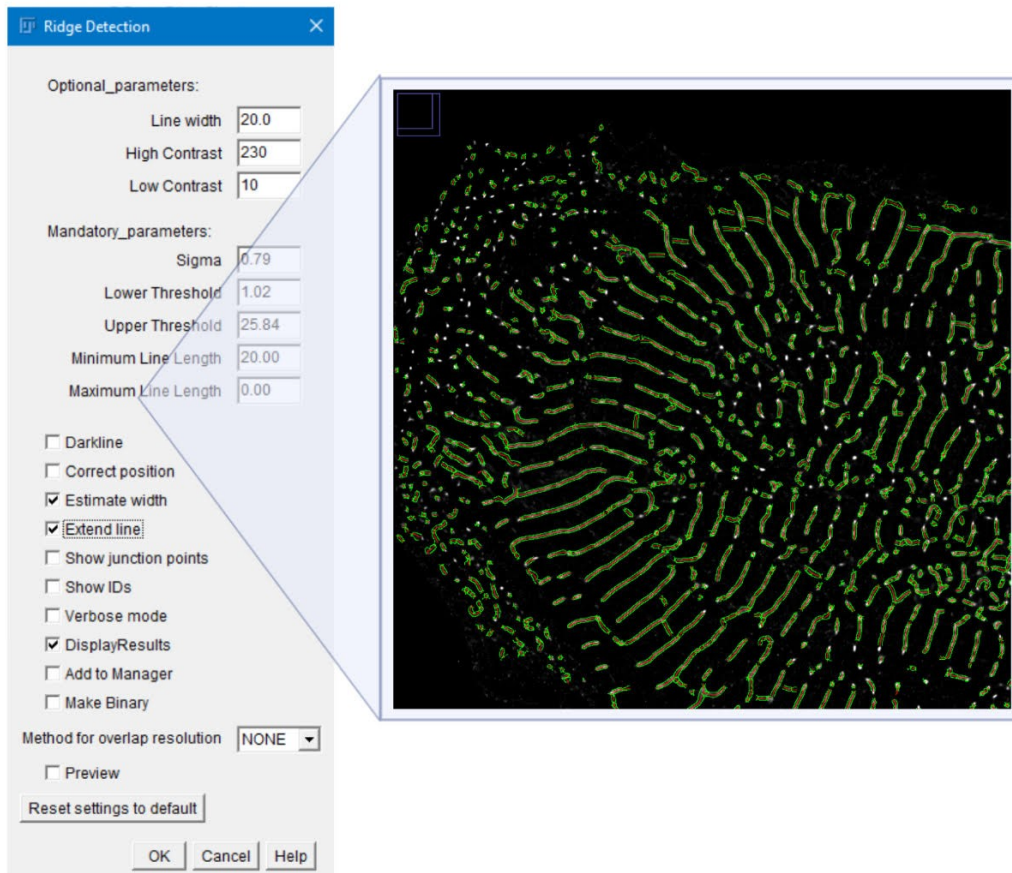


ABBILDUNG 23. *RIDGE DETECTION* PLUGIN ZUR BESTIMMUNG DER Z-STREIFENBREITE BEI DER AUSWERTUNG VON PALM-DATEIEN.

QUELLE: BILDANALYSEPROGRAMM IMAGEJ [89] ERSTELLT MIT BIORENDER.COM [12].

Bestätigt wurde mit *OK* und somit eine zusammenfassende Tabelle konfiguriert, von welcher die ersten 70 Werte von *length* (Länge) und *average width* (durchschnittliche Breite) übernommen wurden.

3.5.2 3D SIM

3.5.2.1 SARKOMERAUSRICHTUNG

Um die Sarkomerausrichtung zu ermitteln, wurde die rekonstruierte SIM Datei in ImageJ geöffnet und in die *Maximum projection* überführt (*Image* → *Stacks* → *Z Project*). Dies erlaubt eine 3D Datei als 2D Bild zu präsentieren. *Z-Projection* ist eine Analysemethode für Stacks, bei der verschiedene Projektionsverfahren für Pixel innerhalb des Bilderstapels angewandt werden. Dieser Prozess kann verwendet werden, um spezifische Werte des Stacks hervorzuheben [90]. Nun wurde die Zielzelle longitudinal ausgerichtet, indem das Bild rotiert wurde

(*Image* → *Transform* → *Rotate*). Bei *Angle (degrees)* wurde die Gradzahl der gewünschten Rotationsbewegung eingetragen. Ein positives Vorzeichen bewirkt eine Rotation nach rechts und ein negatives Vorzeichen eine Rotation nach links.

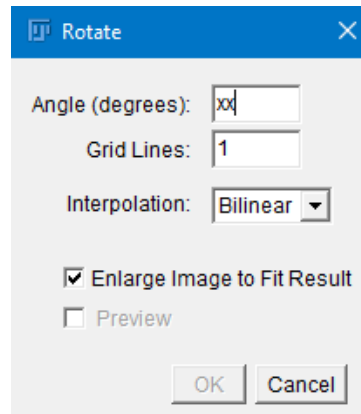


ABBILDUNG 24. *ROTATION SETUPS* BEI DER AUSWERTUNG DER SARKOMERAUSRICHTUNG VON SIM-DATEIEN. DIE ZIELZELLE WIRD HIER LONGITUDINAL AUSGERICHTET. QUELLE: BILDANALYSEPROGRAMM IMAGEJ [89].

Anschließend wurde die Zelle mit der Auswahl *Segmented line* manuell umfahren und ausgeschnitten (*Segmented line* → *Edit* → *Clear outside*).

Die Orientierung der Sarkomerstruktur wurde nun analysiert (*Analyze* → *directionality*) und anhand einer Tabelle abgebildet [91].

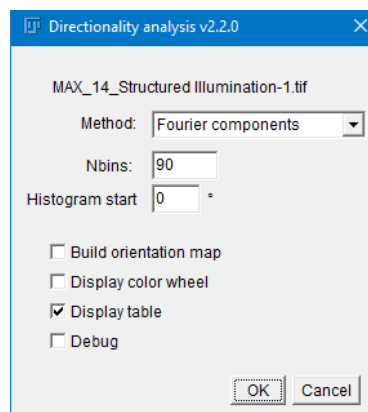


ABBILDUNG 25. *DIRECTIONALITY ANALYSIS PLUGIN* ZUR ERMITTLUNG DER SARKOMERAUSRICHTUNG BEI DER AUSWERTUNG VON SIM-DATEIEN.

DIESES ERSTELLT AUTOMATISCH EIN HISTOGRAMM UND EINE STATISTIK ÜBER DEN HÖCHSTEN PEAK, DER DIE HAUPTAUSRICHTUNG ANGIBT. QUELLE: BILDANALYSEPROGRAMM IMAGEJ [89].

Das *Directionality analysis-Plugin* wird zur Ermittlung der primär vorherrschenden Ausrichtung der Strukturen des Eingabebildes verwendet. Es erstellt ein Histogramm, das diese abbildet. Bei Bildern mit vollständig isotropem Inhalt erhält man ein flaches Histogramm, während bei

Bildern mit einer bevorzugten Ausrichtung ein Histogramm mit einer Spitze in eben dieser zu erwarten ist.

Die Winkel werden in ihrem üblichen mathematischen Sinn angegeben. Das heißt 0° ist die Ostrichtung und die Ausrichtung ist gegen den Uhrzeigersinn.

Über das Histogramm hinaus erstellt das Plugin Statistiken über den höchsten Peak. Dieser wird als Gauß-Verteilung dargestellt. Die Spalte "Direction (°)" gibt das Zentrum der Gaußschen Normalverteilung an. Die Spalte "Dispersion (°)" beschreibt die Standardabweichung [92].

3.5.2.2 ZELLFLÄCHE UND SARKOMERDICHTE

Um die Zellfläche und die Sarkomerdichte zu ermitteln wurde die rekonstruierte SIM Datei in ImageJ geöffnet und in die *Maximum projection* überführt (*Image* → *Stacks* → *Z Project*). Nachfolgend wurde die Zielzelle mit der Auswahl *Segmented line* manuell umfahren und ausgeschnitten (*Segmented line* → *Edit* → *Clear outside*). So konnte die Zellfläche ermittelt werden (*Analyze* → *Measure*) und die Daten wurden aus der Summary-Tabelle übernommen. Darauf folgte die Konvention in eine 8-bit Datei (*Image* → *Type* → *8bit*) um nun *den Ridge detection Plugin* zu verwenden. Folgende Parameter wurden verwendet:

TABELLE 11. EINSTELLUNGEN IM RIDGE DETECTION PLUGIN ZUR ERMITTLUNG DER ZELLFLÄCHE UND SARKOMERDICHTE

Optional_parameters	Mandatory_parameters
Line Width: 20	Sigma: 6,27
High Contrast: 230	Lower Threshold: 0
Low Contrast: 10	Upper Threshold: 0,34
	Minimum Line Length: 10
	Maximum Line Length: 0

QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG

- Estimate width
- Extend line
- Make Binary

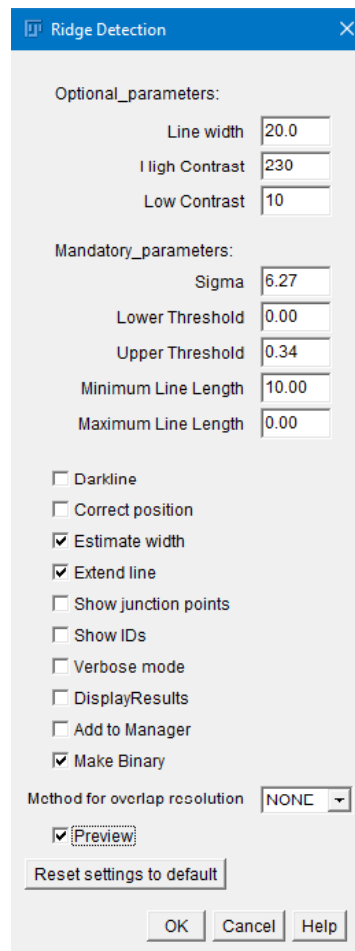


ABBILDUNG 26. *RIDGE DETECTION* PLUGIN ZUR BEURTEILUNG DER SARKOMERISIERUNG BEI DER AUSWERTUNG VON SIM-DATEIEN.

ZUVOR MUSS DIE ZIELZELLE JEDOCH AUS DER SIM-DATEI SEPARIERT WERDEN, UM DIESE AUSWERTEN ZU KÖNNEN. QUELLE: BILDANALYSEPROGRAMM IMAGEJ [89].

Die Eingabe wurde mir *OK* bestätigt und die erhaltene Datei auf ihre Partikeldichte untersucht (*Analyze* → *Analyze Particles*).

3.6 STATISTISCHE ANALYSE

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die Diagramme zeigen Daten aus 7 unabhängigen Experimenten, entsprechend den Zelltypen. n ist die Anzahl der in die Analyse einbezogenen Zellen (siehe Tabelle 12). Die statistische Signifikanz wurde anhand einer ein- oder zweiseitigen ANOVA berechnet, gefolgt von Bonferroni- oder Dunnett-Post-Hoc-Tests für Mehrfachvergleiche. Als statistisch signifikant galten die Wahrscheinlichkeitsstufen * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$. Für die Berechnungen und die grafischen Analysen wurde die Software GraphPadPrism5 verwendet.

TABELLE 12. ANZAHL DER IN DIE ANALYSE EINBEZOGENEN ZELLEN.

PALM		
Zelltyp	n Z-Scheibenbreite	n Sarkomerlänge
Chip d25 KM	32	29
Chip d40 KM	22	18
Chip 4D KM	31	30
H9 KM	31	30
W4 alpha MHC KM	33	32
Adulte KM	30	31
Neonatale KM	23	28

SIM			
Zelltyp	n Zellmorphologie	n Sarkomerdichte	n Sarkomeraus- richtung
Chip d25 KM	68	68	68
Chip d40 KM	52	50	50
Chip 4D KM	56	56	56
H9 KM	54	54	53
W4 alpha MHC KM	52	52	52
Adulte KM	26	60	48
Neonatale KM	20	53	55

QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

IV. ERGEBNISSE

Ziel dieser Arbeit war es, den strukturellen Reifungsprozess des Sarkomergerüsts von aus Stammzellen differenzierte KM zu optimieren. Hierzu wurden murine und humane vordifferenzierte embryonale Stammzellen sowie hiPSC zu Herzzellen differenziert und verschiedene Parameter, welche Aussagen über den Reifegrad zulassen, bestimmt. Um strukturelle Veränderungen bis in den Nanometerbereich feststellen zu können, verwendeten wir für die Bildgebung ausschließlich die Super-Resolution-Mikroskopie. Zur angemessenen Bewertung der strukturellen Reife wurden die gewonnenen KM mit Herzzellen verglichen, die aus neonatalem

und adultem Herzgewebe der Maus isoliert wurden. Bei den KM aus adultem Herzgewebe wurde davon ausgegangen, dass sie das optimale Niveau der Morphologie und der Sarkomerreifung repräsentieren, während neonatale Zellen als vorreifes Stadium betrachtet wurden. Da hiPSCs in diesem Bereich eine vielversprechende Möglichkeit sind, auch aufgrund der wegfallenden ethischen Bedenken, legten wir besonderes Augenmerk auf ebendiese. Bei dem Versuch die strukturelle Reifung von hiPSC KM zu optimieren, wurde die Kultivierungsdauer variiert sowie eine mikrostrukturierte Oberfläche verwendet. Dies bedeutet, dass die Zellen differenziert und anschließend für 25 Tage kultiviert wurden (Chip d25), während eine zweite Zellreihe für 40 Tage differenziert wurde (Chip d40). Zusätzlich wurden KM, welche für 25 Tage differenziert wurden, auf mikrostrukturierten Oberflächen mit 20 µm breiten Linien kultiviert (Chip 4D). Beide Änderungen des Differenzierungsprotokolls, Verlängerung der Kultivierungsdauer und Verwendung strukturierter Objektträger fördern eine der adulten Herzzellen ähnliche Morphologie von hiPSC KM. Die murinen ESC KM (W4) und die humanen vordifferenzierten ESC KM (H9) schneiden generell am schlechtesten ab. Beide zeigen bei allen bestimmten Parametern, außer der Zirkularität, keinen signifikanten Unterschied zu den neonatalen Kontroll KM, was für ihren unreifen Phänotyp spricht.

4.1 ZELLMORPHOLOGIE

Zunächst bestimmten wir die Zellmorphologie, da diese eng mit dem Grad der Sarkomerorganisation verbunden ist. Bei allen Zelltypen betrachteten wir das Seitenverhältnis (Aspect Ratio AR), die Rundheit und die Zirkularität (siehe Abbildung 27). Die Zirkularität beschreibt dabei ein Maß für das Verhältnis des tatsächlichen Umfangs zu einem Kreis mit gleicher Fläche. Ein Kreis hat eine Zirkularität von „1“, wohingegen eine stark unregelmäßige Zelle eine Zirkularität von „0“ aufweist [93]. Primäre KM aus adultem Gewebe sind stäbchenförmig mit einem Seitenverhältnis von ~5 und niedrigen Werten für Rundheit und Zirkularität, was auf die längliche Morphologie zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu weisen neonatale Zellen sowie hiPSC abgeleitete KM, die 25 und 40 Tage lang differenziert wurden, W4 und H9 KM eine runde und vergleichsweise regelmäßige Morphologie auf, was zu einem niedrigen Seitenverhältnis und deutlich erhöhten Werten für Rundheit und Zirkularität führte. Die erhaltenen Daten zeigen, dass die Kultivierung von hiPSC KM auf mikrostrukturierten Oberflächen eine Zellform fördert, die der Morphologie erwachsener KM ähnelt.

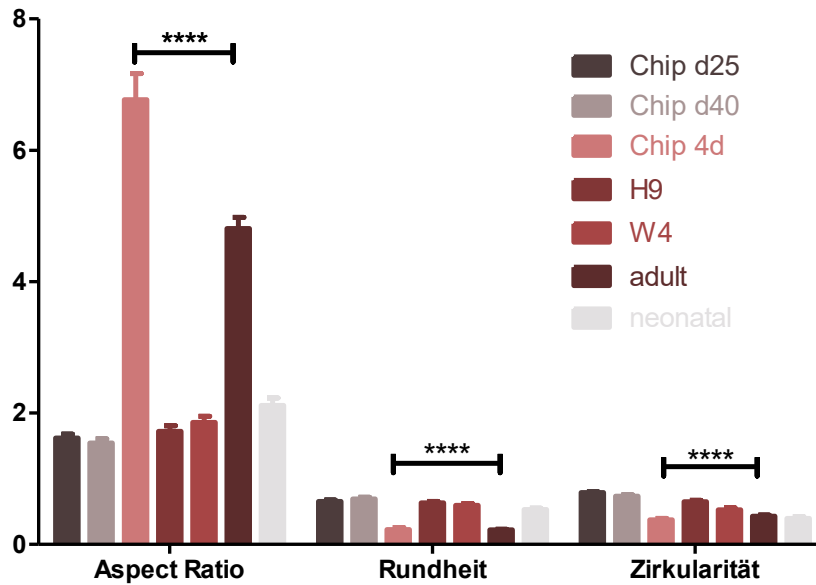


ABBILDUNG 27. ZELLMORPHOLOGIE.

ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm SEM ANGEZEIGT. ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT GALTEN DIE WAHRSCHEINLICHKEITSTUFEN * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ UND **** $P \leq 0,0001$. N SIEHE TABELLE 12. NEONATALE ZELLEN SOWIE HIPSC ABGELEITETE KM (CHIP D25, CHIP D40), W4- UND H9-KM WEISEN EINE RUNDE UND VERGLEICHSWEISE REGELMÄßIGERE MORPHOLOGIE AUF, WAS ZU EINEM NIEDRIGEN SEITENVERHÄLTNIS UND DEUTLICH ERHÖHTEN WERTEN FÜR RUNDHEIT UND ZIRKULARITÄT FÜHRTE. DIE KULTIVIERUNG VON HIPSC KM AUF MIKROSTRUKTURIERTEN OBERFLÄCHEN FÖRDERT EINE ZELLFORM, DIE DER MORPHOLOGIE ERWACHSENER KM ÄHNELT. QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

4.1.1 RUNDHEIT

Die hiPSC Chip 4D KM ($0,25\pm 0,03$) zeigen keinen signifikanten Unterschied zu den adulten KM ($0,21\pm 0,01$), was die einander ähnelnde eher längliche Form bestätigt. Die restlichen untersuchten Zellen (Chip d25 $0,65\pm 0,02$; Chip d40 $0,69\pm 0,02$; H9 $0,63\pm 0,02$; W4 $0,6\pm 0,02$) zeigen sogar Werte über den ermittelten neonatalen Daten ($0,53\pm 0,02$), was für eine runde Form der Herzzellen spricht.

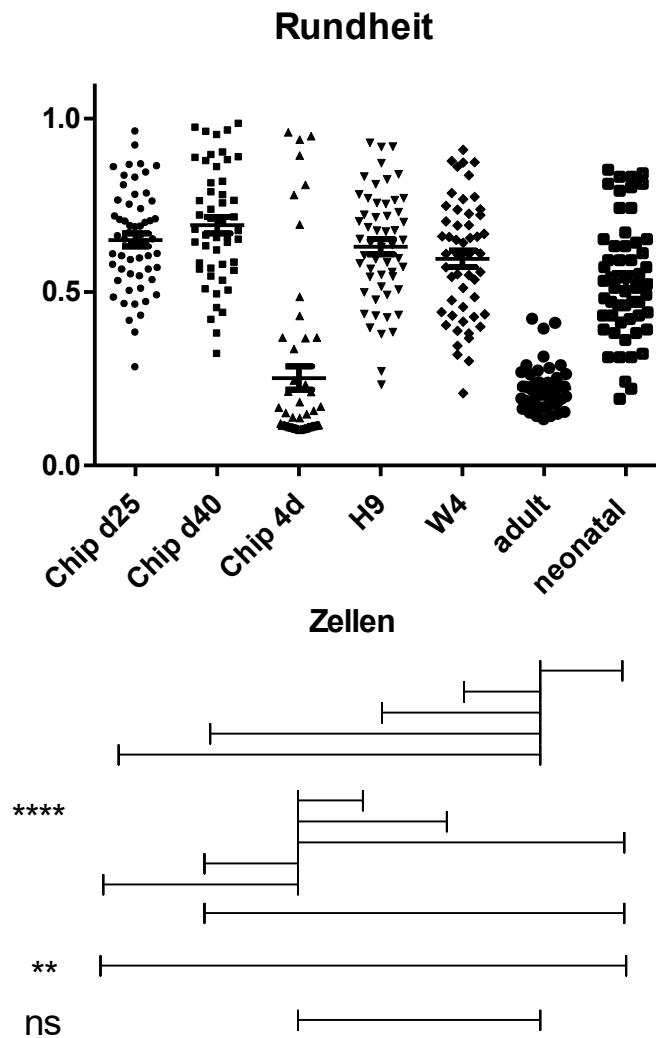


ABBILDUNG 28. RUNDHEIT.

ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm SEM ANGEGEBEN. ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT GALTEN DIE WAHRSCHEINLICHKEITSSTUFEN * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ UND **** $P \leq 0,0001$. N SIEHE TABELLE 12. NS BEDEUTET, DASS KEIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED VORLIEGT, SOMIT ÄHNELN SICH HIPSC 4D KM UND ADULTE KM IN IHRER LÄNGLICHEN FORM. QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

4.1.2 ZIRKULARITÄT

Die neonatalen ($0,4 \pm 0,02$), adulten ($0,41 \pm 0,01$) und Chip 4D KM ($0,39 \pm 0,02$) zeigen keinen signifikanten Unterschied. Mit Werten der Zirkularität um die 0,4 ist von einer eher unregelmäßigen Berandung auszugehen. Die übrigen Versuchszellen (Chip d25 $0,79 \pm 0,01$; Chip 40d $0,73 \pm 0,02$; H9 $0,66 \pm 0,02$; W4 $0,53 \pm 0,03$) liegen deutlich über diesen Werten, was für eine vergleichsweise regelmäßige Morphologie steht.

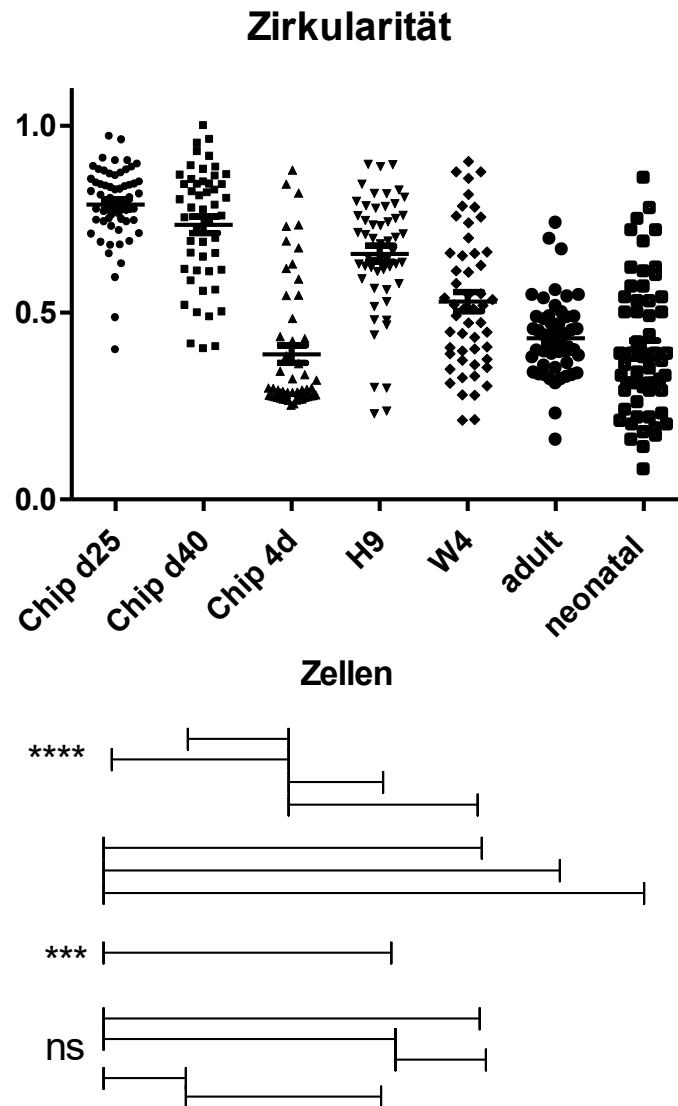


ABBILDUNG 29. ZIRKULARITÄT.

ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT±SEM ANGEGEBEN. ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT GALTEN DIE WAHRSCHEINLICHKEITSSTUFEN * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ UND **** $P \leq 0,0001$. NS BEDEUTET, DASS KEIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED VORLIEGT. N SIEHE TABELLE 12. HIER GLEICHEN SICH DIE ADULTEN, NEONATALEN UND 4D KM MIT EINEM UNREGELMÄßIGEN UMFANG. QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

4.1.3 SEITENVERHÄLTNIS

Die neonatalen KM liegen im Bereich von $2,09 \pm 0,11$ und weisen damit auf eine eher runde Form hin. Alle Versuchszellen, abgesehen von den hiPSC Chip 4D KM, liegen unter diesem Wert (Chip d25 $1,63 \pm 0,06$; Chip d40 $1,54 \pm 0,06$, H9 $1,72 \pm 0,08$, W4 $1,86 \pm 0,1$), zeigen aber keinen signifikanten Unterschied zu den neonatalen Kontroll KM und haben damit eine ähnliche Form. Eine deutliche Signifikanz zwischen den adulten ($5,09 \pm 0,17$) und den hiPSC Chip 4D

KM ($6,53 \pm 0,4$) wird deutlich, jedoch bestätigen die Mittelwerte die ähnliche längliche Form erneut.

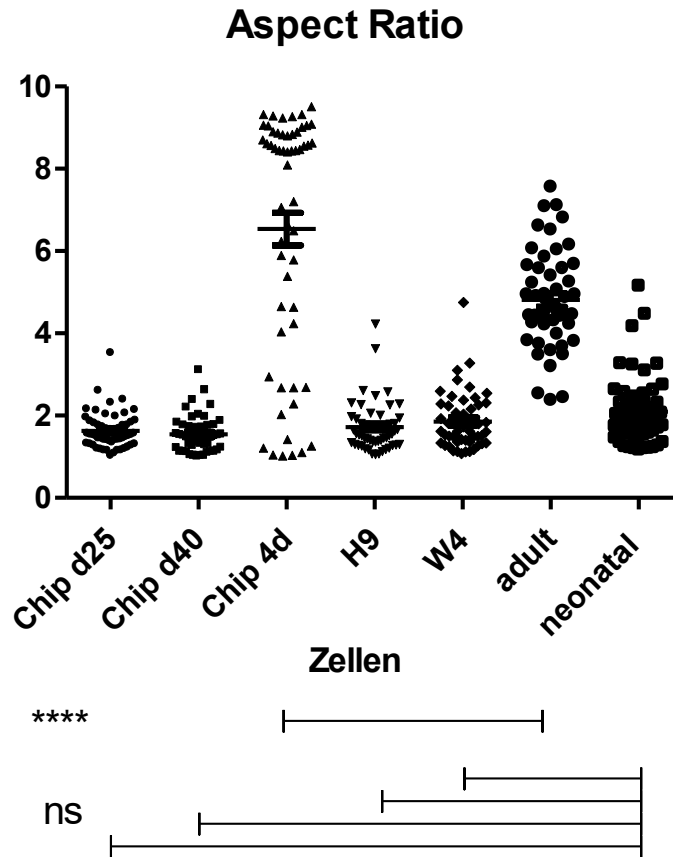


ABBILDUNG 30. SEITENVERHÄLTNIS.

ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm SEM ANGEGBEN. ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT GALTEN DIE WAHRSCHEINLICHKEITSTUFEN * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ UND **** $P \leq 0,0001$. NS BEDEUTET, DASS KEIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED VORLIEGT. N SIEHE TABELLE 12. EINE DEUTLICHE SIGNIFIKANZ ZWISCHEN DEN ADULTEN ($5,09 \pm 0,17$) UND DEN hiPSC CHIP 4D KM ($6,53 \pm 0,4$) WIRD DEUTLICH. DIE RESTLICHEN ZELLEN UNTERSCHIEDEN SICH NICHT SIGNIFIKANT. QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

4.2 SARKOMERDICHTE

Untersucht wurde die Sarkomerdichte, sprich der Prozentsatz der Sarkomerfilamente pro Zelle. Alle Herzzellen der Versuchsreihe zeigen einen signifikanten Unterschied zu den adulten Vergleichskardiomyozyten ($43,6 \pm 0,77\%$), welche erwartungsgemäß den höchsten α -Aktinin-Anteil haben. Die quantitative Analyse ergab, dass adulte KM im Vergleich zu hiPSC, h- und mESC-abgeleiteten KM einen um ca. 40-50 % erhöhten Gehalt an Sarkomeren pro Zelle aufweisen. Die verlängerte Kultur von hiPSC KM (Chip 40d $26,46 \pm 0,8\%$) und die Anwendung

strukturiertes Oberflächen (Chip 4D $26,91 \pm 0,8\%$) führten zu einer etwas höheren Sarkomerdichte, die mit den neonatalen Zellen ($26,71 \pm 1,33\%$) vergleichbar ist. Die restlichen Zellen liegen nochmals unter diesem Niveau (Chip d25 $23,13 \pm 0,71\%$; H9 $22,48 \pm 0,77\%$; W4 $23,99 \pm 0,92\%$).

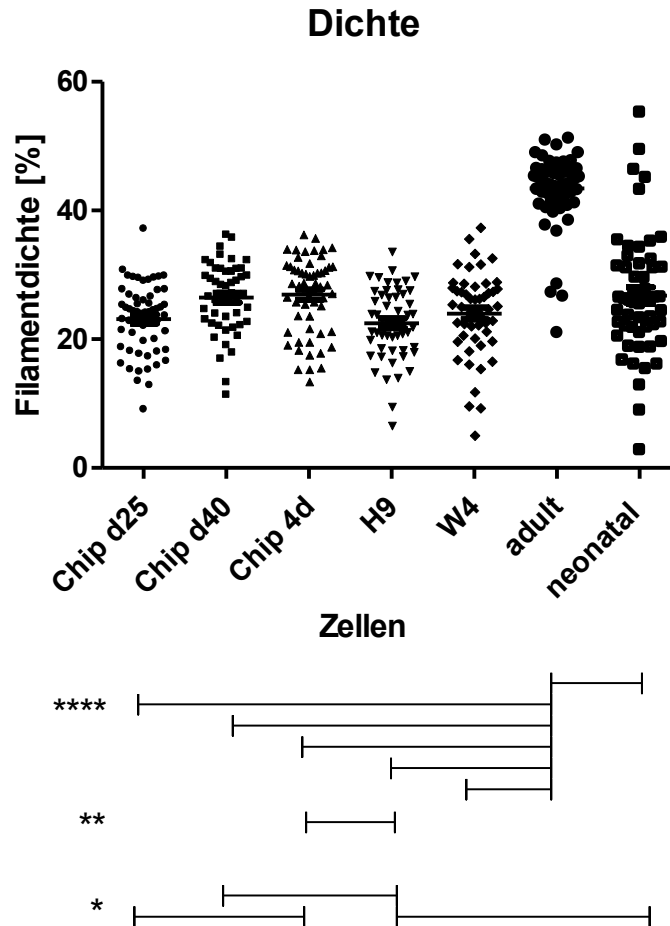


ABBILDUNG 31. SARKOMERISIERUNG/ZELLFLÄCHE [%].

ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm SEM ANGEGBEN. ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT GALTEN DIE WAHRSCHEINLICHKEITSTUFEN * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ UND **** $P \leq 0,0001$. NS BEDEUTET, DASS KEIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED VORLIEGT. N SIEHE TABELLE 12. DIE SARKOMERDICHTE GIBT DAS VERHÄLTNISS DER SARKOMERFILAMENTE ZU DER GESAMTEN ZELLE IN % AN. ALLE HERZZELLEN DER VERSUCHSREIHE ZEIGEN EINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED ZU DEN ADULTEN VERGLEICHSKARDIOMYOZYTEN ($43,6 \pm 0,77\%$). QUANTITATIV KONNTE GEZEIGT WERDEN, DASS ADULTE KM IM VERGLEICH ZU HIPSC, H- UND MESC ABGELEITETEN KM EINE UM CA. 40-50% ERHÖHTE SARKOMERDICHTE HABEN. QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

Darüber hinaus wurden die Zellen entsprechend ihrer Sarkomerdichte in drei Kategorien eingeteilt (niedrig: 0-20 %, mittel: 20-30 % und hoch: >30 %). Das Diagramm in Abbildung 32 zeigt eine deutliche Verschiebung von Zellen mittlerer und niedriger Qualität zu einer höheren Netzwerkichte in hiPSCs, welche optimierten Kulturbedingungen unterzogen wurden.

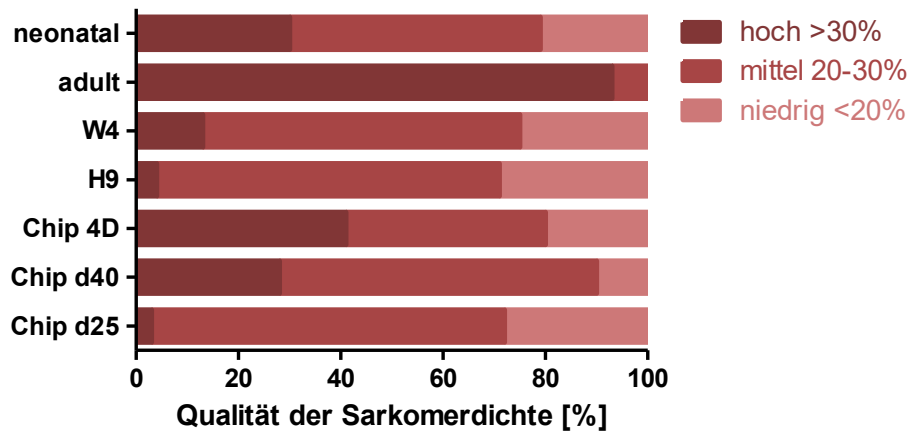


ABBILDUNG 32. QUALITÄT DER SARKOMERDICHTE.

DIE ZELLEN WURDEN ENTSPRECHEND IHRER SARKOMERDICHTE IN DREI KATEGORIEN EINGETEILT: NIEDRIG: 0-20 %, MITTEL: 20-30 % UND HOCH: >30 %. MAN SIEHT EINE DEUTLICHE ZUNAHME DER SARKOMERDICHTE HOHER QUALITÄT BEI DEN 4D KM. QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

Die in Abbildung 33 gezeigten Bilder von α -Aktinin-markierten Zellen bestätigen den Unterschied der Sarkomerdichte in den behandelten Gruppen.

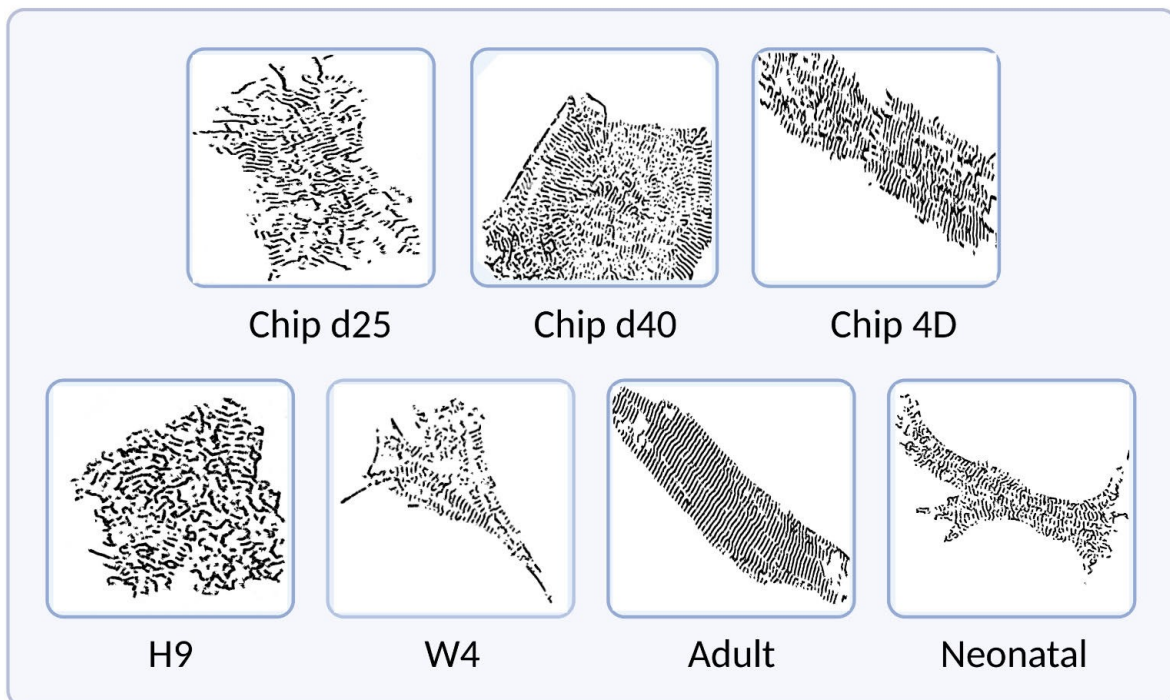


ABBILDUNG 33. DARSTELLUNG DER SARKOMERDICHTE ANHAND DER ALPHA-AKTININ MARKIERTEN ZELLEN.

ES IST DEUTLICH ZU ERKENNEN, DASS DIE ADULTEN KM DIE HÖCHSTE DICHT E AUFWEISEN, GEFOLGT VON DEN CHIP 4D, CHIP D40 UND NEONATALEN KM. QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG ERSTELLT MIT BIORENDER.COM [12]

4.3 SARKOMERAUSRICHTUNG

Eine hohe Sarkomerdichte und eine korrekte Ausrichtung der Filamente sind notwendig, um eine maximale Krafterzeugung und eine optimale Zellkontraktion zu gewährleisten. Daher wurde hier die Sarkomerausrichtung in Bezug auf die Längsachse der Zelle analysiert. Bei adulten KM beträgt die Hauptausrichtung $85,8 \pm 0,89^\circ$. Die meisten Strukturen sind also fast senkrecht zur Zellachse ausgerichtet. Dies entspricht einem optimalen Kontraktionsnetzwerk. Alle Versuchszellen zeigen einen signifikanten Unterschied zu den adulten Kontroll KM und weisen eine deutlich reduzierte Hauptausrichtung auf (siehe Abbildung 34).

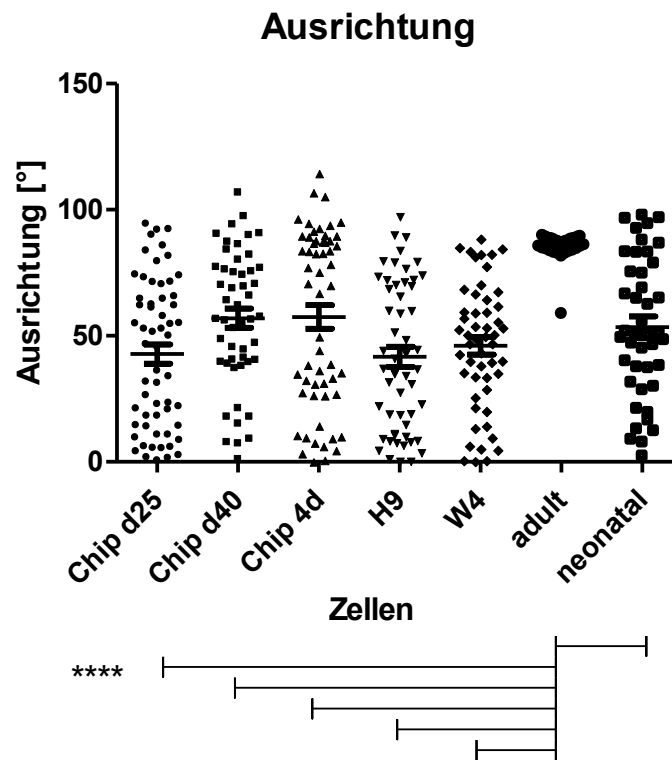


ABBILDUNG 34. AUSRICHTUNG [°] DER FILAMENTE.

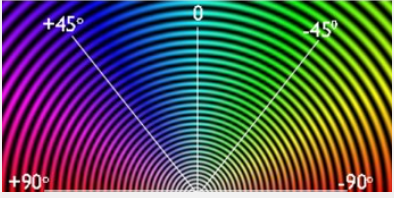
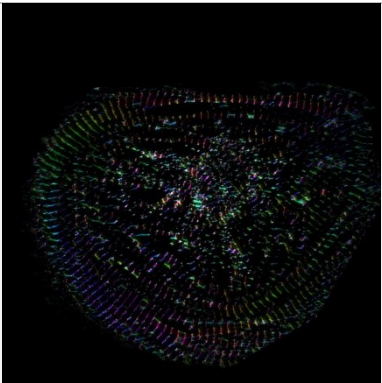
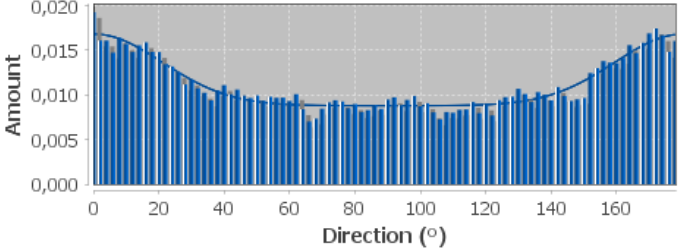
ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm SEM ANGEGBEN. ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT GALTEN DIE WAHRSCHEINLICHKEITSTUFEN * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ UND **** $P \leq 0,0001$. N SIEHE TABELLE 12. ALLE ZELLEN ZEIGEN EINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED ZU DEN ADULTEN KM. QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

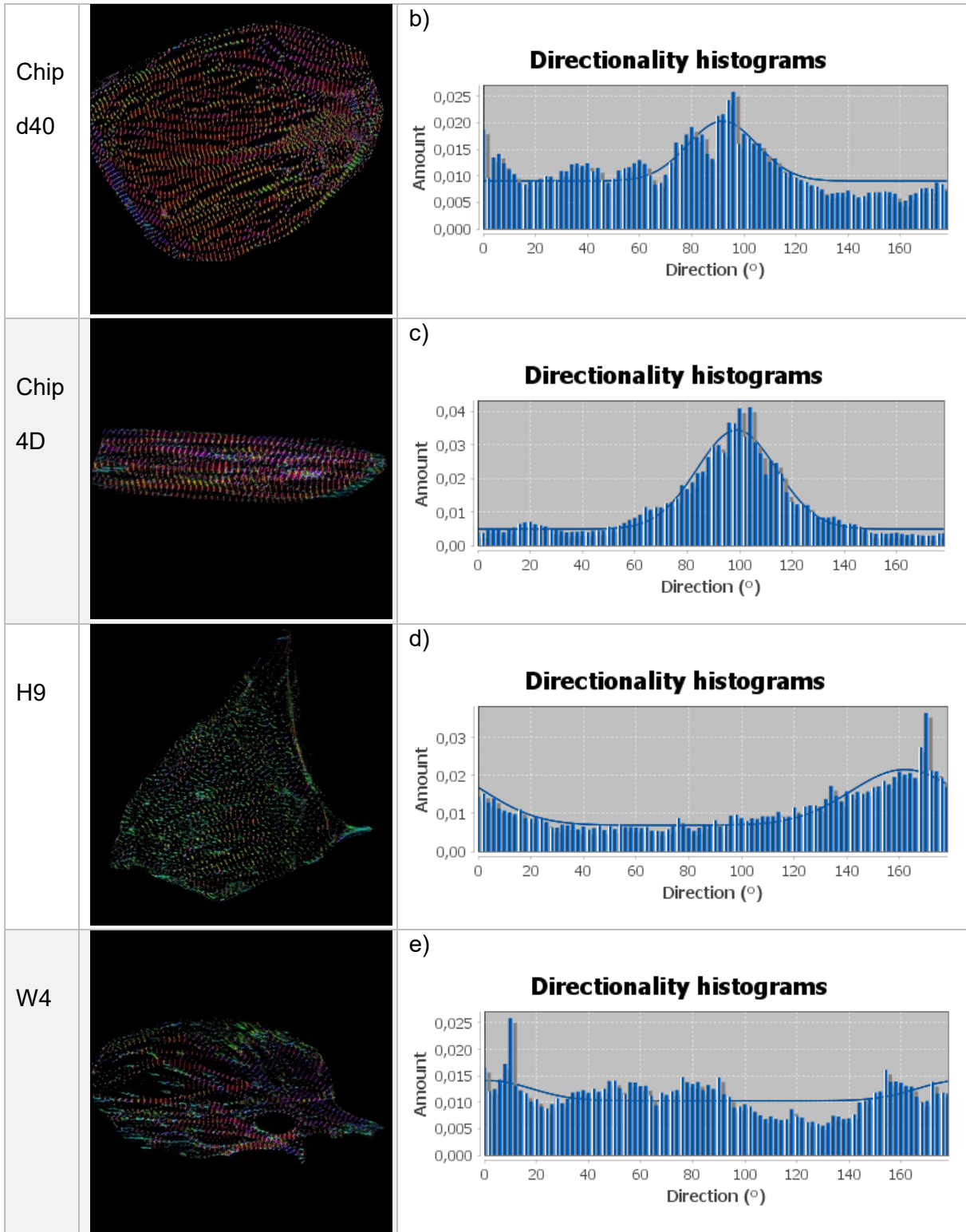
Diese Unterschiede werden in SIM-Bildern (siehe Tabelle 13) veranschaulicht, die die Filamentausrichtung in einer farbkodierten Weise darstellen. Je mehr Farben im SIM-Bild vorhanden sind, desto höher ist der Grad der desorganisierten α -Aktinin-Strukturen. Während adulte KM hauptsächlich aus einer einzigen Farbe bestehen (siehe Tabelle 13, Abbildung f), stellen sich neonatale Zellen, hiPSC, H9 und murin abgeleiteten KM mehrfarbig dar (siehe Tabelle 13, Abbildung a,d,e,g). Länger kultivierte hiPSC KM und die Verwendung einer strukturierten

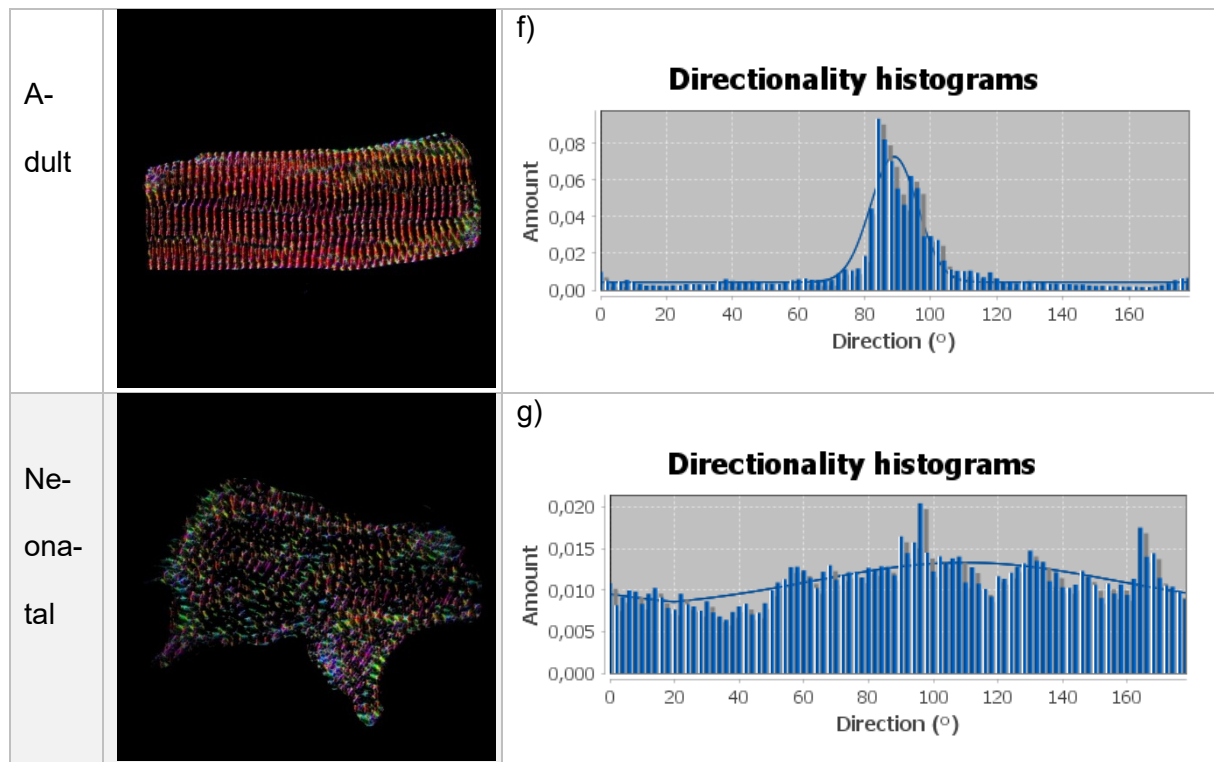
Oberfläche zeigten jedoch eine Reduktion der Farbvielfalt (siehe Tabelle 13, Abbildung b und c).

Diese Ergebnisse werden bestätigt, wenn man sich die Verteilung der einzelnen Filamentpopulationen genauer ansieht. Tabelle 13 zeigt Histogramme aller getesteten Zelltypen, die die Menge der Filamente in Bezug auf den jeweiligen Orientierungsbereich angeben. KM aus adultem Gewebe sind durch einen ausgeprägten Peak zwischen einer Richtung von $-80/+80^\circ$ gekennzeichnet (siehe Tabelle 13, Abbildung f). Im Gegensatz dazu zeigten hiPSC abgeleitete KM, die 25 Tage lang differenziert wurden, keinen Peak, was auf den Phänotyp des desorganisierten Sarkomers hinweist (siehe Tabelle 13, Abbildung a). Die Veränderungen der Zellkulturparameter zeigen auch im Histogramm eine Verbesserung in der erhöhten Anzahl von Filamenten im Richtungsbereich von $-90/+90^\circ$.

TABELLE 13. FARBKODIERTE DARSTELLUNG DER FILAMENTAUSRICHTUNG MIT HISTOGRAMM.

FILAMENTAUSRICHTUNG	
	<p>Kreisförmige Farbkodierung in Grad [°]. Je mehr Farben im SIM-Bild vorhanden sind, desto höher ist der Grad der desorganisierten α-Aktinin-Strukturen.</p>
Zell-typ	Farbcodierte Darstellung
Chip d25	
	<p>a)</p> <p style="text-align: center;">Directionality histograms</p> 





QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG ABBILDUNGEN ERSTELLT MIT IMAGEJ [89].

Nach der Kultivierung von hiPSC KM auf mikrostrukturierten Oberflächen nahm die Hauptrichtung des Sarkomernetzwerks um ~50 % zu (Chip d25 $42,38 \pm 3,87^\circ$ vs. Chip 4D $64,6 \pm 4,19^\circ$). Ein signifikanter positiver Effekt auf die Filamentorientierung wurde außerdem bei Zellen beobachtet, die einer längeren Kultivierungsdauer unterzogen wurden (Chip d40 $57 \pm 3,77^\circ$). Die quantitative Analyse von drei verschiedenen Richtungsintervallen ($0-30^\circ$ vs. $30-60^\circ$ vs. $60-90^\circ$) bestätigte den positiven Einfluss von Kulturdauer und Oberflächenstrukturierung auf die Sarkomerreifung. Die Anzahl der Strukturen im unteren Richtungsbereich ($0-30^\circ$) nahm ab, während mehr Filamente in der optimalen Ausrichtung ($60-90^\circ$) orientiert waren (siehe Abbildung 35).

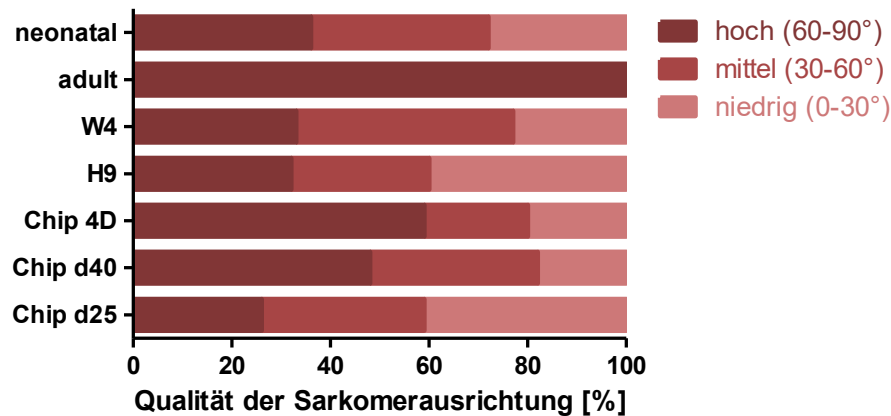


ABBILDUNG 35. QUALITÄT DER SARKOMERAUSRICHTUNG.

DIE QUANTITATIVE ANALYSE VON UNTERSCHIEDLICHEN RICHTUNGSINTERVALLEN (0-30° vs. 30-60° vs. 60-90°) BESTÄTIGTE DEN POSITIVEN EINFLUSS VON KULTURDAUER UND OBERFLÄCHENSTRUKTURIERUNG AUF DIE SARKOMERREIFUNG. QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

Die besten Näherungswerte zur adulten Kontrollgruppe erzielen also die iPSC Chip 4D KM mit $64,6 \pm 4,19^\circ$ gefolgt von den Chip d40 KM mit $57 \pm 3,77^\circ$. Alle anderen Zellen zeigten Werte, die sogar unter denen der neonatalen ($51,69 \pm 3,73^\circ$) Ausrichtung lagen (H9 $41,71 \pm 4,04^\circ$; W4 $46,03 \pm 3,47^\circ$)(siehe Abbildung 34).

4.4 Z-SCHEIBENBREITE

Mit der PALM-Technik bewerteten wir die Dicke einzelner Aktinifilamente. Beim Vergleich der Z-Scheibendicke aller Zellen untereinander sowie auch mit den Kontrollzellen ist kein signifikanter Unterschied feststellbar. Die adulten Zellen zeigen eine Z-Scheibenbreite von $72,6 \pm 1,28$ nm, die neonatalen von $68,9 \pm 1,9$ nm. Nur die H9-Herzzellen liegen mit $68,53 \pm 0,94$ nm näher an dem neonatalen Kontrollwert. Die iPSC KM sowie die murinen W4 KM zeigen alle eine Sarkomerbreite von ca. 70 nm.



ABBILDUNG 36. Z-SCHEIBENBREITE.

ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm SEM ANGEZEIGT. ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT GALTEN DIE WAHRSCHEINLICHKEITSTUFEN * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ UND **** $p \leq 0,0001$. NS BEDEUTET, DASS KEIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED VORLIEGT. N SIEHE TABELLE 12. BEIM VERGLEICH DER Z-SCHEIBENDICKE WIRD KEIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED FESTGESTELLT. QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

4.5 SARKOMERLÄNGE

Die Messung der Sarkomerlänge zeigt deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (siehe Abbildung 37). Mit einer Größe von $1,90 \pm 0,01 \mu\text{m}$ wiesen adulte KM die längsten Sarkomere auf. Nur die hiPSC Chip d25 KM zeigen keinen signifikanten Unterschied zu den adulten Herzzellen und kommen mit $1,83 \pm 0,02 \mu\text{m}$ in einen ähnlichen Bereich. Die neonatalen Kontrollzellen haben eine Länge von $1,68 \pm 0,04 \mu\text{m}$. Eine längere Kulturdauer beziehungsweise die Kultivierung auf mikrostrukturierten Oberflächen der hiPSC KM hatte keinen positiven Effekt auf die molekularen Dimensionen des Sarkomernetzwerks.

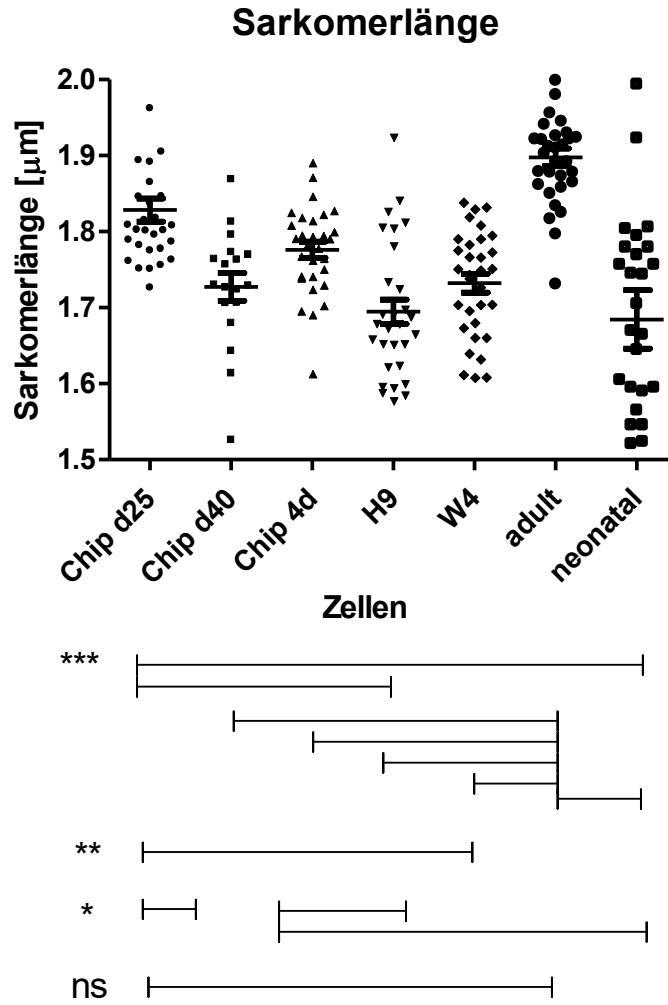


ABBILDUNG 37. SARKOMERLÄNGE.

ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm SEM ANGEZEIGT. ALS STATISTISCH SIGNIFIKANT GALTEN DIE WAHRSCHEINLICHKEITSTUFEN * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ UND **** $p \leq 0,0001$. NS BEDEUTET, DASS KEIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED VORLIEGT. N SIEHE TABELLE 12. DIE MESSUNG DER SARKOMERLÄNGE ZEIGT DEUTLICHE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN UNTERSUCHTEN GRUPPEN * $p \leq 0,0001$. NS BEDEUTET, DASS KEIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED VORLIEGT. DIE MESSUNG DER SARKOMERLÄNGE ZEIGT DEUTLICHE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN UNTERSUCHTEN GRUPPEN. QUELLE: EIGENE DARSTELLUNG.

V. DISKUSSION

Die Erzeugung von KM, die einen adulten Phänotyp aufweisen, ist eines der wichtigsten Ziele in der kardiovaskulären Forschung. Obwohl gerade bei der Entwicklung von iPSC-abgeleiteten KM große Fortschritte erzielt wurden, ist die begrenzte Reifung immer noch ein großes Hindernis, das ihren Einsatz in der Grundlagenforschung und bei klinischen Anwendungen behindert. Die ordnungsgemäße Reifung von Herzzellen umfasst die Etablierung einer funktionellen Kontraktionsmaschinerie. Die meisten Studien, die sich mit der strukturellen Reifung von aus iPSC gewonnenen KM befassen, konzentrieren sich nur auf die Sarkomerlänge und die Zellmorphologie, sodass Informationen zur Ausrichtung und Integrität der Sarkomere fehlen [18] [94] [95]. Wir haben daher weitere Parameter definiert, die mit der Super-Resolution-Mikroskopie erfasst werden können, um die Qualität des Sarkomernetzwerks zu bewerten. Darunter fallen die Hauptausrichtung der Filamente und die Sarkomerdichte der Herzzellen. All diese Kenngrößen wurden bei zu KM differenzierten Stammzellen unterschiedlicher Herkunft bestimmt und mit neonatalen und adulten Herzzellen verglichen.

Murine ESC KM (W4) und vordifferenzierte humane ESC KM (H9) schneiden bei der Auswertung am schlechtesten ab. Sie zeigen keinen signifikanten Unterschied zu den neonatalen Kontroll KM. Dies bedeutet, dass die erhaltenen Herzzellen einen unreifen Phänotyp aufweisen und somit kein funktionierendes Kontraktionsnetzwerk besitzen. Damit sind diese Zellen für den klinischen Gebrauch sowie für Forschungszwecke im Hinblick auf zum Beispiel Zellersatztherapie *etc.* weniger geeignet. Xu *et al.* untersuchten bereits 2002 die H9 Zellen sowie weitere Zelllinien (H1, H7 und H9 unterscheiden sich in der parentalen und H9.1 und H9.2 in der klonalen Herkunft) und alle differenzierten sich zu KM. Die schlagenden Zellen exprimierten Marker, die für KM charakteristisch sind, wie z. B. α MHC, kardiales Troponin I und T, den atrialen natriuretischen Faktor und kardiale Transkriptionsfaktoren [96]. Jedoch wurden in dieser Studie keine weiteren Untersuchungen zur Sarkomerisierung unternommen. Bei schlagenden Zellen wurde ein funktionierender Kontraktionsapparat vorausgesetzt. Sepac *et al.* berichteten 2021 von einer schlechteren KM-Anreicherung bei der Differenzierung von hiPSCs und H9 Zellen als bei H1 Zellen, obwohl alle Zelllinien eine effiziente Kardiomyogenese aufwiesen [97].

Die hiPSC KM zeigen nach verbesserten Kultivierungsbedingungen eine Annäherung an den adulten Phänotyp der reifen Vergleichszellen. Die Verlängerung der Kultivierungszeit von 25 auf 40 Tage und die Verwendung von mikrostrukturierten Oberflächen haben einen positiven Einfluss auf die Zellmorphologie, die Dichte der Sarkomerisierung und die Ausrichtung der Filamente.

Für eine effiziente Kraftentfaltung müssen die stäbchenförmigen KM in Längsrichtung angeordnet sein. Im Gegensatz zu adulten zeigen die m- und vordifferenzierten hESC- sowie die

hiPSC abgeleitete KM eine kreisförmige Morphologie, was auch durch unsere Analysen bestätigt wird (siehe Abbildung 27) [88] [98]. Dieser Phänotyp ist eher mit unreifen, neonatalen Herzzellen vergleichbar, die ebenfalls eine unregelmäßige Morphologie und einen desorganisierten Kontraktionsapparat aufweisen [11] [88] [99]. Lundy *et al.* bewerteten mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie hESC KM im Frühstadium (20-40 Tage nach der Induktion). Diese zeigten auch hier eine stark unterentwickelte kontraktile Maschinerie, die aus falsch ausgerichteten Myofibrillen mit geringer Dichte bestand. Eine stärkere Vergrößerung dieser Myofibrillenbündel zeigte punktförmige Aggregate, die zuvor als Z-Körper beschrieben wurden, und nicht die ausgereiften, linearen Z-Scheiben, die in adulten KM vorliegen [100]. Dies ist ebenfalls ein bedeutender Punkt für die geringere Sarkomerdichte in unreifen KM. Auch dies wird durch unsere Ergebnisse bestätigt (siehe Abbildung 32 und Abbildung 35).

Mittlerweile gibt es mehrere Möglichkeiten, die strukturelle Reifung von *in vitro* erzeugten Herzzellen zu verbessern. Die Anwendung mikrostrukturierter Oberflächen mit grabenartigen Vertiefungen ermöglicht die Erhaltung eines stäbchenförmigen Phänotyps der hiPSC KM, welcher mit nativen KM vergleichbar ist. Der erwachsene KM hat eine Länge von etwa 150 μm , eine Breite von ca. 20 μm , einer Höhe von 15 μm und einem Volumen von 40.000 μm^3 [5]. Daher misst eine Vertiefung des verwendeten strukturierten Objektträgers ebendiese Breite von 20 μm . Mit Hilfe unseres mikroskopischen Ansatzes konnten wir quantitativ einen klaren Vorteil strukturierter Oberflächen für die Sarkomerdichte und, noch tiefgreifender, für die Sarkomerorientierung feststellen (siehe Abbildung 32, Abbildung 33, Tabelle 13, Abbildung 35). Weitere Studien haben einen reifungsfördernden Effekt topografischer Merkmale auf die Sarkomerorientierung festgestellt, was auf die enge Beziehung zwischen Zellmorphologie und der Entwicklung einer optimalen Kontraktionsmaschinerie hinweist [101] [102] [103] [104]. Die mikrostrukturierten Oberflächen liefern topografische Signale, die die Streckung der Zelle sowie die Organisation des Zytoskelettnetzes unterstützen. Ribeiro *et al.* haben gezeigt, dass die Verwendung von Substraten mit physiologischer Form die Ausrichtung der Sarkomerfilamente verbessert [105]. Ebenso wurde gezeigt, dass die Steife des Substrats die Sarkomerorganisation und die Kontraktionseigenschaften beeinflusst. In früheren Studien wurde bereits eine starke Korrelation zwischen dem Grad der Sarkomerorientierung und der Zellkontraktilität festgestellt [95] [98] [106] [107]. Daten bezüglich der Kontraktilität haben wir selbst nicht erhoben. Die Traction Force Microscopy (TFM) oder die Verwendung von fluoreszierenden engl. *Micropillars* kann hier dazu beitragen, Sarkomerqualität und Kontraktionskraft in Korrelation zu bringen und damit unseren mikroskopischen Ansatz ergänzen [108] [109] [110] [111].

Die Kardiomyozytenanzahl nimmt bis zum 20. Lebensjahr um ca. 3,4% zu. Das bedeutet, dass es nach der Geburt in einem geringen Umfang sowie in höherem Lebensalter abnehmend zu einer Neubildung von Zellen kommt. Die Herkunft der Zellen ist noch immer unklar. Bewiesen

ist jedoch, dass KM nach der Geburt deutlich größer und in erheblicher Menge (ca. 40%) polyploid werden [6]. Der gesamte Reifungsprozess von KM *in vivo* dauert also mehrere Jahre. Eine lange *in vitro*-Kultur fördert in ähnlicher Weise die Entwicklung eines reiferen Phänotyps, die Bildung von Z-, A-, H- und M-Banden sowie eine höhere Myofibrillendichte und Sarkomerorganisation [112] [113] [114]. Lundy *et al.* kategorisierten hESC KM und hiPSC KM zwischen 20 und 40 Tagen nach der Induktion als frühes Stadium. Die Myozyten kontrahierten spontan und erschienen als kleine, runde Zellen, die bei der Betrachtung der immunzytochemischen Färbung des α -Aktinin, eine schlecht organisierte kontraktile Maschinerie mit geringer Myofibrillendichte und -ausrichtung zeigten. In den darauffolgenden Monaten wurden die Zellen größer und länglicher. Zwischen dem 80. und 100. Tag begannen die Zellen die Organisation der kontraktilen Maschinerie entlang ihrer gesamten Länge zu zeigen [100]. Auch wir konnten eine verbesserte Filamentdichte und -anordnung in KM feststellen, die einer verlängerten Kultivierungszeit unterzogen wurden (siehe Abbildung 32, Abbildung 35).

Die Erkennung dieser subtilen strukturellen Veränderungen wird durch die angewandte SIM-Technik ermöglicht, die eine Bildaufnahme mit höherer Auflösung liefert. Herkömmliche Fluoreszenzaufnahmen zeigen keine ausreichenden strukturellen Details, sondern führen zu unscharfen mikroskopischen Bildern [108] [115] [116]. Die Visualisierung einzelner Filamente ist jedoch entscheidend, um verlässliche Daten über die Sarkomerorganisation zu erhalten. Das in dieser Arbeit vorgestellte Protokoll kann effizient die Entwicklung neuartiger Differenzierungsprotokolle unterstützen, da es eine quantitative Kontrolle des Phänotyps von KM ermöglicht. Neben der Protokolloptimierung kann unsere Methode auch ein wertvolles Instrument für die Modellierung von Krankheiten sein, da sich gezeigt hat, dass einige Herzfunktionsstörungen und Myopathien mit einer gestörten Sarkomerintegrität zusammenhängen [117] [118] [119] [120] [121]. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass das Fehlen von Dystrophin in erkrankten iPSC KM eine reduzierte Sarkomerlänge und Z-Streifenbreite zur Folge hatte [122]. Eine Einschränkung unserer Studie ist der Vergleich von humanen iPSC abgeleiteten KM mit murinen Zellen. Da es jedoch schwierig ist, isolierte adulte und neonatale KM aus menschlichem Gewebe zu erhalten, ist die Verwendung von primären Mäusezellen als Referenzmarker ein gängiges Verfahren für vergleichende Studien zur KM-Struktur und -Funktion [123] [124] [125]. Lundy *et al.* beschreiben eine Abnahme des Zirkularitätsindex bei hESC KM bei verlängerter Kultivierungsdauer von über 80 Tagen. Damit erreichen sie Werte von $0,28 \pm 0,02$, was nochmals deutlich unter unserem Wert der adulten Vergleichszellen liegt [100]. Jedoch sind sowohl in humanen als auch in murinen KM die Sarkomerfilamente senkrecht zur Längsachse ausgerichtet, um eine optimale Krafterzeugung zu gewährleisten. Daher werden die vorgestellten Richtungsdaten durch den Vergleich zwischen den Spezies kaum beeinflusst.

Die Verwendung von engl. *Non human primates* NHP KM, könnte die Forschungsergebnisse jedoch verbessern. Primatenzellen bieten einzigartige Möglichkeiten zur Entwicklung und Validierung pluripotenter Stammzell-basierter Interventionen [126]. Schließlich ähneln NHP Zellen ihren menschlichen Gegenstücken mehr als ihren murinen Analoga [127] [128]. Obwohl nur wenige Studien menschliche und NHP Zellen verglichen haben, deuten die wenigen verfügbaren Daten zur Genexpression auf große Ähnlichkeiten in der Zellidentität, dem Verhalten und der Ausführung der Pluripotenz hin [127] [128] [129]. Dennoch bringt die Forschung mit NHP einige Herausforderungen mit sich, zum Beispiel hohe Kosten und komplexe Genehmigungsverfahren. Für die Sarkomerlänge haben frühere Studien Abstände zwischen benachbarten Z-Scheiben von 1,75 bis 2,3 μm angegeben, je nach Probe und den für die Bildaufnahme verwendeten Techniken [130] [131] [132] [133]. In ähnlicher Weise ermittelten wir eine Sarkomerlänge von $\sim 2 \mu\text{m}$ in adulten murinen KM, was den reifen Phänotyp menschlicher KM sehr gut widerspiegelt. Daher kommen wir zu dem Schluss, dass sich murine Zellen als Referenzzelltyp eignen, um die strukturelle Reifung von iPSC KM zu bewerten, obwohl leichte Unterschiede in der Sarkomerarchitektur zwischen verschiedenen Spezies nicht ausgeschlossen werden.

Zusammengenommen ermöglicht die Verwendung der Super-Resolution-Mikroskopie die quantitative Bewertung von Veränderungen des Sarkomernetzwerks in KM. Mit dieser Technik konnten wir zeigen, dass die strukturelle Reifung durch spezifische Kulturbedingungen gefördert werden kann. Insbesondere haben mikrostrukturierte Oberflächen und eine verlängerte Kultivierungsdauer einen Einfluss auf den Phänotyp von iPSC abgeleiteten KM. Diese verbessern vor allem die Sarkomerdichte- und hauptausrichtung. Doch genau diese Parameter sind gleichzeitig immer noch jene, welche die Annäherung an einen adulten Phänotyp limitieren. Für die regelrechte Reifung des Sarkomernetzwerks ist ein Isoformwechsel von Myofibrillenproteinen einschließlich Titin und dem Myosin Heavy Chain Protein nötig, was ebenfalls zu berücksichtigen ist [9]. Daher muss in diesem Bereich noch intensivst Forschung betrieben werden.

VI. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Trotz der immensen Fortschritte, die bei der Erzeugung von iPSC KM erzielt wurden, wirken sich einige einschränkende Faktoren wie Unreife, genetische und phänotypische Heterogenität noch immer auf ihre Nutzbarkeit in der Praxis aus. In dieser Arbeit haben wir uns primär auf den Phänotyp der KM konzentriert und die wichtigsten Kenngrößen für eine funktionie-

rende Kontraktion bearbeitet. Hierzu zählen: Zellmorphologie, Z-Streifenbreite, Sarkomerlänge und -hauptausrichtung sowie Dichte des Sarkomernetzwerkes. Wir untersuchten mESCs und humane vordifferenzierte embryonale Stammzellderivate, welche eher eine unreife Sarkomerisierung zeigten. Ein besonderes Augenmerk legten wir auf die Bewertung von hiPSCs, bei welchen die Kultivierungsdauer expandiert und ein Objektträger mit mikrostrukturierter Oberfläche verwendet wurde, was zu einer Verbesserung der Sarkomerdichte und der Filamentausrichtung führte. Als Kontrollzellen dienten murine KM aus neonatalem und adultem Gewebe. Um valide Vergleichsdaten zu erhalten, verwendeten wir die Super-Resolution-Mikroskopie, bei welcher die Auflösung ca. zehn Mal höher ist als bei herkömmlichen Mikroskopen. Diese Technik ermöglichte genaue Analysen und die quantitative Kontrolle des Phänotyps der KM, da auch kleinste Veränderungen des Strukturierungsgrades sichtbar gemacht werden konnten [134] [88]. Daher kann das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll die Entwicklung neuartiger Differenzierungsprotokolle unterstützen.

Der folgende Abschnitt bietet einen Überblick über die noch zu lösende Problematik der Stammzellforschung in Hinblick auf kardiale Differenzierung und den Einsatz von aus iPSC generierten KM in der Praxis (Gewebeersatz, *Bioengineering*, pharmakologische Tests und personalisierte Medizin) [135] [136] [137].

Zur Generierung von Herzzellen aus iPSCs ist mittlerweile ein komplexes Netzwerk an Parametern bekannt, welche als Stellschrauben im Differenzierungsprozess dienen können. Jedoch ist das Outcome an homogenen adulten KM noch immer qualitativ und quantitativ minderwertig. Mit jedem neuen Lösungsansatz scheint auch eine neue Problematik aufzutreten. In mehreren Studien wurde bereits beschrieben, dass eine verlängerte Kultur und andere Methoden, wie zum Beispiel die Erhöhung der Substratsteife [105], mechanischer Stress [138] oder elektrische Stimulation [139], die Reifung von iPSC KM bis zu einem gewissen Grad fördern können [112] [100] [130]. Nunes *et al.* entwickelten *Biowire*, eine technische Plattform, die kultivierten KM Signale sendet, die sie *in vivo* während der Embryonalentwicklung erhalten würden. Dazu gehören eine spezielle extrazelluläre Matrixzusammensetzung, lösliche Faktoren, die elektrische Stimulation und eine 3D-Zellkultur [140]. Der Übergang von 2D- zu 3D-Modellen hat die zelluläre Reife der iPSC KM verbessert, aber auch die Komplexität des Modells und dessen Analysen erhöht [141]. Licht für die Mikroskopie, fluoreszierende Farbstoffe und Medikamente müssen tiefer und gleichmäßiger in die 3D-Kultur eindringen, um alle Zellen zu erreichen.

Das Verständnis der Gene, die an der Reifung von KM beteiligt sind, führte zu einem großen Fortschritt. Das engl. *Single-cell RNA Sequencing* (scRNAseq) hat unser Wissen in diesem

Bereich erweitert, indem Gene nachgewiesen wurden, die in der embryonalen Herzentwicklung früher (TNNI1, MYH6) und später (NKX2-5, MYH7, MYL2, TTN, TNNI3, MYL2) exprimiert werden. So können reife und unreife KM unterschieden werden [142]. Durch die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) können Genexpressionsprofile ermittelt werden. Diese Methode wird zu verschiedenen Zeitpunkten während der Zellproduktion verwendet, um die Qualität der Differenzierung zu überprüfen [53]. Das Vorliegen von kardialem Troponin T hat sich als Goldstandard für die Bestimmung der Reinheit von KM etabliert [143]. Jedoch garantiert diese Methode nur Homogenität und nicht Funktionalität. Um diese auf der phänotypisch-quantitativen Ebene zu prüfen, sind mikroskopische Herangehensweisen von Nöten, wie sie zum Beispiel in dieser Arbeit vorgestellt wurden. Jedoch würde dieses Verfahren die Produktionskosten und den Arbeitsaufwand für eine breite klinische Anwendung enorm in die Höhe treiben.

Der wahrscheinlichste Weg in die Zukunft scheint der Einsatz von Gen-Editing-Technologien. Beim Erhalt und Überleben von transplantierten iPSC KM spielt dies zum Beispiel schon eine Rolle, da so Leukozytenantigene editiert werden können. Eine Immunreaktion gegen das Transplantat bleibt dadurch aus [144]. Weniger als 10 % der injizierten Zellen wachsen erfolgreich in das Herzgewebe ein und überleben [145] [146]. Die überlebenden Zellen vermehren sich jedoch. Inzwischen ist bekannt, dass dieses Phänomen auf eine Untergruppe transplantiertter KM mit intrinsischer Proliferationsfähigkeit zurückzuführen ist [147]. Auch hier könnte die transkriptionelle Manipulation das Potenzial der iPSC KM zur praxisnahen Anwendung verstärken. Durch Gen-Editing-Technologien wie zum Beispiel CRISPR-Cas9 könnten kostengünstig und in großem Umfang homogene und funktionsfähige KM mit entsprechendem Sarkomernetzweg hergestellt werden. Jedoch steckt die Forschung hierzu noch in den Kinderschuhen.

Möchte man die generierten KM zur Testung von Medikamenten verwendet, sollten Pharmakodynamik und Pharmakokinetik nicht vernachlässigt werden. Dazu sind Technologien von Nöten, die eine realistische Gewebephysiologie simulieren. 3D-Bioprinting und mikrophysiologische Systeme, wie zum Beispiel *Multi-Organ-Chips*, versuchen die Komplexität des menschlichen Organismus abzubilden, die *in vitro* nur schwer reproduzierbar sind. Diese ahmen die Zirkulation von Metaboliten und biochemische Signalgradienten durch ein miteinander verbundenes Netzwerk von Kanälen nach, die einen Flüssigkeitsstrom ermöglichen [148] [149] [150]. Jedoch sind diese Innovationen noch nicht ausgereift und unterscheiden sich daher noch erheblich von den *in vivo* Bedingungen.

Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Differenzierungsprotokollen für aus iPSC generierten KM. Die Unterschiede in den Forschungsergebnissen verschiedenster Arbeitsgruppen spiegeln die

Vielfalt der Kulturbedingungen und Messmethoden wider. Daher ist für die Kultivierung und Differenzierung von iPSC KM ein standardisierter Ansatz erforderlich, um gruppen- und länderübergreifend Resultate vergleichen zu können. Es bedarf eines weltweiten, interdisziplinären Ansatzes, um das Ziel von geno- und phänotypisch adulten iPSC KM zu erreichen.

VII. PUBLIKATIONEN

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

- Lemcke Heiko, Skorska Anna, Lang Cajetan Immanuel, **Johann Lisa**, David Robert. Quantitative evaluation of the sarcomere network of human hiPSC-derived cardiomyocytes using single-molecule localization microscopy. *International Journal of Molecular Sciences* 2020 Apr 17;21(8):2819. doi: 10.3390/ijms21082819. PMID: 32316650; PMCID: PMC7216082; JIF: 6.208 (2021). [11]
- **Johann Lisa**, Chabanovska Oleksandra, Lang Cajetan Immanuel, David Robert, Lemcke Heiko. Analyzing the α -actinin network in human iPSC-derived cardiomyocytes using single molecule Localization Microscopy. *Journal of Visualized Experiments* 2020 Nov 3;(165). doi: 10.3791/61605. PMID: 33226020; JIF: 1.424 (2021) [87]
- Skorska Anna, **Johann Lisa**, Chabanovska Oleksandra, Vasudevan Parveen, Kusauer Sophie, Hillemanns Maximilian, Wolfien Markus, Jonitz-Heincke Anika, Wolkenhauer Olaf, Bader Rainer, Lang Hermann, David Robert, Lemcke Heiko. Monitoring the maturation of the sarcomere network: a super-resolution microscopy-based approach. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2022 Feb 23; 79(3):149. doi: 10.1007/s00018-022-04196-3. PMID: 35199227; PMCID: PMC8866374; JIF: 9.234 (2021). [84]

Weitere Publikationen:

- Madea Burkhard, **Johann Lisa**. Mordversuch und Mord durch Einspritzung von Luft, Benzin und Insulin. *Archiv für Kriminologie* 2021 Mai: 247:181-205
- Prangenberg Julian, Doberentz Elke, **Johann Lisa**, Madea Burkhard. The prognostic value of the Frank sign. *Forensic Science, Medicine and Pathology* 2022 Jun;18(2):149-155. doi: 10.1007/s12024-022-00463-8. Epub 2022 Feb 18. PMID: 35179701; PMCID: PMC9106634; JIF: 2.456 (2021).

VIII. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock _____

IX. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir dabei geholfen haben, heute dort zu sein, wo ich bin.

Ein großes Dankeschön gilt natürlich Dr. Lemcke, Prof. Dr. David und dem gesamten Team für die ausgezeichnete und allzeit schnelle Unterstützung bei der Umsetzung dieser Arbeit.

X. LITERATURVERZEICHNIS

1. Robert-Koch-Institut (2022) Sterblichkeit und Todesursachen. https://www.rki.de/DE/Content/GesundAZ/S/Sterblichkeit_Todesursachen/Sterblichkeit_Todesursachen_node.html. Zugegriffen: 04. März 2022
 2. Statistisches Bundesamt (2023) Todesursachen nach Krankheitsarten 2021. https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html#sprg235878. Zugegriffen: 23. März 2023
 3. Statistisches Bundesamt (2022) Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen insgesamt 2021. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>. Zugegriffen: 23. März 2023
 4. DocCheck Flexikon (2021) Herzmuskelzelle. https://flexikon.doccheck.com/de/Herzmuskelzelle?utm_source=www.doccheck.com&utm_medium=DC%2520Search&utm_campaign=DC%2520Search%2520content_type%253Aaall&utm_content=DC%2520Search%2520Kardiomyozyt. Zugegriffen: 01. März 2023
 5. Gerdes AM, Kellerman SE, Moore JA, Muffly KE, Clark LC, Reaves PY, Malec KB, McKeown PP, Schocken DD (1992) Structural remodeling of cardiac myocytes in patients with ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 86(2):426–430. doi:10.1161/01.CIR.86.2.426
 6. Deller T (2018) Histologie. Das Lehrbuch, 5. Aufl. Urban & Fischer in Elsevier
 7. Hescheler J (2019) Motorisches System. Quergestreifte Muskulatur. In: Speckmann E, Hescheler J, Köhling R (Hrsg) Physiologie. Das Lehrbuch, 7. Aufl. Urban & Fischer in Elsevier, S 177–196
 8. Sizarov A, Ya J, A. de Boer B, Boer BA de, Lamers WH, Christoffels VM, Moorman AFM (2011) Formation of the building plan of the human heart: morphogenesis, growth, and differentiation. *Circulation* 123(10):1125–1135. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.980607
 9. Karbassi E, Fenix A, Marchiano S, Muraoka N, Nakamura K, Yang X, Murry CE (2020) Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine. *Nat Rev Cardiol* 17(6):341–359. doi:10.1038/s41569-019-0331-x
 10. Guo Y, Pu WT (2020) Cardiomyocyte maturation: New phase in development. *Circ Res* 126(8):1086–1106. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315862
 11. Lemcke H, Skorska A, Lang CI, Johann L, David R (2020) Quantitative evaluation of the sarcomere network of human hiPSC-derived cardiomyocytes using single-molecule localization microscopy. *Int J Mol Sci* 21(8). doi:10.3390/ijms21082819
 12. BioRender.com (2017). <https://www.biorender.com>
-

13. Bedada FB, Chan SS-K, Metzger SK, Zhang L, Zhang J, Garry DJ, Kamp TJ, Kyba M, Metzger JM (2014) Acquisition of a quantitative, stoichiometrically conserved ratiometric marker of maturation status in stem cell-derived cardiac myocytes. *Stem Cell Reports* 3(4):594–605. doi:10.1016/j.stemcr.2014.07.012
 14. Lahmers S, Wu Y, Call DR, Labeit S, Granzier H (2004) Developmental control of titin isoform expression and passive stiffness in fetal and neonatal myocardium. *Circ Res* 94(4):505–513. doi:10.1161/01.RES.0000115522.52554.86
 15. Dou W, Wang L, Malhi M, Liu H, Zhao Q, Plakhotnik J, Xu Z, Huang Z, Simmons CA, Maynes JT, Sun Y (2021) A microdevice platform for characterizing the effect of mechanical strain magnitudes on the maturation of iPSC-Cardiomyocytes. *Biosens Bioelectron* 175:112875. doi:10.1016/j.bios.2020.112875
 16. Wheelwright M, Mikkila J, Bedada FB, Mandegar MA, Thompson BR, Metzger JM (2020) Advancing physiological maturation in human induced pluripotent stem cell-derived cardiac muscle by gene editing an inducible adult troponin isoform switch. *Stem Cells* 38(10):1254–1266. doi:10.1002/stem.3235
 17. Feyen DAM, McKeithan WL, Bruyneel AAN, Spiering S, Hörmann L, Ulmer B, Zhang H, Briganti F, Schweizer M, Hegyi B, Liao Z, Pölönen R-P, Ginsburg KS, Lam CK, Serrano R, Wahlquist C, Kreymerman A, Vu M, Amatya PL, Behrens CS, Ranjbarvaziri S, Maas RGC, Greenhaw M, Bernstein D, Wu JC, Bers DM, Eschenhagen T, Metallo CM, Merycola M (2020) Metabolic maturation media improve physiological function of human iPSC-derived cardiomyocytes. *Cell Rep* 32(3):107925. doi:10.1016/j.celrep.2020.107925
 18. Giacomelli E, Meraviglia V, Campostrini G, Cochrane A, Cao X, van Helden RWJ, Krotenberg Garcia A, Mircea M, Kostidis S, Davis RP, van Meer BJ, Jost CR, Koster AJ, Mei H, Míguez DG, Mulder AA, Ledesma-Terrón M, Pompilio G, Sala L, Salvatori DCF, Sliker RC, Sommariva E, Vries AAF de, Giera M, Semrau S, Tertoolen LGJ, Orlova VV, Bellin M, Mummery CL (2020) Human-iPSC-derived cardiac stromal cells enhance maturation in 3D cardiac microtissues and reveal non-cardiomyocyte contributions to heart disease. *Cell Stem Cell* 26(6):862-879.e11. doi:10.1016/j.stem.2020.05.004
 19. Chopra A, Kutys ML, Zhang K, Polacheck WJ, Sheng CC, Luu RJ, Eyckmans J, Hinson JT, Seidman JG, Seidman CE, Chen CS (2018) Force generation via β -cardiac myosin, titin, and α -actinin drives cardiac sarcomere assembly from cell-matrix adhesions. *Dev Cell* 44(1):87-96.e5. doi:10.1016/j.devcel.2017.12.012
 20. Zhao B, Zhang K, Chen CS, Lejeune E (2021) Sarc-Graph: Automated segmentation, tracking, and analysis of sarcomeres in hiPSC-derived cardiomyocytes. *PLOS Computational Biology* 17(10):e1009443. doi:10.1371/journal.pcbi.1009443
 21. Hinson JT, Chopra A, Nafissi N, Polacheck WJ, Benson CC, Swist S, Gorham J, Yang L, Schafer S, Sheng CC, Haghighi A, Homsy J, Hubner N, Church G, Cook SA, Linke WA,
-

- Chen CS, Seidman JG, Seidman CE (2015) HEART DISEASE. Titin mutations in iPS cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy. *Science* 349(6251):982–986. doi:10.1126/science.aaa5458
22. Gstraunthaler G, Lindl T (2021) Zell- und Gewebekultur. Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. Springer, Berlin
23. Romito A, Cobellis G (2016) Pluripotent stem cells: Current understanding and future directions. *Stem Cells Int* 2016:9451492. doi:10.1155/2016/9451492
24. Plattner H (2021) Abenteuer Zellbiologie - Streifzüge durch die Geschichte. Springer, Berlin
25. Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819):154–156. doi:10.1038/292154a0
26. Papatsenko D, Waghray A, Lemischka IR (2018) Feedback control of pluripotency in embryonic stem cells: Signaling, transcription and epigenetics. *Stem Cell Res* 29:180–188. doi:10.1016/j.scr.2018.02.012
27. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145–1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145
28. Püttmann H, Volhard T, Einsfelder N, Franzen J (2020) Im Blickpunkt: Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen. <https://www.drze.de/im-blickpunkt/stammzellen>
29. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
30. Kühl S, Kühl M (2012) Stammzellbiologie. Eugen Ulmer, Stuttgart
31. Ärzteblatt.de (2012) Nobelpreis für Medizin 2012 für Stammzellforscher. [https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/51923/Nobelpreis-fuer-Medizin-2012-fuer-Stammzellforscher#:~:text=Stockholm%20Der%20diesj%C3%A4hrige%20Nobelpreis%20f%C3%BCr,unreife%20Stammzellen%20zur%C3%BCckverwandelt%20werden%20k%C3%B6nnen](https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/51923/Nobelpreis-fuer-Medizin-2012-fuer-Stammzellforscher#:~:text=Stockholm%20Der%20diesj%C3%A4hrige%20Nobelpreis%20f%C3%BCr,unreife%20Stammzellen%20zur%C3%BCckverwandelt%20werden%20k%C3%B6nnen.). Zugegriffen: 23. März 2023
32. Gurdon JB (1962) The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Development* 10(4):622–640. doi:10.1242/dev.10.4.622
33. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* (448):318–324. doi:10.1038/nature05944
34. Wang L, Su Y, Huang C, Yin Y, Chu A, Knupp A, Tang Y (2019) NANOG and LIN28 dramatically improve human cell reprogramming by modulating LIN41 and canonical WNT activities. *Biology open* 8(12):bio047225. doi:10.1242/bio.047225
-

35. 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(5):861–872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
 36. 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* 318(5858):1917–1920. doi:10.1126/science.1151526
 37. Zhao T, Zhang Z-N, Rong Z, Xu Y (2011) Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 474(7350):212–215. doi:10.1038/nature10135
 38. HacHacein-Bey-Abina S, Kalle C von, Schmidt M et al (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302(5644):415–419. doi:10.1126/science.1088547
 39. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S (2011) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8(5):409–412. doi:10.1038/nmeth.1591
 40. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M (2009) Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85(8):348–362. doi:10.2183/pjab.85.348
 41. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322(5903):945–949. doi:10.1126/science.1162494
 42. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh Y-H, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7(5):618–630. doi:10.1016/j.stem.2010.08.012
 43. Kim D, Kim C-H, Moon J-I, Chung Y-G, Chang M-Y, Han B-S, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim K-S (2009) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4(6):472–476. doi:10.1016/j.stem.2009.05.005
 44. Yamanaka S (2012) Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell* 10(6):678–684. doi:10.1016/j.stem.2012.05.005
 45. Abu-Issa R, Kirby ML (2007) Heart field: from mesoderm to heart tube. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23:45–68. doi:10.1146/annurev.cell-bio.23.090506.123331
-

46. Rossant J, Tam PPL (2009) Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development* 136(5):701–713.
doi:10.1242/dev.017178
 47. 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. *Journal of Visualized Experiments* (91):52010. doi:10.3791/52010-v
 48. Mazzotta S, Neves C, Bonner RJ, Bernardo AS, Docherty K, Hoppler S (2016) Distinctive Roles of Canonical and Noncanonical Wnt Signaling in Human Embryonic Cardiomyocyte Development. *Stem Cell Reports* 7(4):764–776. doi:10.1016/j.stemcr.2016.08.008
 49. Pei F, Jiang J, Bai S, Cao H, Tian L, Zhao Y, Yang C, Dong H, Ma Y (2017) Chemical-defined and albumin-free generation of human atrial and ventricular myocytes from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* 19:94–103. doi:10.1016/j.scr.2017.01.006
 50. Kumar A, Novoselov V, Celeste AJ, Wolfman NM, Dijke P ten, Kuehn MR (2001) Nodal signaling uses activin and transforming growth factor-beta receptor-regulated Smads. *J Biol Chem* 276(1):656–661. doi:10.1074/jbc.M004649200
 51. Kadari A, Mekala S, Wagner N, Malan D, Köth J, Doll K, Stappert L, Eckert D, Peitz M, Matthes J, Sasse P, Herzig S, Brüstle O, Ergün S, Edenhofer F (2015) Robust generation of cardiomyocytes from human iPS cells requires precise modulation of BMP and WNT Signaling. *Stem Cell Rev Rep* 11(4):560–569. doi:10.1007/s12015-014-9564-6
 52. Batalov I, Feinberg AW (2015) Differentiation of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells using monolayer culture. *Biomark Insights* 10(1):71–76.
doi:10.4137/BMI.S20050
 53. Burridge PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD, Lan F, Diecke S, Huber B, Mordwinkin NM, Plews JR, Abilez OJ, Cui B, Gold JD, Wu JC (2014) Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods* 11(8):855–860.
doi:10.1038/nmeth.2999
 54. Cao N, Liu Z, Chen Z, Wang J, Chen T, Zhao X, Ma Y, Qin L, Kang J, Wei B, Wang L, Jin Y, Yang H-T (2012) Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. *Cell Res* 22(1):219–236. doi:10.1038/cr.2011.195
 55. Gessert S, Kühl M (2010) The multiple phases and faces of wnt signaling during cardiac differentiation and development. *Circ Res* 107(2):186–199.
doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.221531
 56. Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20:781–810. doi:10.1146/annurev.cell-bio.20.010403.113126
-

57. Maye P, Zheng J, Li L, Wu D (2004) Multiple mechanisms for Wnt11-mediated repression of the canonical Wnt signaling pathway. *J Biol Chem* 279(23):24659–24665. doi:10.1074/jbc.M311724200
 58. Ueno S, Weidinger G, Osugi T, Kohn AD, Golob JL, Pabon L, Reinecke H, Moon RT, Murry CE (2007) Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(23):9685–9690. doi:10.1073/pnas.0702859104
 59. Chabanovska O (2020) Programming of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Cardiac Pacemaker Cells
 60. Wang J, Greene SB, Martin JF (2011) BMP signaling in congenital heart disease: new developments and future directions. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91(6):441–448. doi:10.1002/bdra.20785
 61. Kami D, Shiojima I, Makino H, Matsumoto K, Takahashi Y, Ishii R, Naito AT, Toyoda M, Saito H, Watanabe M, Komuro I, Umezawa A (2008) Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. *PLoS ONE* 3(6):e2407. doi:10.1371/journal.pone.0002407
 62. Massey J, Liu Y, Alvarenga O, Saez T, Schmerer M, Warmflash A (2019) Synergy with TGF β ligands switches WNT pathway dynamics from transient to sustained during human pluripotent cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(11):4989–4998. doi:10.1073/pnas.1815363116
 63. Wegerhoff R (2015) Mikroskopische Verfahren. Lichtmikroskopie. In: Mulisch M, Welsch U (Hrsg) Romeis. Mikroskopische Technik. Springer Spektrum, Berlin, S 2–25
 64. Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF (2006) Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313(5793):1642–1645. doi:10.1126/science.1127344
 65. Hamers C, van den Boom F, Reimer R, Eggert D (2015) Hochauflösende Mikroskopie. In: Mulisch M, Welsch U (Hrsg) Romeis. Mikroskopische Technik. Springer Spektrum, Berlin, S 44–52
 66. Pohl DW (1984) Optisches Nahfeldabtastmikroskop (EP0112401A1). <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/008189426/publication/EP0112401A1?q=pn%3DEP0112401>. Zugegriffen: 23. März 2023
 67. Willig KI, Rizzoli SO, Westphal V, Jahn R, Hell SW (2006) STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 440(7086):935–939. doi:10.1038/nature04592
 68. Betzig E, Trautman Jay K (1992) Near-field optics: microscopy, spectroscopy, and surface modification beyond the diffraction limit. *Science* 257(5067):189–195. doi:10.1126/science.257.5067.189
-

69. Jradi FM, Lavis LD (2019) Chemistry of photosensitive fluorophores for single-molecule localization microscopy. *ACS Chem Biol* 14(6):1077–1090. doi:10.1021/acscchembio.9b00197
 70. NobelPrize.org (2014) The Nobel Prize in Chemistry 2014. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2014/summary/>. Zugegriffen: 05. März 2023
 71. Schmitz S, Desel C (2018) *Der Experimentator Zellbiologie*. Springer, Berlin
 72. Zeeck A, Grond S, Zeeck SC (2017) *Chemie für Mediziner*, 9. Aufl. Elsevier, Urban & Fischer, München
 73. Dobrucki JW, Kubitscheck U (2017) Fluorescence microscopy. In: Kubitscheck U (Hrsg) *Fluorescence microscopy. From principles to biological applications*, 2. Aufl. Wiley-VCH, Weinheim, S 85–182
 74. Gustafsson MG (2000) Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc* 198(2):82–87. doi:10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x
 75. Lippincott-Schwartz J, Patterson GH (2003) Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 379(6635):87–91
 76. Lukyanov KA, Chudakov DM, Lukyanov S, Verkhusha VV (2005) Photoactivatable fluorescent proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6:885–890
 77. Betzig E, Hess H (2011) Developing PALM Microscopy. *ibiology.org*. <https://www.ibiology.org/techniques/palm-microscopy/>. Zugegriffen: 23. März 2023
 78. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Gatto GJ (2013) *Biochemie*, 7. Aufl. Springer, Berlin
 79. Louis KS, Siegel AC (2011) Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol* 740:7–12. doi:10.1007/978-1-61779-108-6_2
 80. Brickman JM, Serup P (2017) Properties of embryoid bodies. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 6(2). doi:10.1002/wdev.259
 81. 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(3):173–182. doi:10.1111/j.1432-0436.1991.tb00255.x
 82. KUGELMEIERS Sphericalplate 5D. 3Dcell culture rEvolution. https://www.sp5d.com/cm/wp-content/uploads/Kugelmeiers-SOP_Manual-ohne-Brand.pdf. Zugegriffen: 23. März 2023
 83. Claassen DA, Desler MM, Rizzino A (2009) ROCK inhibition enhances the recovery and growth of cryopreserved human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Mol Reprod Dev* 76(8):722–732. doi:10.1002/mrd.21021
 84. Skorska A, Johann L, Chabanovska O, Vasudevan P, Kussauer S, Hillemanns M, Wolfien M, Jonitz-Heincke A, Wolkenhauer O, Bader R, Lang H, David R, Lemcke H (2022)
-

- Monitoring the maturation of the sarcomere network: a super-resolution microscopy-based approach. *Cell Mol Life Sci* 79(3):149. doi:10.1007/s00018-022-04196-3
85. Ackers-Johnson M, Li PY, Holmes AP, O'Brien S-M, Pavlovic D, Foo RS (2016) A simplified, langendorff-free method for concomitant isolation of viable cardiac myocytes and nonmyocytes from the adult mouse heart. *Circ Res* 119(8):909–920. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309202
86. Lemcke H, Peukert J, Voronina N, Skorska A, Steinhoff G, David R (2016) Applying 3D-FRAP microscopy to analyse gap junction-dependent shuttling of small antisense RNAs between cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 98:117–127. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.07.008
87. Johann L, Chabanovska O, Lang CI, David R, Lemcke H (2020) Analyzing the α -actinin network in human iPSC-derived cardiomyocytes using single molecule Localization Microscopy. *Journal of Visualized Experiments* (165). doi:10.3791/61605
88. Ovesný M, Křížek P, Borkovec J, Svindrych Z, Hagen GM (2014) ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. *Bioinformatics* 30(16):2389–2390. doi:10.1093/bioinformatics/btu202
89. Java ImageJ. Image processing and analysis in Java. <https://imagej.nih.gov/ij/>. Zugegriffen: 10. März 2023
90. Java ImageJ (2022) Z-functions. <https://imagej.net/imaging/z-functions>. Zugegriffen: 10. März 2022
91. Püspöki Z, Storath M, Sage D, Unser M (2016) Transforms and operators for directional bioimage analysis: A survey. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 219:69–93. doi:10.1007/978-3-319-28549-8_3
92. Java ImageJ (2018) Directionality. <https://imagej.net/plugins/directionality>. Zugegriffen: 10. März 2023
93. Lachmanski L, Hessemann R (2007) Partikelform – ein Parameter gewinnt an Bedeutung. Malvern Instruments. <https://www.process.vogel.de/partikelform-ein-parameter-gewinnt-an-bedeutung-a-59131/>
94. Funakoshi S, Fernandes I, Mastikhina O, Wilkinson D, Tran T, Dhahri W, Mazine A, Yang D, Burnett B, Lee J, Protze S, Bader GD, Nunes SS, Laflamme M, Keller G (2021) Generation of mature compact ventricular cardiomyocytes from human pluripotent stem cells. *Nature Communications* 12(1):3155. doi:10.1038/s41467-021-23329-z
95. Kolanowski TJ, Busek M, Schubert M, Dmitrieva A, Binnewerg B, Pöche J, Fisher K, Schmieder F, Grünzner S, Hansen S, Richter A, El-Armouche A, Sonntag F, Guan K (2020) Enhanced structural maturation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes under a controlled microenvironment in a microfluidic system. *Acta Biomater* 102:273–286. doi:10.1016/j.actbio.2019.11.044
-

96. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK (2002) Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 91(6):501–508. doi:10.1161/01.res.0000035254.80718.91
 97. Sepac A, Bosnjak ZJ, Seiwert S, Sikiric S, Dzombeta TR, Kulic A, Karsaj JM, Sedlic F (2021) Human C2a and C6a iPSC lines and H9 ESC line have less efficient cardiomyogenesis than H1 ESC line: Beating enhances cardiac differentiation. *Int J Dev Biol* 65(10-11-12):537–543. doi:10.1387/ijdb.210115fs
 98. Huethorst E, Hortigon M, Zamora-Rodriguez V, Reynolds PM, Burton F, Smith G, Gadegaard N (2016) Enhanced human-induced pluripotent stem cell derived cardiomyocyte maturation using a dual microgradient substrate. *ACS Biomaterials Science & Engineering* 2(12):2231–2239. doi:10.1021/acsbomaterials.6b00426
 99. Khan M, Xu Y, Hua S, Johnson J, Belevych A, Janssen PML, Gyorke S, Guan J, Angelos MG (2015) Evaluation of changes in morphology and function of human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) cultured on an aligned-nanofiber cardiac patch. *PLoS ONE* 10(5):e0126338. doi:10.1371/journal.pone.0126338
 100. Lundy SD, Zhu W-Z, Regnier M, Laflamme MA (2013) Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells and Development* 22(14):1991–2002. doi:10.1089/scd.2012.0490
 101. Nawroth JC, Scudder LL, Halvorson RT, Tresback J, Ferrier JP, Sheehy SP, Cho A, Kannan S, Sunyovszki I, Goss JA, Campbell PH, Parker KK (2018) Automated fabrication of photopatterned gelatin hydrogels for organ-on-chips applications. *Biofabrication* 10(2):25004. doi:10.1088/1758-5090/aa96de
 102. Jiwlawat N, Lynch EM, Napiwocki BN, Stempien A, Ashton RS, Kamp TJ, Crone WC, Suzuki M (2019) Micropatterned substrates with physiological stiffness promote cell maturation and Pompe disease phenotype in human induced pluripotent stem cell-derived skeletal myocytes. *Biotechnology and Bioengineering* 116(9):2377–2392. doi:10.1002/bit.27075
 103. Zhang R, Guo T, Han Y, Huang H, Shi J, Hu J, Li H, Wang J, Saleem A, Zhou P, Lan F (2021) Design of synthetic microenvironments to promote the maturation of human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 109(7):949–960. doi:10.1002/jbm.b.34759
 104. Abadi PPSS, Garbern JC, Behzadi S, Hill MJ, Tresback JS, Heydari T, Ejtehadi MR, Ahmed N, Copley E, Aghaverdi H, Lee RT, Farokhzad OC, Mahmoudi M (2018) Engineering of mature human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes using substrates with multiscale topography. *Advanced Functional Materials* 28(19):1707378. doi:10.1002/adfm.201707378
-

105. Ribeiro AJS, Ang Y-S, Fu J-D, Rivas RN, Mohamed TMA, Higgs GC, Srivastava D, Pruitt BL (2015) Contractility of single cardiomyocytes differentiated from pluripotent stem cells depends on physiological shape and substrate stiffness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(41):12705–12710. doi:10.1073/pnas.1508073112
106. Sheehy SP, Grosberg A, Qin P, Behm DJ, Ferrier JP, Eagleson MA, Nesmith AP, Krull D, Falls JG, Campbell PH, McCain ML, Willette RN, Hu E, Parker KK (2017) Toward improved myocardial maturity in an organ-on-chip platform with immature cardiac myocytes. *Experimental Biology and Medicine* 242(17):1643–1656. doi:10.1177/1535370217701006
107. Wanjare M, Hou L, Nakayama KH, Kim JJ, Mezak NP, Abilez OJ, Tzatzalos E, Wu JC, Huang NF (2017) Anisotropic microfibrinous scaffolds enhance the organization and function of cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells. *Biomater Sci* 5(8):1567–1578. doi:10.1039/c7bm00323d
108. Song K-Y, Correia JC, Ruas JL, Teixeira AI (2021) Effects of topological constraints on the alignment and maturation of multinucleated myotubes. *Biotechnology and Bioengineering* 118(6):2234–2242. doi:10.1002/bit.27731
109. Dainis A, Zaleta-Rivera K, Ribeiro A, Chia Hao Chang A, Shang C, Lan F, Burrige PW, Liu WR, Wu JC, Chia Yu Chang A, Pruitt BL, Wheeler M, Ashley E (2020) Silencing of MYH7 ameliorates disease phenotypes in human iPSC-cardiomyocytes. *Physiological Genomics* 52(7):293–303. doi:10.1152/physiolgenomics.00021.2020
110. Pasqualini FS, Agarwal A, O'Connor BB, Liu Q, Sheehy SP, Parker KK (2018) Traction force microscopy of engineered cardiac tissues. *PLoS ONE* 13(3):e0194706. doi:10.1371/journal.pone.0194706
111. Coppola S, Schmidt T, Ruocco G, Antonacci G (2019) Quantifying cellular forces and biomechanical properties by correlative micropillar traction force and Brillouin microscopy. *Biomed Opt Express* 10(5):2202–2212. doi:10.1364/BOE.10.002202
112. 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. *Circulation Journal* 77(5):1307–1314. doi:10.1253/circj.cj-12-0987
113. Vreeker A, van Stuijvenberg L, Hund TJ, Mohler PJ, Nikkels PGJ, van Veen TAB (2014) Assembly of the cardiac intercalated disk during pre- and postnatal development of the human heart. *PLoS ONE* 9(4):e94722. doi:10.1371/journal.pone.0094722
114. Dias TP, Pinto SN, Santos JI, Fernandes TG, Fernandes F, Diogo MM, Prieto M, Cabral JMS (2018) Biophysical study of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte structural maturation during long-term culture. *Biochem Biophys Res Commun* 499(3):611–617. doi:10.1016/j.bbrc.2018.03.198
-

115. Mohamed MA, Shahini A, Rajabian N, Caserto J, El-Sokkary AMA, Akl MA, Andreadis ST, Cheng C (2021) Fast photocurable thiol-ene elastomers with tunable biodegradability, mechanical and surface properties enhance myoblast differentiation and contractile function. *Bioact Mater* 6(7):2120–2133. doi:10.1016/j.bioactmat.2020.12.022
116. Takahashi H, Shimizu T, Okano T (2018) Engineered human contractile myofiber sheets as a platform for studies of skeletal muscle physiology. *Scientific Reports* 8(1):13932. doi:10.1038/s41598-018-32163-1
117. Berciano MT, Castillo-Iglesias MS, Val-Bernal JF, Lafarga V, Rodriguez-Rey JC, Lafarga M, Tapia O (2020) Mislocalization of SMN from the I-band and M-band in human skeletal myofibers in spinal muscular atrophy associates with primary structural alterations of the sarcomere. *Cell and Tissue Research* 381(3):461–478. doi:10.1007/s00441-020-03236-3
118. Picchio L, Legagneux V, Deschamps S, Renaud Y, Chauveau S, Paillard L, Jagla K (2018) Bruno-3 regulates sarcomere component expression and contributes to muscle phenotypes of myotonic dystrophy type 1. *Dis Model Mech* 11(5):dmm031849. doi:10.1242/dmm.031849
119. van der Velden J, Stienen GJM (2019) Cardiac disorders and pathophysiology of sarcomeric proteins. *Physiol Rev* 99(1):381–426. doi:10.1152/physrev.00040.2017
120. Iruretagoyena JI, Gonzalez-Tendero A, Garcia-Canadilla P, Amat-Roldan I, Torre I, Nadal A, Crispi F, Gratacos E (2014) Cardiac dysfunction is associated with altered sarcomere ultrastructure in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 210(6):550.e1-7. doi:10.1016/j.ajog.2014.01.023
121. Clippinger SR, Cloonan PE, Greenberg L, Ernst M, Stump WT, Greenberg MJ (2019) Disrupted mechanobiology links the molecular and cellular phenotypes in familial dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(36):17831–17840. doi:10.1073/pnas.1910962116
122. Mahadev K, Wu X, Donnelly S, Ouedraogo R, Eckhart AD, Goldstein BJ (2008) Adiponectin inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration of human coronary artery endothelial cells. *Cardiovascular Research* 78(2):376–384. doi:10.1093/cvr/cvn034
123. Yang X, Pabon L, Murry CE (2014) Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res* 114(3):511–523. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.300558
124. Zuppinger C, Gibbons G, Dutta-Passecker P, Segiser A, Most H, Suter TM (2017) Characterization of cytoskeleton features and maturation status of cultured human iPSC-derived cardiomyocytes. *Eur J Histochem* 61(2):2763. doi:10.4081/ejh.2017.2763
-

125. Wheelwright M, Win Z, Mikkila JL, Amen KY, Alford PW, Metzger JM (2018) Investigation of human iPSC-derived cardiac myocyte functional maturation by single cell traction force microscopy. *PLoS ONE* 13(4):e0194909. doi:10.1371/journal.pone.0194909
126. Daadi MM, Barberi T, Shi Q, Lanford RE (2014) Nonhuman primate models in translational regenerative medicine. *Stem Cells and Development* 23:83–87. doi:10.1089/scd.2014.0374
127. Gallego Romero I, Pavlovic BJ, Hernando-Herraez I, Zhou X, Ward MC, Banovich NE, Kagan CL, Burnett JE, Huang CH, Mitrano A, Chavarria CI, Friedrich Ben-Nun I, Li Y, Sabatini K, Leonardo TR, Parast M, Marques-Bonet T, Laurent LC, Loring JF, Gilad Y (2015) A panel of induced pluripotent stem cells from chimpanzees: a resource for comparative functional genomics. *Elife* 4:e07103. doi:10.7554/eLife.07103
128. Hong SG, Lin Y, Dunbar CE, Zou J (2016) The role of nonhuman primate animal models in the clinical development of pluripotent stem cell therapies. *Molecular Therapy* 24(7):1165–1169. doi:10.1038/mt.2016.131
129. Cardoso-Moreira M, Sarropoulos I, Velten B, Mort M, Cooper DN, Huber W, Kaessmann H (2020) Developmental gene expression differences between humans and mammalian models. *Cell Rep* 33(4):108308. doi:10.1016/j.celrep.2020.108308
130. Ronaldson-Bouchard K, Ma SP, Yeager K, Chen T, Song L, Sirabella D, Morikawa K, Teles D, Yazawa M, Vunjak-Novakovic G (2018) Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. *Nature* 556(7700):239–243. doi:10.1038/s41586-018-0016-3
131. McDonald KS, Hanft LM, Robinett JC, Guglin M, Campbell KS (2020) Regulation of myofilament contractile function in human donor and failing hearts. *Front Physiol* 11:468. doi:10.3389/fphys.2020.00468
132. Iorga B, Schwanke K, Weber N, Wendland M, Greten S, Piep B, Dos Remedios CG, Martin U, Zweigerdt R, Kraft T, Brenner B (2017) Differences in contractile function of myofibrils within human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes vs. adult ventricular myofibrils are related to distinct sarcomeric protein isoforms. *Front Physiol* 8:1111. doi:10.3389/fphys.2017.01111
133. Wright PT, Tsui SF, Francis AJ, MacLeod KT, Marston SB (2020) Approaches to high-throughput analysis of cardiomyocyte contractility. *Front Physiol* 11:612. doi:10.3389/fphys.2020.00612
134. Baddeley D, Bewersdorf J (2018) Biological insight from super-resolution microscopy. What we can learn from localization-based images. *Annu Rev Biochem* 87:965–989. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014801
-

135. Kussauer S, David R, Lemcke H (2019) hiPSCs derived cardiac cells for drug and toxicity screening and disease modeling: What micro- electrode-array analyses can tell us. *Cells* 8(11). doi:10.3390/cells8111331
136. Ylä-Herttuala S (2018) iPSC-derived cardiomyocytes taken to rescue infarcted heart muscle in coronary heart disease Patients. *Mol Ther* 26(9):2077. doi:10.1016/j.ymthe.2018.08.006
137. Kadota S, Shiba Y (2019) Pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte transplantation for heart disease treatment. *Curr Cardiol Rep* 21(8):73. doi:10.1007/s11886-019-1171-3
138. Abilez OJ, Tzatzalos E, Yang H, Zhao M-T, Jung G, Zöllner AM, Tiburcy M, Riegler J, Matsa E, Shukla P, Zhuge Y, Chour T, Chen VC, BurrIDGE PW, Karakikes I, Kuhl E, Bernstein D, Couture LA, Gold JD, Zimmermann WH, Wu JC (2018) Passive stretch induces structural and functional maturation of engineered heart muscle as predicted by computational modeling. *Stem cells* 36(2):265–277. doi:10.1002/stem.2732
139. 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(6):989–999. doi:10.1007/s12265-013-9510-z
140. Sun X, Nunes SS (2016) Biowire platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Methods* 101:21–26. doi:10.1016/j.ymeth.2015.11.005
141. Simons E, Loeys B, Alaerts M (2023) iPSC-derived cardiomyocytes in inherited cardiac arrhythmias: Pathomechanistic discovery and drug development. *Biomedicines* 11(2):334. doi:10.3390/biomedicines11020334
142. Friedman CE, Nguyen Q, Lukowski SW, Helfer A, Chiu HS, Miklas J, Levy S, Suo S, Han J-DJ, Osteil P, Peng G, Jing N, Baillie GJ, Senabouth A, Christ AN, Bruxner TJ, Murry CE, Wong ES, Ding J, Wang Y, Hudson J, Ruohola-Baker H, Bar-Joseph Z, Tam PPL, Powell JE, Palpant NJ (2018) Single-cell transcriptomic analysis of cardiac differentiation from human PSCs reveals HOPX-dependent cardiomyocyte maturation. *Cell Stem Cell* 23(4):586-598.e8. doi:10.1016/j.stem.2018.09.009
143. Selvakumar D, Reyes L, Chong JJH (2022) Cardiac cell therapy with pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: What has been done and what remains to do? *Curr Cardiol Rep* 24(5):445–461. doi:10.1007/s11886-022-01666-9
144. Xu H, Wang B, Ono M, Kagita A, Fujii K, Sasakawa N, Ueda T, Gee P, Nishikawa M, Nomura M, Kitaoka F, Takahashi T, Okita K, Yoshida Y, Kaneko S, Hotta A (2019) Targeted disruption of HLA genes via CRISPR-Cas9 generates iPSCs with enhanced immune compatibility. *Cell Stem Cell* 24(4):566-578.e7. doi:10.1016/j.stem.2019.02.005

145. Guo Y, Wysoczynski M, Nong Y, Tomlin A, Zhu X, Gumpert AM, Nasr M, Muthusamy S, Li H, Book M, Khan A, Hong KU, Li Q, Bolli R (2017) Repeated doses of cardiac mesenchymal cells are therapeutically superior to a single dose in mice with old myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 112(2):18. doi:10.1007/s00395-017-0606-5
146. Zeng L, Hu Q, Wang X, Mansoor A, Lee J, Feygin J, Zhang G, Suntharalingam P, Boozer S, Mhashilkar A, Panetta CJ, Swingen C, Deans R, From AHL, Bache RJ, Verfaillie C, Zhang J (2007) Bioenergetic and functional consequences of bone marrow-derived multipotent progenitor cell transplantation in hearts with postinfarction left ventricular remodeling. *Circulation* 115(14):1866–1875
147. El-Nachef D, Bugg D, Beussman KM, Steczina S, Martinson AM, Murry CE, Sniadecki NJ, Davis J (2021) Engrafted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes undergo clonal expansion in vivo. *Circulation* 143(16):1635–1638. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044974
148. Lind JU, Busbee TA, Valentine AD, Pasqualini FS, Yuan H, Yadid M, Park S-J, Kottikian A, Nesmith AP, Campbell PH, Vlassak JJ, Lewis JA, Parker KK (2017) Instrumented cardiac microphysiological devices via multimaterial three-dimensional printing. *Nat Mater* 16(3):303–308. doi:10.1038/nmat4782
149. Qian F, Huang C, Lin Y-D, Ivanovskaya AN, O'Hara TJ, Booth RH, Creek CJ, Enright HA, Soscia DA, Belle AM, Liao R, Lightstone FC, Kulp KS, Wheeler EK (2017) Simultaneous electrical recording of cardiac electrophysiology and contraction on chip. *Lab on a Chip* 17(10):1732–1739. doi:10.1039/c7lc00210f
150. Marsano A, Conficconi C, Lemme M, Occhetta P, Gaudiello E, Votta E, Cerino G, Redaelli A, Rasponi M (2016) Beating heart on a chip: a novel microfluidic platform to generate functional 3D cardiac microtissues. *Lab on a Chip* 16(3):599–610. doi:10.1039/c5lc01356a