

**Metabolische Selektion von Kardiomyozyten und Generierung kardialer
Monolayer aus embryonalen Stammzellen der Maus**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Frederic Justus Pesch
aus Heidelberg

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Physiologisches Institut

Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Sauer

Gutachter: PD Dr. Christian Troidl

Tag der Disputation: 13. November 2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung der Herzzellforschung für Erkrankungen des Herzens	1
1.1.1	Häufigkeitsverteilung von Todesursachen in Deutschland	1
1.1.2	Herzersatzverfahren und Unterstützungssysteme	3
1.1.3	Herztransplantation, Spenderorgane und Xenotransplantation	3
1.1.4	Regenerative Medizin als neuer Forschungsschwerpunkt	4
1.2	Stammzellen	5
1.2.1	Totipotente Stammzellen	6
1.2.2	Pluripotente Stammzellen	6
1.2.2.1	Embryonale Stammzellen	6
1.2.2.2	Induzierte pluripotente Stammzellen	6
1.2.3	Weitere Stammzellarten	7
1.2.4	Therapeutische Einsatzgebiete von Stammzellen	7
1.2.5	Wege zum Erhalt der Pluripotenz embryonaler Stammzellen	7
1.3	Kardiomyogenese	8
1.3.1	Kardiomyogenese in vivo bei der Maus	8
1.3.2	Kardiomyogenese in vitro	13
1.4	Anpassungen des Stoffwechsels im Zuge der Zelldifferenzierung	15
1.4.1	Energiestoffwechselwege in Stammzellen	15
1.4.2	Stoffwechselwege in kardialen Vorläuferzellen und Kardiomyozyten	17
1.5	Maturation von Kardiomyozyten	21
1.6	Gewinnung von Kardiomyozyten/ kardialer Gewebe in Reinform	24
1.6.1	Isolation von Kardiomyozyten aus dem Individuum	25
1.6.2	Selektion von Kardiomyozyten mittels Geneticin-Resistenz	26
1.6.3	Metabolische Selektion von Kardiomyozyten	26
1.7	Ca²⁺-Metabolismus in Kardiomyozyten	29
1.8	Resveratrol – bekannte Stoffwechselwege und Eigenschaften	32
1.9	Zielsetzung der Arbeit	36
2	Material	37
2.1	Firmenanschriften	37
2.2	Geräte und Apparaturen	39
2.3	Chemikalien und Lösungen	41
2.4	Antikörper: primär, sekundär	42
2.5	Software	43
2.6	Zusammensetzung von Pufferlösungen und Zellkultur-Medium	43

2.6.1	Pufferlösungen	43
2.6.1.1	10x konzentrierte Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	43
2.6.1.2	Einfach konzentrierte 1x PBS	43
2.6.1.3	PBS + Triton X-100 (PBST) 1%	43
2.6.1.4	PBST 0,01%	44
2.6.1.5	Hitze-inaktiviertes, 10%iges Fetales Kälberserum (hiFCS)	44
2.6.2	Zellkultur-Medium	44
2.6.2.1	LifPIpro-Medium	44
2.6.2.2	EMFI-Medium	44
2.6.2.3	CCE-Medium	45
2.6.2.4	Laktat-Medium	45
2.6.2.4.1	Laktat-Medium ohne BSA (Lac)	45
2.6.2.4.2	Laktat-Medium + BSA (L+B)	45
2.7	Verwendete Zelllinie	45
2.8	Albumin/ BSA	46
2.9	BAPTA-AM	47
2.10	Fluo-4-AM	48
3	Methoden	49
3.1	Embryonale Stammzellen	49
3.1.1	Auftauen von Feederzellen	49
3.1.2	Inaktivierung von Feederzellen	50
3.1.3	Auftauen von Stammzellen	50
3.1.4	Umsetzen von Stammzellen	51
3.2	Differenzierung der embryonalen Stammzellen	52
3.2.1	Vorbereitung der Spinnerflasche	52
3.2.2	Ansetzen der Spinnerflasche	53
3.3	Behandlungsprotokoll mit Laktat-haltigem Medium	54
3.4	Dissoziation der EBs	55
3.5	Behandlungsprotokoll der dissoziierten Kardiomyozyten mit BAPTA-AM	56
3.6	Bestimmung der Kontraktilität und Größenverlaufsmessung der EBs ..56	
3.7	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	57
3.8	Immunhistochemie	58
3.8.1	α-Actinin/ DRAQ5-Färbung	58
3.8.2	Connexin 43/ α-Actinin/ DRAQ5-Färbung	60
3.9	Messung von Calcium-Transienten	61

3.10	Statistische Auswertung	65
4	Ergebnisse	66
4.1	Größenentwicklung der EBs in Abhängigkeit des Nährmediums	67
4.1.1	Einfluss von BSA auf den EB-Durchmesser	69
4.2	Einfluss von Laktat-Medium auf den Anteil kontrahierender EBs	71
4.3	Immunhistochemische Darstellung von Kardiomyozyten	73
4.3.1	Optimierung des Anteils von Kardiomyozyten an der Gesamtzellzahl	75
4.3.2	Einfluss von BSA auf die metabolische Selektion der Kardiomyozyten	78
4.3.3	Vorliegen von Gap Junctions nach metabolischer Selektion	81
4.4	Effekt des Ca ²⁺ -Chelators BAPTA auf die Zelldifferenzierung	82
4.5	Calcium-Oszillationsmessungen	85
4.5.1	Effekt von Resveratrol auf die Frequenz der Calcium-Oszillationen	87
4.5.1.1	Vergleich des Einflusses von Resveratrol/ Isoprenalin	90
4.5.2	Untersuchung weiterer Parameter der Calcium-Oszillationen	92
4.5.2.1	Effekt von Resveratrol auf die Amplitude der Calcium-Transienten	92
4.5.2.2	Effekt von Resveratrol auf die Dauer der Calcium-Spikes	93
4.5.2.3	Effekt von Resveratrol auf die TTP	95
4.6	Generierung funktionell gekoppelter, kardialer Monolayer	97
4.6.1	Lichtmikroskopische Darstellung eines kardialen Monolayers	98
4.6.2	Immunhistochemische Darstellung eines kardialen Monolayers	99
4.6.3	Calcium-Transienten in kardialen Monolayern	101
5	Diskussion	103
5.1	Laktat-Selektion	103
5.1.1	Grenzen der Laktat-Selektion	103
5.1.2	Optimierung der Laktat-Behandlung	104
5.1.3	Effekt von BSA	106
5.1.4	Strukturelle Veränderungen unter Laktat-Medium	106
5.2	Effekt des Calcium-Chelators BAPTA	107
5.3	Calcium-Oszillationsmessungen mit Resveratrol	109
5.4	Generierung eines konfluenten, kardialen Zellverbandes	111
6	Zusammenfassung	114
7	Summary	115
8	Abkürzungsverzeichnis	116
9	Literaturverzeichnis	122
9.1	Weitere Quellen	152
10	Ehrenwörtliche Erklärung	154

11 Danksagung.....155

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit gewährt einen Überblick über die Entwicklung von Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen am Beispiel von Stammzellen der Maus und beschreibt die hierzu durchgeführten Experimente und Ergebnisse. Die Entwicklung von Myokardgewebe aus Stammzellen stellt einen neuen Behandlungsansatz in Bezug auf Erkrankungen des Herzens dar und bietet viele Vorteile gegenüber bisherigen Therapieansätzen.

Zunächst wird kurz auf die Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen beim Menschen eingegangen, insbesondere auf die Herzinsuffizienz, sowie die derzeit gängigen Therapieverfahren betrachtet. Im Zuge der Heranführung an den experimentellen Teil dieser Arbeit erfolgt sodann die Betrachtung der verschiedenen Stammzellarten, gefolgt von der Diskussion relevanter Signalwege für die Differenzierung von Kardiomyozyten. Hierbei werden die Methoden zur Gewinnung reiner Kardiomyozyten-Populationen diskutiert. Anschließend wird die Rolle von Ca^{2+} in Bezug auf die Herzaktion betrachtet und näher auf die biologischen Effekte von 3,4',5-Stilbentriol (auch bekannt als Resveratrol) eingegangen, welche Gegenstand der Untersuchungen an den experimentell gewonnenen Kardiomyozyten sind.

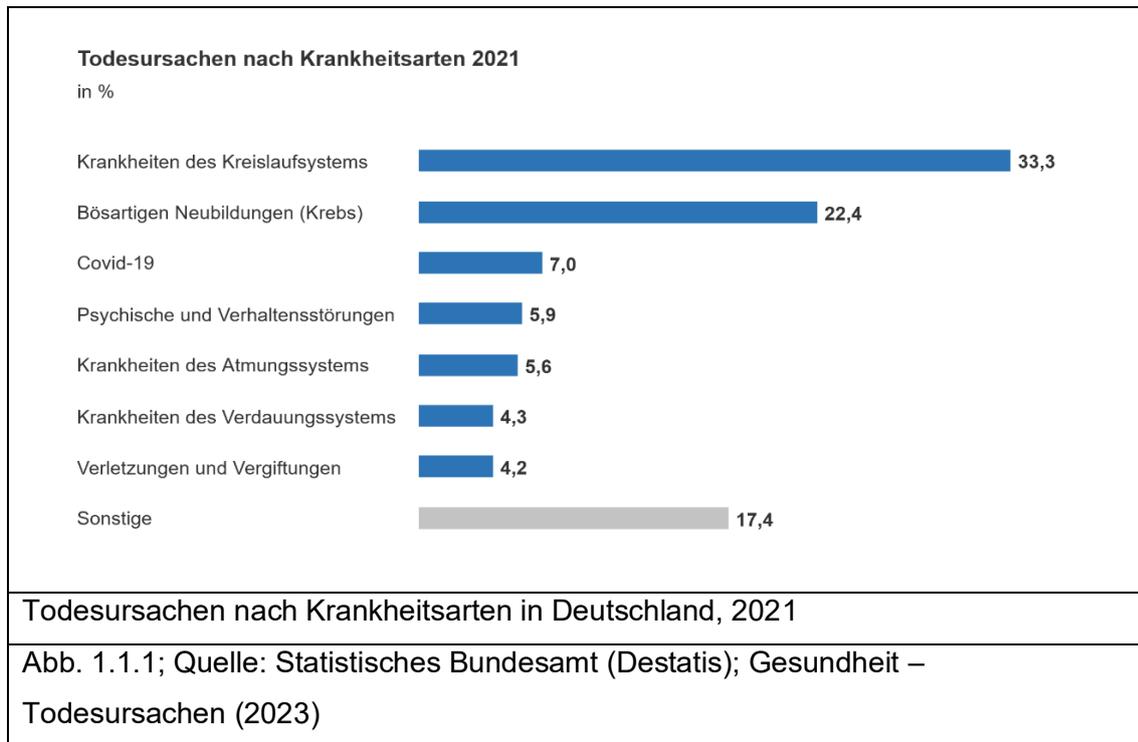
Im experimentellen Teil ist die Anwendung und Optimierung der Selektion von Kardiomyozyten-Populationen der CCE-Stammzelllinie der Maus beschrieben. Es wird der Einfluss des Calcium-Chelators BAPTA auf Kardiomyozyten untersucht. Des Weiteren wird der Effekt von Resveratrol auf Calcium-Transienten in Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen der Maus betrachtet. Darüber hinaus wird die Generierung kardialer Monolayer aus embryonalen Stammzellen gezeigt.

1.1 Bedeutung der Herzzellforschung für Erkrankungen des Herzens

1.1.1 Häufigkeitsverteilung von Todesursachen in Deutschland

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stehen in Deutschland mit 33,3% und über 340.000 Todesfällen für die Haupttodesursache (Statistisches Bundesamt (Destatis): Todesursachen 2021, Grafik & Textquelle (2023); Abb. 1.1.1). Dabei entfallen die meisten Todesfälle auf Menschen über 65 Jahre (Statistisches Bundesamt (Destatis):

23211-0004: Gestorbene: Deutschland, Jahre, Todesursachen, Geschlecht, Altersgruppen (2022)).



Da Herz-Kreislauf-Erkrankungen und insbesondere die Herzinsuffizienz eine starke Einschränkung der Betroffenen und zusätzlich eine hohe monetäre Belastung des Gesundheitssystems darstellen, sind diverse Therapiestrategien entwickelt worden, die heute klinische Anwendung finden (Jones et al., 2019; Kottmair et al., 2005). Ziel der Behandlung ist dabei stets, die Lebensqualität und die Lebenserwartung der Betroffenen zu verbessern.

Dabei geht die Herzinsuffizienz auf eine Schädigung des Myokards zurück, welche zu einer reduzierten Auswurfleistung des Herzens führt (Ziaeian & Fonarow, 2016). Die Therapie orientiert sich am Stufenschema der New York Heart Association, welche die Herzinsuffizienz nach Schweregrad der Symptomatik einteilt. Bei der medikamentösen Behandlung sind Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer (ACE-Hemmer), Betablocker und Aldosteron-Antagonisten Therapeutika der ersten Wahl. So führen insbesondere ACE-Hemmer und verwandte Medikamente, welche in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System eingreifen, zu einer deutlich reduzierten Mortalität (Leong et al., 2019). Ist allerdings das Herz schon soweit geschädigt, dass eine Eskalation der medikamentösen Therapie nicht mehr ausreichend ist, können je nach Herzerkrankung weitere Therapiemaßnahmen zum Einsatz kommen. Hierzu zählen beispielsweise der Einsatz von Herzunterstützungssystemen sowie im weiteren Schritt die Herztransplantation.

1.1.2 Herzersatzverfahren und Unterstützungssysteme

Eine schon früh zum Einsatz gelangte Therapiemöglichkeit ist die Unterstützung des Herzens durch ein mechanisches Supplement der Pumpfunktion. Dabei war die Entwicklung der Herz-Lungen-Maschine und ihr erfolgreicher Einsatz ab 1953 bei Herzoperationen ein entscheidender Schritt (Böttcher & Woysch, 2006). Weitere Forschung im Verlauf der Zeit ermöglichte die Entwicklung mobiler, mechanischer Unterstützungssysteme für die Pumpfunktion des Herzens. Diese werden je nach beteiligter Herzkammer als rechts-, links- oder bi-ventrikuläre Unterstützungssysteme (engl.: Right/ Left/ Bi Ventricular Assist Device, RVAD/ LVAD/ BiVAD) bezeichnet. Das LVAD ist die häufigste genutzte Variante und zeigte 2001 in der REMATCH-Studie ein signifikant besseres Überleben (52% vs. 25%, $p=0,002$) nach einem Jahr im Vergleich zu einer medikamentösen Maximaltherapie (Rose et al., 2001). Indikationen für die Implantation eines LVAD-Systems sind beispielsweise die Überbrückung der Zeitspanne bis zur Transplantation eines Spenderorgans, die vorübergehende kardiale Entlastung bei schwerer Myokarditis oder als finale Therapieform aufgrund des Mangels an Spenderorganen (Kadokia et al., 2016; O'Hara, 2021).

1.1.3 Herztransplantation, Spenderorgane und Xenotransplantation

Erstmals erfolgreich am Menschen wurde eine Herztransplantation 1967 in Kapstadt durch Barnard und sein Team durchgeführt (Barnard, 1967). Seither wurden die Transplantationsverfahren sowie die Nachbehandlungen fortwährend weiterentwickelt. Die Zahl der durchgeführten Transplantationen hat sich seither beständig erhöht. So sind im Jahr 2021 im Eurotransplant-Raum (Belgien, Deutschland, Kroatien, Luxemburg, Niederlande, Österreich, Slowenien und Ungarn) 571 Herzen, davon 329 in Deutschland, transplantiert worden. Allerdings besteht über einen Zeitraum der letzten 10 Jahre (2012 bis 2021) in jedem einzelnen Jahr ein deutlich höherer Bedarf an Spenderherzen (Eurotransplant: Eurotransplant region; Eurotransplant: Eurotransplant – Statistics Report Library, 2012-2021).

Die mittlere Transplantatlebensdauer beträgt derzeit etwa 12 Jahre, wobei herztransplantierte Frauen im Mittel eine etwas höhere Überlebenszeit aufweisen (Hsieh et al., 2020). Die Verbesserung des Langzeitüberlebens der letzten Jahrzehnte erfolgte trotz Zunahme von Risikofaktoren für ein Transplantatversagen. Diese Risiken sind u.a. ein höheres Lebensalter von Spender und Empfänger, sowie ein erhöhter Body-Mass-Index der Empfänger bei Transplantation (Reul Jr. et al., 2021; Stehlik et al., 2018).

Der große Nachteil einer Herztransplantation besteht in einer anschließend lebenslang notwendigen Immunsuppression und den damit verbundenen Nebenwirkungen, um eine Abstoßungsreaktion des körperfremden Gewebes zu unterdrücken. Dabei zählen die Transplantat-Vaskulopathie, Infektionen, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Einschränkungen der Nierenfunktion und Tumorbildung zu den häufigsten Komplikationen (Kirklin et al., 2003; Laks & Dipchand, 2022; Ojo et al., 2003; Stehlik et al. 2018; Van Keer et al., 2019; Vassalli et al., 2003).

Um den Mangel an Spenderorganen zu kompensieren, werden auch die Möglichkeiten einer Xenotransplantation erforscht. Dienten zunächst Primaten als Spender, werden neuerdings vermehrt genetisch modifizierte Schweine als Organspender erprobt, da sie gegenüber Primatenarten vorteilhafter in Bezug auf Aufzucht, Organgröße oder übertragbare Infektionen sind (Cooper et al., 2016 & 2018). Die genetische Modifikation der Spendertiere ist nötig, da präformierte Donor-spezifische Antikörper sowohl in Menschen wie auch in Empfänger-Versuchstieren vorkommen, die zu einer Abstoßungsreaktion innerhalb von Minuten (min) bis Stunden (h) führen (Lexer et al., 1986). Hauptkatalysator der angeborenen Immunantwort gegen transplantierte Schweineorgane ist Galactose- α 1,3-Galactose (Good et al., 1992). Durch Knockout der produzierenden Transferase und in Kombination mit einem Komplement-regulierenden Protein wie Cluster of Differentiation 46 (CD46 sowie weitere wie CD55, CD59) kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Immunantwort und einem verbesserten Transplantatüberleben (Hara et al., 2008). Waren bislang Xenotransplantationen am Tier Gegenstand der Forschung, so erfolgte im Januar 2022 die erste Xenotransplantation eines genetisch modifizierten Schweineherzens durch Griffith und sein Team. Der Empfänger war ein 57-jähriger, terminal herzkranker Patient (Kotz, 2022b). Zwei Monate nach Transplantation verstarb der Patient, nachdem sich sein Zustand innerhalb kurzer Zeit rasant verschlechterte (Kotz, 2022a).

1.1.4 Regenerative Medizin als neuer Forschungsschwerpunkt

Ein weiterer grundlegend neuer Behandlungsansatz ist der Ersatz geschädigter Herzmuskulatur mittels im Labor erzeugter Herzzellen. Ziel der Forschung ist dabei, Herzzellen zu implantieren, die mit denen des Empfängers identisch sind, um auf eine anschließende Immunsuppression verzichten zu können. Darüber hinaus bedeutet die Implementierung und Nutzung von aus körpereigenen Stammzellen gewonnenen Myokardzellen eine Entkopplung vom Organspende-Angebot sowie den damit einhergehenden Risiken wie Abstoßungsreaktionen, Therapienebenwirkungen oder

Infektionen. Auch auf mechanische Unterstützungssysteme, der damit verbundenen Antikoagulation und eingeschränkten Leistungsfähigkeit, könnte dadurch verzichtet werden. Aktuell liegt der Schwerpunkt der Behandlungen mit Stammzellen und kardialen Vorläuferzellen auf Tierexperimenten (Bolli et al., 2021; Strauer et al., 2002). Für den therapeutischen Ersatz von Herzgewebe werden schätzungsweise 10^9 - 10^{10} Kardiomyozyten benötigt (Kempf et al., 2016). Entsprechend befasst sich die aktuelle Forschung sowohl mit der Generierung von Kardiomyozyten aus Stammzellen als auch der Optimierung der Differenzierung sowie der Selektion von Kardiomyozyten.

1.2 Stammzellen

Die erstmalige Isolation von embryonalen Stammzellen gelang 1981 aus Mäusen (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). 1998 gelang es, menschliche Stammzellen aus durch in-vitro Fertilisation gezeugten Embryos zu isolieren (Thomson et al., 1998). In Deutschland ist die Forschung an humanen, embryonalen Stammzellen durch das Embryonenschutzgesetz untersagt. Neben den gesetzlichen Beschränkungen zur Verwendung humaner Stammzellen bietet die Arbeit an embryonalen Stammzellen der Maus weitere Vorteile. So ist die Maus ein etablierter Modell-Organismus, der zur Veranschaulichung und Erforschung komplexer physiologischer/ pathologischer Vorgänge im Menschen herangezogen wird. In der Stammzellforschung dienen embryonale Stammzellen der Maus ebenfalls als vereinfachtes, günstiges Modell zur Erforschung von Signalwegen und pharmakologischen Effekten, wenn auch gewisse Unterschiede zu humanen Stammzellen bestehen (Camacho et al., 2016; Rohdewold & Wobus, 2002).

Der Unterschied von Stammzellen zu anderen, differenzierten Zellen liegt in ihrer Fähigkeit zur nahezu unbegrenzten Proliferation sowie der Differenzierung zu diversen Geweben und dem damit einhergehenden Ersatz von funktionsbeeinträchtigten Zellen. Ein Beispiel für Stammzellen im Menschen sind die Zellen des blutbildenden Systems im Knochenmark. Weitere Stammzellen im Menschen finden sich unter anderem in der Haut, im Nervengewebe, im Darm oder in der Muskulatur (Wang, 2019). Allerdings können beispielsweise die Stammzellen im Knochenmark sich nicht zu jeder Art von Zelle differenzieren. Es gibt also Unterschiede in ihrer Differenzierungsbreite, ihrer sogenannten Potenz.

1.2.1 Totipotente Stammzellen

Totipotente Stammzellen können sich zu Zellen aller drei Keimblätter und zu extraembryonalem Gewebe (z.B. Plazenta) differenzieren, besitzen also das Potential, sich zu einem neuen Lebewesen in geeigneter Umgebung zu entwickeln. Totipotente Stammzellen liegen nach Befruchtung der Eizelle durch ein Spermium bis zum 8-16 Zellstadium vor. Erste Experimente in Mäusen zeigten bereits 1959 den totipotenten Charakter dieser Zellen, die sich im Uterus von Muttertieren zu normal lebensfähigen Tieren entwickelten (Tarkowski, 1959).

1.2.2 Pluripotente Stammzellen

Pluripotente Stammzellen können sich zu Zellen aller drei Keimblätter entwickeln, nicht aber zu extraembryonalem Gewebe. So können sie, anders als totipotente Stammzellen, sich nicht zu einem funktionsfähigen Organismus differenzieren. Beispiele für pluripotente Stammzellen werden im Folgenden näher betrachtet.

1.2.2.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste isoliert und anschließend kultiviert. Um ihre Differenzierung *in vitro* zu unterdrücken, wird dem Zellkulturmedium Leukämie inhibierender Faktor (LiF) zugesetzt. Ferner ist die Anwesenheit von Ammenzellen, sog. Feederzellen, notwendig. Diese halten für die Stammzellen ein entsprechendes Mikromilieu aufrecht, unter anderem auch durch Sekretion von LiF (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981).

1.2.2.2 Induzierte pluripotente Stammzellen

Einen Durchbruch in der Stammzellforschung erzielten Takahashi & Yamanaka 2006, als es ihnen gelang, aus differenzierten Zellen pluripotente Stammzellen zu generieren. Diese Stammzellen bezeichneten sie als induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen). Die erfolgreiche „Reprogrammierung“ differenzierter Zellen zu iPS-Zellen gelingt durch retrovirale Transfektion mit Octamer-binding Transcription Factor 3/4 (Oct3/4), Sex determining region Y-box 2 (Sox2), cellular-Myc (c-Myc) und Krüppel Like Factor 4 (Klf4) (Takahashi & Yamanaka, 2006).

1.2.3 Weitere Stammzellarten

Weitere Stammzellen sind in ihrer Differenzierung auf ihr Keimblatt beschränkt und können sich zu verschiedenen Zellen eines Gewebes oder eines Typs von Zellen entwickeln. Sie werden in multi-, oligo- oder unipotente Stammzellen unterteilt.

1.2.4 Therapeutische Einsatzgebiete von Stammzellen

Während in der Therapie von Leukämien und anderen Erkrankungen des Knochenmarks die Transplantation von Stammzellen gut etabliert ist (Niederwieser et al., 2019), ist die Anwendung auf anderen Gebieten weiter Gegenstand aktueller Forschung, wie beispielsweise bei der Therapie des/ der:

- Myokardinfarkts (Park et al., 2019; Yoon et al., 2005)
- Diabetes mellitus Typ 1 (Ianus et al., 2003; Inoue et al., 2021)
- Morbus Parkinsons (Perlow et al., 1979; Yasuhara et al., 2017)
- Leberzirrhose (Shi et al., 2021; Terai et al., 2006)

1.2.5 Wege zum Erhalt der Pluripotenz embryonaler Stammzellen

Bereits 1975 konnten Martin & Evans für embryonale Karzinomzellen zeigen, dass die Anwesenheit von Feederzellen essentiell für die Unterdrückung der Differenzierung und somit für den Erhalt der Pluripotenz ist (Martin & Evans 1975). Feederzellen sezernieren LiF und bieten den Stammzellen ein Mikroklima, in dem diese in Gegenwart von Serum nicht differenzieren (Williams et al., 1988).

Während der Aufklärung der Signalwege konnte gezeigt werden, dass weniger der Erhalt der Pluripotenz, als vielmehr die Unterdrückung der Differenzierung essentiell für die erfolgreiche Kultivierung embryonaler Stammzellen ist. Die im Rahmen der Forschung entwickelten, spezifischen Inhibitoren sind:

- „PD1845332“ – Inhibitor der Mitogen Activated Protein (MAP)-Extracellular signal Related Kinase (ERK) Kinase 1 (MEK1)
- „CHIR99021“ – Inhibitor der Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3)

Durch Zusatz dieser zwei Inhibitoren ist eine Kultivierung und der Erhalt der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen in Verbindung mit LiF ohne Serum möglich. Auf andere Faktoren wie Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) oder Wingless/ Int-1 (Wnt) kann so verzichtet werden (Ying et al., 2008).

Nach Bindung von LiF an den LiF-Rezeptor kommt es zur Interaktion mit den folgenden Signalwegen: Januskinase/ Signal Transducers and Activators of Transcription 3 (JAK/STAT3), Phosphoinositid-3-Kinase (Pi3K) und MAP-Kinase (MAPK). Die Aktivierung von STAT3 führt zur Expression von Oct4, Sox2 und Homeoboxprotein Nanog (Nanog) via Klf4 und Klf5 (Bourillot et al., 2009). Gleichzeitig kommt es über den Pi3K-Signalweg zu einer Inhibierung des MEK-Signalweges (Paling et al., 2004). Darüber hinaus benötigte Substrate zum Erhalt der Pluripotenz in Stammzellen sind BMP4 und Wnt. BMP4 trägt zum Erhalt der Pluripotenz vor allem durch Blockierung des ERK- sowie des MAPK-vermittelten Signalweges via Inhibitor of DNA-binding (Id) bei, welcher andernfalls die Differenzierung induziert (Qi et al., 2004). Wnt bewirkt via Rezeptor FRIZZLED eine Inhibierung der GSK3. In der Folge kommt es zu einem Anstieg von β -Catenin und bewirkt via Suppression von Transcription Factor 3 (Tcf3) eine vermehrte Expression von Oct4, Reduced Expression 1 (Rex1), Nanog und Estrogen Related Receptor Beta (ERR β) (Martello et al., 2012; Sato et al., 2004).

1.3 Kardiomyogenese

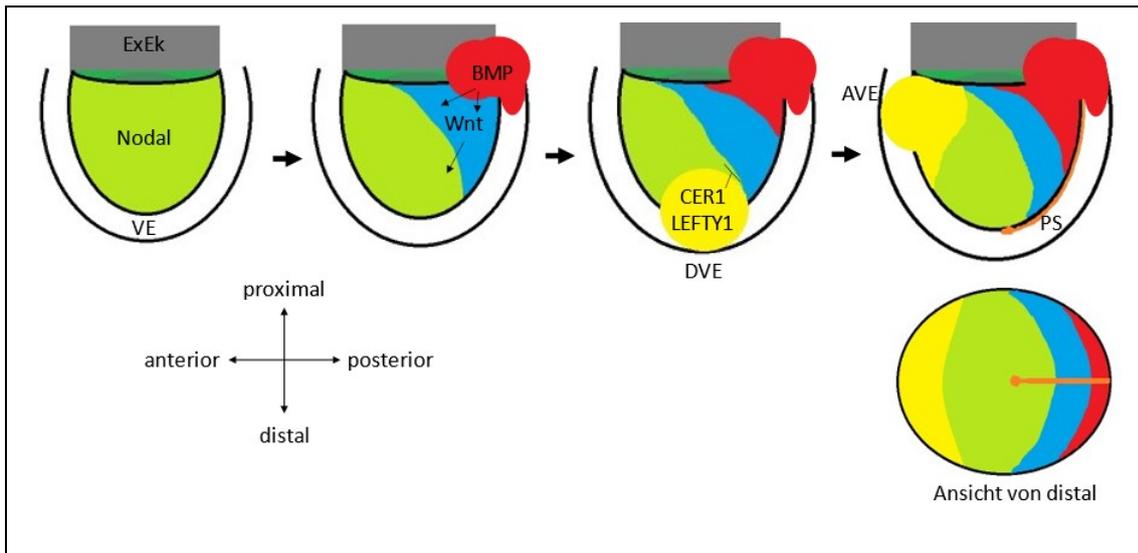
Für die proliferierenden Zellen des frühen Embryos ist die Entwicklung eines Herz-Kreislauf-Systems zur Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff für die weitere Entwicklung entscheidend. So ist das Herz-Kreislauf-System das erste funktionsfähige Organsystem in der Embryonalentwicklung. Im Folgenden wird die embryologische Entwicklung des Herzens der Maus betrachtet, um anschließend auf die wichtigsten Entwicklungsschritte in der Differenzierung von Stammzellen *in vitro* zu Kardiomyozyten einzugehen.

1.3.1 Kardiomyogenese *in vivo* bei der Maus

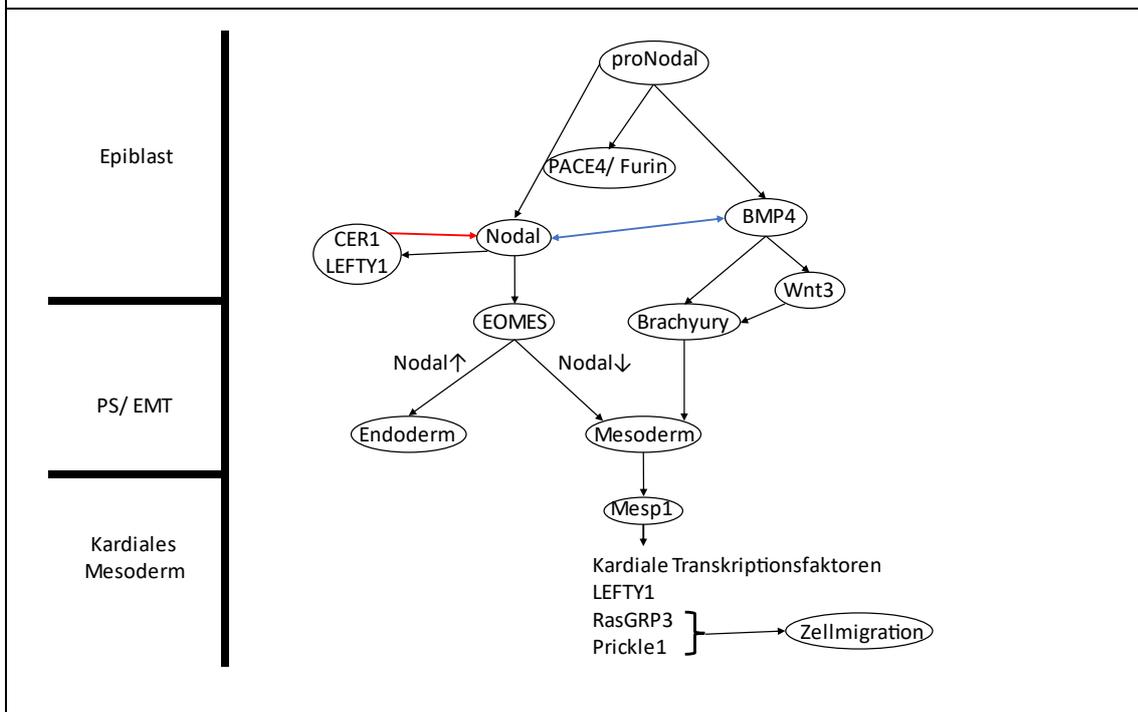
Im Rahmen der Entwicklung des Mausembryos kommt es zur Gastrulation mit Entstehung des Primitivstreifens (PS) und anschließender Zellmigration. In der Folge entstehen die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm aus Zellen des Epiblasten. Dies stellt den ersten Schritt in der Differenzierung zu Kardiomyozyten dar. Abb. 1.3.1 zeigt die Schritte, die zur Entwicklung des PS und somit zur Gastrulation führen. Im Folgenden werden diese Vorgänge näher betrachtet.

Die Expression von pro-Nodal im Epiblasten, einem Mitglied der Tumor Growth Factor β -Familie, führt zur Induktion von BMP4 und Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme 4 (PACE4) / Furin im extraembryonalen Ektoderm (ExEk) (Ben-Haim et al., 2006). PACE4 und Furin katalysieren die Bildung von Nodal (Ben-Haim et al., 2006). BMP4 wirkt unterstützend auf die Expression von Wnt3 und führt zur Unterdrückung des Wnt-Antagonisten Dickkopf-1 (Dkk1) (Miura et al., 2010). BMP4 wird zunächst in Zellen des proximalen, posterioren viszeralen Endoderms (VE) exprimiert (Yoon et al., 2015), führt dann zur Freisetzung von Wnt3 im Epiblasten und zum Erhalt der Nodal-Expression (Ben-Haim et al., 2006). Gleichzeitig wirkt BMP4 zusammen mit Mothers against decapentaplegic homolog 5 (Smad5) begrenzend auf die Wirkung von Nodal und ist entscheidend für eine regelhafte Induktion des PS im Epiblasten (Pereira et al., 2012). Das entstandene Konzentrationsgefälle von Nodal führt in den Zellen des distalen VE (DVE) zur Freisetzung der Nodal- und BMP-Antagonisten Cerberus 1 (CER1) und Left-right determination factor 1 (LEFTY1) (Brennan et al., 2001; Rodriguez et al., 2005). Die Zellen des DVE migrieren zum anterioren Teil des Embryos, wirken begrenzend auf die Nodal-Expression im Epiblasten, führen so zur anterior-posterioren Ausrichtung und werden als anteriores VE (AVE) bezeichnet (Hoshino et al., 2015). Es sind also mehrere Konzentrationsgradienten vorhanden, die für die weitere Entwicklung und Differenzierung entscheidend sind (vgl. Abb. 1.3.1 A, B). Dies führt in der Folge zur Entstehung des PS und zur vorübergehenden Expression von Brachyury (Wilkinson et al., 1990).

Die hohe Konzentration von Nodal im anterioren Bereich des PS (vgl. Abb. 1.3.1 A, B) führt zur Entstehung von Endoderm, wohingegen die niedrigere Konzentration von Nodal im posterioren Teil des PS, aufgrund der Expression von BMP, zur Entwicklung hin zu Mesoderm führt (Lewis & Tam, 2006). Der Teil des Mesoderms, aus welchem das Herz hervorgeht, wird kardiales Mesoderm genannt. Die Konzentration von Nodal ist also entscheidend für die Spezialisierung der Zellen hin zu Mesoderm. Im Bereich des PS exprimieren die Zellen Eomesodermin (EOMES), welches entscheidend für die Umwandlung von Epithel zu Mesoderm (Epitheliale-mesenchymale Transition, EMT) und die Differenzierung der Zellen ist (Arnold et al., 2008). In Abhängigkeit niedriger Nodal-Konzentrationen im posterioren Abschnitt führt EOMES zur Expression von Mesoderm Posterior factor 1 (Mesp1) in mesodermalen Vorläuferzellen (Probst et al., 2021).



A: Vereinfachte Darstellung der Expression von Nodal (grün), BMP (rot), Wnt (blau), CER1 (gelb) und LEFTY1 (gelb) im Epiblast mit VE/ DVE/ AVE (gelb) bis zur Induktion des Primitivstreifens (PS, orange); ExEk (grau).



B: Schematische Darstellung von Signal-Interaktionen (rot – inhibitorisch, blau – wechselwirkend) im Zuge der Gastrulation, welche zur Entstehung von kardialen Mesoderm beitragen

Abb. 1.3.1 (nach Textquellen)

Die Mesp1-Expression ist essentiell für die Kardiogenese (Bondue et al., 2008; Kitajima et al., 2000). Ferner induziert Mesp1 die Expression von Nodal-Antagonisten wie LEFTY1 im kardialen Mesoderm (Kitajima et al., 2000). Mesp1 führt weiter zur Expression von Markern der EMT sowie kardialer Transkriptionsfaktoren. Gleichzeitig

kommt es durch Induktion von Rat Sarcoma (Ras)- Guanyl nucleotide Releasing Peptide 3 (RasGRP3) via ERK-Signalweg und Prickle planar cell polarity protein 1 (Prickle1) zu einer gerichteten Zellmigration (Chiapparo et al, 2016). Die Inaktivierung von Mesp1 erfolgt selbstinduziert durch negative Rückkopplung (Bondue et al., 2008; Haraguchi et al., 2001). Ebenso führt der Konzentrationsgradient von Wnt3a, welcher im Bereich des PS erhöht ist, zur Migration der Zellen des kardialen Mesoderms weg nach anterolateral (Yue et al., 2008).

Aufgrund der starken Größenzunahme der Kopfanlage und Formung des Primitivdarms während der Embryonalentwicklung werden die anterolateralen, beidseitigen Herzzellanlagen unterhalb des entstehenden Kopfes vor dem Primitivdarm zusammengeführt. Die Zusammenführung der anterolateralen Zellen des Kardiomesoderms führt zur Bildung des „cardiac crescent“ (E7.5 \triangleq embryonic day 7.5, 7,5 Tage nach Konzeption). Die weitere Zusammenführung der kardialen Vorläuferzellen lässt den primitiven Herzschauch entstehen (E8), es zeigen sich bereits erste Kontraktionen (Brade et al., 2013). Die Herzanlagen, die sich zum „cardiac crescent“ vereinigen, werden als erstes Herzfeld bezeichnet (engl. first heart field, FHF). Wichtige Differenzierungssignale wie BMP2 stammen hierfür aus dem anliegenden Endoderm (Madabhushi & Lacy, 2011). Zum Erhalt des kardialen Mesoderms und der weiteren Differenzierung sind BMP2 und Dkk1 essentiell. Durch Stimulation mittels BMP2 und Unterdrückung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges kommt es zur anhaltenden Expression der kardialen Transkriptionsfaktoren und zur weiteren Differenzierung der kardialen Vorläuferzellen (Klaus et al., 2012). Die Expression von Mesp1 während der Gastrulation induziert die Expression kardialer Transkriptionsfaktoren wie GATA binding protein 4 (GATA4) und Nk2 homeobox 5 (Nkx2.5), bei gleichzeitiger Inhibition von Brachyury, Fibroblast Growth Factor 8 (FGF8), Sox17 und Nodal. Es kommt somit zu einer Reduktion der Differenzierungsbreite der Zellen und Festlegung auf die Entwicklung hin zu kardialem Gewebe (Bondue et al., 2008). Die Induktion kardialer Transkriptionsfaktoren wie GATA4, Nkx2.5 sowie T-box transcription factor 5 (Tbx5) führt zur Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren und einem positiven Feedback-loop (Välimäki & Ruskoaho, 2020). In der Folge werden typische kardiale Markerproteine wie α -Actinin und Troponin T verstärkt exprimiert und die Organisation der Sarkomere nimmt zu. α -Actinin befindet sich in den Z-Scheiben zu beiden Seiten der Sarkomere und wird im experimentellen Teil dieser Arbeit zur immunhistochemischen Darstellung von Kardiomyozyten genutzt (Ahmed et al., 2022). Dabei gehen Calcium-Oszillationen einer gerichteten Kontraktion voraus (Sauer et al., 2001; Tyser et al., 2016). Weitere Marker

des FHF sind Hyperpolarization-activated and Cyclic Nucleotide-gated ion channel 4 (HCN4) und Tbx5 (Pezhouman et al., 2021).

Posteromedial des Herzschlauchs befinden sich weitere kardiale Vorläuferzellen, das zweite Herzfeld (engl. second heart field, SHF). Diese Zellen weisen eine hohe Proliferationsrate auf und lagern sich im Zuge ihrer Differenzierung dem Herzschlauch an und vergrößern diesen. Typische Marker dieser Zellpopulation sind Islet-1 (Isl1), Tbx1, FGF8 und FGF10. Für die Proliferation und Differenzierung der Zellen des SHF sind mehrere Signalwege von entscheidender Bedeutung. Dazu gehören Hedgehog (Hh), Wnt, FGF und BMP. Der Hh-Signalweg führt zur Proliferation durch Interaktion mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg im SHF und ist an der Entstehung der Links-Rechts-Asymmetrie beteiligt (Briggs et al., 2016; Dyer & Kirby, 2009). Ferner verstärkt Hh die Expression von Nkx2.5 und ist an der Formierung des Sinusknotens und des Endokardkissens zur Trennung der Atrien von den Vorhöfen im weiteren Verlauf der Herzentwicklung beteiligt (Zhang et al., 2021). Als typischer Marker für Zellen des SHF ist Isl1, welcher durch Wnt/ β -Catenin gehemmt wird, für die Differenzierung essentiell (Lin et al., 2007). Isl1 induziert die Expression kardialer Transkriptionsfaktoren wie Myocardin (Kwon et al., 2009). Durch Phosphorylierung eines Serin-Restes wird Isl1 in der Zelle stabilisiert. Eine vermehrte Expression im weiteren Verlauf der Herzentwicklung hingegen steht in Zusammenhang mit der Differenzierung hin zu Zellen des Erregungsleitungssystems (Jing et al., 2021).

Auch FGF8 und FGF10 spielen eine zentrale Rolle in der Herzentwicklung. Sie stimulieren die Proliferation von Vorläuferzellen, die zum rechten Ventrikel und Ausflusstrakt beitragen. Die Expression von FGF8/ FGF10 im SHF wird durch Tbx1 und Isl1 unterhalten, wohingegen in differenzierenden Zellen FGF10 durch Nkx2.5 inhibiert wird (Brown et al., 2004; Ilagan et al., 2006; Watanabe et al., 2012). Für die Proliferation der Zellen des SHF spielt außerdem der Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine essentielle Rolle, indem dieser die Differenzierung unterdrückt und weitere für die Proliferation entscheidende Faktoren induziert. Inhibiert wird der Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch Notch1, welches parallel über die Induktion von BMP2 zur Differenzierung der kardialen Vorläuferzellen führt (Klaus et al., 2012; Kwon et al., 2009). Ferner unterdrückt der Wnt/ β -Catenin-Signalweg die ektopische Entstehung von kardialen Gewebe im Mesoderm. Das Wnt-Signal entstammt dabei aus dem dorsalen Teil des Neuralrohrs (Tzahor & Lassar, 2001). Im Zuge der Zelldifferenzierung kommt es zur Zellmigration der Zellen des SHF hin zum FHF. Die dabei steigenden BMP-Spiegel führen weiter zur Inhibition von Wnt/ β -Catenin via Homeodomain Only Protein homeobox (HOPX) und verstärken die Differenzierung (Jain et al., 2015). Die Migration von sich differenzierenden Zellen

des SHF hin zum FHF wird chemotaktisch gesteuert. Der Macrophage migration Inhibitory Factor (MIF)/ C-X-C motif chemokine Receptor 2/ 4 (CXCR2/ 4) -Signalweg ist dabei als essentieller Bestandteil der interzellulären Kommunikation identifiziert worden. Die Expression wird durch Nkx2.5 gesteuert (Xiong et al., 2019). Die Expression von CXCR4 ist dabei kennzeichnend für noch undifferenzierte Zellen des SHF (Andersen et al., 2018).

Weitere Faktoren, die an der Herzentwicklung beteiligt sind, sind u.a. Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Bloomekatz et al., 2017; Stankunas et al., 2010).

Im Zuge der Herzentwicklung entstammt der linke Ventrikel sowie Teile der Atrien dem FHF. Das SHF bildet den rechten Ventrikel, den arteriellen Ausflusstrakt und ebenfalls Teile der Atrien sowie die venösen Verbindungen zum Lungen- und Körperkreislauf (Brade et al., 2013). Die Unterteilung des arteriellen Ausflusstraktes in Lungen- und Körperarterie geschieht durch eingewanderte Zellen aus der Neuralleiste, die gleichzeitig für die para-/ sympathische Innervation verantwortlich sind (Kirby et al., 1983). Die Herzentwicklung der Maus ist nach etwa 14 Tagen (d) deutlich schneller abgeschlossen als beim Menschen (erst in der 10. Schwangerschaftswoche). Dabei findet die Kardiogenese der Maus wie auch die des Menschen weitestgehend in der gleichen Abfolge statt und ist somit vergleichbar (Krishnan et al., 2014). In der verbleibenden Fetalzeit kommt es zu einer Größenzunahme des Herzens durch Proliferation, postnatal erfolgt weiteres Wachstum v.a. durch Hypertrophie (Zhao et al., 2020). Die Proliferation von Kardiomyozyten spielt eine untergeordnete Rolle (Ali et al., 2014). Dies steht u.a. in engem Zusammenhang mit dem erhöhten Sauerstoffangebot und der damit erhöhten reaktiven Sauerstoffspezies (engl. Reactive Oxygen Species, ROS) -Konzentration (Puente et al., 2014).

1.3.2 Kardiomyogenese in vitro

Auch in vitro kommt es unter geeigneten Bedingungen zur Differenzierung von Stammzellen und Entwicklung von Kardiomyozyten. Entscheidend sind die Abwesenheit von Inhibitoren der Differenzierung sowie ein ausreichendes Nährstoffangebot. Funktionelle Messungen zeigen eine Vergleichbarkeit der aus Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten zu in vivo generierten Kardiomyozyten. Sie bieten daher ein gutes Untersuchungsmodell für die Forschung (Doevendans et al., 2000; Wobus et al., 1995). Essentiell für die Differenzierung von embryonalen Stammzellen ist die Bildung sogenannter Embryoid Bodies (EBs). Diese entstehen durch

Zusammenlagerung der Stammzellen in Abwesenheit von LiF-haltigem Medium (Evans & Kaufmann, 1981). Im Folgenden wird die Formierung der EBs, die Entstehung von Zellen der drei Keimblätter sowie deren weitere Differenzierung hin zu kardialen Zellen genauer betrachtet.

Die Kultivierung von embryonalen Stammzellen erfolgt in Vollmedium ohne LiF bzw. weiterer Inhibitoren. Zur Generierung von EBs werden die Stammzellen entweder in Suspension oder in Methylcellulose gehalten. Auch mittels „hanging-drop“-Methode können EBs generiert werden (Keller, 1995). Es kommt zur spontanen Zusammenlagerung der Stammzellen durch Knüpfung von Zellkontakten via E-Cadherin und Bildung der charakteristischen EBs (Larue et al., 1996). Als eine der ersten Strukturen entsteht Ras-vermittelt in EBs eine außen aufliegende Epithelschicht, die Ähnlichkeiten zum VE des Mäuseembryos aufweist (Yoshida-Koide et al., 2004). Diese Zellschicht bildet eine extrazelluläre Membran, die die Zellen im Innern umgibt und in der Folge zu Konzentrationsgradienten von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren innerhalb der EBs führt (Sachlos & Auguste, 2008). Etwa ab dem zweiten Tag nach EB-Formierung kommt es zur spontanen Expression von Wnt in verschiedenen Regionen der EBs. Dieses breitet sich im Verlauf über den EB aus. Es kommt zur Bildung von PS-ähnlichen Strukturen und zur Expression von frühen Mesodermmarkern wie Brachyury. Der initiale Impuls für die Wnt-Expression erfolgt durch das dem Medium zugesetzte Serum. Dabei sind Wnt3a, Activin und BMP4 entscheidend für die Stimulation und auch alleine ausreichend. Es kommt zur EMT und zur Bildung von Mesoderm (ten Berge et al., 2008; van den Brink et al., 2014). Gleichzeitig werden Pluripotenzmarker wie Oct4 herabreguliert (Sajini et al., 2012). Für die weitere Differenzierung zu Kardiomyozyten ist die Konzentration von Activin und BMP im Nährmedium essentiell, beeinflussen sie doch entscheidend die Entstehung kardialer Vorläuferzellen (Kattmann et al., 2011). Niedrige Konzentrationen von Activin führen zur Induktion von Mesp1 via EOMES, analog zur embryonalen Kardiogenese (van den Aemele et al., 2012). Es kommt zur Expression von Isl1 und Nkx2.5 sowie von GATA4. Die Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren wie z.B. Myocyte-specific Enhancer Factor 2c (Mef2c) führt zur fortschreitenden Differenzierung hin zu Kardiomyozyten. Nach 6-7d der Differenzierung der Stammzellen in Vollmedium sind erste spontane Kontraktionen der EBs sichtbar.

Die Aufklärung der Signalwege zur Differenzierung von Kardiomyozyten führte zur Entdeckung und Identifizierung von Signal- und Wachstumsfaktoren, welche den Anteil von kardialen Vorläuferzellen und Kardiomyozyten in Kultur stark erhöhen sowie zur Induktion der Differenzierung beitragen. Für embryonale Stammzellen der Maus ist dabei die Differenzierung über den Zwischenschritt der EB-Formierung essentiell. Durch

Zugabe von Activin, BMP4 und VEGF, wobei die jeweiligen Konzentrationen abhängig von der verwendeten Zelllinie sind, kann im Mittel der Anteil an Kardiomyozyten an der Gesamtzellzahl von unter 5% auf über 60% gesteigert werden (Lynch et al., 2018).

Die Differenzierung von humanen Stammzellen orientiert sich eng an den komplexen Entwicklungsvorgängen im Embryo. Mittels „CHIR99021“, einem Inhibitor der GSK3, kommt es durch Stabilisierung von β -Catenin über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zur Mesoderm-Induktion. Anschließend erfolgt die Hemmung des Wnt-Signalweges (z.B. durch „IWP2“), da dieser sonst die weitere kardiale Entwicklung hemmen würde. Die weitere Differenzierung findet unter Vollmedium statt (Sharma et al., 2015). Nach Beobachtung von spontanen Kontraktionen werden die Zellen für mehrere Tage nicht gefüttert, um den Anteil an Kardiomyozyten weiter zu erhöhen. Anschließend werden die Zellen bis zur Verwendung wieder normal genährt. So lassen sich Anteile von bis zu 50% Kardiomyozyten erzielen (Rupert et al., 2020).

1.4 Anpassungen des Stoffwechsels im Zuge der Zelldifferenzierung

Die Differenzierung der Stammzellen zu Kardiomyozyten führt neben einer Veränderung des Phänotyps auch zu Änderungen im Stoffwechsel, um den gesteigerten Energiebedarf zu decken. Im Folgenden wird auf die grundlegenden Stoffwechselwege sowie deren Bedeutung für Stammzellen, kardiale Vorläuferzellen und Kardiomyozyten eingegangen.

1.4.1 Energiestoffwechselwege in Stammzellen

Stammzellen haben einen anabolen Metabolismus, um ihrer inerten Funktion der Proliferation nachzukommen. Ferner ist die Vermeidung von DNA- und Protein-Schäden essentiell für die erfolgreiche Biosynthese und Zellteilung. So erfolgt die ATP-Generierung vor allem über die anaerobe Glykolyse. Die vermehrte Gewinnung von ATP via oxidativer Phosphorylierung (OXPHOS) hingegen würde zu einem erhöhten Aufkommen von ROS führen, welche bekanntermaßen DNA- und Proteinschäden induzieren (Intlekofer & Finley, 2019; Ito & Ito, 2016). Die Bedeutung des Metabolismus auf die Eigenschaften von Stammzellen zeigt sich insbesondere auch bei der Induktion pluripotenter Stammzellen. Hier geht die metabolische Umstellung hin zur Glykolyse als

ATP-Quelle der Expression pluripotenter Marker voraus und hat signifikanten Einfluss auf den Erfolg der Reprogrammierung (Folmes et al., 2011).

Die Glykolyse dient als primäre Energiequelle für Stammzellen, stellt sie doch schneller ATP zur Verfügung und liefert Substrate für andere Stoffwechselwege, die für die Zellteilung entscheidend sind (Intlekofer & Finley, 2019). Das bei der Glykolyse entstehende Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) aus Pyruvat wird auch für die Synthese von Citrat in Mitochondrien genutzt sowie für die Synthese von Lipiden in Verbindung mit Citrat. Die *de novo* Fettsäurebiosynthese ist auch für die Zellmembran und die Teilung der Mitochondrien bei der Zellproliferation essentiell. Ferner führt die Verwendung von Acetyl-CoA für die Fettsäuresynthese zur verminderten Acetylierung und somit zur Hemmung des proteolytischen Abbaus von Fission protein 1 (FIS1), einem mitochondrialen Protein, welches die mitochondriale Teilung forciert (Wang et al., 2017). Weiter wird Acetyl-CoA für die Acetylierung von Histonproteinen verwendet. Dies führt zu deren Funktionshemmung sowie in der Folge zur vermehrten Expression bestimmter Gene wie dem Pluripotenzmarker Oct4. Umgekehrt führen inhibitorische Eingriffe in die Glykolyse oder die Histon-Acetylierung zur beschleunigten Differenzierung von Stammzellen (Moussaieff et al., 2015). Trotz plumpen Phänotyps der Mitochondrien findet in embryonalen Stammzellen ein basaler Durchfluss im Citratzyklus statt, um ausreichend Metabolite für andere Stoffwechselwege bereitzustellen. Die Expression von Uncoupling Protein 2 (UCP-2) ist charakteristisch für hochproliferative Zellen und verliert sich während der Differenzierung (Rupprecht et al., 2014). UCP-2 spielt eine zentrale Rolle, indem es durch Export von Zwischenprodukten des Citratzyklus wie Oxalacetat ins Zytosol Einfluss auf den Stoffwechsel nimmt. Die verminderte Konzentration von Oxalacetat führt zur verringerten oxidativen Metabolisierung von Acetyl-CoA/Pyruvat in Mitochondrien. Dies befördert weiter die anaerobe Glykolyse (Vozza et al., 2014). Fructose-6-Phosphat, ein Zwischenprodukt der Glykolyse, trägt über den Hexosamin-Weg zur N-Acetylglucosaminierung von Proteinen bei, wie z.B. von Oct4 und Sox2. Dies führt zur gesteigerten Aktivität von Oct4, einer verstärkten Expression von Zielgenen und ist relevant für den Erhalt der Pluripotenz (Jang et al., 2012). Ebenso reguliert Oct4 positiv die Expression von Hexokinase und Pyruvatkinase, essentiellen Enzymen im Glucose-Stoffwechsel. Deren Überexpression führt auch in Abwesenheit von LiF zum Erhalt der Pluripotenz und findet sich auch in Tumorzellen (Kim et al., 2015).

Glucose-6-Phosphat, das erste Zwischenprodukt der Glykolyse, dient auch als Substrat für den Pentosephosphatweg für die Synthese von Nukleinsäuren und damit der DNA-

Replikation sowie zur Bildung von Aminosäuren. Dies ist essentiell für die Zellteilung der Stammzellen (Stincone et al., 2015).

Ebenfalls Einfluss auf die Glykolyse hat die Aktivität der GSK3. Im Zuge des Wnt- und Pi3K/Proteinkinase B (Akt)-Signalweges, welcher über extrazelluläre Faktoren wie Insulin oder Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1) stimuliert wird, kommt es durch Phosphorylierung zur negativen Regulierung der GSK3. So entfällt die Hemmung wichtiger Enzyme für diverse Stoffwechselwege. Davon betroffen ist u.a. auch die Verwertung von Glucose durch Regulation des Glucose Transporter 1 (GLUT1) und der Hexokinase, ebenso wie die Fettsäuresynthese sowie die Verstoffwechslung von Glutamin (Papadopoli et al., 2021).

Die Nutzung von Glutamin wiederum ist ebenfalls essentiell für den Stoffwechsel der Stammzellen. Glutamin ist entscheidend für die Synthese von α -Ketoglutarat(α -KG) und für die Histon-Demethylierung (Carey et al., 2015). Eine weitere Rolle spielt Glutamin in der Generierung von Glutathion über Glutamat. Glutathion ist Teil des Redox-Systems der Zelle und schützt vor oxidativem Stress. Glutathion hemmt so auch die Oxidation von Oct4, was andernfalls zum enzymatischen Abbau von Oct4 führen würde, und trägt so zum Erhalt der Pluripotenz bei (Marsboom et al., 2016).

Darüber hinaus übt auch der Fettstoffwechsel Einfluss auf die Pluripotenz der Stammzellen aus. Die Induktion der β -Oxidation oder deren Metaboliten führt zur beschleunigten Differenzierung der Zellen, unter anderem auch durch ROS-Produktion (Yanes et al., 2010).

1.4.2 Stoffwechselwege in kardialen Vorläuferzellen und Kardiomyozyten

Im Zuge der Differenzierung der Stammzellen kommt es zur vermehrten Produktion von ROS. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte ROS-Konzentrationen die kardiale Differenzierung begünstigen (Sauer et al., 2000). ROS entstehen auch als zufällige, ungewollte Nebenprodukte bei einem der bedeutendsten Stoffwechselwege der ATP-Generierung, der OXPHOS. So ist im Mesoderm im Vergleich zu Stammzellen der Sauerstoffverbrauch deutlich erhöht, bedingt durch eine verstärkte Nutzung der OXPHOS (Lu et al., 2019). Die vermehrte Energiegewinnung und die damit einhergehende ROS-Produktion via OXPHOS in den Mitochondrien wird durch mehrere Signalwege vorangetrieben.

Die Differenzierung zu Kardiomyozyten geht mit einem erhöhten Energiebedarf der Zellen einher. Zwar ist die absolute Konzentration von ATP in Kardiomyozyten erhöht,

durch den gesteigerten Energiebedarf steigt jedoch das Verhältnis von AMP zu ATP. Dies führt zur Induktion des AMP aktivierten Protein Kinase (AMPK)-Komplexes und zur Veränderung der Genexpression durch vermehrte nukleäre Lokalisation (Dzeja et al., 2011). Die Aktivierung und Funktionsfähigkeit der AMPK ist dabei entscheidend für die Differenzierung zu Kardiomyozyten (Ziegler et al., 2020). Zentral ist dabei die aktivierende Phosphorylierung von Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)-Gamma Coactivator-1 α (PGC-1 α), einem wichtigen Transkriptionsfaktor in der mitochondrialen Biogenese (Jäger et al., 2007). PGC-1 α moduliert durch vermehrte Expression von Proteinen, die Teile des mitochondrialen Stoffwechsels sind oder sich auf diesen auswirken, den Stoffwechsel der Zelle. ERR α wird durch PGC-1 α vermehrt exprimiert und bildet dann einen Komplex mit PGC-1 α . Dieser Komplex ist essentiell für die Beeinflussung des Metabolismus durch PGC-1 α (Zhou et al., 2020a). Dies ist insbesondere relevant für kardiale Vorläuferzellen. So beeinträchtigt die Hemmung von PGC-1 α die weitere kardiale Differenzierung durch verminderte Expression von GATA4, einem zentralen Transkriptionsfaktor der Kardiomyogenese (Zadegan et al., 2015). Mitofusin-2 (MFN2) und Optic Atrophy-1 (OPA1) werden durch PGC-1 α vermehrt exprimiert und sind unabdingbar für die Fusion von Mitochondrien sowie für die kardiale Differenzierung aus Mesoderm (Kasahara et al., 2013).

In humanen iPS-Zellen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Hemmung von Dynamin-related protein 1 (Drp1), welches die mitochondriale Teilung forciert, eine gesteigerte Kardiogenese induziert (Hoque et al., 2018). Ebenfalls relevant für die Kardiogenese ist ein weiterer mitochondrialer Transkriptionsfaktor: Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM). Kommt es im Verlauf der Differenzierung zur Aktivierung von TFAM via PGC-1 α und Nuclear Respiratory Factor 1 (NRF1), führt dies zur Vervielfältigung der mitochondrialen DNA, Grundlage für die gesteigerte Expression mitochondrialer Proteine der Atmungskette (Ventura-Clapier et al., 2008). Knockout-Experimente zeigten, dass in Abwesenheit von TFAM die Kardiogenese durch Verschiebungen im Stoffwechsel hin zur Glykolyse signifikant beeinträchtigt ist (Facucho-Oliveira et al., 2007; Suliman et al., 2016). Gleichzeitig kommt es im Verlauf der Differenzierung zur verminderten Expression von UCP-2, welches in Stammzellen am Substrataustausch zwischen Mitochondrien und Zytoplasma beteiligt ist (Zadegan et al., 2015).

Auch der Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-Signalweg spielt eine zentrale Rolle in der kardialen Differenzierung. Es gibt zwei mTOR-Komplexe (mTORC 1 & 2). Die Aktivität von mTORC1 wird u.a. durch Wachstumsfaktoren über den Pi3K/ Akt-Signalweg reguliert. mTORC1 führt dabei zur Steigerung der Fettsäuresynthese, des

Pentosephosphatweges und über Hypoxie induzierten Faktor 1 α (HIF-1 α) zur gesteigerten Glykolyse (Sengupta et al., 2010). Die Hemmung von mTORC1 führt zur Aktivierung von mTORC2 und dadurch zur vermehrten Expression mesodermaler sowie kardialer Marker und in Folge zu einer gesteigerten kardialen Differenzierung (Zheng et al., 2017).

Die niedrigen Sauerstoffkonzentrationen im Fötus induzieren den HIF-1 α -Signalweg, um die ATP-Gewinnung der Zelle aufrecht zu erhalten (Lopaschuk & Jaswal, 2010). HIF-1 α bedingt die vermehrte Expression von Enzymen wie Hexokinase und Laktatdehydrogenase (LDH), die an der anaeroben Glykolyse beteiligt sind. Ebenso wird die ATP-Gewinnung in den Mitochondrien durch Hemmung zuführender Stoffwechselwege, wie die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA oder der Import von Fettsäuren in die Mitochondrien, negativ reguliert (Thomas & Ashcroft, 2019). Somit ist Glucose weiterhin eine der wichtigsten Energiequellen in frühen Differenzierungsstadien. Allerdings wirken erhöhte Glucose- und HIF-1 α -Konzentrationen hemmend auf die Maturierung unreifer Kardiomyozyten (Hu et al., 2018; Nakano et al., 2017). Im Gegenzug werden wichtige kardiale Transkriptionsfaktoren wie Mef2c positiv von HIF-1 α während der embryonalen Entwicklung reguliert (Krishnan et al., 2008).

Die geringen Sauerstoffkonzentrationen und der erhöhte Energiebedarf in der Fetalzeit führen durch anaerobe Glykolyse zu steigenden Laktat-Spiegeln im Fötus. So wird Laktat ebenfalls als Energiesubstrat metabolisiert. Entsteht in früheren Entwicklungsstadien der Zellen Laktat als Endprodukt der anaeroben Glykolyse, führen die gestiegenen Laktatspiegel zur Reaktionsumkehr der LDH. Nach Aufnahme in die Zellen wird Laktat via LDH zu Pyruvat oxidiert, in den Mitochondrien dem Citrat-Zyklus zugeführt und zur ATP-Generierung genutzt (Lopaschuk & Jaswal, 2010; Tohyama et al., 2013).

Eine weitere Energiequelle für Kardiomyozyten sind Fettsäuren. Diese spielen jedoch für die ATP-Gewinnung in der Fetalzeit nur eine untergeordnete Rolle (Lopaschuk & Jaswal, 2010). Im Rahmen der mitochondrialen Biogenese kommt es zum Ausbau der enzymatischen Ausstattung des Fettsäuremetabolismus. Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1 (CPT-1), Transportprotein für Fettsäuren in die Mitochondrien, wird via PGC-1 α vermehrt exprimiert. So verhält es sich auch mit weiteren Enzymen im Citrat-Zyklus wie der Citrat-Synthetase und Enzymen der Atmungskette wie Cytochrom C. Diese sind insbesondere bedeutsam für die Maturierung der fetalen Kardiomyozyten und die postnatale Umstellung in der ATP-Erzeugung (Zhou et al., 2020a).

Durch die postnatal erhöhten Sauerstoffkonzentrationen im Organismus wird HIF-1 α vermehrt abgebaut, folglich werden die HIF-1 α -vermittelten Signalwege unterdrückt. Die ATP-Generierung über OXPHOS wird ausgebaut und der Anteil der anaeroben Glykolyse wird zunehmend geringer. Die hohen Sauerstoffkonzentrationen und das veränderte Nährstoffangebot, geringere Laktat- und Glucosekonzentrationen sowie ein höheres Angebot an Fetten, führen zu einer vermehrten Metabolisierung von Fettsäuren via β -Oxidation (Lopaschuk & Jaswal, 2010). Die Aufnahme von Fettsäuren für die β -Oxidation erfolgt u.a. via CD36. Anschließend erfolgt die zytosolische Aktivierung der Fettsäuren mittels ATP. Durch Kopplung an Carnitin erfolgt der Transport in die Mitochondrien via CPT1, da die aktivierten Fettsäuren die Mitochondrienmembran nicht passieren können. Nach Einschleusung der Fettsäuren in die Mitochondrien erfolgt der enzymatische Abbau im Zuge der β -Oxidation zu Acetyl-CoA und Reduktionsäquivalenten, welche dem Citrat-Zyklus und der Atmungskette zugeführt werden (Lopaschuk et al., 2010).

Weitere Transkriptionsfaktoren für die Fettsäureoxidation sind PGC-1 α zusammen mit PPAR α sowie PPAR β/δ . Zu den Zielen dieser Signalwege zählen die mitochondriale Biogenese wie auch die Expression zentraler Enzyme im Fettsäurestoffwechsel wie Acyl-CoA-Synthetase, CPT-1 oder Malonyl-CoA-Decarboxylase. Die Malonyl-CoA-Decarboxylase baut Malonyl-CoA ab, welches der Ausgangsbaustein der Fettsäuresynthese ist und sonst die CPT-1 hemmt (Lopaschuk & Jaswal, 2010).

Im adulten Herzen läuft die Energiegewinnung fast ausschließlich via OXPHOS, wobei die β -Oxidation etwa 70% des Gesamt-ATPs bereitstellt (Lopaschuk et al., 2010). Über den Randle-Zyklus besteht dabei eine enge Wechselwirkung zwischen β -Oxidation und Glykolyse. Kommt es infolge der β -Oxidation zu erhöhten Konzentrationen von Acetyl-CoA, hemmt dieses die Pyruvatdehydrogenase (PDH) und somit den Eintritt der Glucose-Metabolite in den Citrat-Zyklus. Umgekehrt führt eine erhöhte Ausschleusung von Metaboliten aus der Glykolyse zur Bildung von Malonyl-CoA via Acetyl-CoA-Carboxylase und so zu einer Hemmung des Transports von Fettsäuren in die Mitochondrien (Hue & Taegtmeyer, 2009).

Durch die verstärkte Nutzung von OXPHOS zur Energiegewinnung kommt es zur vermehrten Generierung von ROS und in der Folge zu Schäden an DNA und Proteinen sowie Reparaturvorgängen. Dies führt in Summe zum Arrest des Zellzyklus (Puentes et al., 2014). Die weitere Größenzunahme postnatal ist folglich durch Hypertrophie getrieben (Leu et al., 2001).

1.5 Maturation von Kardiomyozyten

Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, kommt es nach Differenzierung der Stammzellen zu Kardiomyozyten zu weiteren Anpassungen auf zellulärer Ebene. Besondere Bedeutung hat der perinatale und postnatale Zeitraum, da dieser mit Umstellungen bezüglich des Nährstoff- und Sauerstoffangebotes wie auch der mechanischen Belastung einhergeht. Diese Adaptationen umfassen den Stoffwechsel, den Zellzyklus und Zellaufbau wie auch elektrophysiologische Eigenschaften der Kardiomyozyten.

Die metabolischen Veränderungen von Kardiomyozyten im Zuge der Differenzierung sind in Kapitel 1.4 bereits ausführlich betrachtet. Im Folgenden werden kurz die wichtigsten Vorgänge zusammengefasst.

Das veränderte Nährstoffangebot wie auch höhere Sauerstoffkonzentrationen führen zu einer Reduktion der Glykolyse und einer gesteigerten ATP-Generierung via OXPHOS von Fettsäuren (Lopaschuk & Jaswal, 2010). Es kommt zur Inaktivierung des HIF-1 α -Signalweges. Dies unterstützt die Verschiebung der ATP-Generierung weg von der Glykolyse hin zur OXPHOS (Thomas & Ashcroft, 2019; vgl. Kapitel 1.4.2). Durch die Reduktion des Glykolyse-Durchflusses fehlen Zwischenprodukte für andere Stoffwechselwege wie den Pentosephosphatweg zwecks Nukleinsäurebiosynthese für die Zellteilung (Stincone et al., 2015; vgl. Kapitel 1.4.2). Eine weiterhin hohe Nutzung von Glucose führt andernfalls zum Erhalt eines fetalen Phänotyps mit Hemmung der Maturierung von Kardiomyozyten (Nakano et al., 2017; vgl. Kapitel 1.4.2).

Die metabolischen Veränderungen führen auch zu Anpassungen der Mitochondrien (vgl. Kapitel 1.4.2). Es kommt zur weiteren Zunahme der Mitochondrien mit vermehrten Cristae, Einstülpungen der inneren Mitochondrienmembran, dem Ort der ATP-Generation (Ding et al., 2021). Darüber hinaus spielt die Umstellung von Glucose auf Fettsäuren postnatal als Energiequelle eine essentielle Rolle für die Abnahme der Proliferation via ROS-Generierung und DNA-Schäden (Cardoso et al., 2020; Puente et al., 2014; vgl. Kapitel 1.4.2). Zentrale Faktoren für die mitochondriale Biogenese sind PPAR $\alpha/\beta/\delta$, PGC-1 α und TFAM (vgl. Kapitel 1.4.2). Ebenso wird die Teilung der Mitochondrien gehemmt und die Fusion durch Expression von MFN2 und OPA1 begünstigt (vgl. Kapitel 1.4.2). Ferner findet ein Abbau fetaler Mitochondrien mit mangelhafter Enzymausstattung statt. Wird dieser als Mitophagie bezeichnete Prozess durch genetische oder pharmakologische Intervention unterbunden, bleibt eine mitochondriale Maturierung der Kardiomyozyten aus (Gong et al., 2015; Zhou et al., 2020b).

In Mäusen kommt es binnen 7d postnatal zu einem Verlust der Fähigkeit zur Regeneration von Kardiomyozyten durch Proliferation (Porrello et al., 2011). Beim Menschen kommt es postnatal ebenfalls zu einer Abnahme der Proliferationsfähigkeit, wobei bis ins hohe Alter eine basale Erneuerung von Kardiomyozyten stattfindet (Bergmann et al., 2009).

Zentraler Wächter der Proliferation in Kardiomyozyten und in Zellen generell ist das Tumorsuppressorprotein p53. Der Knockout von p53 und dessen Inhibitor Murine Double Minute 2 (MDM2) führt via micro-RNAs (miR) zu einer Reduktion von mitosehemmenden Faktoren wie p21 und zu einer Zunahme mitosefördernder Enzyme wie Cyclin E sowie folglich einer Steigerung der Aktivität von Cyclin-abhängiger Kinase 2 (engl. cyclin-dependent kinase 2, CDK2) (Stanley-Hasnain et al., 2017). Hingegen führt die verstärkte Expression von CDK-Inhibitoren (wie p21) in Kardiomyozyten zum Erhalt des Zellzyklus-Arrests (Di Stefano et al., 2011). Ebenso führt die Expression von Myeloid Ecotropic viral Integration Site 1 (Meis1) zum Arrest des Zellzyklus in Kardiomyozyten (Mahmoud et al., 2013).

Auch hat die Unterdrückung von Yes-associated Protein (YAP1) durch den Hippo-Signalweg entscheidenden Einfluss auf die Abnahme der Proliferationsfähigkeit von Kardiomyozyten (Heallen et al., 2011). Hingegen ist während der Embryonalentwicklung der Einfluss von Hippo/ YAP1 auf die Proliferation der Herzmuskelzellen für die Ausbildung normaler Herzstrukturen entscheidend. Ferner besteht eine Interaktion mit Zielgenen des Wnt-Signalweges, die zur Proliferation beitragen (Heallen et al., 2011). Im Tierversuch wurde gezeigt, dass eine Expression von YAP in adulten Kardiomyozyten zu einer Induktion der Proliferation führt (Lin et al., 2014). Ein Zusammenhang zwischen Proliferation sowie Zellzyklus-Arrest und Hypertrophie kann weiter über das Expressionslevel von miRs (z.B. miR-106b~25) hergestellt werden. Eine erhöhte Expression unterdrückt Zellzyklus-Inhibitoren sowie Differenzierungssignale, wohingegen die postnatale Abnahme von miR-106b~25 sich positiv auf die Hypertrophie auswirkt (Raso et al., 2022). Des Weiteren wirkt sich die postnatal beobachtete Polyploidie, welche mit dem Lebensalter zunimmt (Mollova et al., 2013), negativ auf die Proliferationsfähigkeit der Kardiomyozyten aus (Patterson et al., 2017).

Trotz des Zellzyklus-Arrests der Kardiomyozyten kommt es postnatal zu einem starken Größenwachstum des Herzens, welches in der Hypertrophie der Herzmuskelzellen begründet ist (Bergmann et al., 2009).

Die postnatale Zunahme der Herzbelastung führt zu einer verbesserten Ausrichtung und Zunahme der Sarkomere entlang einer Kraftachse, die in vitro nachgebildet werden kann

(Bishop et al., 2021). Ebenso beeinflusst die Maturierung des Kontraktionsapparat weitere Anpassungsvorgänge in Kardiomyozyten wie beispielsweise die Ausbildung des transversen Tubulus- (T-Tubulus) -Systems oder die mitochondriale Biogenese (Guo et al., 2021). Ferner kommt es zu einem Isoform-Wechsel zentraler Strukturproteine wie Titin und Troponin im Zuge der Maturierung (Lahmers et al., 2004; Wheelwright et al., 2020).

Postnatal kommt es zu einem starken Anstieg an Schilddrüsenhormon und in der Folge auch von anderen Wachstumsfaktoren wie IGFs, welche Einfluss auf die Maturierung der Kardiomyozyten nehmen (Li et al., 2014).

Schilddrüsenhormon führt mittels zytoplasmatischem Rezeptor via Pi3K-AKT-mTOR zur vermehrten Proteinbiosynthese und zur Zunahme der Zellgröße (Kenessey & Ojamaa, 2006). Ebenso fördert Schilddrüsenhormon den Isoform-Wechsel von Strukturproteinen (Krüger et al., 2008). Ferner kommt es auch zur Hypertrophie und Induktion der AMPK sowie zur Hemmung der Proliferation via p21-Induktion (Takano et al., 2013; Yang et al., 2014b). Die IGFs unterscheiden sich maßgeblich in ihrer Funktion. Die Expression von IGF2 während der Fetalzeit führt zu einer gesteigerten Proliferation (Li et al., 2011). Postnatal kommt es zum deutlichen Abfall der Expression von IGF2 (Lui & Baron, 2013). Hingegen induziert IGF1 die vermehrte Expression von Genen des adulten Fettsäurestoffwechsels und bewirkt via Pi3K-AKT-Signalweg die Hypertrophie von Kardiomyozyten (McMullen et al., 2004; Montessuit et al., 2006). Mit zunehmendem Alter des Fetus steigen ferner die Glucocorticoid-Spiegel im Blut (Manabe et al., 2005). Diese beeinflussen ebenfalls positiv die Maturation der Sarkomerstrukturen sowie der Mitochondrien von Kardiomyozyten via Induktion von PGC-1 α . (Rog-Zielinska et al., 2015). Ebenso kann ein neuronaler Einfluss auf die Maturierung von iPS-Zellen abgeleiteten Kardiomyozyten, welcher über die Stimulation mittels Adrenalins hinausgeht, nachgewiesen werden (Kowalski et al., 2022).

Um bei zunehmender Zellgröße eine zeitgleiche Freisetzung von Ca²⁺ und damit eine einheitliche Kontraktion zu gewährleisten (vgl. Kapitel 1.7), kommt es zu Einstülpungen der Zellmembran. Diese Einstülpungen werden als T-Tubuli und in ihrer Gesamtheit als T-Tubulus-System bezeichnet. Essentiell für die Entstehung und den Erhalt von T-Tubuli sind dabei box-dependent-interacting protein 1 (BIN-1), Caveolin-3 und Junktophilin-2 (Chen et al., 2013; De La Mata et al., 2019; Parton et al., 1997; Poulet et al., 2021; Ziman et al., 2010). Die T-Tubuli sind dicht besetzt mit spannungsabhängigen Calcium-Kanälen, welche in enger räumlicher Beziehung zu Ryanodin-Rezeptoren Typ 2 (RyR2) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) stehen, um eine gleichzeitige Freisetzung von

Ca^{2+} in Kardiomyozyten bei Erregung zu ermöglichen (Hong & Shaw, 2017). In Kardiomyozyten, abgeleitet aus humanen, pluripotenten Stammzellen, führt die Gabe von Schilddrüsenhormon und Glucocorticoiden zur Zunahme von T-Tubuli und darüber hinaus zu einer Maturierung elektrophysiologischer Parameter (Parikh et al., 2017).

Elektrophysiologische Veränderungen im Zuge der Maturierung der Kardiomyozyten betreffen u.a. das Membranpotential wie auch den Ca^{2+} -Stoffwechsel. Die vermehrte Expression von K^+ -Kanälen (inward-rectifier potassium channel, $\text{K}_{ir2.1}$) führt zum Absinken des Membranpotentials der Kardiomyozyten und erschwert ferner die spontane Depolarisation (Li et al., 2020b; Lieu et al., 2013). Durch Veränderungen in der Expression von Untereinheiten des L-Typ Calcium-Kanals (LTCC) kommt es zu Veränderungen der Calciumverschiebungen und des Aktionspotentials (Li et al., 2016; Takemura et al., 2005).

Im Zuge der Maturierung und Steigerung der Kontraktionskraft kommt es ebenfalls zur vermehrten Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten via N-Cadherin oder Connexin 43 (Vreeker et al., 2014).

Die Bedeutung der Maturation von Kardiomyozyten für die regenerative Medizin liegt darin, dass die mittels Zellkultur gewonnenen Kardiomyozyten dem fetalen Phänotyp ähneln. Die Erkenntnisse aus den Vorgängen in vivo, welche zu einem adulten Phänotyp der Kardiomyozyten führen, sind essentiell zur Generierung funktionsfähiger adulter Kardiomyozyten. Zentral ist dabei die Anpassung des Nährstoff- und Sauerstoffangebots, die elektrische und mechanische Stimulation wie auch die Nutzung von Hormonen.

1.6 Gewinnung von Kardiomyozyten/ kardialer Gewebe in Reinform

Um große Zellpopulationen an reinen Kardiomyozyten zu erhalten, sind verschiedene Verfahren etabliert. Diese Methoden dienen im Grunde der Selektion von Kardiomyozyten vor anderen Zellen. Im Folgenden werden beispielhaft drei gängige Verfahren näher betrachtet, welche in der Herzzellforschung Anwendung finden.

1.6.1 Isolation von Kardiomyozyten aus dem Individuum

1960 gelang Harary und Farley die erfolgreiche Isolation und Kultivierung von Kardiomyozyten aus dem Herzen junger Ratten. Hierfür zerkleinerten sie Rattenherzen, inkubierten diese mit Trypsin, isolierten die Zellen mittels Zentrifugation, setzten diese anschließend in Vollmedium und konnten so im Verlauf rhythmisch kontrahierende Zellen ausmachen (Harary & Farley, 1960). Die Nutzung junger, meist neonataler Tiere hat den Vorteil einer relativ einfachen, enzymatischen Dissoziation neonataler Herzen gegenüber adulten Tieren. Die Isolation adulter Kardiomyozyten in gleicher Weise lieferte dagegen meist schlechtere Ergebnisse. Über Herzexplantation und unter Zuhilfenahme der retrograden Perfusion der Koronarien über die Aorta (Langendorff, 1895) mit Kollagenase-haltiger, calciumfreier Lösung gelang 1970 die Isolation adulter Kardiomyozyten der Ratte (Berry et al., 1970). Das Herz wird zerkleinert und erneut mit Kollagenase inkubiert. Mittels Zentrifugation werden die Herzzellen isoliert (Berry et al., 1970). Die gewonnenen Herzzellen zeigten unter Ca^{2+} -Zugabe zunächst verbesserte Kontraktionen, die sich aber rasch verschlechterten. 1976 veröffentlichten Powells und Twist eine ähnliche Methode zur Isolierung von adulten Kardiomyozyten unter Nutzung von Hypothermie. Die derart isolierten Kardiomyozyten zeigten auch nach Zugabe von Ca^{2+} einen deutlich besseren Erhalt ihrer Integrität (Powell & Twist, 1976). Der Zelluntergang von Kardiomyozyten nach Zugabe von Ca^{2+} in calciumfreier Suspension wird als Calcium-Paradox bezeichnet. Protektiv auf die Kardiomyozyten wirken dabei Hypothermie, Hyponatriämie und Spuren von Ca^{2+} im Perfusionsmedium während der Isolation (Oliveira et al., 2014). Die Nutzung von 2,3-Butandion-monoxim (BDM), einem reversiblen Myosin-ATPase Inhibitor (National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, aktualisiert 2022), führt zu einer weiteren Erhöhung der Zellzahl und Zellviabilität (Thum & Borlak, 2001). Die Nutzung der Langendorff-Perfusion ist bis heute verbreitet und wird stetig weiterentwickelt (Li et al., 2020a; Butova et al., 2020). Nach erfolgter enzymatischer Dissoziation können weitere Methoden zur Aufreinigung der Kardiomyozyten zum Einsatz kommen, da in der Zellsuspension auch Fibroblasten und andere Zellen enthalten sind. Hierzu wird u.a. die Percoll-Zentrifugation eingesetzt. So können Kardiomyozyten-Populationen mit einer Reinheit von $\geq 95\%$ erreicht werden (Li et al., 2020a).

Diese Methoden können auch zur Isolation menschlicher Kardiomyozyten angewandt werden. Hierfür werden meist Proben genutzt, die im Rahmen einer Herzoperation entnommen wurden (Fiegle et al., 2020).

1.6.2 Selektion von Kardiomyozyten mittels Geneticin-Resistenz

Geneticin (G418) ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum, welches die Proteinbiosynthese in prokaryotischen und auch in eukaryotischen Zellen durch Bindung an die 80S-Ribosomenuntereinheit hemmt (Bar-Nun et al., 1983).

1996 gelang Klug et al. erstmals die Transfektion von embryonalen Stammzellen mit einem gemeinsamen Gen für eine Aminoglykosid-Phosphotransferase und einem α -kardialen Myosin Heavy Chain (MHC) -Promotor sowie einem Gen für eine Phosphoglyceratkinase-Hygromycin Resistenz. Durch Applikation von Hygromycin wird die Selektion der erfolgreich transfizierten Stammzellen durchgeführt. Anschließend wird die Differenzierung der Stammzellen in Abwesenheit von LiF induziert. Im Zuge der Differenzierung zu Herzmuskelzellen kommt es zur Aktivierung des kardialen MHC-Promotors und somit zur Expression der Aminoglykosid-Phosphotransferase ausschließlich in Kardiomyozyten. Darauf folgt die Selektion mittels G418, welches zu einem Anteil an Kardiomyozyten an den verbliebenen Zellen von über 99% führt. Ohne diesen Selektionsprozess beträgt der Anteil an Kardiomyozyten bei gleicher Kulturdauer weniger als 1%. Die so selektierten Kardiomyozyten weisen eine typische Sarkomerstruktur auf und zeigen rhythmische Kontraktilität (Klug et al., 1996).

1.6.3 Metabolische Selektion von Kardiomyozyten

Seit längerem ist bekannt, dass Herzmuskelzellen auch C_3 -Körper, wie Laktat, zur Energiegewinnung nutzen können. Andere Zellen, vor allem Stammzellen, benötigen zur Aufrechterhaltung ihres Energiestoffwechsels Glucose bzw. Glutamin, welche in regulärem Zellkulturmedium in hohem Maße zur Verfügung stehen. Tohyama et al. konnten zeigen, dass durch Nutzung eines Mediums, welches nur Laktat als Energiequelle für Zellen enthält, eine Selektion von Kardiomyozyten metabolisch erfolgt (Tohyama et al., 2013). Die Ursache für diese metabolische Selektion liegt in der unterschiedlichen Ausstattung der Stoffwechselwege der verschiedenen Zellen.

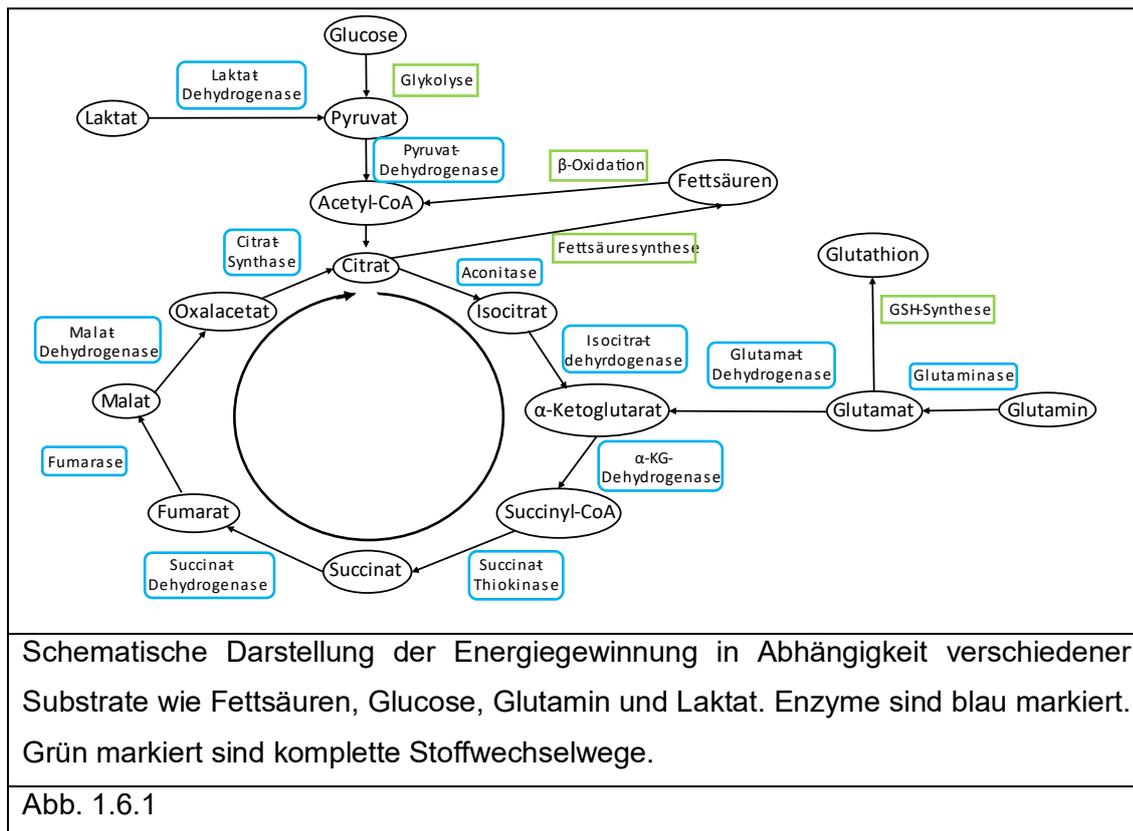


Abb. 1.6.1 zeigt eine Stoffwechselübersicht von Kardiomyozyten und Stammzellen für Fettsäuren, Glucose, Glutamin und Laktat. Zu sehen sind die Glykolyse und der Citratzyklus erweitert um die zuführenden Stoffwechselwege von Glutamin und Laktat sowie in vereinfachter Form von Fettsäuren.

In Abwesenheit anderer Energiesubstrate wird Laktat in die Zellen aufgenommen und mittels LDH zu Pyruvat oxidiert. Es erfolgt der Transport in die Mitochondrien. Dort findet der weitere Abbau durch die PDH zu Acetyl-CoA statt und macht so Laktat dem Citratzyklus zugänglich. Über die Isoenzym-Varianten Aconitase-2 (ACO-2) und Isocitrat-Dehydrogenase-2/3 (IDH-2/3), die in Kardiomyozyten mehr als achtfach höher konzentriert vorhanden sind als in Stammzellen, erfolgen die ersten Schritte des Citratzyklus. Die mangelnde Enzymausstattung mit ACO-2 und IDH-2/3 in Stammzellen bewirkt, dass diese in Abwesenheit anderer Kohlenstoffquellen nicht in der Lage sind, über den Citratzyklus ausreichend ATP zu generieren (Tohyama et al., 2016).

Die effektive Verstoffwechslung und ATP-Generierung aus Laktat von Kardiomyozyten hat also ihre Ursache in einer besseren Enzymausstattung der Mitochondrien, welche ihre Anpassungsfähigkeit an veränderte Nährsituationen erhöht. So kann durch Laktat-Selektion der Anteil von Kardiomyozyten an der Gesamtzellzahl auf über 95% erhöht werden. Vor metabolischer Selektion beläuft sich der Anteil an Kardiomyozyten auf ca. 8% (Tohyama et al., 2013). Mit Laktat (4mM) werden dabei die besten Ergebnisse

bezüglich Reinheit und Zellviabilität erzielt (Tohyama et al., 2013). Dies ist auch die Konzentration, die im experimentellen Teil dieser Arbeit verwendet wurde.

Eine weitere Möglichkeit der metabolischen Selektion besteht in der Nutzung von Fettsäuren, die zur Generierung von ATP auf effektive Verstoffwechslung innerhalb der Mitochondrien angewiesen sind. Dies ist, wie zuvor beschrieben (vgl. Kapitel 1.4.2), in Kardiomyozyten der Fall. Um mögliche toxische Nebenwirkungen von Fettsäuren zu neutralisieren, erfolgt außerdem die Zugabe von Bovine Serum Albumin (BSA) zur Komplexierung der freien Fettsäuren. Im adulten Herzen macht der Fettsäurestoffwechsel den Großteil der Energiegewinnung aus. Durch zusätzliche Substitution mit Trijodthyronin können so ebenfalls Kardiomyozyten mit einer Reinheit von bis zu 95% generiert werden, die ferner ein Genexpressionsmuster, Aktionspotentiale und eine Sarkomerstruktur ähnlich dem adulten Kardiomyozyten aufweisen (Lin et al., 2017). Weitere Faktoren, die die Maturation von Kardiomyozyten *in vitro* induzieren und unterstützen, sind Dexamethason und Palmitinsäure sowie die Aktivierung des ERR γ . Diese bewirken eine Umstellung der Energiegewinnung hin zur verbesserten Verstoffwechslung von Fettsäuren und einer Zunahme der Mitochondrien sowie der Ausprägung von Merkmalen adulten Kardiomyozyten wie T-Tubuli (Funakoshi et al., 2021; Miki et al., 2021).

Zusammenfassend bietet die metabolische Selektion eine einfache und günstige Methode zur Anreicherung von Kardiomyozyten. Sie ist universell anwendbar, gerade auch auf iPS-Zellen. Dies ist insbesondere im Hinblick auf regenerative Therapien relevant, da keine genetische Manipulation mittels Transfektion oder chemische Markierung der Zellen benötigt wird. Auch stellt sie eine Alternative zur Isolation von Kardiomyozyten durch Tierversuche dar, indem zuverlässig eine hohe Reinheit von Kardiomyozyten aufgrund metabolischer Vorteile erzielt wird.

1.7 Ca²⁺-Metabolismus in Kardiomyozyten

Die Aufgabe des Herzens liegt in der Aufrechterhaltung der Kreislaufzirkulation. Um diese zu gewährleisten, fungiert das Herz als zentrale Pumpe des Blutkreislaufs. Die mechanische Arbeit wird auf zellulärer Ebene durch Kardiomyozyten verrichtet.

Im Herzen findet die Erregungsbildung autonom statt. Dies geschieht über Schrittmacherzellen, welche in der Diastole spontan durch Einstrom von Kationen über HCN-Kanäle depolarisieren. Wird dabei das sog. Schwellenpotential erreicht, kommt es spannungsabhängig zu einem Ca²⁺-Einstrom über Dihydropyridin-Rezeptoren (DHPR, LTCC). Über das Erregungsleitungssystem des Herzens werden die Zellen des Arbeitsmyokards in der Folge erregt. Für die Depolarisation der Herzmuskulatur sind spannungsabhängige Natrium-Kanäle verantwortlich. Es kommt zum Na⁺-Einstrom und zur weiteren Depolarisierung der Zelle. Dies mündet in der Aktivierung der DHPR (Gilbert et al., 2020). Der Einstrom von Ca²⁺ führt über RyR2 zu „Ca²⁺-Funken“ (engl. Ca²⁺-spark) und bedingt durch Summation die massive Freisetzung von Ca²⁺ aus dem SR. Dies ermöglicht das Filamentgleiten und somit die Sarkomerverkürzung, es kommt zur Kontraktion der Zelle (elektromechanische Kopplung). Die Entfernung von Ca²⁺ aus dem Zytosol führt zur Beendigung der Kontraktion (Fearnley et al., 2011).

Um eine möglichst gleichmäßige Freisetzung von Ca²⁺ über die Herzmuskelzelle zu erzielen, besitzt der adulte Kardiomyozyt tiefe Einstülpungen der Zellmembran, das T-Tubulus-System (vgl. Kapitel 1.5). Hier liegen die spannungsabhängigen DHPR der Zellmembran in enger räumlicher Beziehung zu den RyR2 des SR (Eisner et al., 2017; Louch et al., 2004). Durch Depolarisation der Zellmembran öffnet sich der DHPR, Ca²⁺ gelangt in die Zelle und bindet an die RyR2 des SR. Die RyR2 liegen dabei als Cluster von etwa 10-100 Einheiten in Verbindung mit etwa 25 DHPR vor und bilden zusammen ein „Couplon“. Durch Stimulation eines RyR2 kommt es zur weiteren Ca²⁺-Freisetzung, benachbarte RyR2 werden ebenfalls stimuliert, es entsteht ein sogenannter Ca²⁺-Funken. Dieser Vorgang wird als Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung (engl. calcium induced calcium release, CICR) bezeichnet (Fabiato, 1983). Dies resultiert in Summe in einer massiven Freisetzung von Ca²⁺ aus dem SR (Cheng & Lederer, 2008; Meissner, 2002). Ist die intrazelluläre Konzentration von Ca²⁺ stark erhöht, führt dies zur Inhibierung der RyR2 und zu einem Stopp des Ca²⁺-Ausstroms aus dem SR (Balshaw et al., 2002). Die intrazelluläre Konzentration an freiem Ca²⁺ steigt auf etwa 1µM an, durch enzymatische Pufferung gebundenes Ca²⁺ ist dabei etwa um den Faktor 100 erhöht (Bers, 2002). Durch Bindung von Ca²⁺ an Troponin wird dieses von den

Aktinfilamenten gelöst und ermöglicht so die Aktivierung des Aktin-Myosin-Komplexes. Es kommt zur Spaltung von ATP in ADP und Phosphat im Kopf des Myosins. Durch Lösung von Phosphat und ADP kommt es zum Abknicken des Myosinköpfchens auf dem Aktinfilament, das Sarkomer verkürzt sich. Die elektromechanische Kopplung zwischen Herzzellerregung und Kontraktion ist erfolgt (Barrick & Greenberg, 2021).

Um die erhöhte intrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} wieder zu normalisieren, sind die Aktivität der SR-Calcium ATPase (SERCA) und des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers (NCX) essentiell (Bers, 2002). SERCA „pumpt“ Ca^{2+} aus dem Zytosol entgegen dem Konzentrationsgradienten unter ATP-Verbrauch zurück ins SR. Reguliert wird die Aktivität der SERCA durch Phospholamban (PLN). PLN hemmt als Monomer die Aktivität der SERCA durch Herabsetzung der Affinität zu Ca^{2+} . Unter Katecholamineinfluss kommt es zur Phosphorylierung von PLN an einem Serin- sowie einem Threonin-Rest und über Bildung von Pentameren zu einer Inaktivierung. Der Wegfall von PLN bewirkt eine gesteigerte Affinität der SERCA zu Ca^{2+} und erhöht so die Transportleistung (Glaves et al., 2019; Periasamy et al., 2008). Ein weiterer Regulator der SERCA-Aktivität ist Sarcolipin, welches im Herzen in den Vorhöfen vorkommt und wie PLN ebenfalls katecholaminabhängig reguliert wird (Glaves et al., 2020; Periasamy et al., 2008). Innerhalb des SR ist Ca^{2+} an Calsequestrin (CSQ) gebunden. Löst sich durch Ausstrom von Ca^{2+} und der somit einhergehenden Verschiebung des Ca^{2+} -Gleichgewichts bei der Erregungsentstehung Ca^{2+} von CSQ, kommt es zur Freilegung der Bindungsstellen des CSQ für Triadin/Junctin. Diese fungieren als Vermittler zwischen CSQ und RyR2 innerhalb des SR und führen nach Bindung von CSQ zu einer Blockade des RyR2 und weiterer Ca^{2+} -Freisetzung. Steigt dagegen die Ca^{2+} -Konzentration innerhalb des SR wieder an, werden die Bindungsstellen durch Ca^{2+} besetzt und die Blockade des RyR2 ist aufgehoben (Györke et al., 2004). Darüber hinaus wird Ca^{2+} aus dem Zytosol nach extrazellulär entfernt. Dies geschieht durch den NCX, der seine Triebkraft aus dem Konzentrationsgradienten der Na^+/K^+ -ATPase bezieht. Der NCX schleust ein Ca^{2+} gegen 3 Na^+ nach extrazellulär (Ottolia et al. 2021). Ein geringer Teil des Ca^{2+} wird ferner durch eine Ca^{2+} -ATPase in der Zellmembran sowie einen Ca^{2+} -Uniporter der Mitochondrien (MCU) aus dem Zytoplasma entfernt (Bers, 2002).

Ebenso beteiligt an der Beendigung des Aktionspotentials ist der Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex (Ca-CaM). Ist die Ca^{2+} -Konzentration stark erhöht, inhibiert Ca-CaM sowohl den DHPR wie auch den RyR2 und hemmt damit die weitere Freisetzung von Ca^{2+} (Balshaw et al., 2002; Ben-Johny & Yue, 2014; Yamaguchi et al., 2003). Ferner kommt es zur Aktivierung der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) durch Ca-CaM. Bleibt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration weiter erhöht, führt dies zur

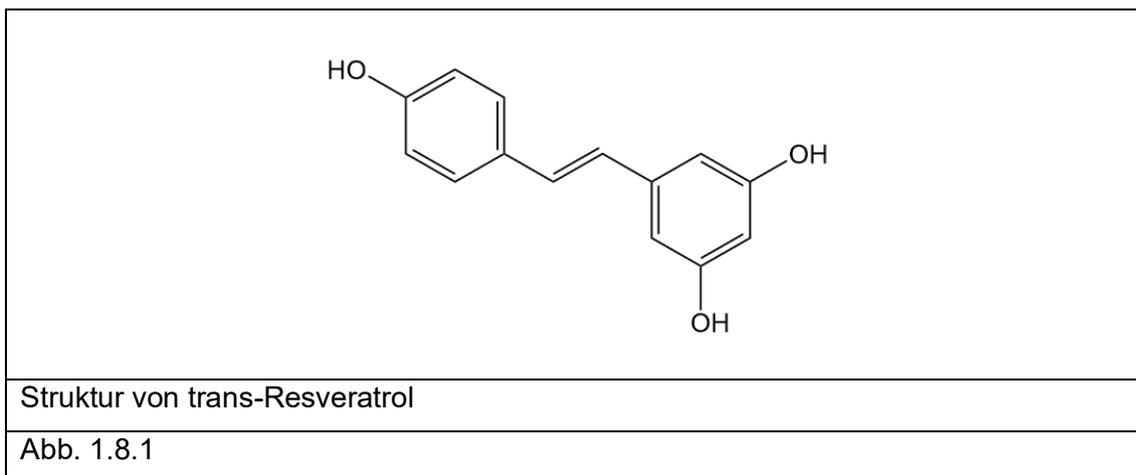
Autophosphorylierung und somit zur verlängerten Aktivität, unabhängig von der aktuellen Ca^{2+} -Konzentration. Durch ROS kann es ebenfalls zu einer Daueraktivierung unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration kommen, ein wesentlicher Aspekt in der Pathogenese des Herzversagens. Ziele der CaMKII sind u.a. der DHPR, PLN sowie der RyR2. Die Phosphorylierung dieser Zielproteine resultiert in einer gesteigerten Freisetzung von Ca^{2+} sowie einer beschleunigten Eliminierung aus dem Zytosol. Gleichwohl kommt es durch „ Ca^{2+} -Lecks“ zu proarrhythmogenen Effekten (Mattiuzzi et al., 2015; Wood et al., 2018).

Durch Bindung von Katecholaminen an β_1 -Adrenozeptoren kommt es G-Protein-abhängig zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die erhöhte cAMP-Konzentration aktiviert die Protein Kinase A. Die Phosphorylierung des DHPR führt zu einem gesteigerten Ca^{2+} -Einstrom, die Aktivität des RyR2 nimmt zu und durch Inhibierung von PLN kommt es zu einer vermehrten Aktivität der SERCA. Dies bewirkt eine schnellere und stärkere Freisetzung und Eliminierung von Ca^{2+} , also einer Anpassung an erhöhte Leistungserfordernisse. Ferner kommt es zur Stimulation der CaMKII sowie zur Phosphorylierung sarkomerer Proteine (Colombe & Pidoux, 2021; Cuello et al, 2021; Fu et al., 2014; Yoo et al., 2009).

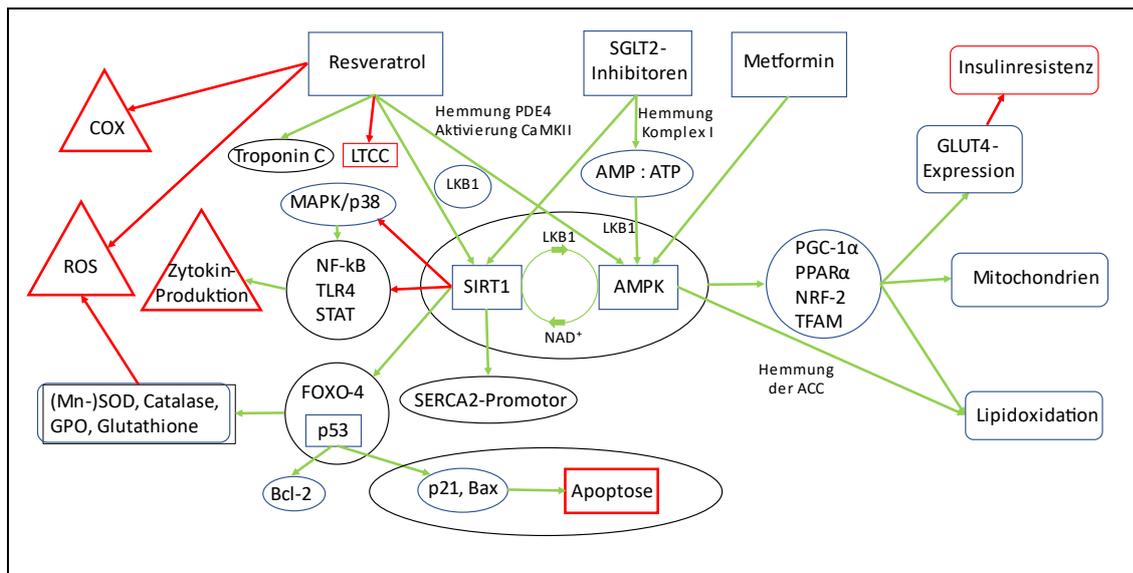
Es zeigt sich somit, dass Ca^{2+} -Oszillationen durch externe Stimuli beeinflusst werden. Im Zuge des experimentellen Teils dieser Arbeit wurden Ca^{2+} -Oszillationen in Kardiomyozyten untersucht, welche aus embryonalen Stammzellen differenziert und selektiert wurden. Dabei wurde der Einfluss von Resveratrol näher untersucht.

1.8 Resveratrol – bekannte Stoffwechselwege und Eigenschaften

1992 beschrieben Renaud und de Lorgeril das „französische Paradoxon“. Die Bezeichnung ergibt sich durch die geringere Mortalität der Franzosen aufgrund koronarer Herzerkrankungen im Vergleich zu anderen Ländern, trotz eines hohen Anteils an ungesättigten Fettsäuren in der Ernährung. Als Erklärung führten die Autoren den relativ höheren Konsum von Alkohol, vor allem Rotwein, an (Renaud & de Lorgeril, 1992). Seither wurden mehrere biologisch aktive Substanzen im Rotwein identifiziert, denen positive Eigenschaften auf das Herz-Kreislauf-System zugeschrieben werden. Bekanntester Vertreter ist hierbei das Resveratrol (Xiang et al., 2014). Resveratrol ist ein pflanzliches Polyphenol und kommt in der Schale von Weintrauben, in Soja, Erdnüssen und ihren Produkten vor (Cassidy et al., 2000). Die biologisch aktive Form ist das trans-Resveratrol (vgl. Abb. 1.8.1), welches sich durch ultraviolette Strahlung in die inaktive cis-Form umlagert (Kalantari & Das, 2010).



Burns et al. und Xiang et al. zeigten allerdings, dass die Konzentration von Resveratrol in Rotwein (98-1803µg/ 100ml und 80-1471µg/ 100ml) stark variabel ist (Burns et al., 2002; Xiang et al., 2014). Sie folgerten, dass der alleinige Bezug von Resveratrol über Weinkonsum die positiven Effekte nicht ausreichend erklärt (Xiang et al., 2014). In einer Metaanalyse von 7 randomisiert-kontrollierten Studien mit insgesamt 389 Probanden konnten positive Effekte auf die Stoffwechsellleistung und die vermehrte Expression von Sirtuin 1 (SIRT1) gezeigt werden. Die verabreichten Tagesdosen betragen dabei allerdings zwischen 150mg und 3000mg (Fraiz et al., 2021). Im Folgenden wird auf die von Resveratrol beeinflussten Stoffwechselwege näher eingegangen.



Übersicht der durch Resveratrol induzierten Signalwege, ergänzt durch Antidiabetika. Stimulierende (grün) und inhibitorische Signalwege (rot) veranschaulichen die verschiedenen Wirkungen.

Abb. 1.8.2; (basierend auf Textquellen)

Abb. 1.8.2 zeigt eine schematisierte Übersicht der molekularen Signalwege von Resveratrol. Zentral für die Wirkung von Resveratrol sind hierbei SIRT1 und AMPK (Dasgupta & Milbrandt, 2007; Howitz et al., 2003). Huang et al. konnten zeigen, dass die Aktivierung von SIRT1 via Phosphorylierung mittels Leber-Kinase-B 1 (LKB1) nach Stimulation durch Resveratrol erfolgt (Huang et al., 2021). SIRT1 gilt als Schlüsselenzym für Langlebigkeit und steht in enger Wechselwirkung mit der AMPK (Baur et al., 2006). Die AMPK dient als Sensor für die Energiereserven der Zelle und wird durch eine Erhöhung des Verhältnisses von AMP zu ATP via LKB1 aktiviert (Hardie, 2004). LKB1 kann auch durch Deacetylierung und vermehrte Expression durch SIRT1 zu einem Anstieg von AMPK führen (Hou et al., 2008; Price et al., 2012). Die Aktivierung von SIRT1 geschieht ebenfalls durch erhöhte Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺)-Spiegel, Indiz mangelnder Energiezufuhr (Cantó et al., 2009; Price et al., 2012). Park et al. zeigten, dass eine Aktivierung der AMPK auch via Hemmung von Phosphodiesterase 4 (PDE4) durch Resveratrol möglich ist. Es kommt zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration und via Exchange Protein directly Activated by cAMP 1 (Epac1) zu einem Anstieg des intrazellulären Ca²⁺. Ca²⁺-vermittelt kommt es zur Aktivierung der CaMKII, welche die AMPK aktiviert. Diese führt wiederum zur Induktion von SIRT1 (Park et al., 2012; Park et al., 2021). Beide Proteine führen zur vermehrten Expression von beispielsweise PPARα sowie PGC-1α, damit einhergehend auch von NRF2 und TFAM, wichtigen Transkriptionsfaktoren des mitochondrialen Stoffwechsels. Diese bewirken

eine Zunahme der Mitochondrienanzahl und -masse sowie die Steigerung der Lipidoxidation (Cantó et al., 2009; Lee et al., 2006; Zhang et al., 2019). Über Inaktivierung durch Phosphorylierung via AMPK der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), welche Malonyl-CoA synthetisiert und dadurch die CPT-1 und den Transport von Fettsäuren in die Mitochondrien hemmt, wird die Energiegewinnung mittels β -Oxidation weiter unterstützt (Long & Zierath, 2006). Im Skelettmuskel kommt es zum vermehrten Einbau von GLUT4 in die Zellmembran und in der Folge zu einer verbesserten Insulinsensitivität (Salt & Hardie, 2017; Vlavecski et al., 2020). Resveratrol kann so die Stoffwechsellage ähnlich einer Kalorienrestriktion oder dem Intervallfasten beeinflussen (Lagouge et al., 2006). Die beschriebenen Veränderungen im Stoffwechsel sind auch pharmazeutisch interessant, sind sie schließlich Angriffspunkte moderner Arzneimittel wie Metformin oder der Sodium Glucose Transporter 2 (SGLT2) -Inhibitoren in der Diabetes- und Herzinsuffizienztherapie (Hoong & Chua, 2021).

Ferner ist Resveratrol ein Inhibitor der Cyclooxygenase (COX; Jang et al., 1997) und schützt als Radikalfänger die Zelle vor ROS. Dieser antioxidative und antiinflammatorische Effekt wird durch veränderte Genexpression via SIRT1 zusätzlich weiter verstärkt. So wird die Zytokinproduktion (z.B. Tumornekrosefaktor α oder Interleukin (IL) -1/ -6) durch verringerte Expression von Nuclear factor kappa B (NF- κ B), Toll-Like Receptor 4 (TLR4) oder STAT gemindert. Zusätzlich kommt es via Forkhead-box-Protein O4 (FOXO4) und p53 zur vermehrten Expression von (Mangan-) Superoxiddismutase (SOD), Catalase, Glutathion-Peroxidase (GPO), also einer Aktivierung des Redox-Systems zum Schutz der Zelle vor ROS (Carrizzo et al., 2013; He et al., 2021).

Ebenso führt Resveratrol über SIRT1 und p53 via p21/ B-Cell Lymphoma 2 (Bcl-2) Associated X-protein (Bax) zu einem Zellzyklusarrest in Tumorzellen und zur Apoptose (Shakibaei et al., 2009). Hingegen konnte in Kardiomyozyten gezeigt werden, dass eine Inkubation mit Resveratrol zytoprotektiv durch Stabilisierung der Bcl-2 - Proteinexpression unter Stress wirkt (Kim et al., 2007). Diese scheinbar widersprüchlichen Wirkungen von Resveratrol auf verschiedene Zellpopulationen liegen im jeweiligen Apoptosesignalweg und dessen Einflussfaktoren begründet (Fu et al., 2021; Yeung et al., 2004).

Ebenso wirkt Resveratrol auf den Ca^{2+} -Stoffwechsel von Kardiomyozyten ein. Im Tiermodell der Maus mit induzierter diabetischer Kardiomyopathie führte eine Applikation von Resveratrol via Aktivierung von SIRT1 zu einer Erhöhung der SERCA2a-Expression durch erhöhte Aktivität des SERCA2-Promotors und insgesamt zu einer

verbesserten Kontraktilität (Sulaiman et al., 2010). Ferner interagiert Resveratrol mit Troponin C an der Bindungsstelle von Troponin I. Dies resultiert in einer gesteigerten Ca^{2+} -Sensitivität der Kardiomyozyten (Pineda-Sanabria et al., 2011). Die Interaktion mit dem DHPR führt zu einer Reduktion des Ca^{2+} -Einstroms und zur Abnahme des Ca^{2+} -Transienten in Kardiomyozyten (Liew et al., 2005).

Neben einer verbesserten Herzfunktion nach Herzinfarkt wirkt Resveratrol weiter positiv auf das kardiale Remodelling und führt zu einer verlangsamten Bildung atherosklerotischer Plaques (Brito et al., 2009; Riba et al., 2017). Ebenso wirkt Resveratrol kardioprotektiv bei Behandlung mit Chemotherapeutika wie Doxorubicin durch Reduktion der ROS-Generierung (Brito et al., 2021; Monahan et al., 2021; Tian et al., 2020). Das antioxidative Potential von Resveratrol wirkt dabei auch neuroprotektiv, indem es vor oxidativem Stress und ROS schützt, was ansonsten die Pathogenese des Morbus Alzheimer und anderer neurologischer Krankheiten begünstigt (Gomes et al., 2018; Huang et al., 2011; Marambaud et al., 2005; Sun et al., 2010). Ferner konnten die antikanzerogenen Effekte in mehreren Mausmodellen gezeigt werden (Boily et al., 2009; Jang et al., 1997; Provinciali et al., 2005). Darüber hinaus führt die Zugabe von Resveratrol zum Nährmedium von Stammzellen zu einer gesteigerten Kardiomyogenese (Ding et al., 2016).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Der das Angebot weit übersteigende Bedarf an Spenderorganen für Herztransplantationen zeigt den Mangel an Alternativen für Therapien bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz auf. Eine Möglichkeit zur Entlastung und kurativen Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bietet die regenerative Medizin.

Im ersten Teil der Arbeit erfolgt die Darstellung des aktuellen Forschungsstands bezüglich Stammzellen, Kardiomyogenese und Selektion von Kardiomyozyten, welche die Grundlage für den experimentellen Teil der Arbeit bildet. Dieser umfasst die Gewinnung und Optimierung einer hochreinen Kardiomyozyten-Population aus embryonalen Stammzellen der Maus. Ein wesentliches Ziel ist die Herstellung einer vernetzten, elektrisch-gekoppelten, kardialen Monolayer. Darüber hinaus werden Untersuchungen an Kardiomyozyten mit Resveratrol durchgeführt.

Die Arbeitsschritte des experimentellen Teils stellen sich wie folgt dar:

- 1.) Herstellung und Optimierung reiner Kardiomyozyten-Populationen
- 2.) Untersuchung des Einflusses eines veränderten intrazellulären Ca^{2+} -Milieus auf den Zellreifezustand nach Dissoziation
- 3.) Analyse des Effekts von Resveratrol ($50\mu\text{M}$) auf Calcium-Transienten von metabolisch selektierten Kardiomyozyten
- 4.) Generierung konfluenter Zellverbände aus metabolisch selektierten Kardiomyozyten

2 Material

2.1 Firmenanschriften

Abcam plc, Cambridge, CB2 0AX, UK

AppliChem GmbH, 64291 Darmstadt, Deutschland

B. Braun, 34212 Melsungen, Deutschland

Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland

BioLegend, San Diego, California 92121, USA

Bio&Sell GmbH, 90537 Feucht, Deutschland

Bitly Inc., New York, New York 10010, USA

Canon Deutschland, 47807 Krefeld, Deutschland

Carl Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland

Carl Zeiss AG, 73447 Oberkochen, Deutschland

Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan 48108, USA

Cole-Parmer, Staffordshire, ST15 0SA, UK

DWK Life Sciences GmbH, 55122 Mainz, Deutschland

Eppendorf SE, 22339 Hamburg, Deutschland

Fisher Scientific GmbH, 58239 Schwerte, Deutschland

Gerhard Menzel GmbH, 38116 Braunschweig, Deutschland

Gilson Inc., Middleton, Wisconsin 53562, USA

Graphpad Software, San Diego, California 92108, USA

Greiner Bio-One, 72636 Frickenhausen, Deutschland

Gentaur Molecular Products BVBA, 1910 Kampenhout, Belgien

Google LLC, Seattle, Washington 98103, USA

Hanna Instruments Deutschland GmbH, 89269 Vöhringen, Deutschland

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, 93309 Kelheim, Deutschland

Heraeus Holding GmbH, 63450 Hanau, Deutschland

Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, 74246 Eberstadt, Deutschland

Imgflip LLC, Santa Barbara, California 93101, USA

Integra Biosciences AG, 7205 Zizers, Schweiz

InvivoGen, 31400 Toulouse, Frankreich

Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, CB7 4EX, UK

Leica Microsystems GmbH, 35578 Wetzlar, Deutschland

Labexchange, 72393 Burladingen, Deutschland

LAUDA Scientific GmbH, 97922 Lauda-Königshofen, Deutschland

LO – LaborOptik Ltd., Lancing, BN15 8TN, UK

Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland

Mettler-Toledo, International Inc., 8606 Greifensee, Schweiz

Microsoft Corporation, Redmond, Washington 98052, USA

Nerbe plus GmbH & Co. KG, 21423 Winsen/ Luhe, Deutschland

Otto Fischar GmbH & Co. KG, 66133 Saarbrücken, Deutschland

PAN Biotech, 94501 Aldenbach, Deutschland

Pechiney Plastic Packaging, Inc., Chicago, Illinois 60631, USA

PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts 02451, USA

Robert Bosch GmbH, 70839 Gerlingen, Deutschland

Sarstedt AG & Co. KG, 51588 Nürnbrecht, Deutschland

Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, 37079 Göttingen, Deutschland

Science Services GmbH, 81737 München, Deutschland

Siemens AG, 80333 München, Deutschland

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland

Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts 02451, USA

VWR International GmbH, 64295 Darmstadt, Deutschland

2.2 Geräte und Apparaturen

<i>Zellkultur</i>	
Bunsenbrenner	Fireboy plus, Integra Biosciences
Cellspin Rührsystem	Integra Biosciences
Deckgläser	Carl Roth
Gewebekulturschalen 60mm	Suspension/ Standard, Sarstedt
Inkubatoren	HERA cell 150, HERA cell 240, Heraeus
Neubauer-Zählkammer	LaborOptik
Petrischale, mit Nocken	Greiner Bio-One
Pumpenabsaugsystem	Science Services GmbH
Schüttler	Mini see-saw rocker SSM4, Stuart/Cole-Palmer
Spinnerflaschen	CELLspin 250, Integra Biosciences
Sterilbank	Hera safe, Heraeus
Sterilfilter (0,20µm)	Carl Roth
Wasserbad	AQUALine AL 25, AL 12, LAUDA
Zellkulturplatten	24 Well, Standard, Sarstedt

<i>Mikroskopieren</i>	
Heizplatte	TRZ 3700, Labexchange
Konfokales Lasermikroskop	Leica TCS SP2, Leica Microsystems
Lichtmikroskop	Zeiss Axiovert 40C, Carl Zeiss
Objektträger	Fisher Scientific

<i>Diverses</i>	
Digitalkamera	Canon Powershot A630 Ai AF, Canon
Einmalspritzen (10ml)	B. Braun
Eppendorf tubes	Eppendorf
Fein-Waage	AB265-S, Mettler Toledo
Gefrierschrank, -20°C	Bosch, Thermo Fisher Scientific
Gefrierschrank, -80°C	HERAfreeze, Heraeus
Glaspipetten 150mm/ 230mm	DWK Life Sciences/ VWR

Kamera-Mikroskop-Adapter	SOLIGOR Adaptor Tube for Canon A610/ A620 52mm Tele, Carl Zeiss 426126, Carl Zeiss
Kanülen	Microlance 3, Becton Dickinson
Kühlschrank, 4°C	Siemens
Mikroliter-Pipetten	Pipetman, GILSON; Eppendorf
Orbitalschüttler	Polymax 1040, Heidolph
pH- Meter digital	pH 211, Hanna Instruments
Pipettenspitzen, steril 1000µl, 200µl 100µl, 10µl	Nerbe plus Sarstedt
Pipettenspitzen, unsteril 1000µl, 200/100µl, 10µl	Sarstedt
Pipetus-Standard	Hirschmann Laborgeräte
Röhrchen 15/ 50ml	CELLSTAR TUBES, Greiner Bio-One
Rollmischer	SRT6, Stuart/Cole-Palmer
Serologische Pipette 10ml	Sarstedt
Sterile Pipette 10ml	CELLSTAR; Greiner Bio-One
Vortexer	VWR, Stuart
Waage	AB265-S, Mettler Toledo Sartorius
Wachspapier	PARAFILM „M“, Pechiney Plastic Packaging
Zentrifugen	HERAEUS Multifuge 1 S-R Centrifuge, Heraeus Centrifuge 5417 C, Eppendorf

2.3 Chemikalien und Lösungen

<i>Chemikalien und Lösungen in der Zellkultur Zellkultur</i>	
β-Mercaptoethanol	Carl Roth
Bovines Serumalbumin	Carl Roth Gentaur
DMEM	Bio&Sell Thermo Fisher Scientific
DMEM (ohne: Glucose, L-Glutmain, Natriumpyruvat, Phenol Red)	PAN Biotech
DMSO	Merck (Calbiochem)
ESGRO® (LiF, 10 ⁷ U/ml)	Merck (Millipore)
Fetales Rinderserum (FCS)	Merck (Sigma Aldrich)
Gelatine 0,1% in Wasser gelöst	Merck (Millipore)
HEPES	Carl Roth
IMDM	PAN Biotech
L-Glutamin 200mM (100x)	PAN Biotech
MEM NEAA (100X)	PAN Biotech
Mitomycin C (986µg/mg)	Merck (Millipore)
Na-DL-Laktat	Merck (Sigma Aldrich)
Natriumpyruvat (100mM)	PAN Biotech
PBS	Carl Roth; Bio&Sell
Penicillin-Streptomycin (Penicillin 10.000 U/ml, 10mg/ml Streptomycin)	PAN Biotech
Phenol red	Merck (Sigma Aldrich)
Plasmocin-Propylaxe (2,5mg/ml)	InvivoGen

<i>Chemikalien zur Herstellung der Pufferlösungen</i>	
Aqua	B. Braun
KCl	Carl Roth
KH ₂ PO ₄	Carl Roth
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Carl Roth
NaCl	Carl Roth
Triton X-100	Merck (Sigma Aldrich)

<i>Chemikalien allgemein</i>	
BAPTA-AM	Abcam/ Cayman Chemical Company
DRAQ5	BioLegend
Ethanol	Otto Fischer
Fluo-4-AM	Invitrogen
Fluoromount-G	Invitrogen
Isoproterenol Hydrochlorid	Merck (Calbiochem)
Methanol	Merck (Sigma Aldrich)
Milchpulver	AppliChem GmbH
NaOH	Carl Roth
Paraformaldehyd	Merck (Sigma Aldrich)
Sigmacote	Merck (Sigma Aldrich)
Trans-Resveratrol	Cayman Chemical Company
Trypsin-EDTA 0,05%	Thermo Fisher Scientific (Gibco, life technologies)

2.4 Antikörper: primär, sekundär

Connexin 43 Polyclonal Antibody (rabbit, PA1-25098)	Thermo Fisher Scientific
Monoklonal Anti- α -Actinin (Sarcomeric) produced in mouse, Clone EA-53, A 7811	Merck (Sigma Aldrich)
Ms mAb to Sarcomeric Alpha Actinin (EA-53), Ab 9465	Abcam

Alexa 488 Donkey anti-mouse	Invitrogen
Cy3-conjugated sheep anti-mouse IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories
FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories
FITC-conjugated goat anti-mouse IgG + IgM	Jackson ImmunoResearch Laboratories
FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG	Merck (Sigma Aldrich)

2.5 Software

ChemDraw	PerkinElmer
GraphPad Prism	Graphpad Software
ImageJ	Open Source (National Institute of Health, Maryland, USA)
Imgflip (https://www.imgflip.com/)	Imgflip LLC
Leica Confocal Software	Leica
Microsoft Office	Microsoft
Quick response-Code (QR-Code) Generator (https://www.qrcode-generator.de/)	Bitly Inc.
Youtube-Videportal	Google LLC

2.6 Zusammensetzung von Pufferlösungen und Zellkultur-Medium

2.6.1 Pufferlösungen

2.6.1.1 10x konzentrierte Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

KCl	27mM
KH ₂ PO ₄	15mM
NaCl	1,4M
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	65mM
Gelöst in Aqua dest.	

2.6.1.2 Einfach konzentrierte 1x PBS

10x PBS	100ml
Aqua dest.	900ml

2.6.1.3 PBS + Triton X-100 (PBST) 1%

1x PBS	49,5ml
Triton X-100	0,5ml

2.6.1.4 PBST 0,01%

10x PBS	100,0ml
Aqua dest.	899,9ml
Triton X-100	0,1ml

2.6.1.5 Hitze-inaktiviertes, 10%iges Fetales Kälberserum (hiFCS)

Die Hitze-Inaktivierung von FCS erfolgt bei 56°C für 30min. Anschließend wird das hiFCS auf Eis abgekühlt und zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

hiFCS	1ml
0,01% PBST	9ml

2.6.2 Zellkultur-Medium

2.6.2.1 LifPIpro-Medium

β-Mercaptoethanol	100μM
hiFCS	16 Vol.-%
L-Glutamin	2mM
LiF (ESGRO)	1000 U/ml
Na-Pyruvat	1mM
NEAA (100X)	1 Vol.-%
Plasmocin Prophylaxe	5μg/ml
Gelöst in IMDM	

2.6.2.2 EMFI-Medium

β-Mercaptoethanol	100μM
FCS	15 Vol.-%
L-Glutamin	2mM
Na-Pyruvat	1mM
NEAA (100X)	1 Vol.-%
Penicillin/Streptomycin	50 U/ml
Gelöst in DMEM	

2.6.2.3 CCE-Medium

β-Mercaptoethanol	100μM
hiFCS	16 Vol.-%
L-Glutamin (200mM)	2mM
Na-Pyruvat (100mM)	1mM
NEAA (100X)	1 Vol.-%
Penicillin/Streptomycin	50 U/ml
Gelöst in IMDM	

2.6.2.4 Laktat-Medium

2.6.2.4.1 Laktat-Medium ohne BSA (Lac)

β-Mercaptoethanol	100μM
HEPES-Stammlösung	25mM
Na-DL-Laktat	4mM
Penicillin/Streptomycin	50 U/ml
Phenol red-Lösung	40μM
Gelöst in DMEM (ohne: Glucose, L-Glutamin, Natriumpyruvat, Phenol Red)	

2.6.2.4.2 Laktat-Medium + BSA (L+B)

BSA	0,2 Vol.-%
Gelöst in Laktat-Medium	

2.7 Verwendete Zelllinie

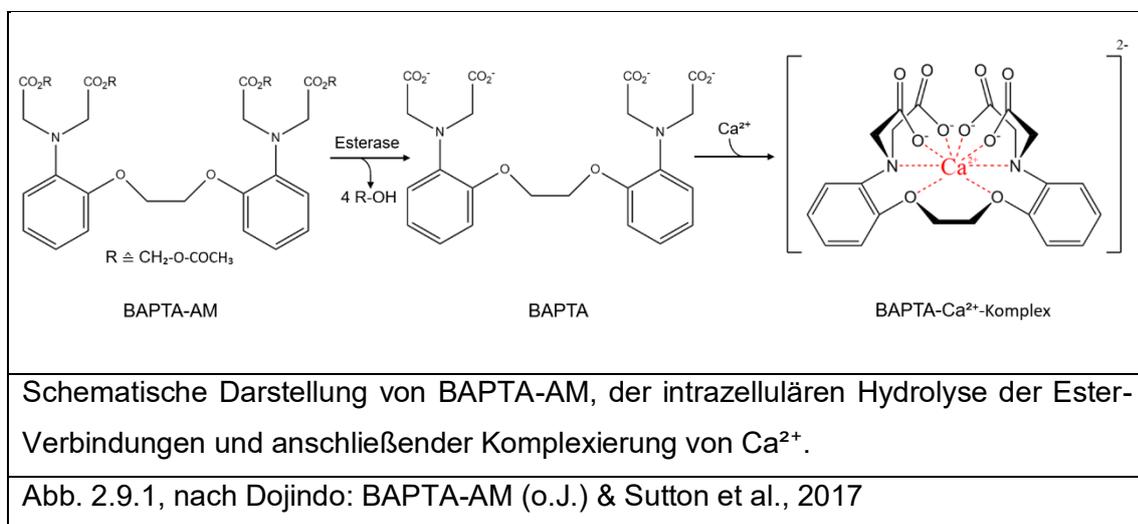
CCE-Zellen sind embryonale Mäuse-Stammzellen isoliert aus dem Mäusestamm 129 SvE und Feederzell-abhängig (Evans & Kaufman, 1981).

2.8 Albumin/ BSA

Albumin dient in seiner physiologischen Funktion der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks in den Blutgefäßen und bindet darüber hinaus diverse Blutbestandteile, darunter Ca^{2+} , aber auch Plasmaproteine und pharmazeutische Wirkstoffe. Darüber hinaus ist Albumin auch Teil des hämatologischen Puffersystems (Moman et al., updated 2022; Sigma-Aldrich: Product Information, 2000). Das aus dem Blut von Rindern gewonnene und in der Zellkultur verwendete Albumin wird auch als BSA bezeichnet. Wie zuvor beschrieben, bindet BSA auch freie Fettsäuren und reduziert so deren potentiell schädliche Wirkung auf Zellen in Zellkultur (Lin et al., 2017). In weiteren Arbeiten konnte ebenfalls ein zytoprotektiver Effekt von BSA gezeigt werden (Gallego-Sandín et al., 2005; Liu et al., 2012). Auch beim Menschen ist die Albumin-Konzentration im Blut wichtig. So wurde eine signifikante Korrelation zwischen einem normalen Albumin-Wert und der Mortalität bei LVAD-Implantation nachgewiesen (Lietz et al., 2007).

2.9 BAPTA-AM

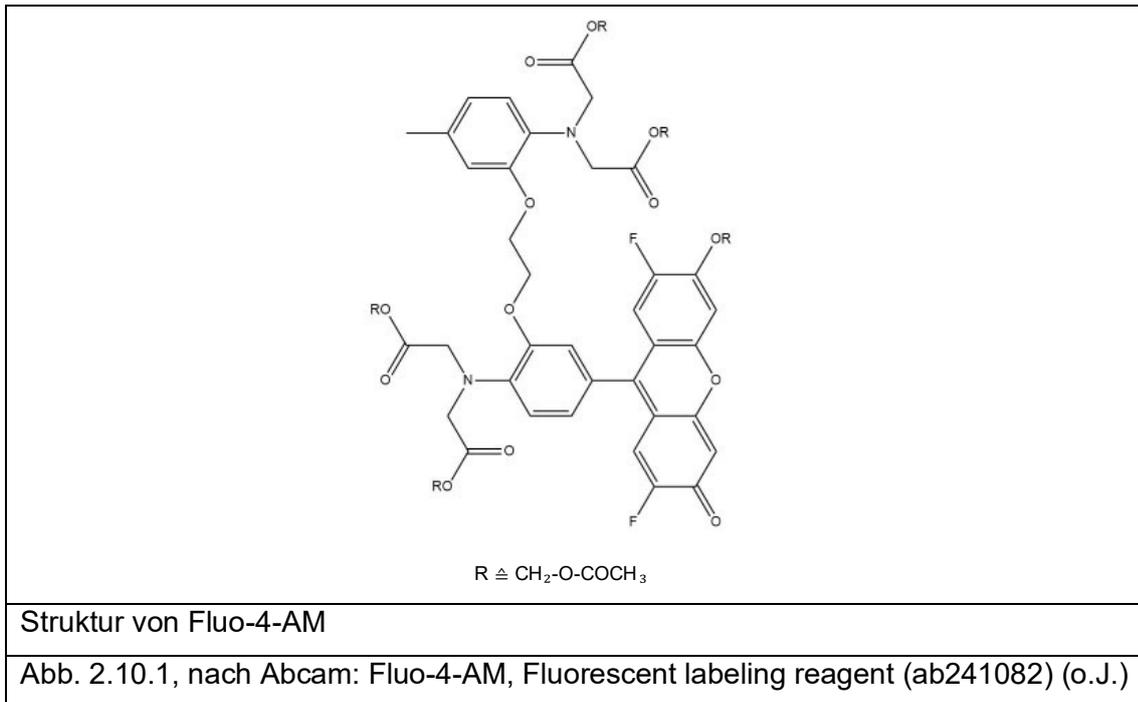
BAPTA ist ein hochselektiver Chelator für Ca^{2+} , der aufgrund seiner chemischen Struktur in der Lage ist, das Ca^{2+} zu umschließen und als acht-zähliger Ligand die Koordinationsstellen von Ca^{2+} zu besetzen (vgl. Abb. 2.9.1). Dadurch besitzt es eine deutlich stärkere Affinität zu Calcium- als zu den im Ionenradius kleineren Magnesiumionen. Allerdings ist BAPTA aufgrund der 4 Carboxyl-Gruppen und der damit einhergehenden negativen Ladung in diesem Zustand nicht membrangängig. Durch Veresterung entfallen die negativen Ladungen der Carboxylgruppen und BAPTA-AM wird membrangängig (AAT Bioquest: What is an AM-Ester? (2021)).



Die Esterbindungen werden intrazellulär durch unspezifische Esterasen hydrolysiert (vgl. Abb. 2.9.1). So wird die ursprüngliche Chelatbildner-Funktion wiederhergestellt. Intrazellulär bindet BAPTA freies Ca^{2+} und senkt so die zur Verfügung stehende Konzentration von Ca^{2+} (Sutton et al., 2017). Aufgrund der Ca^{2+} -selektiven Eigenschaften fand BAPTA Anwendung in der Erforschung der Ca^{2+} -abhängigen Signalwege in Muskelzellen (Sztretye et al., 2011).

2.10 Fluo-4-AM

Fluo-4 ist ein reversibler Ca^{2+} -Chelator. Durch Veresterung entfallen die negativen Ladungen der Carboxylgruppen und Fluo-4-AM wird zellmembrangängig (AAT Bioquest: What is an AM-Ester? (2021); vgl. Abb. 2.10.1). Die Esterbindungen werden intrazellulär durch unspezifische Esterasen hydrolysiert.



Durch Bindung von Ca^{2+} kommt es zur Steigerung der Fluoreszenz um etwa den Faktor 100. Fluo-4-AM ist die veresterte Form von Fluo-4, ein Analogon zu Fluo-3. Der Austausch zweier Chlorid-Substituenten durch Fluor ermöglicht eine stärkere Anregung durch Argon-Laser (mit 488nm) (AAT Bioquest: Fluo-4 (o.J.)).

3 Methoden

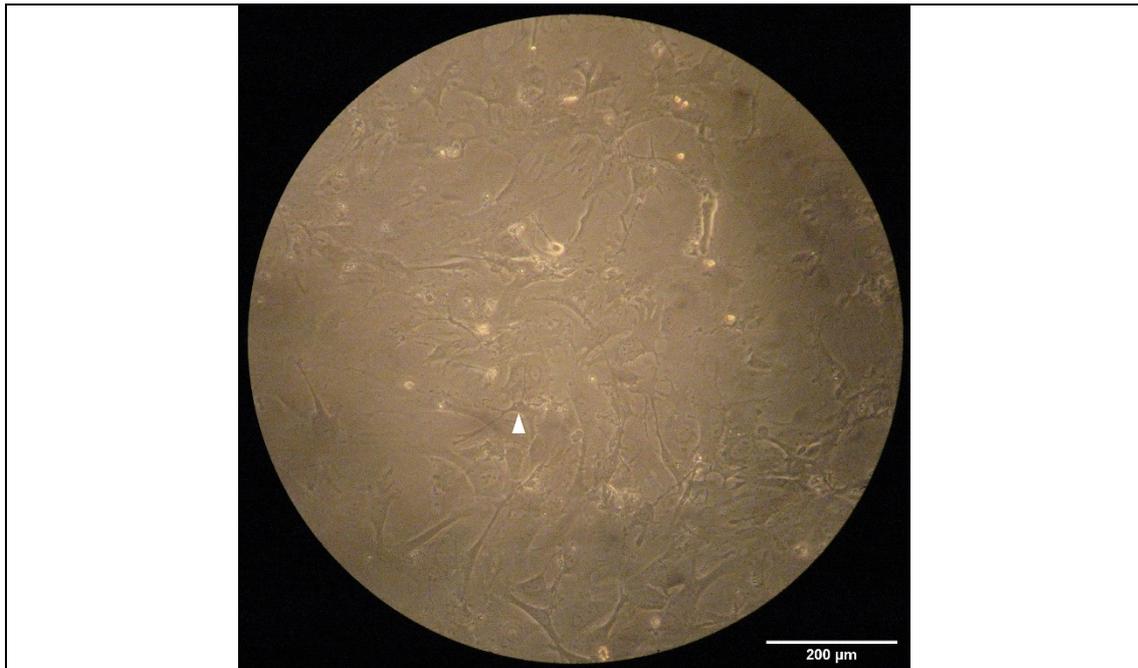
3.1 Embryonale Stammzellen

Die in der Arbeitsgruppe verwendeten Stammzellen entstammen der CCE-Zelllinie. Zur Kultivierung der CCE-Stammzellen werden sogenannte Feederzellen benötigt. Diese bieten den Stammzellen ein Grundgerüst für die Adhäsion und produzieren ferner LiF, welcher auch additiv zur Unterdrückung der spontanen Differenzierung der Stammzellen zugesetzt wird (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981).

3.1.1 Auftauen von Feederzellen

Eingefrorene Feederzellen, eingelagert in -196°C flüssigem Stickstoff, wurden im Wasserbad bei 37°C soweit aufgetaut, dass noch ein Rest der Zelllösung gefroren war. Sodann wurden diese Zellen in 20ml auf 37°C vorgewärmtes EMFI-Medium gegeben und für 5min bei $327g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in auf 37°C vorgewärmtes EMFI-Medium überführt, 5-fach resuspendiert und in vorbereitete Petrischalen (60mm – 5ml EMFI-Medium) überführt. Dabei wurden 8×10^5 Feederzellen pro Petrischale gesetzt. Um eine lokale Ansammlung der Zellen zu vermeiden, wurden diese im Inkubator kreuzförmig hin- und herbewegt. Nach 24h waren die Zellen an der Petrischale fest angewachsen und es konnte mit der Inaktivierung begonnen werden.

Für ideale Wachstumsbedingungen der Stammzellen ist es essentiell, dass die Feederzellen möglichst frisch aufgetaut sind, und dass sie weder zu dicht noch zu dünn ausgesät sind. Abb. 3.1.1 zeigt eine typische Verteilung der Feederzellen.



Lichtmikroskopische Aufnahme von Feederzellen, beispielhaft mit weißer Pfeilspitze markiert.

Abb. 3.1.1

3.1.2 Inaktivierung von Feederzellen

Da die Feederzellen im Vergleich zu den Stammzellen eine hohe Proliferationsrate haben, werden sie vor Kontakt mit den CCE-Stammzellen mittels Mitomycin C behandelt, um die Zellteilung zu unterbinden. Dieser Vorgang findet 24h nach dem Auftauen der Feederzellen statt und wird als Inaktivierung bezeichnet.

Die Feederzellen wurden mit je 3ml EMFI mit 12 μ g/ml Mitomycin C für 2-3h im Dunkeln bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Feederzellen dreimal mit je 3ml EMFI-Medium gewaschen und abschließend mit 5ml EMFI-Medium gefüttert.

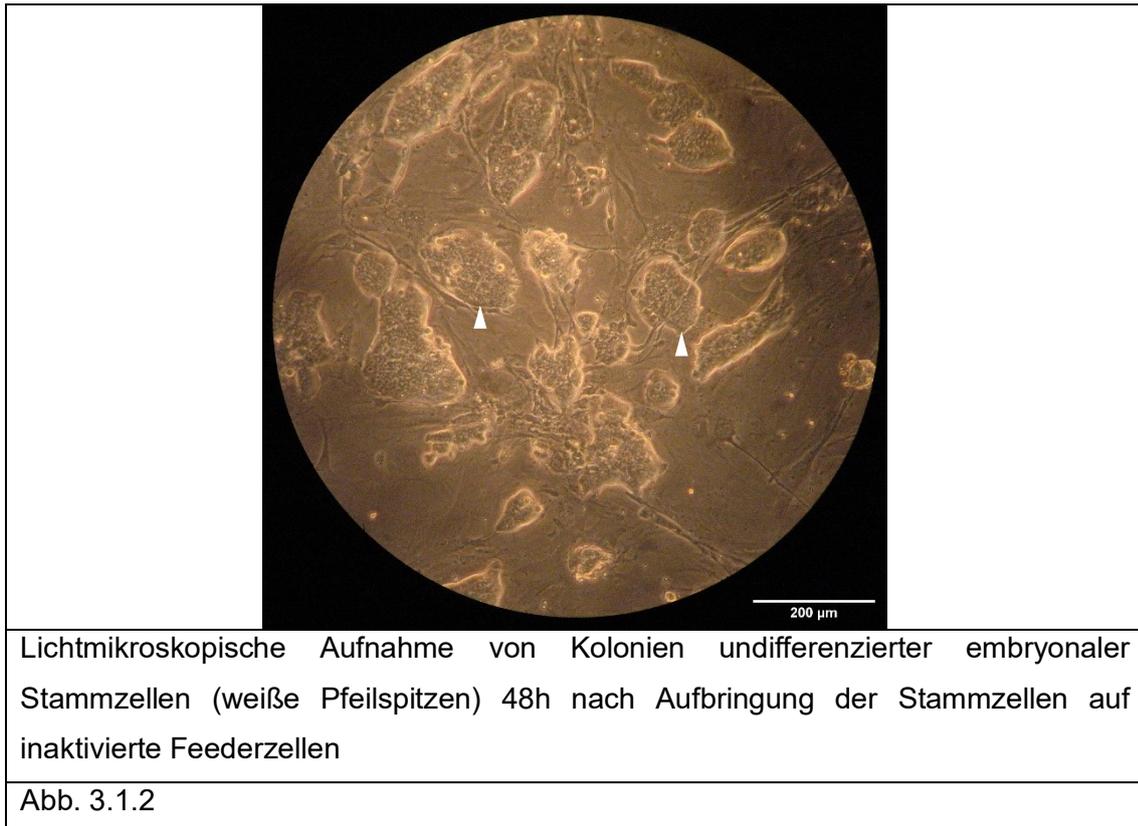
Alle Feederzellen, die nicht unmittelbar Verwendung fanden, wurden nun alle 2d mit je 5ml EMFI-Medium gefüttert.

3.1.3 Auftauen von Stammzellen

Eingefrorene Stammzellen werden bei -80°C im Gefrierschrank oder in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Auch diese Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C soweit aufgetaut, dass auch hier ein Rest der Zelllösung gefroren war. Anschließend wurden diese in 20ml auf 37°C vorgewärmtes CCE-Medium (37°C) überführt und für 5min bei 209g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut mit auf 37°C

vorgewärmtem CCE-Medium 5-fach resuspendiert und auf bereits mit LiFPLpro-Medium gefütterte, inaktivierte Feeder-Schalen gegeben. Dabei wurden 1×10^6 Stammzellen pro Petrischale eingesetzt. Diese wurden im Inkubator bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ kreuzförmig geschüttelt und über 24h stehengelassen, um eine gute Verteilung über die gesamte Schale zu erreichen.

Anschließend wurden die Stammzellen täglich mit 7-9ml LiFPLpro-Medium gefüttert. Abb. 3.1.2 zeigt eine typische Verteilung von CCE-Stammzellen und Feederzellen.



3.1.4 Umsetzen von Stammzellen

Alle 2d bis 3d war es nötig, die Stammzellen zu passagieren, da durch Proliferation der Stammzellen eine hohe Konfluenz der Zellen erreicht wurde und es andernfalls zu negativen Auswirkungen auf das weitere Wachstum und die Unterdrückung der Differenzierung käme.

Die Stammzellen wurden dabei von ihrer ursprünglichen Feederzell-Schale auf eine neue, inaktivierte Feederzell-Schale gesetzt. Etwa 30-60min vor dem Umsetzen wurden die Feeder mit 6ml, die Stammzellen mit 5ml LiFPLpro-Medium gefüttert, nachdem das alte Medium verworfen wurde.

Anschließend wurden die Stammzellen einmal kurz mit 2ml 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung gewaschen und dann mit 2ml 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung für 2min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurde die trübe Zelllösung mehrfach resuspendiert, um möglichst alle Zellen von der Petrischale zu lösen. Anschließend wurden erneut 1x10⁶ Zellen auf eine neue Feeder-Schale gesetzt. Um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu begünstigen, wurden diese im Inkubator kreuzförmig geschüttelt und über 24h anwachsen gelassen. Die verbliebenen Zellen wurden verworfen oder in eine Spinnerflasche überführt (vgl. Kapitel 3.2.2).

3.2 Differenzierung der embryonalen Stammzellen

Während die embryonalen Stammzellen auf den Feeder-Schalen in ihrer Differenzierung durch LiF supprimiert werden, dienen die Spinnerflaschen dazu, die Stammzellen zur Differenzierung zu bringen. Dies geschieht in Abwesenheit von LiF. In der Folge entstehen durch Zelladhäsion Aggregate, sogenannte EBs. In diesen EBs differenzieren sich die Stammzellen zu Zellen aller drei Keimblätter (Meso-, Ekto- und Endoderm). Im weiteren Verlauf der Differenzierung bilden sich aus dem Mesoderm die für diese Arbeit relevanten Kardiomyozyten (vgl. Kapitel 1.3).

3.2.1 Vorbereitung der Spinnerflasche

Damit es nicht zu einer Adhäsion der embryonalen Stammzellen beziehungsweise der EBs an der Spinnerflaschenoberfläche kommt, musste die Spinnerflasche vor Benutzung präpariert werden.

Zunächst wurde die Spinnerflasche für 30 – 60min mit wässrigem, 70%-igem Ethanol befüllt und sodann zwei- bis dreimal mit entsalztem Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Spinnerflasche mit NaOH (5 M) befüllt und dieses für 24h einwirken gelassen. Daraufhin wurde die Spinnerflasche kurz mit entsalztem Wasser ausgespült und mit Detergenz 7X befüllt. Diese Lösung wirkte erneut über 24h ein. Anschließend wurde die Spinnerflasche erneut ausgewaschen, mit entsalztem Wasser gespült und getrocknet.

Die trockene Spinnerflasche wurde mittels Sigma-Cote beschichtet. Hierzu wurden die Wände, der Boden und die Magnetschläger 8- bis 10-mal mit 10-12ml Sigmacote

benetzt. Das Sigma-Cote wurde bei 60°C für 60min einwirken gelassen. Sodann wurde dreimal mit entsalztem Wasser gewaschen und anschließend autoklaviert.

3.2.2 Ansetzen der Spinnerflasche

Das Ansetzen einer Spinnerflasche erfolgt parallel zum Passagieren der Stammzellen. Die vorbereitete Spinnerflasche wurde zuerst mit 10ml CCE-Medium gespült und dann mit 125ml CCE-Medium befüllt und bis zur Nutzung auf das Spinnersystem in den Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gestellt.

Nachdem die Stammzellen mittels Trypsin-Lösung von der Petrischale gelöst und ein Teil auf eine neue Feeder-Schale mit LiFPIpro-Medium gesetzt wurden, wurde die Trypsin-Reaktion in der verbliebenen Zellsuspension der Stammzellen mit 6ml CCE-Medium gestoppt und 13x10⁶ embryonale Stammzellen in eine Spinnerflasche überführt.

Damit sich die Zellen nicht allesamt am Boden absetzten, stand die Spinnerflasche auf einem magnetischen Spinnsystem. Hierfür befanden sich in der Spinnerflasche zwei magnetische Rührstäbe, die mit 20 Umdrehungen/min rotiert wurden und alle 4 Umdrehungen die Richtung wechselten. Die Schraubverschlüsse an den Seiten blieben zwecks Gasaustausches leicht geöffnet. Da die Stammzellen in ihrer Entwicklung nun nicht mehr durch LiF beeinträchtigt waren, entwickelten sie sich zu multizellulären, dreidimensionalen EBs.

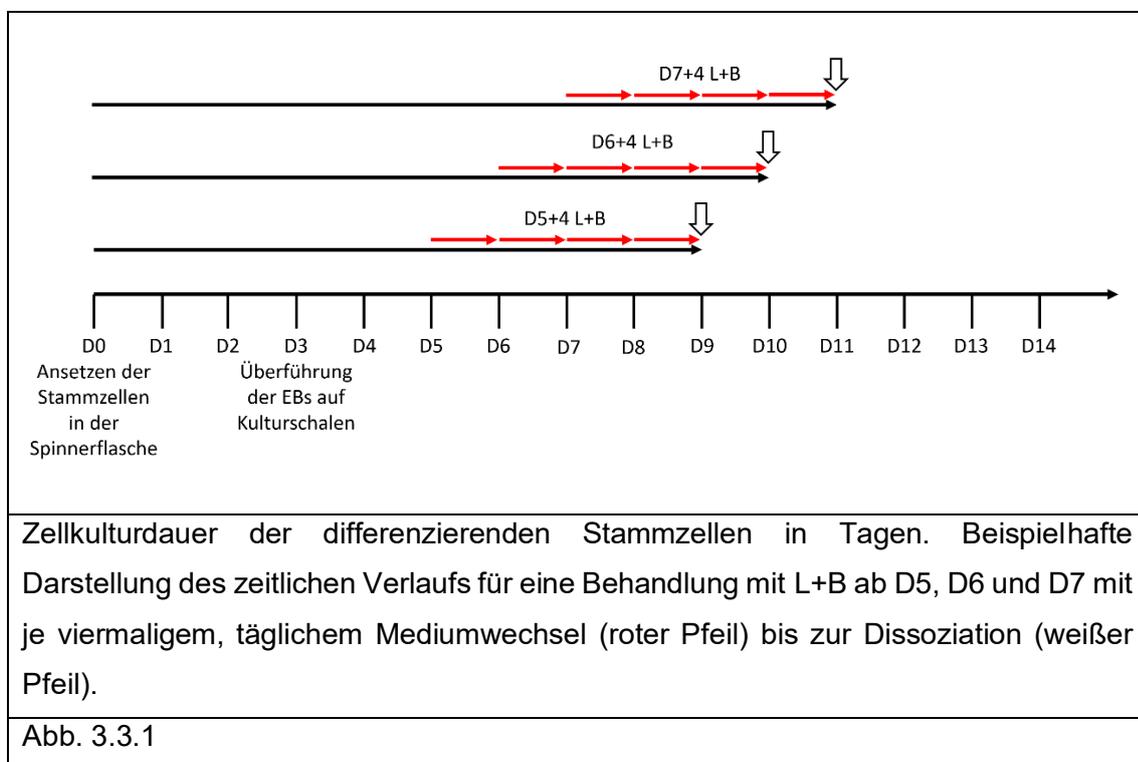
Die Spinnerflasche wurde täglich mit 125ml CCE-Medium gefüttert, wobei 24h nach dem Ansetzen der Spinnerflasche 125ml CCE-Medium hinzugegeben wurden. An allen Folgetagen wurde zunächst, nach dem Absetzen der Zellen, 125ml Überstand verworfen und anschließend mit 125ml CCE-Medium in der Spinnerflasche ersetzt.

Für die Durchführung der Experimente wurden die EBs 72h nach dem Ansetzen der Spinnerflasche auf eine 100mm Petrischale in 20ml CCE-Medium gesetzt und bis zur Verwendung für die Experimente bei täglichem Mediumwechsel weiter im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Petrischale mit den EBs befand sich im Inkubator auf einem Säge-Schüttler (10 Oszillationen/ min), um auch hier ein Anwachsen der Zellen an die Schale zu verhindern.

3.3 Behandlungsprotokoll mit Laktat-haltigem Medium

Um den optimalen Startzeitpunkt der Laktat-Behandlung der Zellen zu ermitteln, wurde diese zwischen Tag 5 und Tag 10 (D5, D10) begonnen.

Am ersten Tag der Laktat-Behandlung (bspw. D5) wurden die Zellen aus der gemeinsamen Zellkulturschale entnommen und auf je zwei 60mm Zellkulturschalen gesetzt. Die Kontrollschale wurde mit 6ml CCE-Medium befüllt und wieder in den Inkubator verbracht. Die Zellen in der zweiten experimentellen Schale wurden zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit 6ml Laktat-haltigem Medium gefüttert und ebenfalls im Inkubator auf den Schüttler gestellt. Es erfolgte ein täglicher Mediumwechsel mit je 6ml Medium.



Die Nomenklatur der verschiedenen Ansätze und Proben ergibt sich dabei aus dem Beginn und der Dauer der Laktat-Behandlung, dem verwendeten Medium sowie ggf. dem Tag nach Dissoziation für die Immunhistochemie und die Ca^{2+} -Oszillationsmessungen. Beispielhaft wird dies anhand von Abb. 3.3.1 dargelegt.

Erfolgte der Beginn der Laktat-Behandlung exemplarisch an D5 nach Ansetzen der Spinnerflasche mit L+B, so erfolgten die Mediumwechsel an D5, D6, D7 und D8. Der Name dieser Probe lautete daher „D5+4 L+B“. Fand keine Supplementierung mit BSA statt, so ergab sich daraus „D5+4 Lac“.

Nach erfolgtem Mediumwechsel an 4d (D5, D6, D7 und D8) fand die Dissoziation der EBs am Folgetag (D9) statt. Wurden nun Proben für die Immunhistochemie 24h nach Dissoziation genutzt, so lautete die Bezeichnung dieser Proben „D5+4 L+B, 24h post“.

Kontrollen, die weiter mit CCE-Medium gefüttert wurden, wurden nach dem gleichen Muster bezeichnet. Daraus ergab sich der Name der Kontrolle zu oben genannter Probe: „D5+4 CCE, 24h post“.

3.4 Dissoziation der EBs

Nach Ende der Laktat-Behandlung wurden die Zellen mittels 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung dissoziiert, um für weitere Untersuchungen genutzt zu werden.

Am Tag der Dissoziation wurde das noch vorhandene Medium abgesaugt und die Zellen mit 37°C warmem PBS zweimal gewaschen. Je Schale wurden 3ml 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und die Zellen für 5min auf dem Schüttler (10 Oszillationen/min) im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden weitere 3ml Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und für weitere 10min inkubiert. Nach der zweiten Inkubation wurden die verbliebenen Zellklumpen mittels Pipettenspitze mechanisch zerkleinert und in ein Reaktionsgefäß mit 18ml vorgewärmten CCE-Medium zur Neutralisation des Trypsins überführt. Es wurde für 5min bei 209g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das verbliebene Zellpellet in CCE-Medium gelöst. Die Menge an CCE-Medium richtete sich dabei nach der Größe der Pellets und betrug zwischen 100µl und 2ml.

Die so gelösten Zellen wurden nun auf Deckgläschen in einer 24-Well Platte gesetzt. Dabei wurden ca. 5×10^4 Zellen für die Proben in der Immunhistochemie sowie für die Ca²⁺-Oszillationsmessungen und bis zu 2×10^5 Zellen zur Bildung von Monolayern eingesetzt.

Die Deckgläschen waren zuvor in der 24-Well-Platte mit 0,1% Gelatine gelöst in Wasser für 30min inkubiert worden. Die Gelatine wurde abgesaugt und die Platte wurde für weitere 30min im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ angetrocknet. Der Trockenvorgang war nötig, um ein Verlaufen des Zelltropfens zu minimieren.

Um möglichst große, zusammenhängende Zellverbände aus Kardiomyozyten zu erzeugen, war es nötig, die Zellpellets in möglichst wenig Medium zu lösen, um eine

hohe Zellkonzentration zu erreichen. Es wurden 30-80µl der Zelllösung auf ein Deckgläschen ausplattiert und für 30-60min in den Inkubator verbracht. Erst dann wird das Well, in welchem sich das Deckgläschen befindet, mit 1ml CCE-Medium vorsichtig vom Rand nach zentral-innenlaufend aufgefüllt und über 24h in den Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ verbracht.

Die so generierten Deckgläschen wurden 24h nach Dissoziation zwecks Ca²⁺-Oszillationsmessungen mit Fluo-4-AM inkubiert, für immunhistochemische Färbungen in Methanol fixiert oder über 24h mit BAPTA-AM inkubiert.

3.5 Behandlungsprotokoll der dissoziierten Kardiomyozyten mit BAPTA-AM

Für die Durchführung der BAPTA-AM-Versuche wurden CCE-Stammzellen genutzt, die nach begonnener Differenzierung in CCE-Medium ab D7 mit Laktat-Medium, ohne Zusatz von BSA, behandelt und an D11 dissoziiert wurden (D7+4 Lac). Dabei wurden ca. 5x10⁴ Zellen pro Probe ausplattiert und mit je 1ml CCE-Medium gefüttert. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel und die Inkubation der Zellen für 24h mit BAPTA-AM (5µM). 48h nach Dissoziation wurden die Proben für die Immunhistochemie in Methanol fixiert.

3.6 Bestimmung der Kontraktilität und Größenverlaufsmessung der EBs

Unter CCE-Vollmedium kam es zu einer Größenzunahme der EBs über die Zeit (vgl. Abb. 3.6.1 A und B) sowie einer weiteren Differenzierung. Ein eindeutiger lichtmikroskopischer Anhaltspunkt hierfür war die Ausbildung kontrahierender Areale ab D6-D7 nach Ansetzen der Spinnerflasche.

Zur Bestimmung der kontrahierenden EBs wurde ab einem Tag vor Beginn der Laktat-Behandlung und dann täglich der Anteil kontrahierender EBs lichtmikroskopisch (Zeiss Axiovert 40C) erfasst. Um Effekte durch Temperaturänderung auf die EBs in Suspension zu minimieren, wurde der Objektisch am Lichtmikroskop an eine Heizvorrichtung angeschlossen und auf 37°C erwärmt. Es erfolgte eine Auszählung von mindestens 20

EBs je Schale. Frequenz, Größe oder Anzahl der kontrahierenden Areale pro EB flossen nicht in die Auswertung ein.

Anschließend erfolgte die lichtmikroskopische, digitale Fotodokumentation der EBs mittels Kamera (Canon Powershot) zwecks Größenbestimmung. Die Auswertung der so generierten Bilder erfolgte mit der Software ImageJ. Hierfür wurde der mittlere Durchmesser der EBs als Größenindikator ausgewählt und auf den Fotos ausgemessen. Die Daten aus mehreren Passagen wurden zu je einem Mittelwert für den entsprechenden Untersuchungstag zusammengefasst.

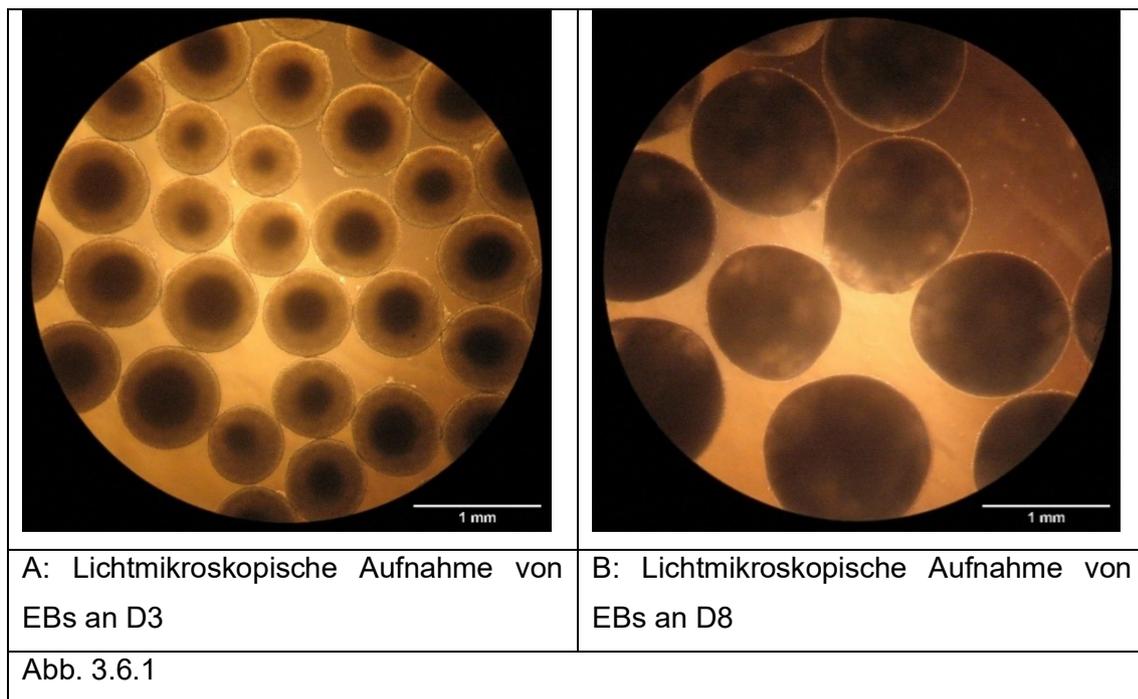


Abb. 3.6.1 A und B zeigen exemplarisch die Größenzunahme der EBs über die Zeit.

3.7 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Für weiterführende Untersuchungen wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop verwendet. Der Vorteil dieser Art von Mikroskop besteht in seiner hohen Auflösung und Kontrastschärfe.

Das für diese Arbeit verwendete konfokale Laser-Scanning-Mikroskop Leica TCS SP2 nutzt folgende drei Laser: einen Argon/Argon-Krypton-Laser mit einer Wellenlänge von 488nm sowie 2 Helium/Neon-Laser mit Wellenlängen von 543/ 594nm beziehungsweise

633nm. Das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop wird genutzt für immunhistochemische Färbungen und Messungen von Calcium-Oszillationen. Um diese Untersuchungen durchzuführen, werden die Proben vorab mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Zur Bildgenerierung dient die vom Hersteller bereitgestellte Software „Leica Confocal Software“. Die Farbdarstellung der durch einen Laser angeregten Objekte kann individuell festgelegt werden.

3.8 Immunhistochemie

Als Nachweismethode zur Quantifizierung der Kardiomyozyten und Bestimmung der Reinheit nach Laktat-Behandlung wurden ab 24h nach Dissoziation Proben mittels Immunhistochemie untersucht. Ebenso wurde das Vorhandensein von Connexin 43 als essentieller Bestandteil von Kardiomyozyten geprüft.

3.8.1 α -Actinin/ DRAQ5-Färbung

Die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen von 12mm Durchmesser wurden zunächst zweimal mit 25°C warmem PBS gewaschen und anschließend in -20°C kaltem Methanol fixiert. Die fixierten Zellen wurden mindestens 20min bei -20°C verwahrt.

Anschließend wurden die Zellen viermal mit PBST 0,01% gewaschen und dann für 10min mit PBST 1% zwecks Permeabilisierung bei Raumtemperatur inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen der im weiteren Verlauf verwendeten Antikörper (AK) zu blockieren, wurden die Zellen nach weiteren 4 Waschvorgängen mit PBST 0,01% für 1h mit 10%igem hiFCS inkubiert. Es wurde erneut viermal mit PBST 0,01% gewaschen und über Nacht mit dem primären AK (vgl. Tab. 3.8.1) gelöst in 10%-igem hiFCS bei 4°C inkubiert.

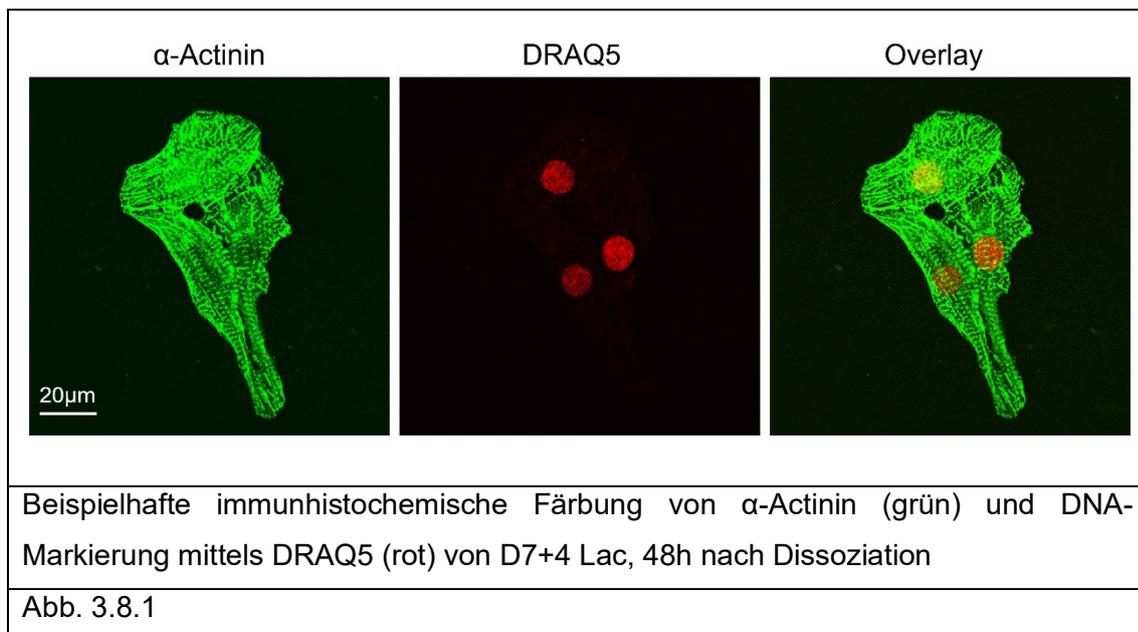
Primäre AK	Verdünnung in 10%igem hiFCS
Ms mAb to Sarcomeric Alpha Actinin (EA-53)	1 : 100
Monoklonal Anti- α -Actinin (Sarcomeric) produced in mouse (EA-53)	1 : 800
Konzentration der verwendeten primären AK	
Tab. 3.8.1	

Nach 24h erfolgten weitere vier Waschvorgänge mit PBST 0,01% und eine Inkubation bei Raumtemperatur mit dem sekundären AK für 60min (vgl. Tab. 3.8.2), gelöst in 10%-igem hiFCS, unter Lichtausschluss.

Sekundäre AK	Verdünnung in 10%igem hiFCS
Alexa 488 Donkey anti-mouse	1 : 100
FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG	1 : 100
FITC-conjugated goat anti-mouse IgG + IgM	1 : 100
Konzentration der verwendeten sekundären Antikörper	
Tab. 3.8.2	

Nach nochmaligem, vierfachem Waschen mit 0,01% PBST erfolgte die Inkubation mit DRAQ5, tausendfach mit PBS verdünnt, für 25min bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Proben zweimal mit PBS gewaschen. Zur weiteren Aufbewahrung verblieben die Proben in PBS bei 4°C oder wurden mittels Fluoromount auf Objektträgern fixiert. Nach Fixierung wurden die Proben für 48-72h bei +4°C zur Trocknung aufbewahrt.

Die Bildgebung erfolgte mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Um einen repräsentativen Überblick über den Prozentsatz an Kardiomyozyten in den jeweils vorliegenden Proben zu erhalten, erfolgte - entsprechend der Zellzahl und Verteilung in verschiedenen Regionen - die Bilddokumentation (vgl. Abb. 3.8.1). Die Auswertung der Bilder erfolgte mittels der Software ImageJ.



3.8.2 Connexin 43/ α -Actinin/ DRAQ5-Färbung

Die Proben wurden zunächst zweimal mit 25°C warmem PBS gewaschen und anschließend in mit 4% Paraformaldehyd auf Eis für 20min fixiert.

Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann für 15min mit PBST 0,1% zwecks Permeabilisierung bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgten zwei weitere Waschvorgänge mit PBS. Um unspezifische Bindungsstellen der im weiteren Verlauf verwendeten AK zu blockieren, wurden die Zellen für 60min mit 5% Milchpulver gelöst in PBS inkubiert („Milch“). Die Inkubation mit dem Anti-Connexin 43-AK gelöst in Milch erfolgte über Nacht bei 4°C (vgl. Tab. 3.8.3). Nach 24h erfolgten weitere drei Waschvorgänge mit PBS, gefolgt von einer Inkubation bei Raumtemperatur mit dem sekundären AK für 60min (vgl. Tab. 3.8.3), gelöst in Milch.

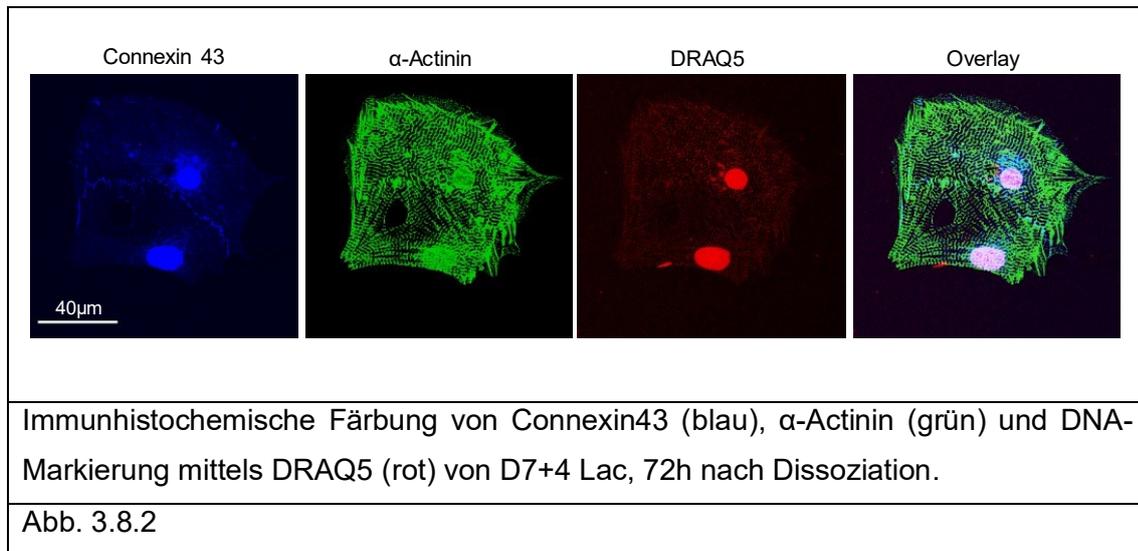
Primärer AK	Verdünnung in „Milch“
Connexin 43 Polyclonal Antibody (rabbit, PA1-25098)	1 : 100
Sekundärer AK	Verdünnung in „Milch“
FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG	1 : 100
Konzentration der verwendeten AK zur Färbung von Connexin 43	
Tab. 3.8.3	

Nach anschließendem, dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem primären AK gegen α -Actinin (vgl. Tab. 3.8.4) für 90min bei Raumtemperatur. Nach erneutem, dreifachem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären AK (vgl. Tab. 3.8.4) für 60min bei Raumtemperatur.

Primärer AK	Verdünnung in „Milch“
Monoklonal Anti- α -Actinin (Sarcomeric) produced in mouse (EA-53)	1 : 400
Cy3-conjugated sheep anti-mouse IgG	1 : 100
Konzentration der verwendeten sekundären Antikörper	
Tab. 3.8.4	

Anschließend erfolgte nach dreimaligem Waschen mit PBS die Inkubation mit DRAQ5, tausendfach mit PBS verdünnt, für 30min bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Proben zweimal mit PBS gewaschen. Zur weiteren Aufbewahrung wurden die Proben mittels Fluoromount auf Objektträgern fixiert. Nach Fixierung wurden die Proben für 48-72h bei +4°C zur Trocknung aufbewahrt. Die Bildgebung erfolgte mit dem

konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Abb. 3.8.2 zeigt eine beispielhafte Färbung gegen Connexin 43, α -Actinin und DNA (DRAQ5).



3.9 Messung von Calcium-Transienten

In Herzmuskelzellen und -geweben ist Ca^{2+} zentraler Bestandteil der Erregungsausbreitung und des Kontraktionsmechanismus. Die intrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} ist dabei abhängig vom Erregungszustand der Zelle (vgl. Kapitel 1.7). Mittels bestimmter Farbstoffe, wie Fluo-4, die durch Komplexbildung mit Ca^{2+} stark an Fluoreszenz zunehmen, ist es möglich, die intrazellulären Ca^{2+} -Oszillationen optisch zu quantifizieren.

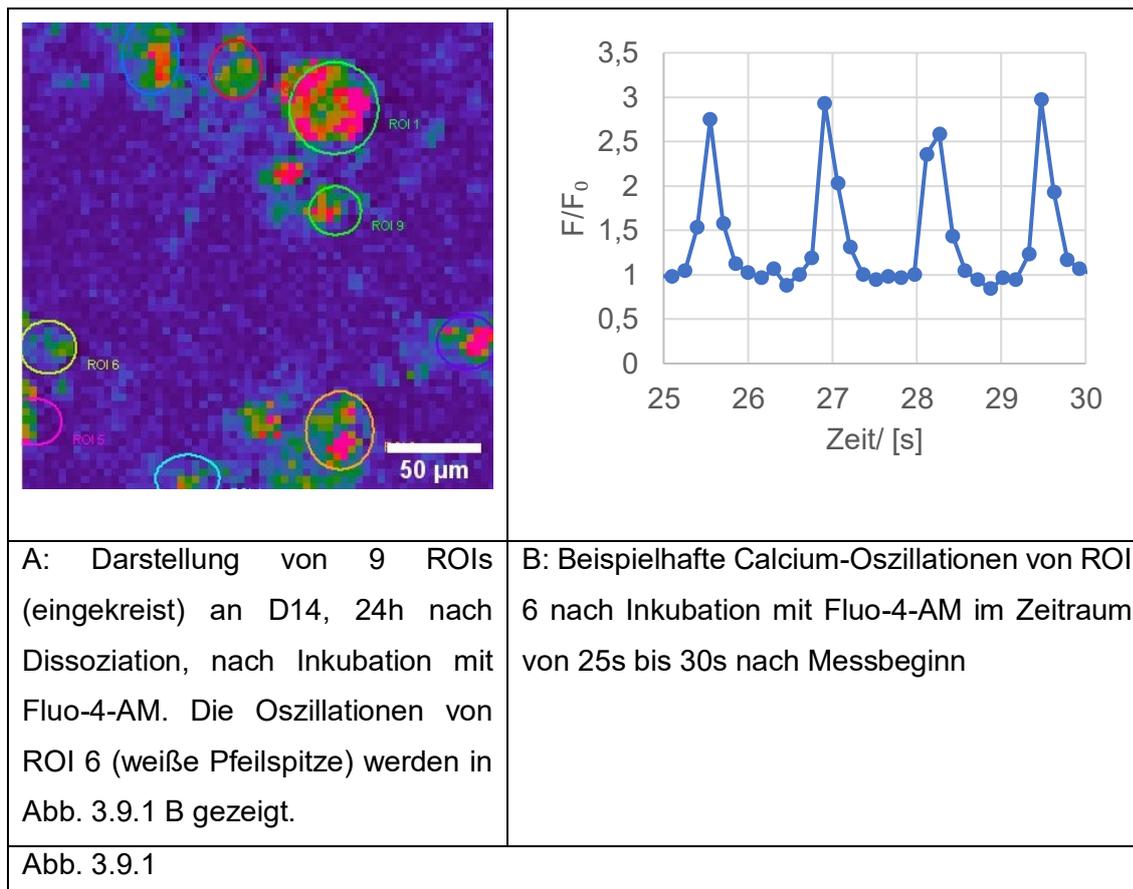
Nachdem die Kardiomyozyten mittels Laktat-haltigem Medium aufgereinigt worden sind, wurden 24h nach Dissoziation und Ausbringen auf 12mm Coverslips Calcium-Oszillationsmessungen durchgeführt. Die Untersuchungen auf eine Reaktion bei Zugabe von Resveratrol fanden an D12 und an D14 statt. Die Messung der Calcium-Transienten erfolgte mittels Fluo-4-AM. Die Zellen wurden dabei mit Fluo-4-AM (3-5 μM) für 12min inkubiert, höhere Konzentrationen wurden getestet, erwiesen sich jedoch als nachteilig. Anschließend wurde der Coverslip in die zuvor mit 400 μl CCE-Medium gefüllte Messkammer überführt.

Während der Messung erfolgte die Zugabe der gelösten Messsubstanz in 100 μl CCE-Medium. Die Endkonzentration in der Messkammer betrug 50 μM Resveratrol, wobei

auch in der Literatur ähnliche Konzentrationen verwendet wurden (Li et al., 2013; Liu et al., 2005; Wallace et al., 2006; Zhang et al., 2006). In den Kontrollproben wurden analoge Mengen von DMSO (0,25µl DMSO + 2,25µl PBS) beziehungsweise PBS (2,25µl) wie in der Resveratrol-Probe verwendet. Die Anregung von Fluo-4 erfolgte mittels Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488nm. Das Emissionsmaximum von Fluo-4 liegt bei 516nm (Thermo Fisher Scientific: Molecular Probes – Invitrogen detection technologies: Fluo Calcium Indicators (2011)). Geeignete Zellen wurden lichtmikroskopisch anhand ihrer Kontraktibilität identifiziert. Die Auswahl richtete sich danach, möglichst viele verschiedene Zellen/ Zellaggregate in einem Blickfeld messen zu können.

Es wurden Bilderserien mit 4-7 Bildern pro Sekunde (s) über einen Zeitraum von insgesamt 5min aufgenommen. Begonnen wurde mit der Zugabe der Substanzen ab ca. 80s nach Messbeginn. Um Messfehler durch mechanische Stimulation der Zellen bei Zugabe der Messsubstanz zu vermeiden, erfolgte die Betrachtung zeitversetzt zur Zugabe nach etwa 10s. Ausgewertet wurden 4 Messzeiträume. Die Vorlaufzeit von 80s diente zur Ermittlung des Ausgangswertes (z.B. der Grundfrequenz der Calcium-Transienten). Nach Zugabe von Resveratrol/ DMSO (Vehikelkontrolle)/ CCE-PBS (Kontrolle) wurde die Frequenz für die ersten 30s und die ersten 60s nach Zugabe bestimmt. Abschließend erfolgte eine weitere Frequenzbestimmung 2min nach Zugabe.

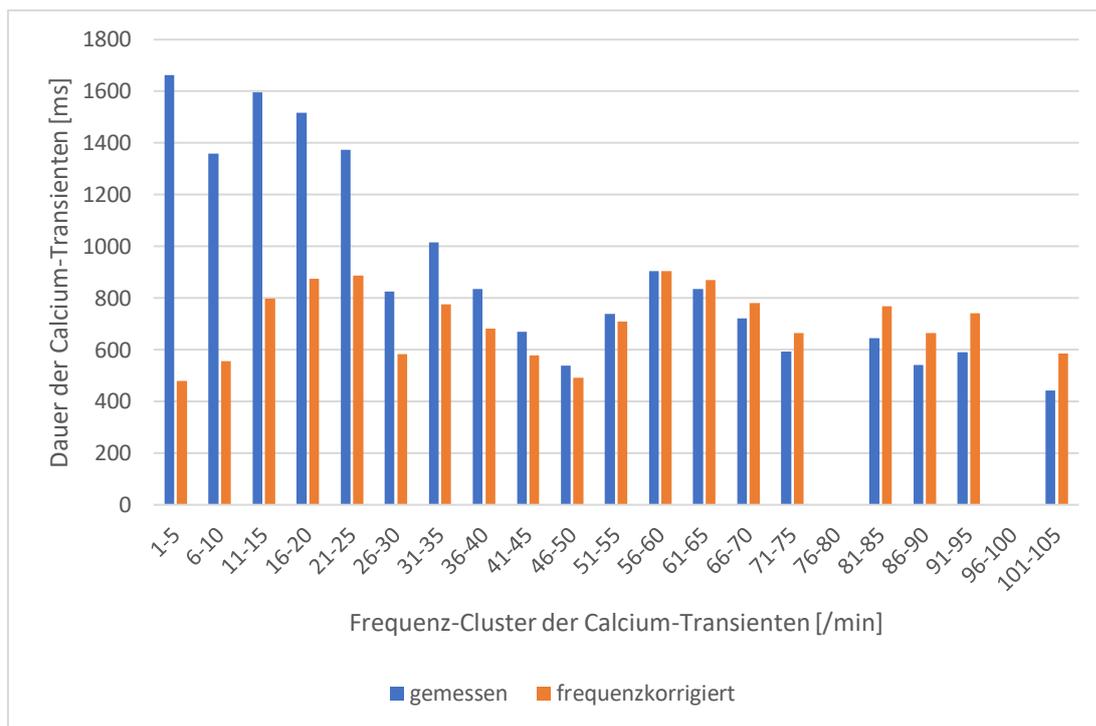
Abb. 3.9.1 A zeigt exemplarisch das Sichtfeld bei Messung der Ca^{2+} -Oszillationen. Die farblich markierten Regionen (engl. region of interest, ROI) werden messtechnisch erfasst und die Veränderungen der Fluoreszenz-Intensität über die Zeit graphisch als relative Signalintensität (F/F_0) dargestellt (vgl. Abb. 3.9.1 B). Dabei stellen sich in der Falschfarben-Darstellung niedrige Ca^{2+} -Konzentrationen als blau, hohe Konzentrationen gelb-rot dar.



Es wurden Messungen mit je vier Passagen durchgeführt. Da sich eine Frequenzabhängigkeit sowohl der Dauer der Calcium-Transienten (vgl. Abb. 3.9.2 B) wie auch der Time To Peak (TTP) zeigte, erfolgte die Frequenzkorrektur mittels Bazett-Formel (vgl. Abb. 3.9.2 A). Dabei wurde die gemessene Dauer (t_{gemessen}) zur frequenzkorrigierten Dauer ($t_{\text{frequenzkorrigiert}}$) transformiert (vgl. Abb. 3.9.2 B).

$$t_{\text{frequenzkorrigiert}} [\text{ms}] = \frac{t_{\text{gemessen}} [\text{ms}]}{\sqrt{\frac{60 \left[\frac{1}{\text{min}} \right]}{\text{Frequenz} \left[\frac{1}{\text{min}} \right]}}$$

A: Bazett-Formel zur Frequenzkorrektur der Dauer der Calcium-Transienten



B: Beispielhafte Darstellung der gemessenen (blau) und frequenzkorrigierten (orange) Dauer der Calcium-Transienten in Abhängigkeit der Frequenz-Cluster an D14.

Abb. 3.9.2

War es gelungen, durch erfolgreiche Behandlung mit Laktat-Medium, eine hohe Reinheit der Probe an Kardiomyozyten zu erzielen und diese als konfluenten Zellverband zu kultivieren, wurden an dem Zellverband Ca^{2+} -Messungen durchgeführt, um eine generalisierte Erregungsausbreitung nachzuweisen.

3.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mittels GraphPad Prism-Software. Die Resultate wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Zur Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen wurden alle Versuche, wenn nicht anders beschrieben, mindestens dreimal durchgeführt.

Um signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Proben festzustellen, wurde der student's t-Test bzw. die Analyse der Varianz (ANOVA) mit anschließendem post-hoc Test durchgeführt. Bei Vergleich von Proben über einen Zeitraum erfolgte die statistische Auswertung mittels ANOVA mit Messwiederholungen (engl. Repeated measures-ANOVA, RM-ANOVA) (Lew, 2007; Schober&Vetter, 2018). Für den Fall ungleicher Standardabweichungen von zu vergleichenden Proben erfolgte die Analyse mittels Welch-Test und anschließendem Dunnett T3 post-hoc Test.

Bei Vergleich von Proben in Abhängigkeit einer Variablen wurde der post-hoc Test nach Tukey angewendet. Bei Vergleich von Proben in Abhängigkeit von 2 Faktoren wurde der post-hoc Test nach Sidak durchgeführt.

Dabei gilt:

$p > 0,05$ – nicht signifikant (ns)

$p < 0,05$ – signifikant

4 Ergebnisse

Im Zuge der Differenzierung der Stammzellen kommt es in Suspension zur Zusammenlagerung und Formung von EBs. Unter Vollmedium nehmen die EBs an Größe zu. Kardiomyozyten werden im Prozess der Kardiomyogenese im Zeitraum zwischen D5 und D10 gebildet. Bei Ersatz des Vollmediums durch Laktat-Medium, also dem Entzug sämtlicher Kohlenstoffenergiequellen außer Laktat, kommt es innerhalb kurzer Zeit zu einer Größenreduktion der EBs in Kultur. Kardiomyozyten und möglicherweise auch kardiogene Progenitorzellen können aufgrund einer umfangreicheren Enzymausstattung ihrer Mitochondrien Laktat besser als andere Zellen verwerten und werden somit metabolisch selektiert (Tohyama et al., 2016 & Kapitel 1.5.3). Dieses Phänomen konnte auch für die eingesetzte CCE-Zelllinie nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 4.3).

In der Literatur finden sich primär Laktat-Protokolle für humane iPS-Zellen, welche neben einem anderen Differenzierungs- und Kulturmuster (vgl. Kapitel 1.3.2) auch eine längere Behandlung mit Laktat-Medium benötigen. Das in der Literatur beschriebene Laktat-Medium (Tohyama et al., 2013) enthält kein Serum.

Da die für diese Arbeit genutzten, embryonalen CCE-Stammzellen in Serum-haltigen Medien kultiviert werden, hat sich der Ersatz von Serum durch BSA in Serum-freien Medien in der Arbeitsgruppe etabliert um bessere Funktionalitäten der CCE-Zellen zu erzielen.

4.1 Größenentwicklung der EBs in Abhängigkeit des Nährmediums

In Abhängigkeit des verwendeten Nährmediums ließ sich eine unterschiedliche Entwicklung der EBs beobachten.

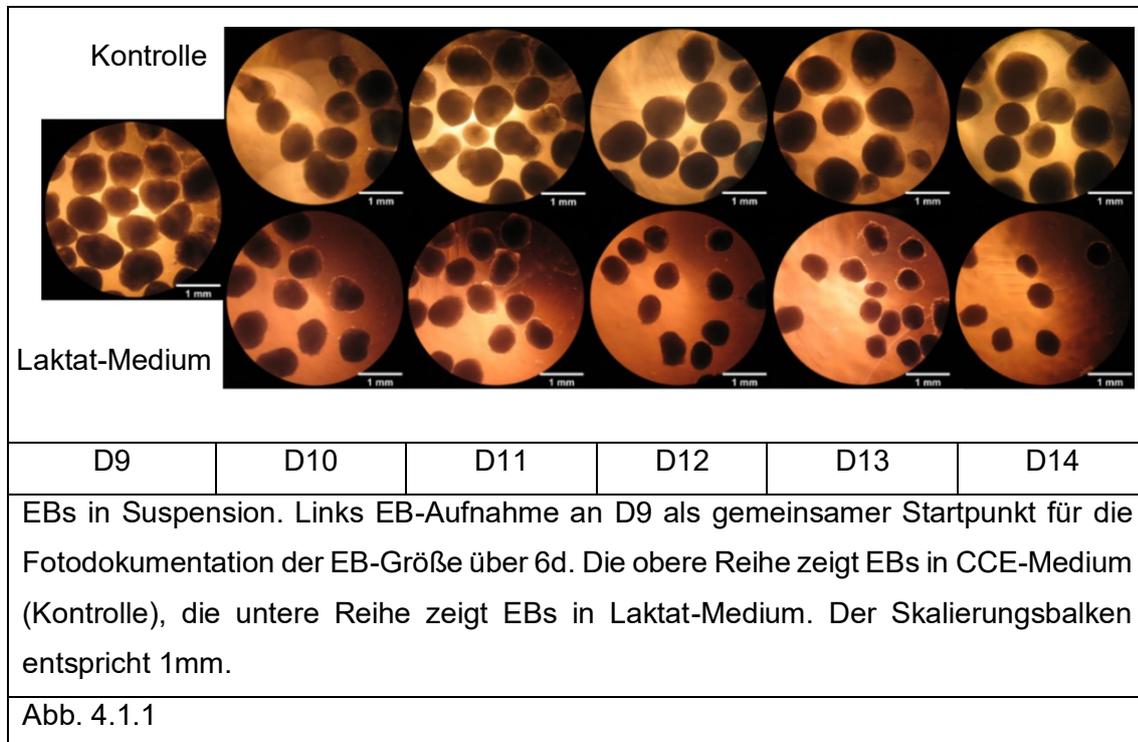
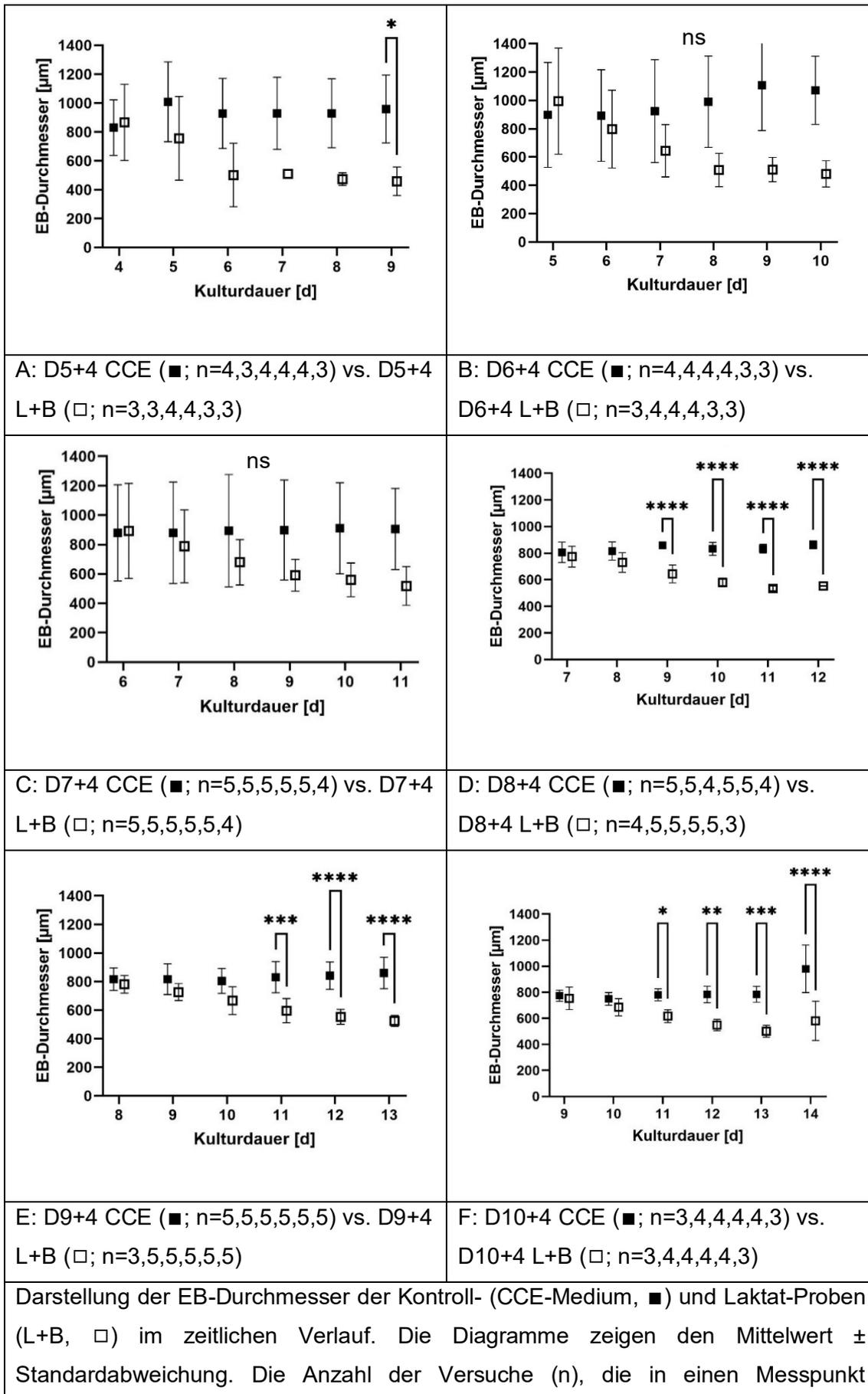


Abb. 4.1.1 zeigt beispielhaft die Größenveränderung der generierten EBs in CCE-Medium (D10+4 CCE, obere Reihe) und Laktat-Medium (D10+4 L+B, untere Reihe). Die Größendokumentation der EBs erfolgte 3h nach dem täglichen Wechsel des Nährmediums. Die letzte Aufnahme der EBs erfolgte vor Dissoziation, 24h nach dem letzten Mediumwechsel.

Um zu ermitteln, inwiefern sich der Zeitpunkt des Beginns der Laktat-Behandlung auf die EB-Größe auswirkt, wurde die Entwicklung des mittleren EB-Durchmessers als Maß für die EB-Größe über einen Zeitraum von je 6d gegenüber EBs in CCE-Vollmedium bestimmt. Dabei wurde zwischen D5 und D10 mit der Laktat-Behandlung begonnen, da sich typischerweise erste Kontraktionen der EBs zwischen D6-D7 zeigten und bis D10 die Kardiomyogenese weitestgehend abgeschlossen ist.



eingeflossen sind, sind unter den Grafiken vermerkt. Dabei gilt: * \triangleq $p < 0,05$; ** \triangleq $p < 0,01$; *** \triangleq $p < 0,001$; **** \triangleq $p < 0,0001$; ns \triangleq nicht signifikant.

Abb. 4.1.2

Abb. 4.1.2 zeigt den Einfluss des Nährmediums auf den mittleren EB-Durchmesser für sechs verschiedene Starttage bei nachfolgender Laktat-Behandlung über 4d bis einschließlich zum Dissoziationstag (letzter Wert, X-Achse). Der mittlere EB-Durchmesser in Mikrometern wurde als Größenindikator dargestellt (Y-Achse).

Über alle Starttage hinweg konnte eine Abnahme des mittleren EB-Durchmessers der mit L+B gefütterten EBs beobachtet werden. Der Durchmesser der EBs in CCE-Medium (Kontrolle) hingegen zeigte tendenziell eine leichte Zunahme der Mittelwerte, allerdings ohne signifikante Unterschiede zum Ausgangswert. Auch ein Vergleich der EB-Durchmesser nach Laktat-Behandlung zeigte bei Betrachtung der unterschiedlichen Startpunkte der Inkubation keine signifikanten Unterschiede, wobei die Größendurchmesser bei späterem Behandlungsbeginn tendenziell größer waren. Die Abnahme des EB-Durchmessers, und somit der EB-Größe, impliziert einen Zellverlust durch Zelltod infolge der Laktat-Behandlung.

4.1.1 Einfluss von BSA auf den EB-Durchmesser

Da das in der Literatur verwendete Laktat-Medium kein BSA enthält, wurde im Folgenden der Effekt von BSA auf die metabolische Selektion und die EB-Größe untersucht. D7 wurde hierfür ausgewählt, da sich in der immunhistochemischen Färbung ein Maximum des Anteils an Kardiomyozyten an der Gesamtzellzahl für Beginn der Laktat-Behandlung an D7 ergab (vgl. Kapitel 4.3.1). Im Folgenden wurde der Effekt von 0,2% BSA in Laktat-haltigem Medium auf die EB-Größe untersucht.

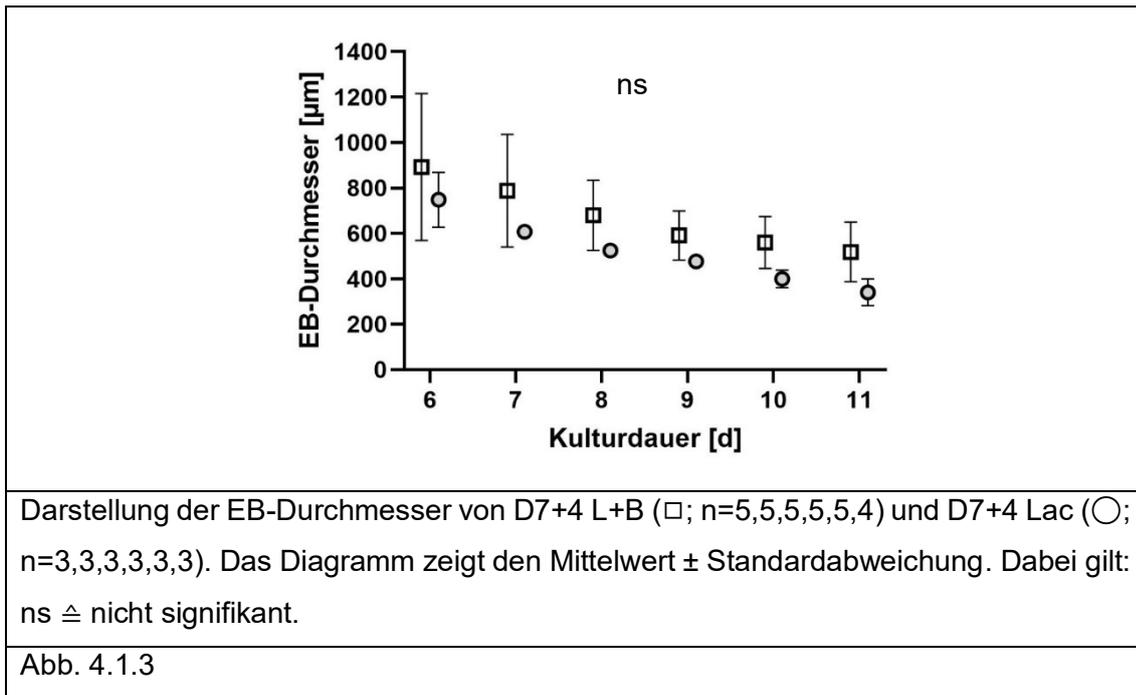


Abb. 4.1.3 zeigt die Veränderung des mittleren EB-Durchmessers über die Zeit. Die Beobachtungstage sind auf der X-Achse abgetragen, der EB-Durchmesser in Mikrometern auf der Y-Achse. Die Daten für D7+4 L+B entsprechen denen aus Abb. 4.1.2 C.

Die Auswertung bezüglich der Supplementierung von BSA erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen L+B und Lac (vgl. Abb. 4.1.3).

Insgesamt zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der EB-Durchmesser am Dissoziationstag nach Behandlung mit Laktat-Medium zwischen den einzelnen Starttagen, ebenso wenig wie in Abhängigkeit von der Supplementierung mit BSA. Hingegen konnte in allen Experimenten eine Abnahme der EB-Durchmesser unter Laktat-Medium mit und ohne BSA beobachtet werden.

4.2 Einfluss von Laktat-Medium auf den Anteil kontrahierender EBs

Die Abnahme der EB-Durchmesser im Laktat-Medium ließ darauf schließen, dass es zu einem Zellverlust innerhalb der EBs im Vergleich zum CCE-Medium kam. Hieraus ergab sich die Frage, welche Auswirkungen dies auf die sich in den EBs differenzierenden Kardiomyozyten hatte. Daher wurde lichtmikroskopisch der Anteil spontan kontrahierender EBs in Bezug zur Gesamtzahl der EBs pro Stichprobe ermittelt. Es wurden je mindestens 20 EBs betrachtet.

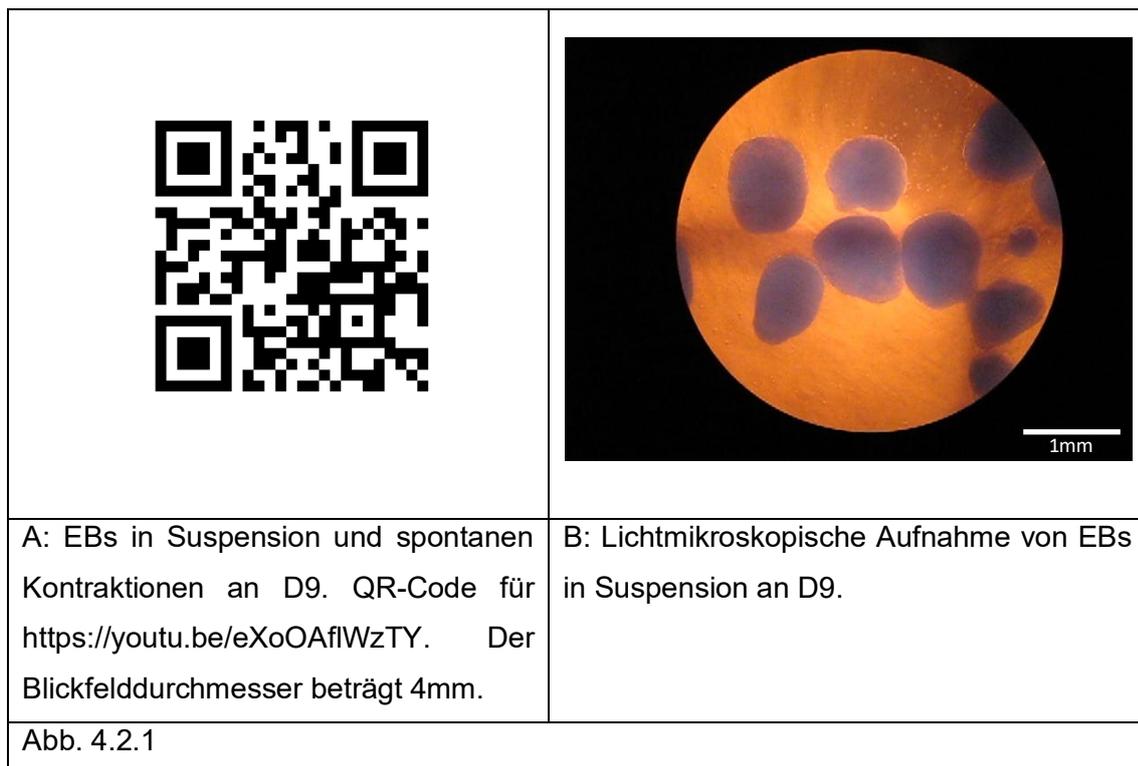
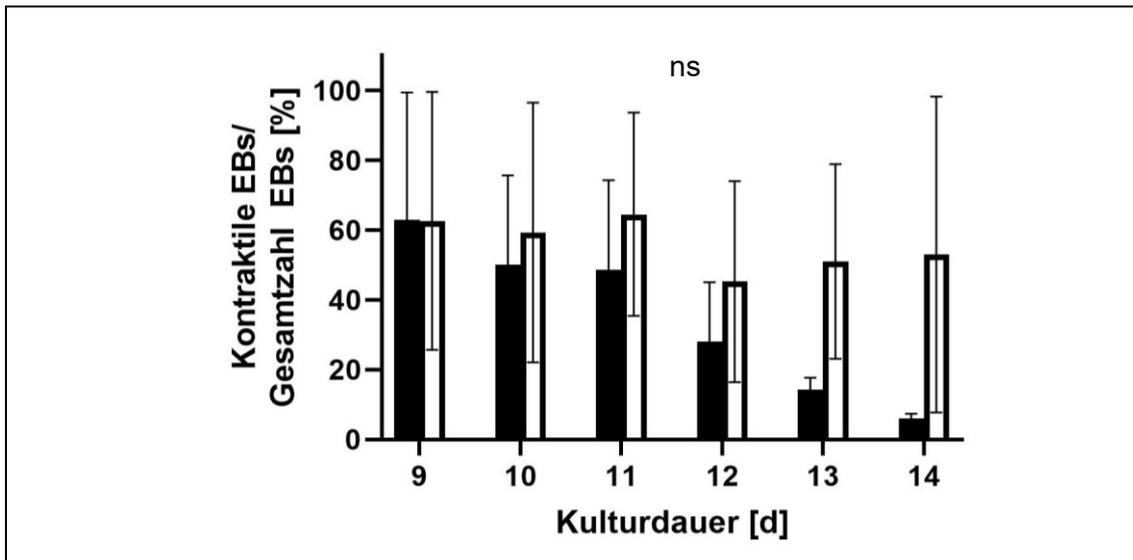
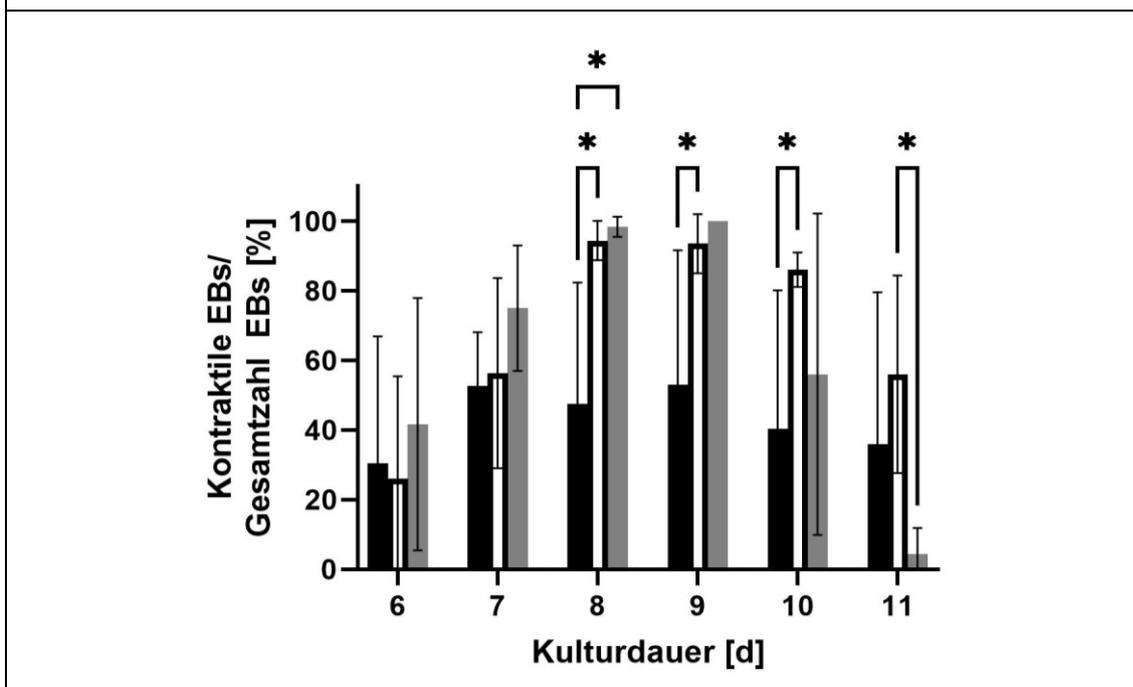


Abb. 4.2.1 A verlinkt zum YouTube-Videoportal und zeigt Filmaufnahmen mittels Lichtmikroskop von EBs in Suspension an D9 in CCE-Medium, welche spontan kontrahieren. Die gezeigte Sequenz ist dabei repräsentativ für die der Messung zugrundeliegenden Proben. Abb. 4.2.1 B zeigt ein Standbild der kontraktiven EBs, die in Abb. 4.2.1 A verlinkt sind.



A: Prozentualer Anteil kontraktile EBs für D10+4 CCE (schwarz; n=3,3,4,4,4,2) und D10+4 L+B (weiß; n=3,3,4,4,4,2) in Abhängigkeit der Kulturdauer. Das Diagramm zeigt den Mittelwert ± Standardabweichung. Dabei gilt: ns = nicht signifikant.



B: Prozentualer Anteil kontraktile EBs für D7+4 CCE (schwarz; n=5,6,6,6,6,5), D7+4 L+B (weiß; 5,6,5,6,5,5) und D7+4 Lac (grau; n=3,3,3,3,3,3) beginnend an D6. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert ± Standardabweichung. Dabei gilt: * \triangleq p<0,05.

Abb. 4.2.2

Abb. 4.2.2 vergleicht die Anteile kontraktile EBs von D10+4 L+B, D7+4 L+B und D7+4 Lac mit den jeweiligen CCE-Kontrollen. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil kontraktile EBs auf der Y-Achse über die Kulturdauer auf der X-Achse. Die Aufzeichnung begann einen Tag vor Verwendung des Laktat-Mediums und endete am

Tag der Dissoziation, 24h nach dem letzten Mediumwechsel. Bei allen Proben zeigten sich erste kontrahierende Areale ab D6 – D7.

Es zeigte sich ein Maximum für den Anteil spontan kontrahierender EBs an D9 und in der Folge eine Abnahme des Anteils kontrahierender EBs im CCE-Medium (vgl. Abb. 4.2.2 A). In den Proben für D10+4 L+B sank ab D11 ebenfalls der Anteil kontrahierender EBs, allerdings nicht so schnell wie unter CCE-Medium. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Kontraktilität zwischen D10+4 CCE-Medium und D10+4 L+B wurde nicht nachgewiesen.

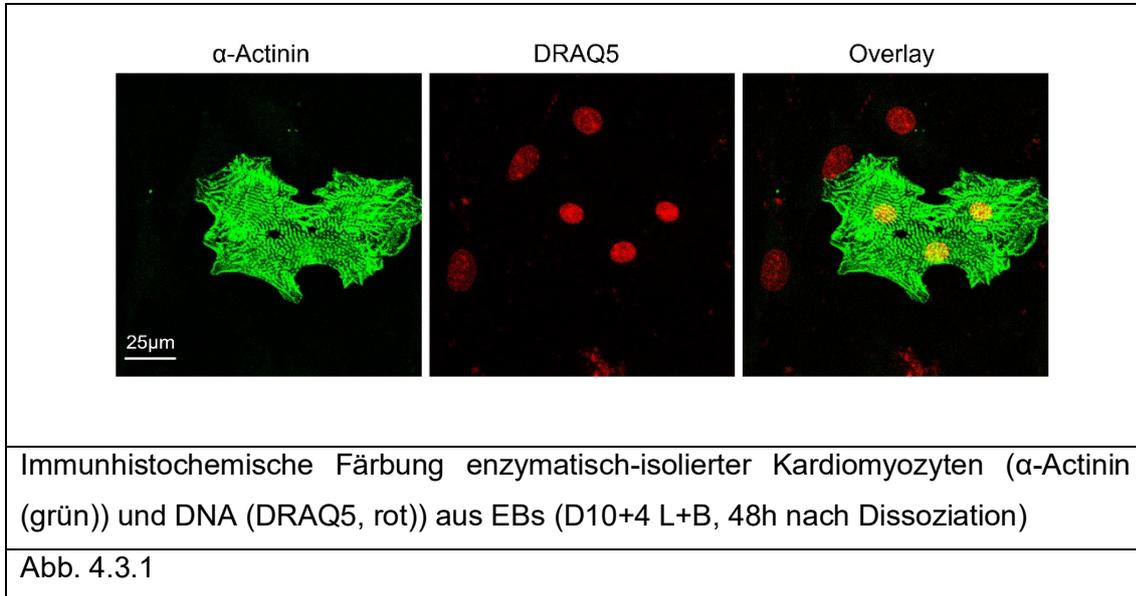
In den Proben mit Start der Laktat-Behandlung ab D7 (vgl. Abb. 4.2.2 B) wurde ersichtlich, dass bereits ab D7 ein Maximum kontrahierender EBs im CCE-Medium erreicht war, welches sich über mehrere Tage hielt. Der Einsatz des Laktat-Mediums hingegen führte zu einer Steigerung des Anteils kontrahierender EBs an D8 und D9 sowie an D10 bei Verwendung von L+B. Für D8 ergaben sich dabei signifikante Unterschiede zwischen den mit Laktat behandelten Proben im Vergleich zu der weiter mit CCE-Medium behandelten Kontrolle. Dabei blieb ein signifikanter Unterschied zwischen CCE-Medium und L+B an D9 und D10 bestehen. An D11 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen L+B und Lac ($p=0,0422$), da es unter Lac zu einer deutlichen Abnahme des Anteils kontraktiler EBs kam (vgl. Abb. 4.2.2 B).

Diese Ergebnisse zeigten, dass das Laktat-Medium den prozentualen Anteil spontan kontrahierender EBs im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Des Weiteren zeigte sich aber auch, dass eine spätere bzw. längere Behandlung mit Laktat-Medium zu keinem weiteren positiven Effekt auf den Anteil kontrahierender EBs führte. Hingegen kam es zur Reduktion des Anteils kontrahierender EBs. Der Vergleich an D11 von L+B zu Lac deutet auf einen Vorteil von BSA bezüglich der Kontraktilität der EBs und somit des Anteils an Kardiomyozyten hin.

4.3 Immunhistochemische Darstellung von Kardiomyozyten

Die Abnahme der EB-Durchmesser wie auch der höhere Anteil schlagender EBs in den Laktat-haltigen Proben ist im Einklang mit der in Kapitel 1.6.3 beschriebenen metabolischen Selektion von Kardiomyozyten. Um weiter zu überprüfen, dass sich der Anteil an Kardiomyozyten in den Laktat-Proben im Vergleich zu den Kontroll-Proben erhöht hat, wurden die EBs nach 4d Laktat-Behandlung dissoziiert und

immunhistochemisch der Anteil an Kardiomyozyten an der Gesamtzellzahl bestimmt. Ziel war, den Effekt der metabolischen Selektion durch das Laktat-Medium zu zeigen. Ein weiteres Ziel war die Maximierung des Prozentsatzes an Kardiomyozyten durch gegebenenfalls veränderte Versuchsbedingungen für die verwendete CCE-Zelllinie.



In Abb. 4.3.1 ist exemplarisch eine immunhistochemische Färbung gegen α -Actinin mit einer DNA-Färbung mittels DRAQ5 von D10+4 L+B, 48h nach Dissoziation gezeigt. Dabei wurden für die Proben in der Immunhistochemie ca. 5×10^4 Zellen/ Well nach Dissoziation ausplattiert.

Da sich ein Maximum kontrahierender EBs um D9 zeigte (vgl. Abb. 4.2.2) und die Kardiomyogenese bis D10 weitestgehend abgeschlossen war, erfolgte vorrangig die Laktat-Behandlung mit BSA für 4d ab D10 und im Anschluss die immunhistochemische Färbung der EBs, um eine solide Datengrundlage für ggf. weitere Anpassungen der Versuchsbedingungen zu erhalten.

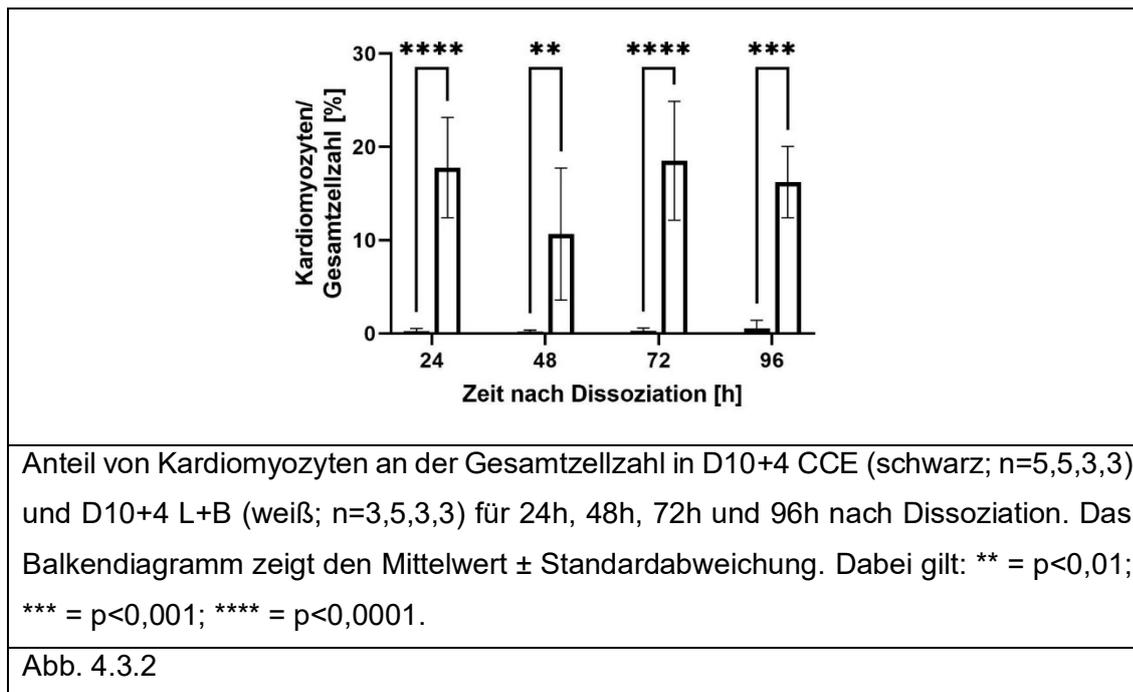


Abb. 4.3.2 zeigt den Anteil an Kardiomyozyten an der Gesamtzellzahl auf der Y-Achse in Abhängigkeit der Zeit nach Dissoziation auf der X-Achse. Verglichen wird der Anteil an Kardiomyozyten zwischen D10+4 CCE und D10+4 L+B.

Wie in Abb. 4.3.2 dargestellt, fand sich ein signifikant höherer Anteil an Kardiomyozyten bei D10+4 L+B im Vergleich zu D10+4 CCE über den gesamten Beobachtungszeitraum. Der Anteil an Kardiomyozyten lag dabei 24h nach Dissoziation in den Proben von D10+4 CCE bei 0,3%. In den Proben aus D10+4 L+B ergab sich ein Prozentsatz 24h nach Dissoziation von 17,8%.

Es konnte somit belegt werden, dass die Laktat-Behandlung der verwendeten CCE-Stammzellen der Maus zu einer Selektion von Kardiomyozyten vor anderen Zellen führt. Allerdings war die erhaltene Ausbeute an Kardiomyozyten deutlich geringer, verglichen mit den in der Literatur beschriebenen Anteilen von Kardiomyozyten von >90% (Tohyama et al., 2013). Nachfolgend wurden die Versuchsbedingungen experimentell so optimiert, mit dem Ziel vergleichbar hohe Ausbeuten, wie in der Literatur beschrieben, zu erhalten.

4.3.1 Optimierung des Anteils von Kardiomyozyten an der Gesamtzellzahl

Im Hinblick auf die Steigerung der Ausbeute an Kardiomyozyten erwies sich der frühere Beginn mit der Laktat-Behandlung als vorteilhaft. Es wurde daher der Fokus auf den Einfluss des Beginns der Laktat-Behandlung auf den Anteil der Kardiomyozyten an der

Gesamtzellzahl gelegt (vgl. Abb. 4.3.3, Abb. 4.3.4). In Zusammenschau all dieser Ergebnisse wurde eine Behandlung der CCE-Zellen für 4d mit Laktat-Medium als Optimum zwischen Funktionalität und Ausbeute ermittelt. Im Folgenden sind die Ergebnisse für die Behandlung der Stammzellen mit CCE-Medium bzw. mit Laktat-Medium für 4d dargestellt:

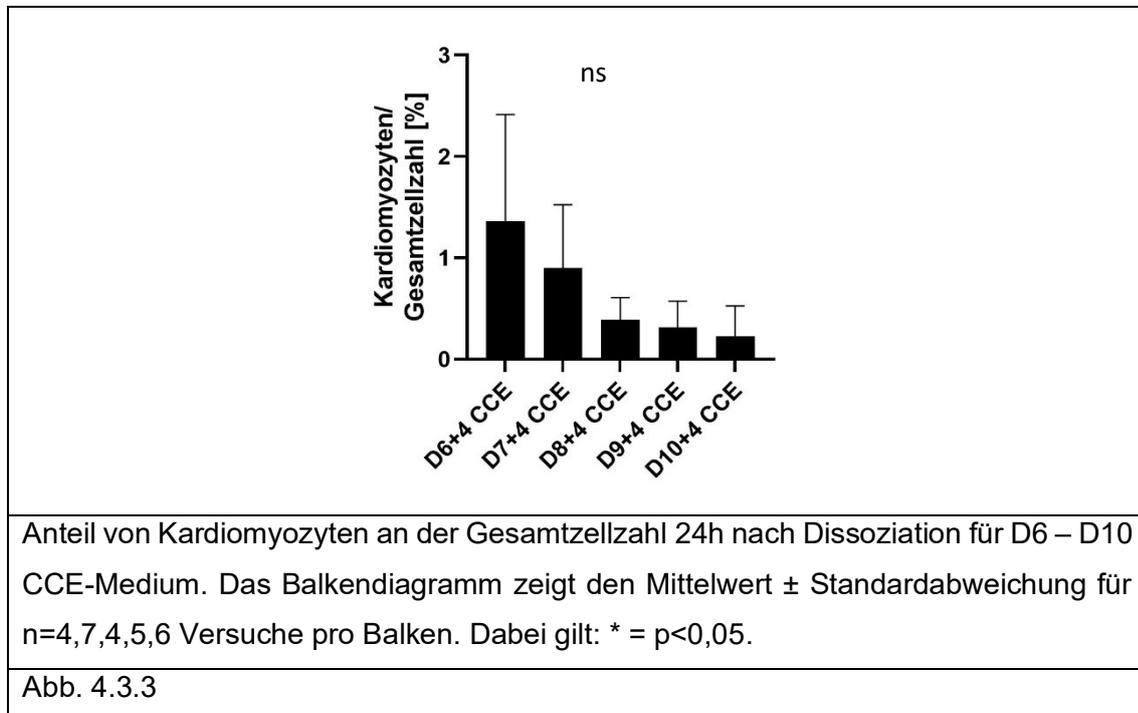
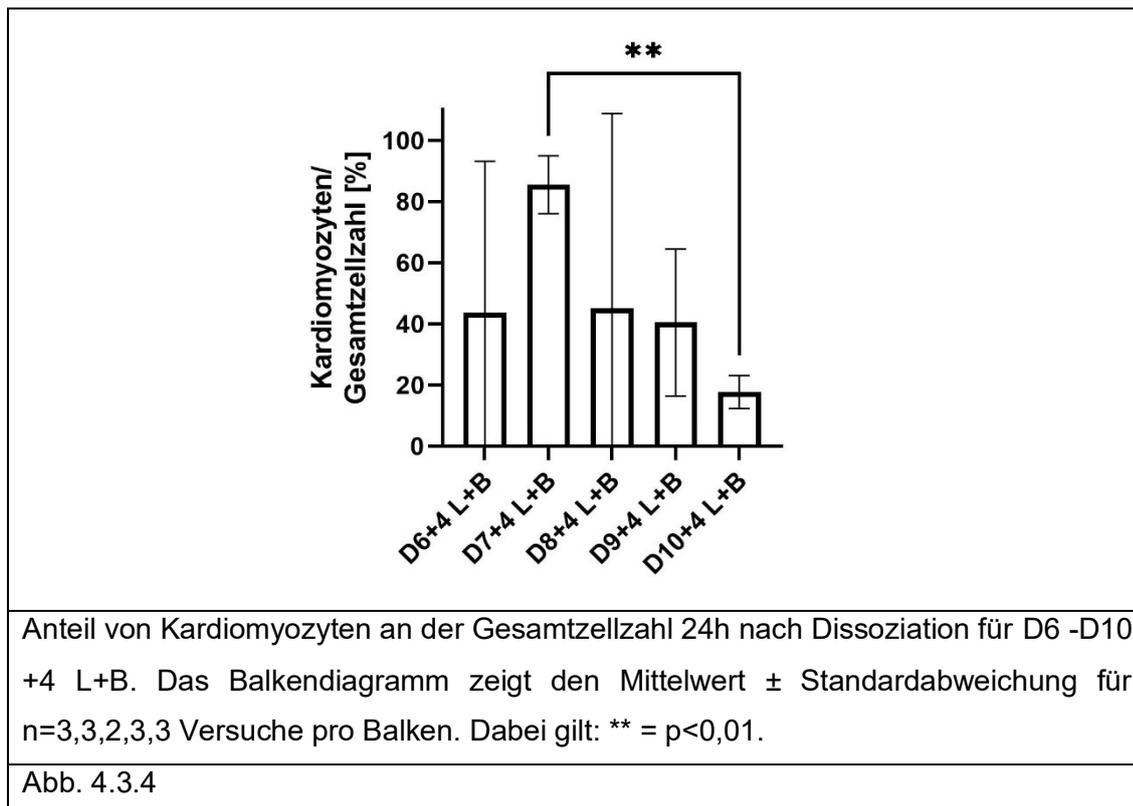


Abb. 4.3.3 zeigt auf der Y-Achse den prozentualen Anteil an Kardiomyozyten 24h nach Dissoziation in Abhängigkeit der unterschiedlichen Versuchsansätze (X-Achse). Die Werte für D10+4 CCE, 24h nach Dissoziation entsprechen denen aus Abb. 4.3.2.

Es zeigte sich, dass je länger die Kultur- und Entwicklungsdauer der EBs in CCE-Medium andauerte, der Anteil an Kardiomyozyten in den Proben abnahm. Dabei ist zu beachten, dass der Anteil an Kardiomyozyten in allen Proben unter 3% lag. Der geringe Anteil an Kardiomyozyten stimmte auch mit den lichtmikroskopischen Beobachtungen nach Dissoziation überein.



In Abb. 4.3.4 ist auf der Y-Achse der Prozentsatz an Kardiomyozyten 24h nach Dissoziation aufgetragen. Auf der X-Achse ist der Beginn der Substitution mit Laktathaltigem Medium beginnend mit D6+4 L+B bis einschließlich D10+4 L+B abgebildet. Die Werte für D10+4 L+B, 24h nach Dissoziation entsprechen denen aus Abb. 4.3.2.

Es zeigte sich, dass bei der verwendeten CCE-Zelllinie die mittlere Ausbeute an Kardiomyozyten durch metabolische Selektion entscheidend vom Zeitpunkt des Behandlungsbeginns beeinflusst wurde. So führte die Behandlung mit Laktat-Medium beginnend an D7 (D7+4 L+B) mit 85,5% zu einer signifikant besseren Ausbeute als ein späterer Beginn wie beispielsweise an D10+4 L+B ($p=0,0087$).

Die Behandlung der EBs ab D7 für 4d mit Laktat-Medium erbrachte stets hohe Ausbeuten. Zur Generierung der Werte in Abb. 4.3.4 wurden verschiedene Passagen zu verschiedenen Startzeitpunkten behandelt. Es war festzustellen, dass manche Passagen nur sehr geringe Ausbeuten an Kardiomyozyten trotz gleichbleibender Versuchsbedingungen lieferten. So waren auch für den Behandlungsbeginn bei D6 mitunter hohe Ausbeuten nachweisbar, was sich in einer hohen Standardabweichung ausdrückte.

Ein früherer Beginn der Laktat-Behandlung, nämlich an D5 für 4d, zeigte vergleichbare Effekte auf die EB-Durchmesser wie in Kapitel 4.1 beschrieben. Dabei konnten vereinzelt unter Laktat-Medium vorübergehend spontane Kontraktionen der EBs im

Lichtmikroskop beobachtet werden. In mehreren Ansätzen konnte jedoch kein Nachweis von Zellen nach der Dissoziation und somit auch kein Nachweis von Kardiomyozyten erbracht werden. Dies ist als Indiz zu werten, dass ein Beginn der Laktat-Behandlung an D5, vor dem Auftreten spontaner Kontraktionen der EBs, zu früh für eine metabolische Selektion von Kardiomyozyten war.

4.3.2 Einfluss von BSA auf die metabolische Selektion der Kardiomyozyten

Um den Einfluss des BSA auf die Ausbeute an Kardiomyozyten zu untersuchen, erfolgte der Vergleich des verwendeten Laktat-Mediums mit und ohne BSA.

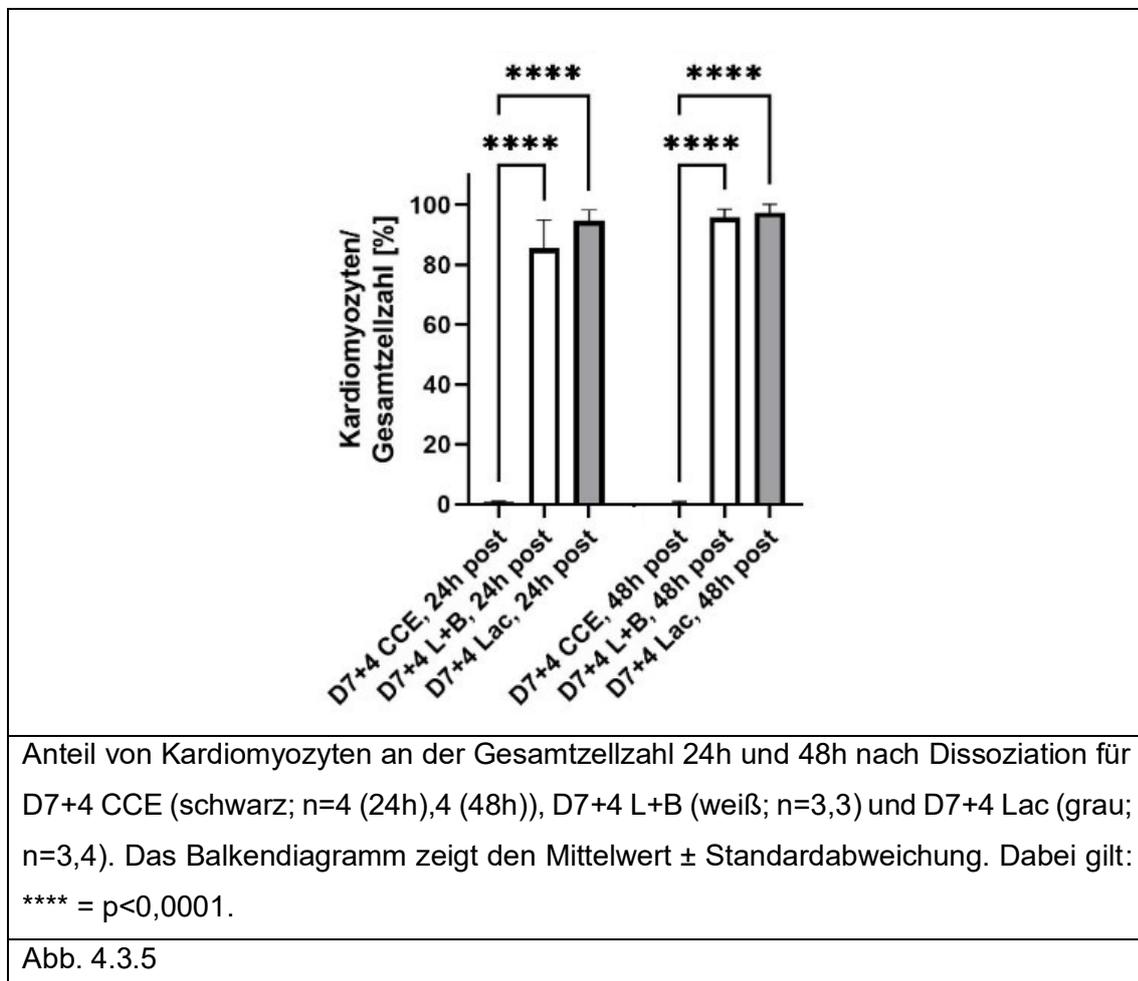
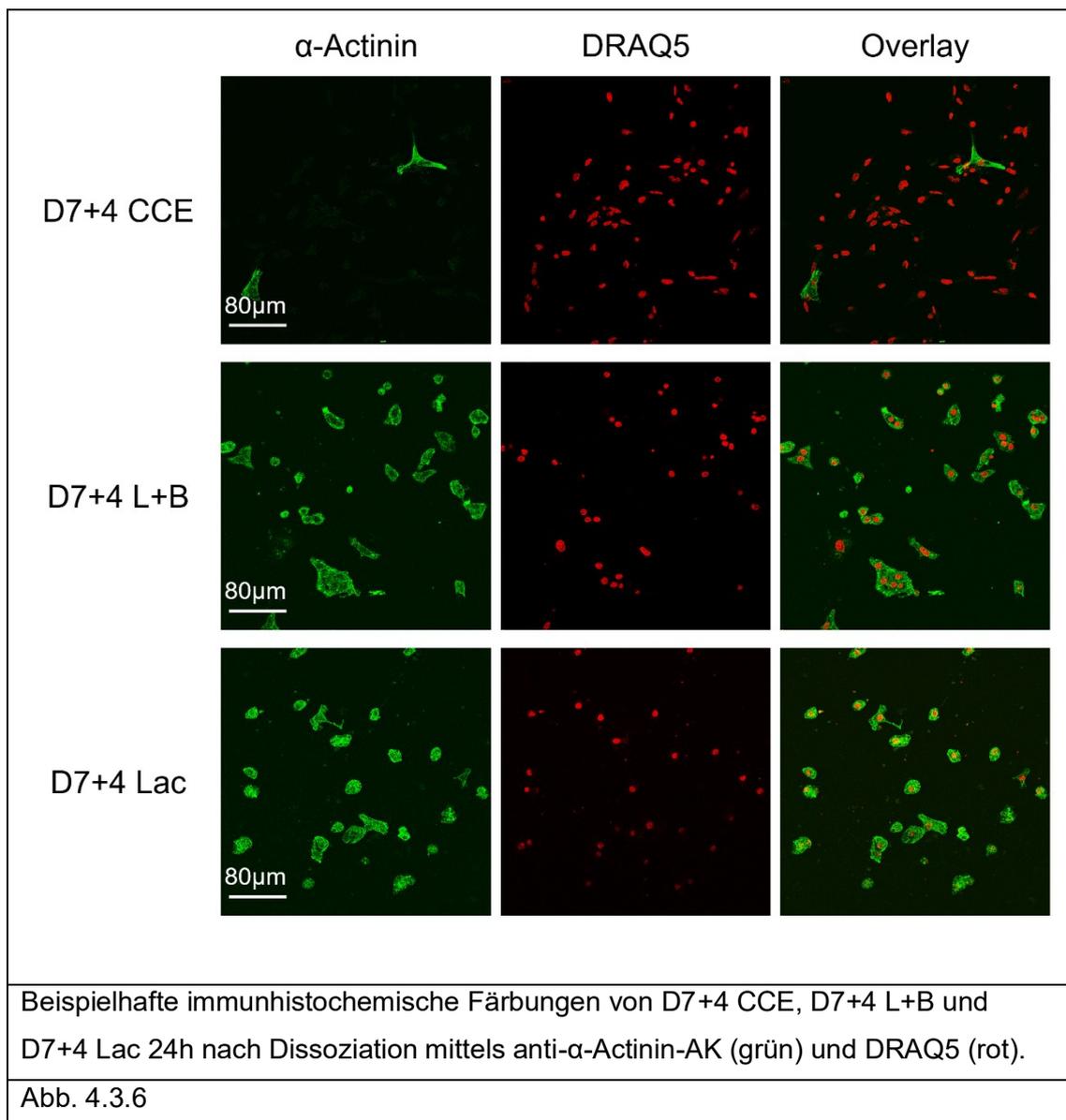


Abb. 4.3.5 zeigt den prozentualen Anteil an Kardiomyozyten auf der Y-Achse. Die X-Achse ist unterteilt in 24h und 48h nach Dissoziation. Die Werte für D7+4 CCE, 24h nach Dissoziation und D7+4 L+B, 24h nach Dissoziation entsprechen denen in den Abb. 4.3.3 und Abb. 4.3.4.

Die Behandlung mittels Laktat-Medium mit und ohne BSA zeigte signifikante Unterschiede in Bezug auf den Anteil an Kardiomyozyten gegenüber dem CCE-Kontrollmedium. 24h nach Dissoziation zeigten sich signifikante Unterschiede der mit Laktat-Medium behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle. Ein Unterschied zwischen L+B und Lac wurde nicht nachgewiesen ($p=0,1180$). 48h nach Dissoziation konnten für D7+4 L+B 95,8% und für D7+4 Lac 97,3% Kardiomyozyten in den Proben generiert werden. Für D7+4 CCE, 48h post hingegen belief sich der Anteil an Kardiomyozyten auf 0,4%.



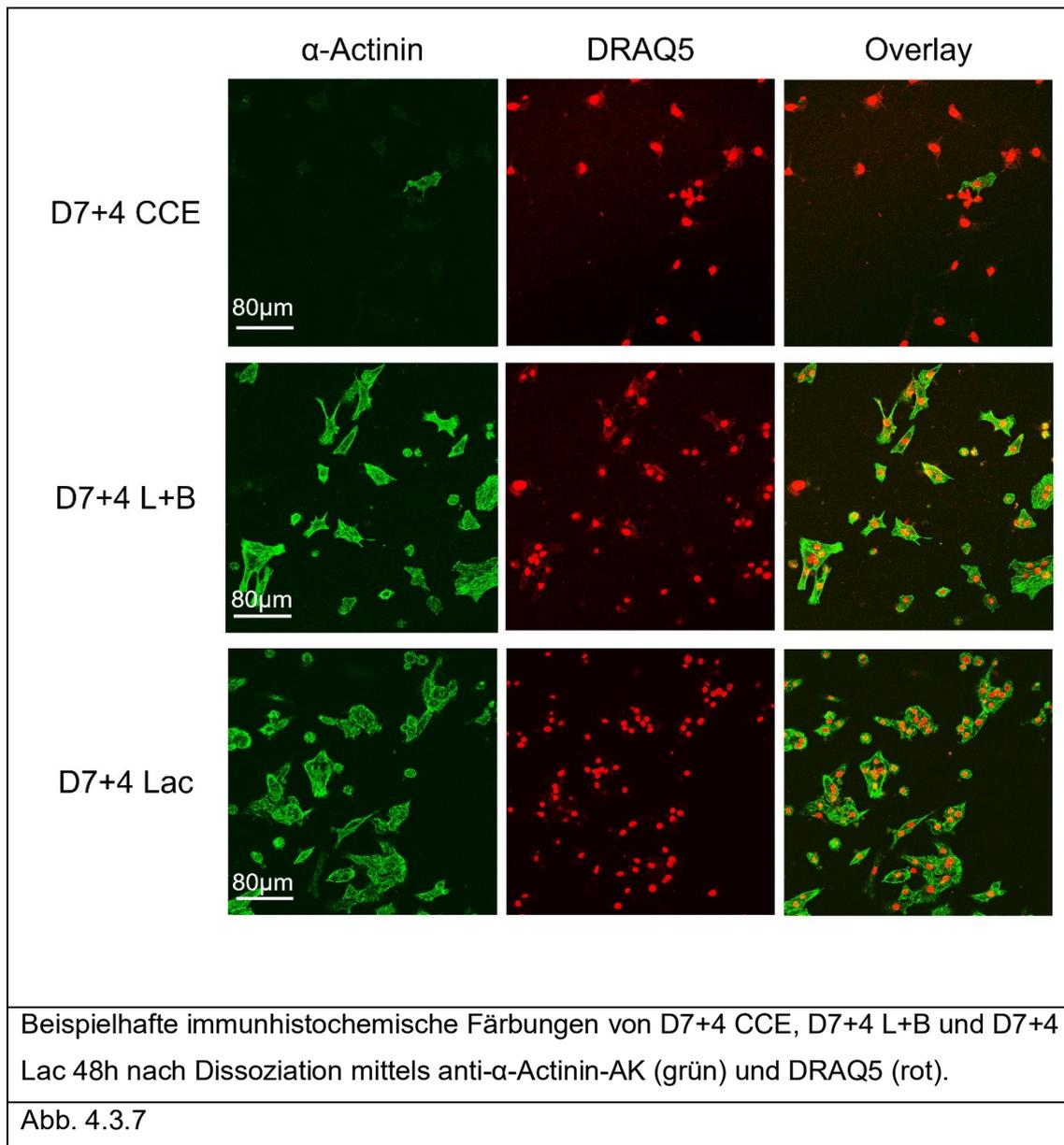


Abb. 4.3.6 und Abb. 4.3.7 zeigen exemplarisch die Darstellung von Kardiomyozyten nach immunhistochemischer Färbung für 24h (Abb. 4.3.6) und 48h (Abb. 4.3.7) nach Dissoziation. In den Proben für D7+4 CCE zeigte sich eine geringe Ausbeute an Kardiomyozyten für 24h bzw. 48h nach Dissoziation im Vergleich zu den mit Laktat-Medium behandelten Proben D7+4 L+B und D7+4 Lac (vgl. Abb. 4.3.5).

Da sich α -Actinin zu beiden Seiten des Sarkomers in den Z-Scheiben befindet, war eine Bestimmung der Sarkomerlänge in den immunhistochemischen Proben hierüber möglich. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Sarkomerlänge für 24h bzw. 48h nach Dissoziation zwischen D7+4 CCE, D7+4 L+B und D7+4 Lac. Diese betragen für D7+4 CCE $2,0\mu\text{m} \pm 0,0\mu\text{m}$ für 24h (n=5 Passagen) und $2,0\mu\text{m} \pm 0,1\mu\text{m}$ für 48h (n=3 Passagen) nach Dissoziation. Für D7+4 L+B lagen die Werte 24h bei $2,0\mu\text{m} \pm$

0,1µm (n=3 Passagen) sowie 48h nach Dissoziation bei $1,9\mu\text{m} \pm 0,1\mu\text{m}$ (n=3 Passagen) und für D7+4 Lac 24h bei $2,0\mu\text{m} \pm 0,1\mu\text{m}$ (n=3 Passagen) sowie 48h nach Dissoziation bei $2,0\mu\text{m} \pm 0,1\mu\text{m}$ (n=3 Passagen).

Darüber hinaus fanden sich in den Laktat-Proben 24h nach Dissoziation viele kleine, sphärische Zellen, welche im Lichtmikroskop kontrahierten und durch anti- α -Actinin-AK markiert wurden. 48h nach Dissoziation hatte die Anzahl dieser kleinen, sphärischen Kardiomyozyten abgenommen, hingegen hatte die Zellgröße zumeist zugenommen. Zudem wurde ein höherer Grad an Vernetzung der Kardiomyozyten nach 48h in den Laktat-Proben sowohl mit als auch ohne BSA festgestellt.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass sich mit Beginn der Laktat-Behandlung an D7 für 4d zuverlässig hohe Ausbeuten an Kardiomyozyten generieren ließen. Ferner waren keine signifikanten Einflüsse von BSA auf die metabolische Selektion 48h nach Dissoziation feststellbar. Die folgenden Experimente wurden daher mit Kardiomyozyten durchgeführt, welche vorab mittels Laktat-Medium ohne BSA metabolisch selektiert wurden.

4.3.3 Vorliegen von Gap Junctions nach metabolischer Selektion

Neben der Ausbildung des Kontraktionsapparates ist die Entwicklung von Gap Junctions für die Funktion und mögliche Integration von experimentell-gewonnenen Kardiomyozyten entscheidend. Hierfür wurde Connexin 43 als Bestandteil von Gap Junctions immunhistochemisch dargestellt (vgl. Abb. 4.3.8). Die Entwicklung von Gap Junctions zwischen Kardiomyozyten erfolgte spontan.

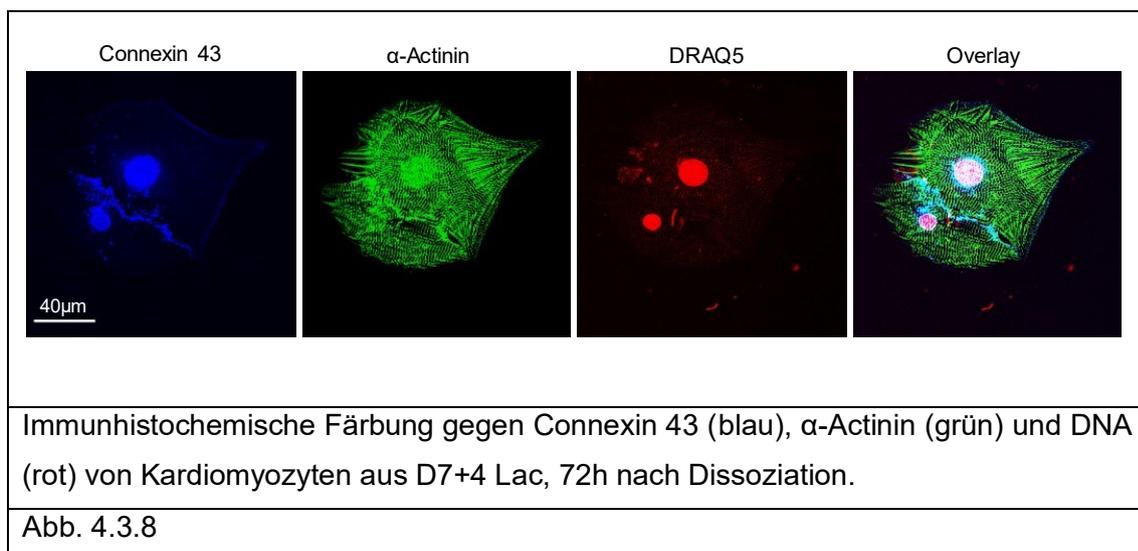


Abb. 4.3.8 zeigt, dass es zwischen Kardiomyozyten von D7+4 Lac, 72h nach Dissoziation zur spontanen Ausbildung von Zellkontakten, welche Connexin 43 beinhalten, gekommen ist. Auffällig ist dabei der Nachweis von Connexin 43 im Zellkern.

4.4 Effekt des Ca^{2+} -Chelators BAPTA auf die Zelldifferenzierung

Nach enzymatischer Dissoziation der EBs und immunhistochemischer Analyse der α -Actinin-gefärbten Kardiomyozyten ließen sich morphologische Unterschiede zwischen den Zellen beobachten. Es traten kleine, sphärische kardiiale Progenitorzellen mit nur rudimentär angelegtem Kontraktionsapparat, Übergangsstadien und große, terminal differenzierte Kardiomyozyten mit regelmäßiger Sarkomer-Struktur auf (vgl. Abb. 4.4.1).

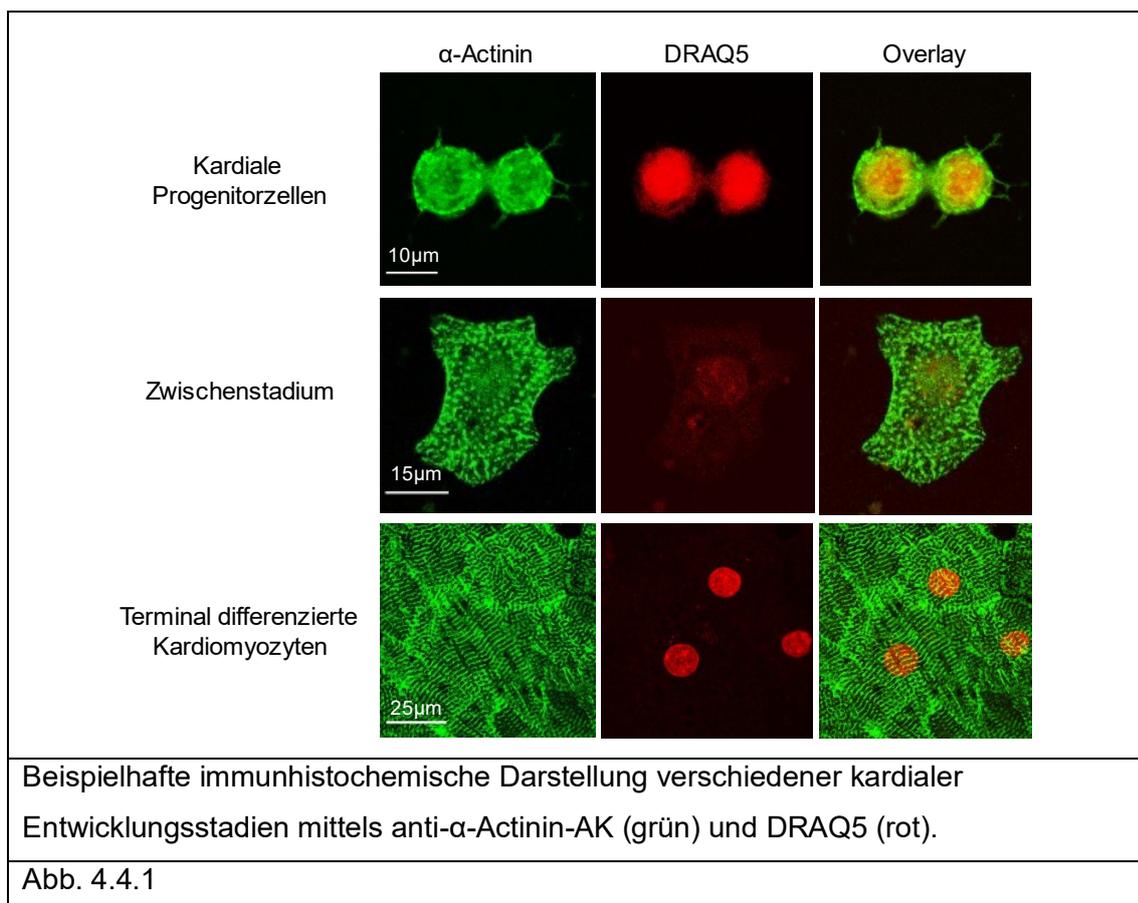


Abb. 4.4.1 zeigt exemplarisch Kardiomyozyten in verschiedenen Entwicklungsstadien nach immunhistochemischer Färbung. Im Zuge der Entwicklung von kardialen Progenitorzellen über Zwischenstadien zu terminal differenzierten Kardiomyozyten ist eine Zunahme der Zellgröße wie auch eine zunehmende Organisation und Ausdehnung

der Sarkomer-Strukturen erkennbar. Die zeitgleich beobachteten, verschiedenen Entwicklungsstadien der Kardiomyozyten deuteten darauf hin, dass sich innerhalb der EBs zum Zeitpunkt der Dissoziation Kardiomyozyten unterschiedlicher Differenzierungsstadien befanden. Innerhalb von 48h nach Dissoziation kam es zu einer generellen hypertrophen Zunahme der Zellfläche und der Ausbildung einer geordneten Sarkomer-Struktur. Dies deutete auf eine Reifung der Kardiomyozyten hin. Weiterhin fanden sich 48h nach Dissoziation nahe beieinanderliegende Gruppen von Kardiomyozyten. Dies könnte auf eine mögliche, proliferative Aktivität der noch unreifen kardialen Progenitorzellen hinweisen.

Die Anwesenheit von sphäroidalen kardialen Progenitorzellen in den mit Laktat behandelten Proben weist ferner darauf hin, dass schon in den Progenitorzellen an D7 der Differenzierung Laktat-metabolisierende Stoffwechselwege vorhanden waren, die den Zellen das Überleben im Laktat-Medium ermöglichten.

Im Folgenden wurde der Effekt eines veränderten, intrazellulären Calcium-Milieus auf das Vorkommen kleiner, sphärischer Kardiomyozyten nach Dissoziation untersucht. Hierfür wurde der Calcium-Chelator BAPTA (5 μ M) verwendet. Es wurde der Anteil sphäroidaler Kardiomyozyten im Verhältnis zur Gesamtzahl der Kardiomyozyten bestimmt.

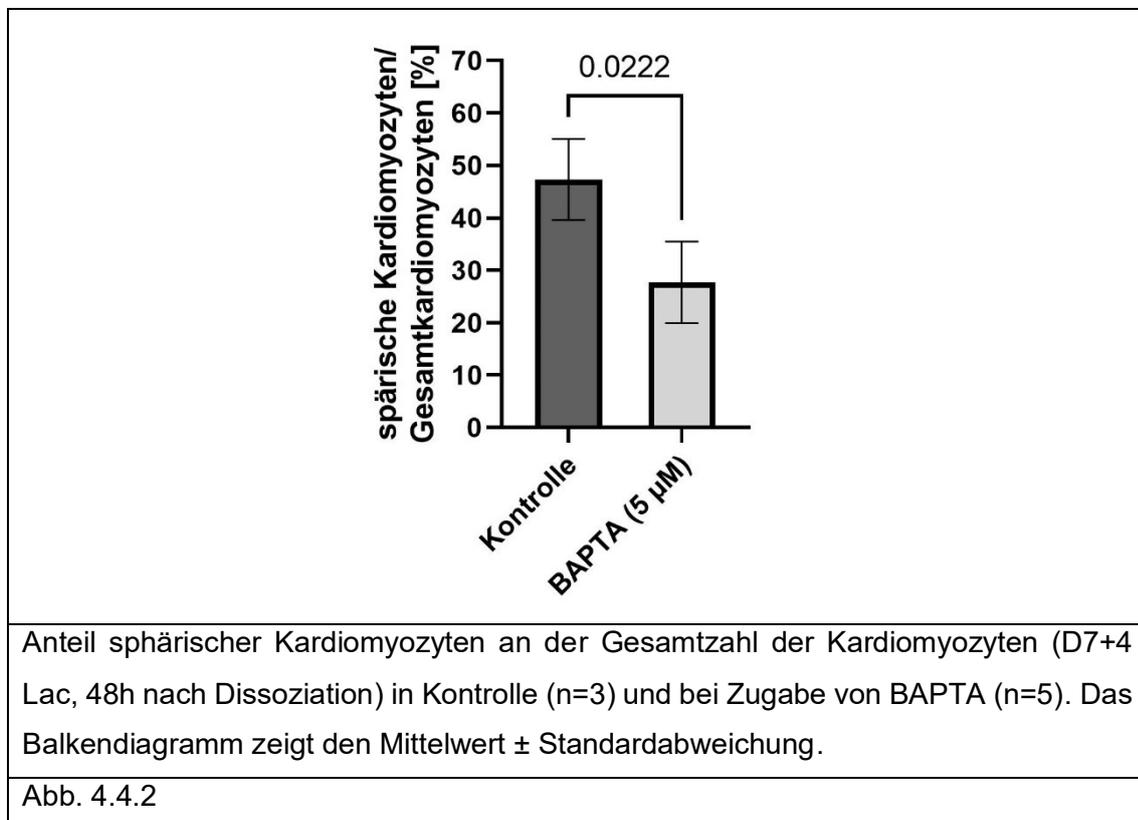


Abb. 4.4.2 zeigt den Anteil sphärischer Kardiomyozyten an der Gesamtzahl der Kardiomyozyten von unbehandelten Proben im Vergleich zur Supplementierung mit BAPTA ($5\mu\text{M}$) an D7+4 Lac, 48h nach Dissoziation.

Die Behandlung der dissoziierten Zellen nach Laktat-Selektion erfolgte 24h nach Dissoziation (D12) für 24h mit BAPTA ($5\mu\text{M}$). Nach Zugabe von BAPTA ($5\mu\text{M}$) zum CCE-Medium zeigten die Zellen für ca. 24-48h keine spontanen Kontraktionen. Gleichzeitig war ein deutlicher Hinweis auf einen Unterschied bezüglich des Anteils sphäroidaler, kardialer Progenitorzellen zu beobachten, welcher unter BAPTA ($5\mu\text{M}$) erniedrigt war (vgl. Abb. 4.4.2, Abb. 4.4.3). Entsprechend war der Anteil größerer, weiter differenzierter Kardiomyozyten erhöht. Einen Effekt auf die Organisationsstruktur der Sarkomere durch Supplementierung mit BAPTA ($5\mu\text{M}$) konnte nicht beobachtet werden.

Im Folgenden sind exemplarische Übersichtsaufnahmen immunhistochemischer Färbungen ohne (Kontrolle) und mit Supplementierung von BAPTA ($5\mu\text{M}$) nach 24h gezeigt.

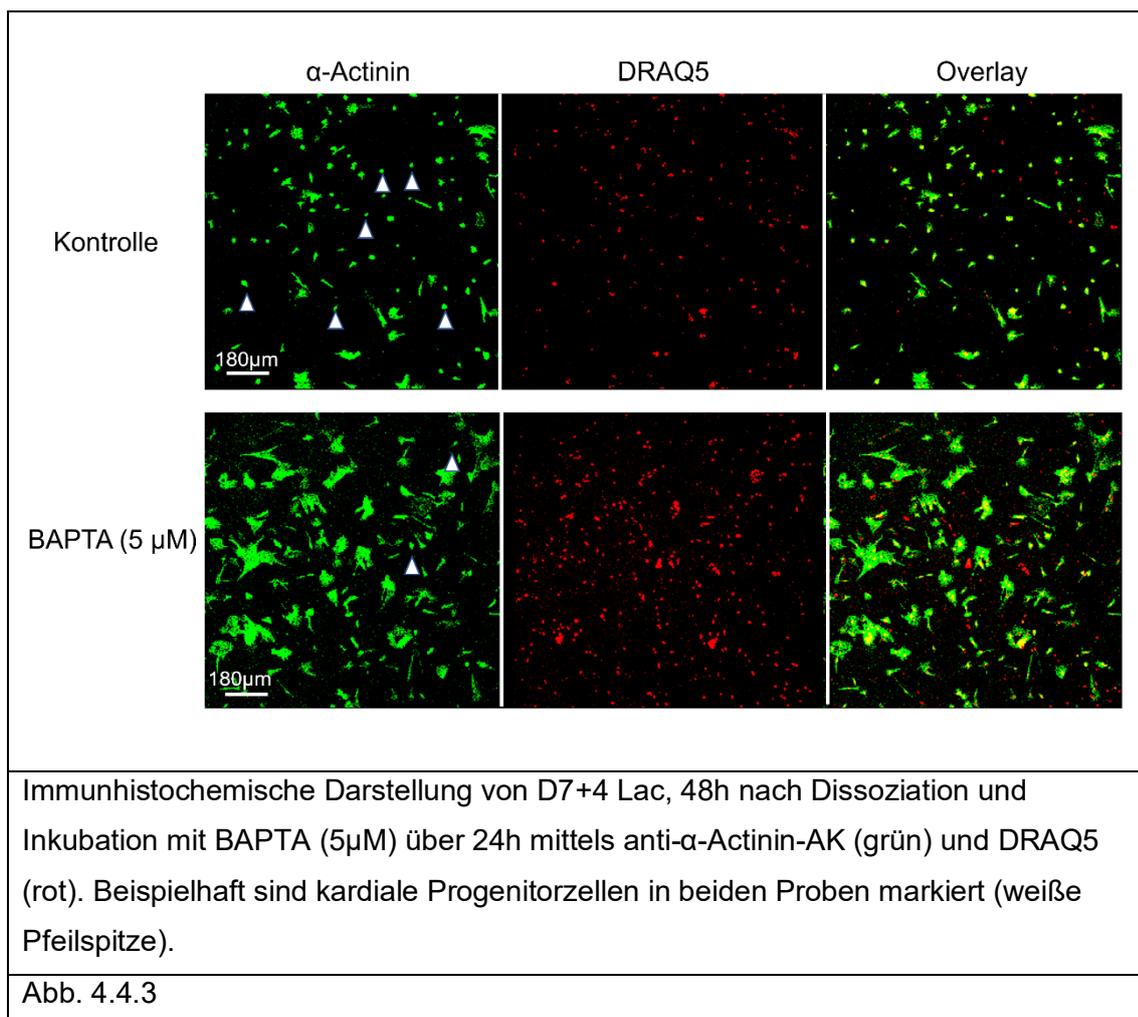
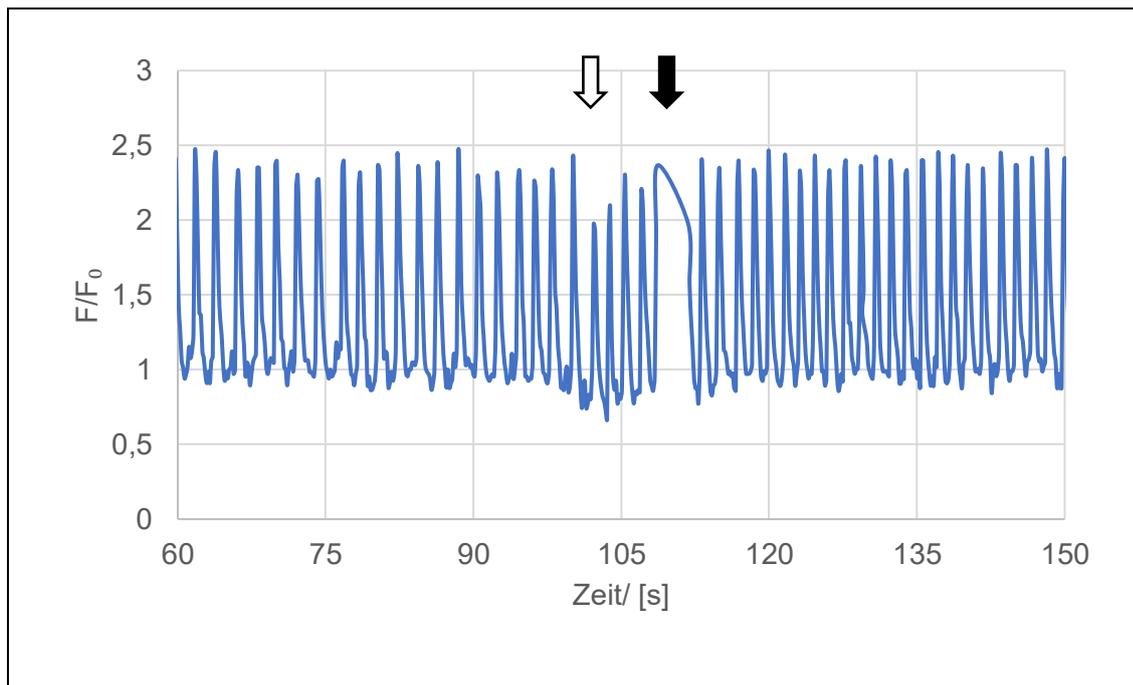


Abb. 4.4.3 zeigt beispielhaft Kardiomyozyten nach immunhistochemischer Färbung 48h nach Dissoziation und Behandlung mit dem Calcium-Chelator BAPTA (5 μ M). Bei den mit Pfeilspitzen markierten Zellen handelt es sich um kleine, sphärische, kardiale Progenitorzellen. Zu erkennen sind eine deutlich höhere Anzahl an kleinen, sphärischen Kardiomyozyten in der Kontrollprobe im Vergleich zu der mit BAPTA (5 μ M) behandelten Probe.

4.5 Calcium-Oszillationsmessungen

An den mittels Laktat-Medium metabolisch selektierten Kardiomyozyten wurden Calcium-Oszillationsmessungen vorgenommen. Die Messungen wurden 24h nach Dissoziation der EBs an D12 (D7+4 Lac, 24h post) und an D14 (D9+4 Lac, 24h post) durchgeführt. Wie in Kapitel 1.7 beschrieben, variiert die Ca²⁺-Konzentration innerhalb der Herzmuskelzelle in Abhängigkeit des Kontraktionszyklus. Ferner kann die Ca²⁺-Konzentration auch von anderen Stoffen, die auf den Kardiomyozyten wirken, beeinflusst werden. Hierzu zählen beispielsweise Adrenalin und Strukturanaloga. Von Resveratrol ist bekannt, dass es vielfältige Wirkungen auf Kardiomyozyten und den Organismus besitzt (vgl. Kapitel 1.8). Es sollte ermittelt werden, inwieweit Resveratrol zu akuten Veränderungen der Calcium-Oszillationen der metabolisch selektierten Kardiomyozyten führt. Um beobachtete Effekte aufgrund von Lösungsmitteln oder mechanischer Stimulation abzugrenzen, erfolgte der Vergleich von Resveratrol zu DMSO (Lösungsmittel für Resveratrol, Vehikelkontrolle) wie auch zu CCE-Medium (mechanische Stimulation, Kontrolle). Um weitere Effekte durch mechanische Stimulation der Zellen bei Zugabe der Lösungen zu vermeiden, erfolgte die Betrachtung zeitversetzt zur Zugabe nach etwa 10s.



Repräsentative Calcium-Oszillationen in isolierten Kardiomyozyten an D14 vor und nach Zugabe von Resveratrol (50 μ M). Die Zugabe von Resveratrol ist durch den weißen Pfeil markiert. Der Versatz nach Zugabe von Resveratrol ist durch die messtechnische Dokumentation apparativ begründet (schwarzer Pfeil). Die Veränderung der Fluo-4-Fluoreszenz ist als Verhältnis des Fluoreszenzanstiegs (F) zur Basisfluoreszenz (F_0) aufgetragen.

Abb. 4.5.1

Abb. 4.5.1 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt aus einer Calcium-Oszillationsmessung vor und nach Zugabe von Resveratrol. Auf der Y-Achse ist die Amplitude des Calcium-Transienten als F/F_0 über die Zeit (X-Achse) aufgetragen. Der Messausschnitt beträgt 90s. Die Zugabe von Resveratrol ist durch den weißen Pfeil markiert. Aufgrund der mechanischen Zugabe der Messsubstanz kommt es zu einer vorübergehenden Abwärtsverschiebung des Calcium-Transienten von ca. 4s Dauer. Der Versatz zwischen Sekunde 108-112 ist durch die messtechnische Dokumentation apparativ begründet (schwarzer Pfeil).

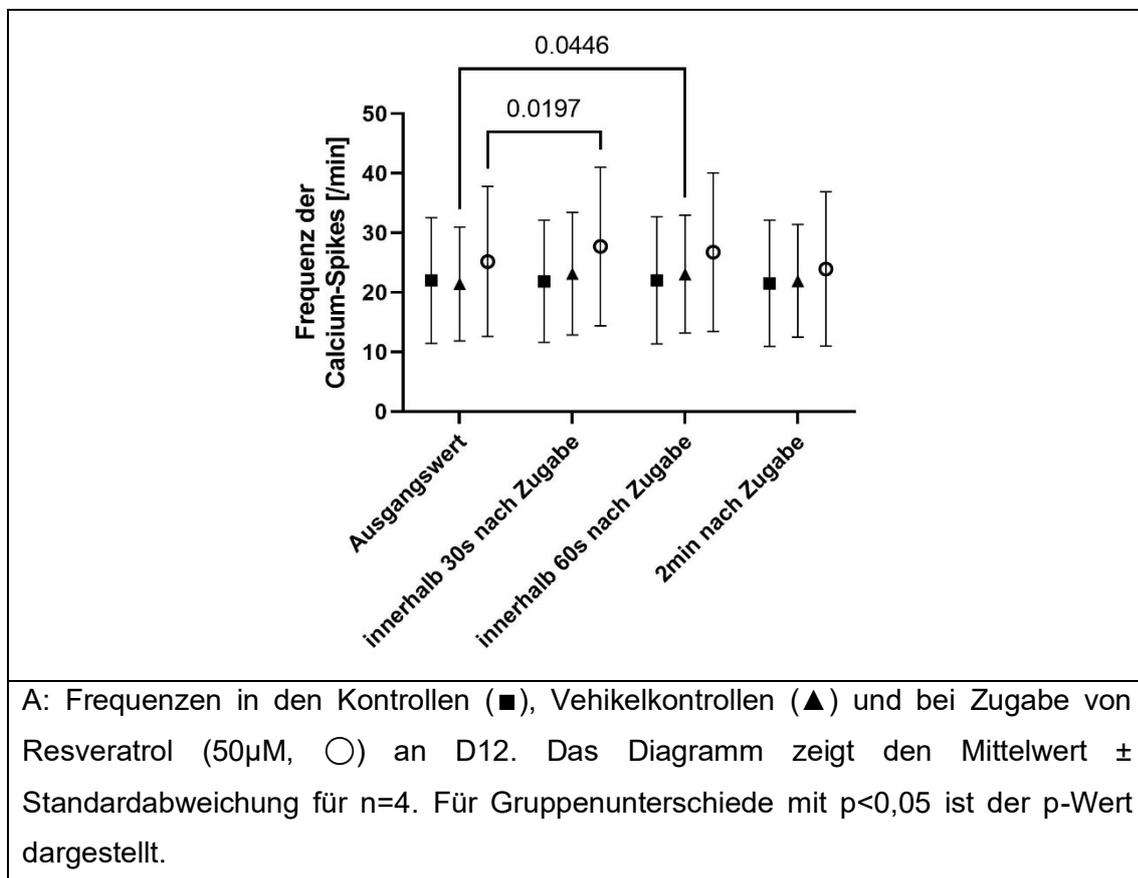
Zu erkennen ist die Frequenzsteigerung nach Zugabe von Resveratrol. Die Frequenz der Calcium-Transienten betrug vor Zugabe von Resveratrol 28 Spikes/min und steigerte sich nach Zugabe auf 38 Spikes/min. Eine Veränderung der Amplitude der Calcium-Transienten wurde nicht beobachtet.

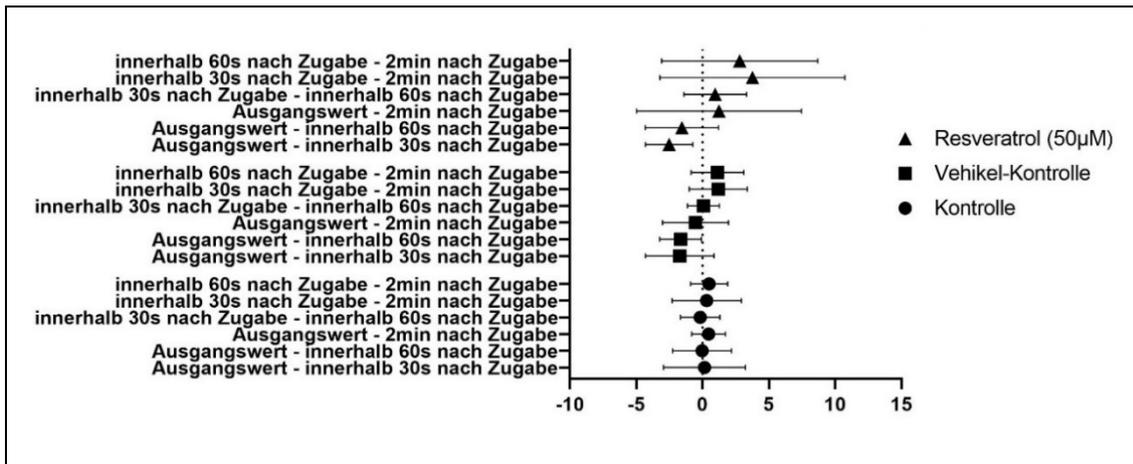
Im Folgenden werden die Effekte von Resveratrol auf die Parameter der metabolisch selektierten Kardiomyozyten quantifiziert und graphisch dargestellt. Dabei werden zuerst

die Auswirkungen auf die Frequenz gezeigt, anschließend werden weitere Wellen-Parameter wie Amplitude und Dauer des Calcium-Transienten sowie die TTP verglichen.

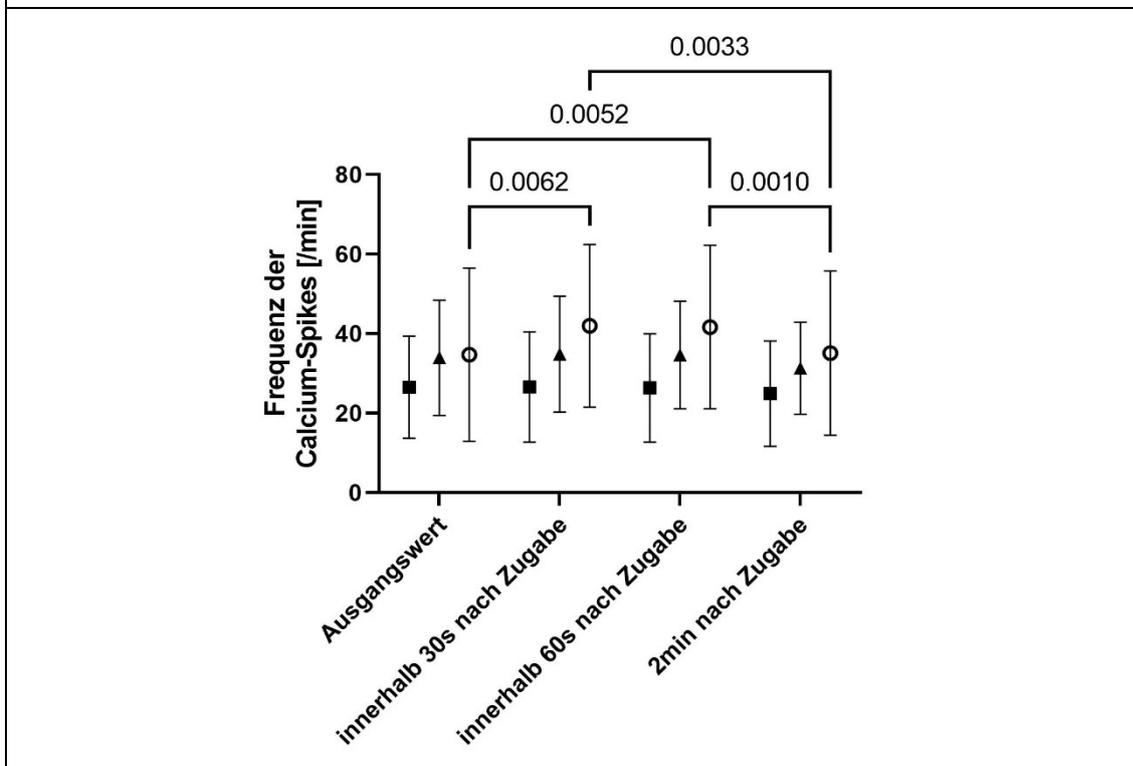
4.5.1 Effekt von Resveratrol auf die Frequenz der Calcium-Oszillationen

Zur Analyse des Effekts von Resveratrol (50 μ M) wurden mehrere Messungen mit jeweils vier verschiedenen Passagen untersucht. Dabei wurden an D12 für Resveratrol, Vehikelkontrolle und Kontrolle je 5-10 Messungen mit insgesamt 38-76 ROIs ausgewertet. An D14 wurden für Resveratrol, Vehikelkontrolle und Kontrolle je 7-11 Messungen mit insgesamt 37-72 ROIs betrachtet (vgl. Kapitel 3.9). Die Darstellung der gemittelten Werte für die Frequenzen zu den verschiedenen Messzeiträumen an D12 und D14 lieferte folgende Ergebnisse:

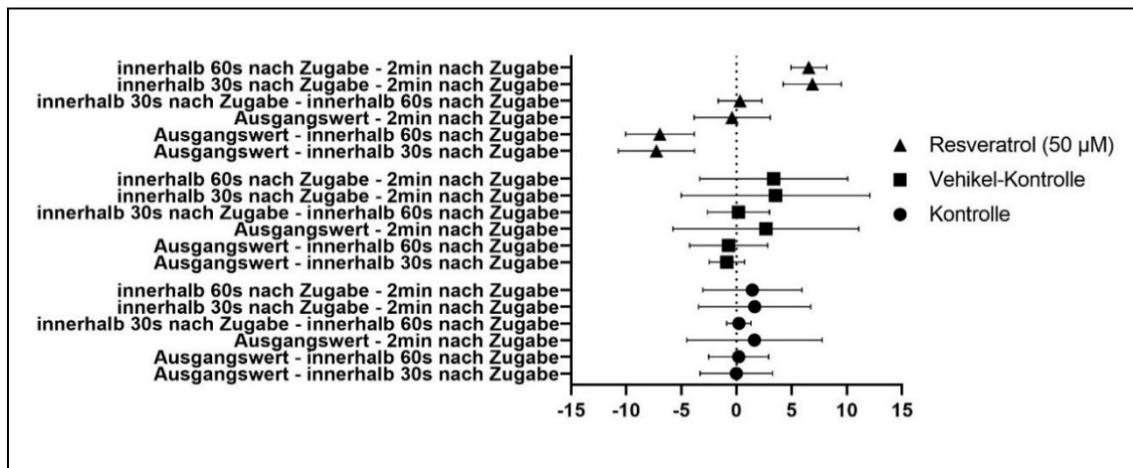




B: 95%-Konfidenzintervall der Differenz der Mittelwerte von Resveratrol, Vehikelkontrolle und Kontrolle an D12, gezeigt in Abb. 4.5.2 A.



C: Frequenzen in den Kontrollen (■), Vehikelkontrollen (▲) und bei Zugabe von Resveratrol (50µM, ○) an D14. Das Diagramm zeigt den Mittelwert ± Standardabweichung für n=4. Für Gruppenunterschiede mit $p < 0,05$ ist der p-Wert dargestellt.



D: 95%-Konfidenzintervall der Differenz der Mittelwerte von Resveratrol, Vehikelkontrolle und Kontrolle an D14, gezeigt in Abb. 4.5.2 B.

Abb. 4.5.2

Abb. 4.5.2 A und C zeigen die Oszillationsfrequenz der Calcium-Spikes auf der Y-Achse. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Messzeiträume abgetragen. Gezeigt sind die Frequenzen mit Standardabweichung vor und nach Zugabe von CCE (Kontrolle, ■), DMSO (Vehikelkontrolle, ▲) und Resveratrol (50µM, ○). Abb. 4.5.2 B und D zeigen die zugehörigen 95%-Konfidenzintervalle der Differenz der Mittelwerte der Messungen an D12 und D14. Verglichen wurde dabei auf Unterschiede in Abhängigkeit der Zeit, da sich aufgrund der hohen Standardabweichungen keine Hinweise auf Unterschiede hinsichtlich der Stoffzugabe nachweisen ließen.

Die Messungen der Oszillationsfrequenz an D12 ergaben Hinweise auf Unterschiede in zeitlicher Abhängigkeit nach Zugabe von Resveratrol (Ausgangswert – innerhalb 30s nach Zugabe, $p=0,0197$) und in der Vehikelkontrolle (Ausgangswert – innerhalb 60s nach Zugabe, $p=0,0446$; vgl. Abb. 4.5.2 A, B).

Für D14 hingegen zeigten sich Unterschiede ausschließlich nach Zugabe von Resveratrol in zeitlicher Abhängigkeit von „innerhalb 30s nach Zugabe und „innerhalb 60s nach Zugabe“ gegenüber dem Ausgangswert (Ausgangswert – innerhalb 30s nach Zugabe, $p=0,0062$; Ausgangswert – innerhalb 60s nach Zugabe, $p=0,0052$) und „2min nach Zugabe“ (2min nach Zugabe – innerhalb 30s nach Zugabe, $p=0,0033$; 2min nach Zugabe – innerhalb 60s nach Zugabe, $p=0,0010$; vgl. Abb. 4.5.2 C, D).

Unterschiede zwischen den verschiedenen Substratlösungen waren bei Betrachtung der Mittelwerte der absoluten Frequenzen an D12 bzw. D14 nicht feststellbar. Dies war in der hohen Variabilität der Eigenfrequenzen der Kardiomyozyten begründet. Dies

verdeutlichte sich bei Darstellung der Mittelwerte der einzelnen Messungen (n= 11, vgl. Abb. 4.5.3).

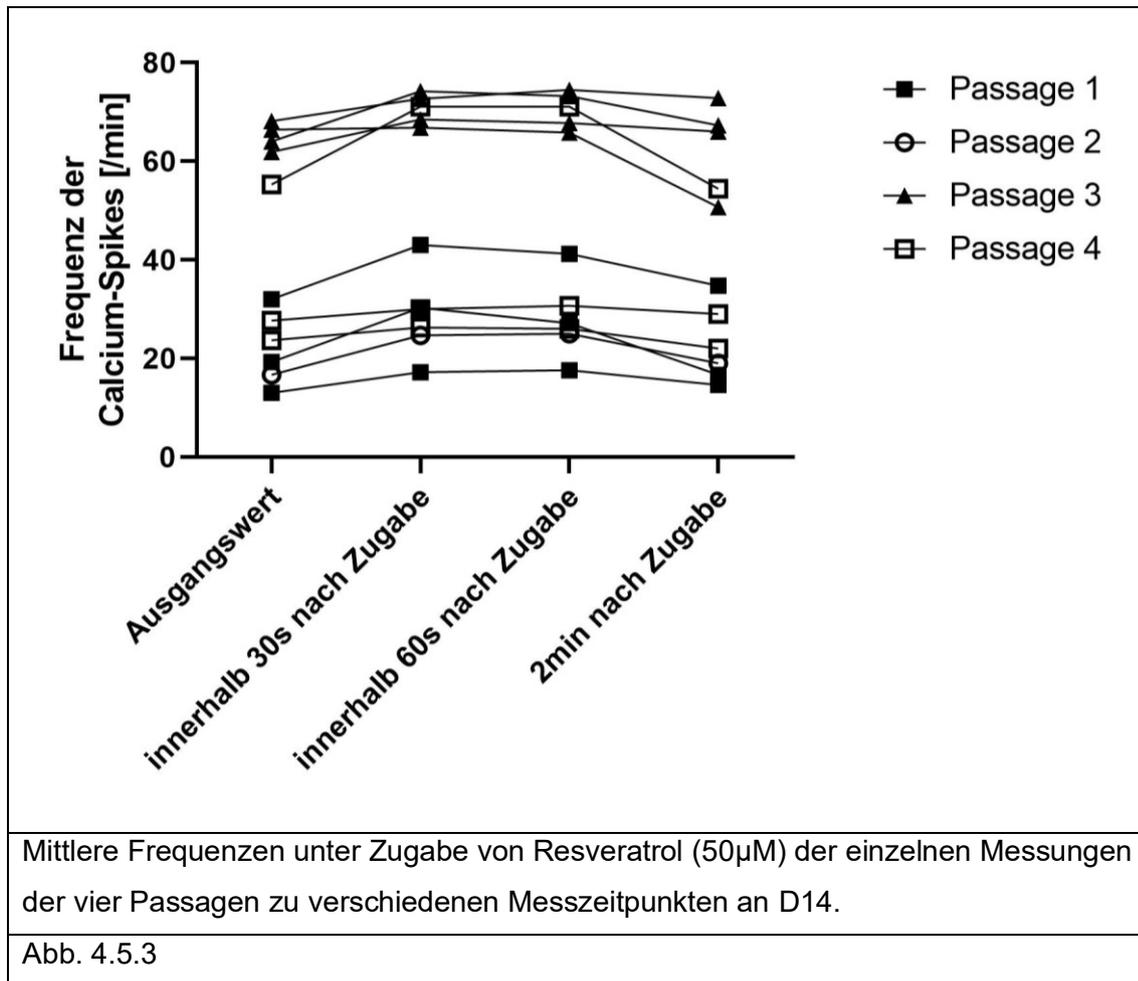


Abb. 4.5.3 zeigt die Frequenz auf der Y-Achse in Abhängigkeit der Messzeiträume auf der X-Achse. Dargestellt sind die mittleren Frequenzen der Messungen in vier Passagen. Es war zu sehen, dass schon innerhalb der gleichen Passage die Frequenzen der Ausgangswerte eine größere Streuung bereits aufwiesen. Gleichwohl konnte jedoch unabhängig von der Streuung der absoluten Frequenzwerte ein ähnliches Reaktionsmuster bezüglich der Oszillationsfrequenzänderung der Calcium-Transienten nach Zugabe von Resveratrol beobachtet werden.

4.5.1.1 Vergleich des Einflusses von Resveratrol/ Isoprenalin

Der Effekt von Resveratrol (50µM) auf die Frequenz der Calcium-Oszillationen an D12 war signifikant geringer im Vergleich zu D14. Um nachzuweisen, dass die metabolisch selektierten Zellen an D12 durchaus schon auf externe Stimulantien adäquat reagieren konnten und somit nicht einfach nur unreif waren, erfolgte beispielhaft der Vergleich zu

Isoprenalin an D12 bezüglich des Effekts auf die Frequenz. Bei Isoprenalin handelt es sich um einen selektiven β -Adrenozeptor-Agonisten (vgl. Kapitel 1.7). Die Wirkung von Isoprenalin wurde an einer der Passagen mit vier verschiedenen ROIs überprüft.

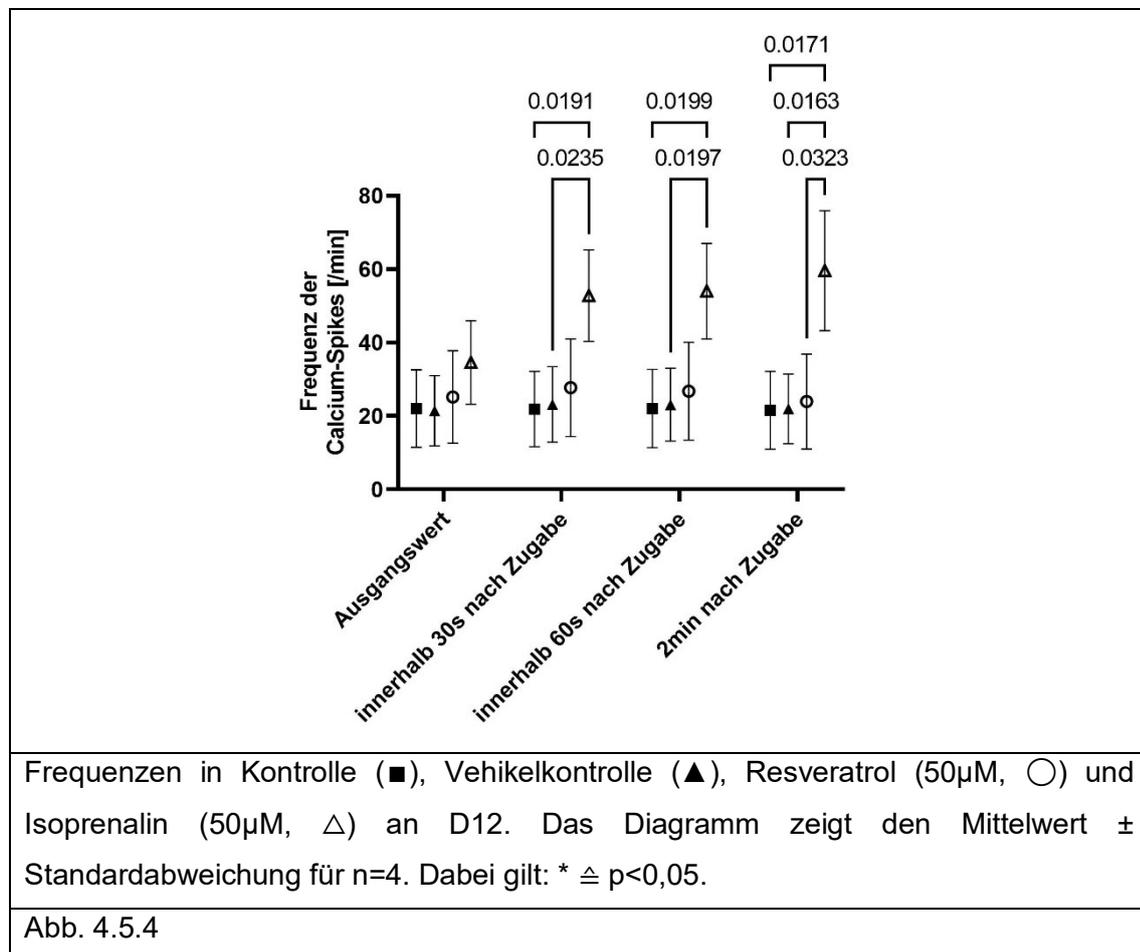


Abb. 4.5.4 zeigt die absolute Oszillationsfrequenz auf der Y-Achse. Die Messzeiträume sind auf der X-Achse abgetragen. Gezeigt sind die Frequenzänderungen nach Substratzugabe in der Kontrolle, Vehikelkontrolle, Resveratrol und Isoprenalin. Die Werte für Kontrolle, Vehikelkontrolle und Resveratrol (50 μ M) dienen zum Vergleich und entsprechen den Werten aus Abb. 4.5.2 A, wobei hier auf Unterschiede bezüglich der Stoffzugabe getestet wurde.

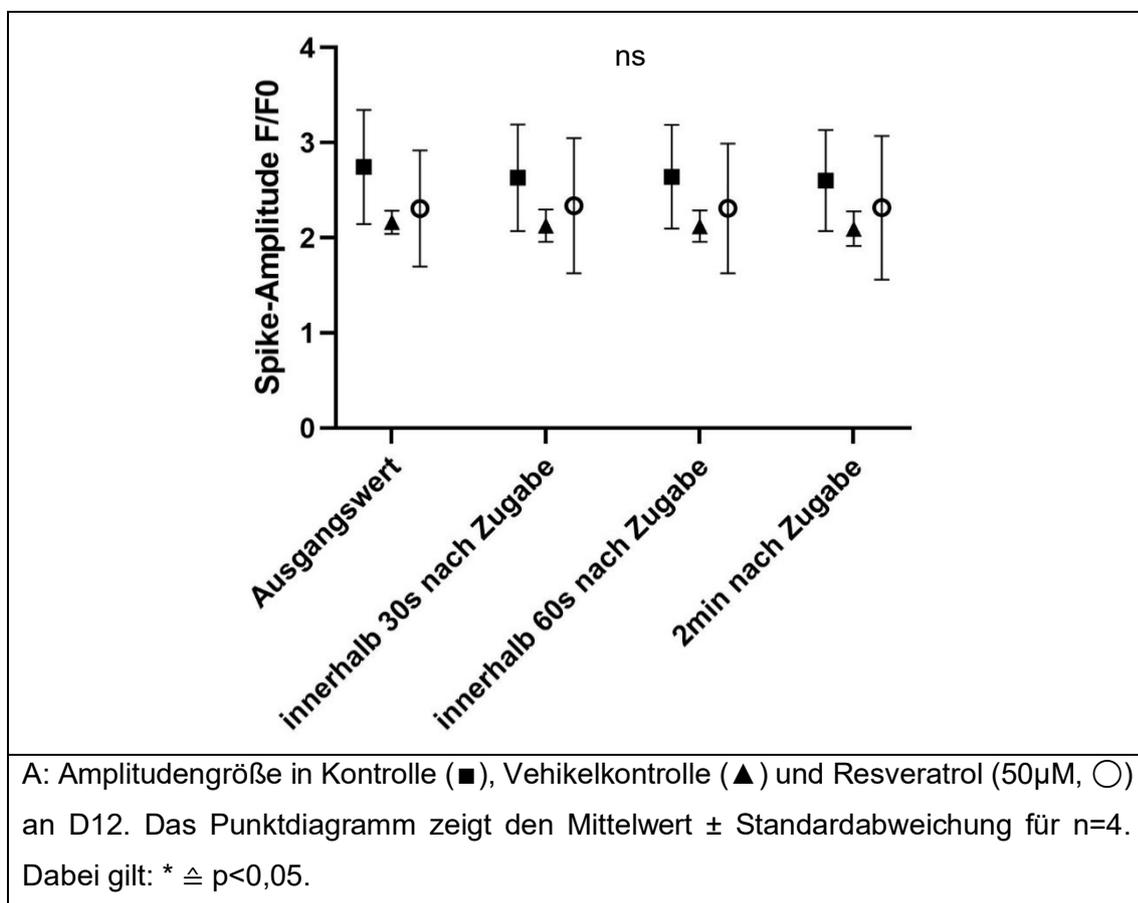
Nach Zugabe von Isoprenalin ließ sich im Vergleich zu den anderen untersuchten Messsubstanzen ein deutlicher Frequenzanstieg beobachten (p=0,0323). Die Frequenzzunahme unter Isoprenalin (50 μ M) betrug ca. das 6-11-fache (mittlere Zunahme von 18-25 Spikes/min) der Änderung unter Zugabe von Resveratrol (50 μ M) und blieb darüber hinaus über die gesamte Messdauer nach Zugabe erhöht.

4.5.2 Untersuchung weiterer Parameter der Calcium-Oszillationen

Neben der Oszillationsfrequenz wurden auch die Amplitude, die Dauer der Calcium-Transienten sowie die TTP untersucht, um zu klären, inwiefern sich die Zugabe von Resveratrol (50 μ M) auf diese Parameter auswirkt. Die Auswertung erfolgte für D12 und D14. Dabei wurden für D12 für Resveratrol 28, für die Vehikelkontrolle 30 und für die Kontrolle 19 ROIs aus vier Passagen ausgewertet. Für D14 wurden für Resveratrol 28, für die Vehikelkontrolle 28 und für die Kontrolle 22 ROIs aus vier Passagen ausgewertet.

4.5.2.1 Effekt von Resveratrol auf die Amplitude der Calcium-Transienten

Die Amplitude der Calcium-Spikes wird als F/F_0 bestimmt, da keine absoluten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen bestimmt wurden.



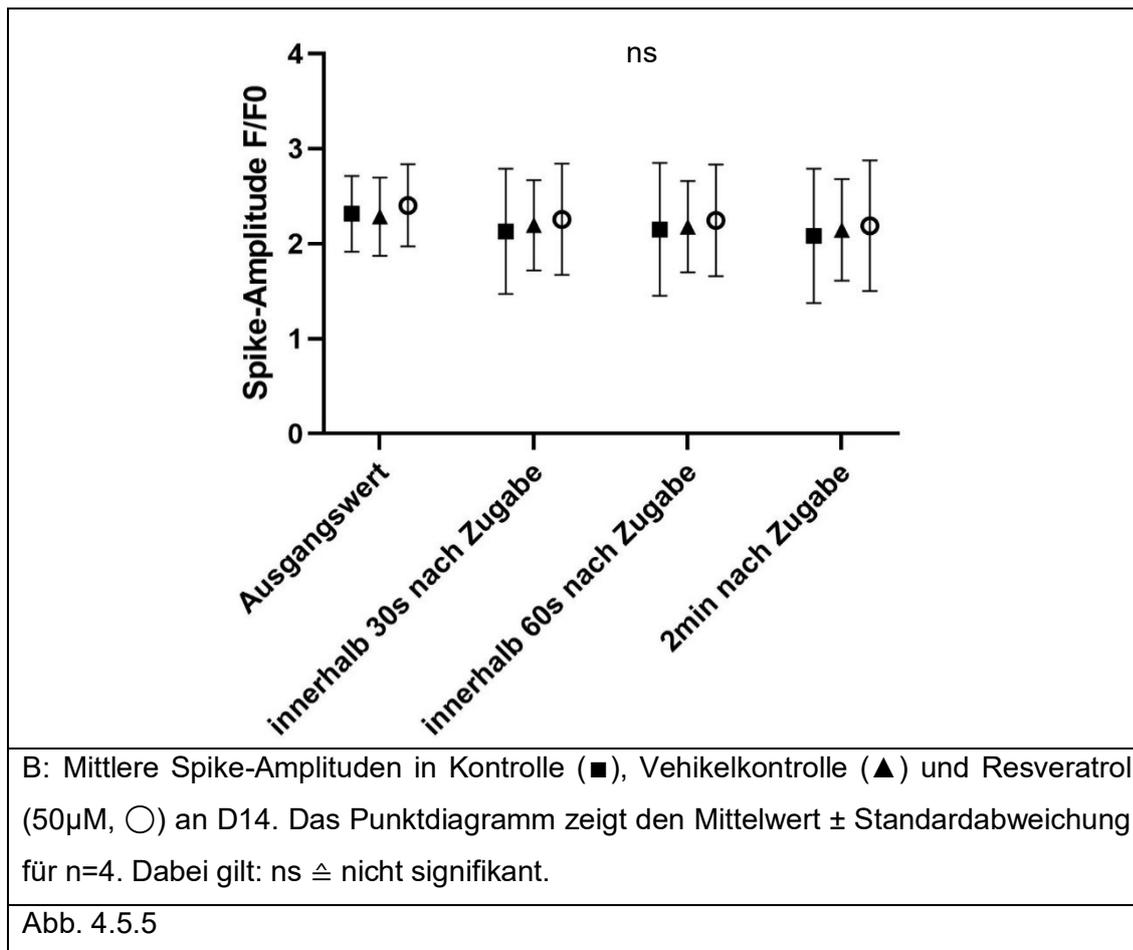
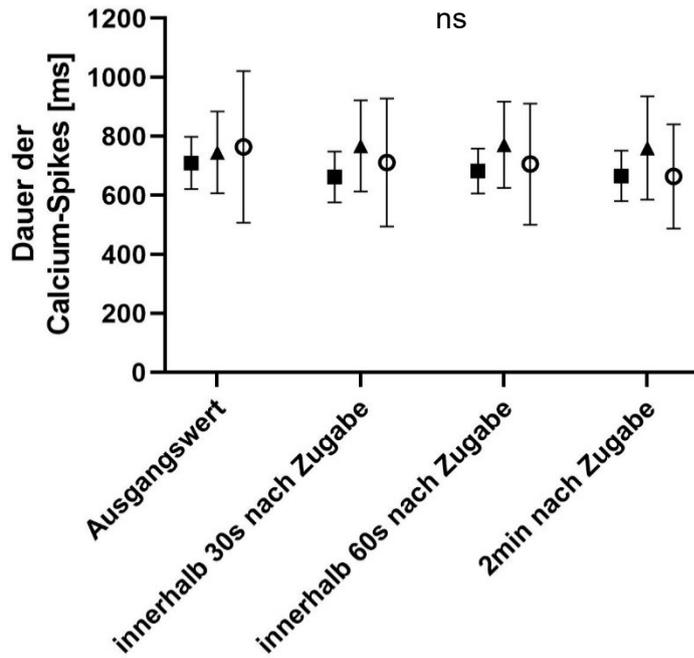


Abb. 4.5.5 A und B zeigen die mittleren Spike-Amplituden auf der Y-Achse für die Kontrolle, Vehikelkontrolle und Resveratrol (50µM) in Abhängigkeit der Messzeiträume (X-Achse).

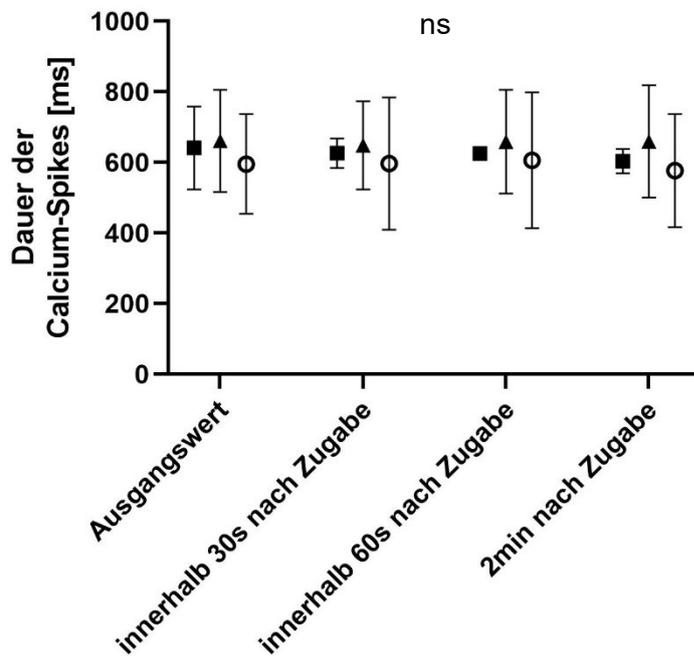
Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Messzeiträumen wie auch nicht zwischen den zugegebenen Substraten.

4.5.2.2 Effekt von Resveratrol auf die Dauer der Calcium-Spikes

In der Auswertung zeigte sich eine Frequenzabhängigkeit der Dauer der Calcium-Spikes. Die Transformation der Werte erfolgte mittels Bazett-Formel (vgl. Kapitel 3.9).



A: Dauer der Calcium-Spikes in Kontrolle (■), Vehikelkontrolle (▲) und Resveratrol (50µM, ○), an D12. Das Punktdiagramm zeigt den Mittelwert ± Standardabweichung für n=4. Dabei gilt: * \triangleq p<0,05.



B: Dauer der Calcium-Spikes in Kontrolle (■), Vehikelkontrolle (▲) und Resveratrol (50µM, ○), an D14. Das Punktdiagramm zeigt den Mittelwert ± Standardabweichung für n=4. Dabei gilt: * \triangleq p<0,05.

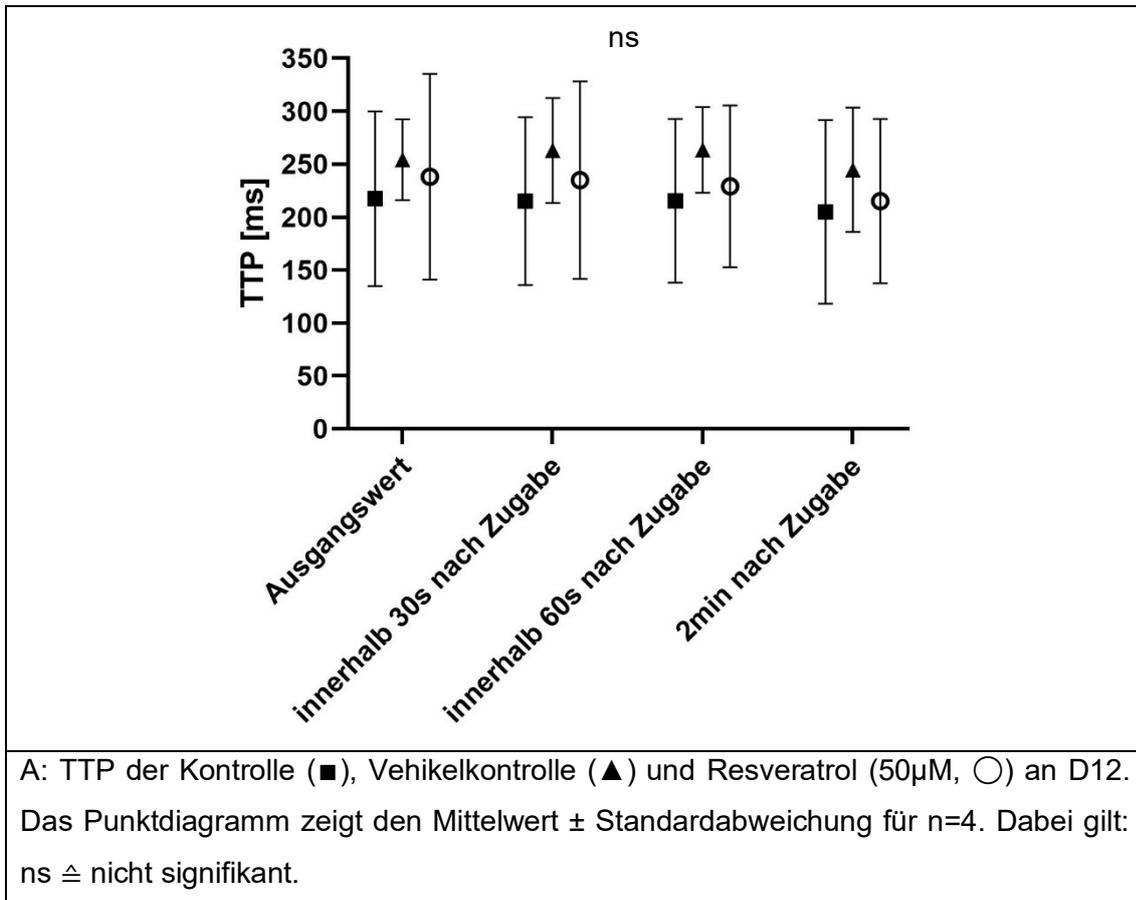
Abb. 4.5.6

Abb. 4.5.6 A und B zeigen die Dauer der Calcium-Spikes in Millisekunden auf der Y-Achse. Die Messzeiträume befinden sich auf der X-Achse.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Messzeiträumen wie auch nicht zwischen den zugegebenen Substraten.

4.5.2.3 Effekt von Resveratrol auf die TTP

In der Auswertung zeigte sich auch eine Frequenzabhängigkeit der TTP der Calcium-Spikes. Die Transformation der Werte erfolgte mittels Bazett-Formel.



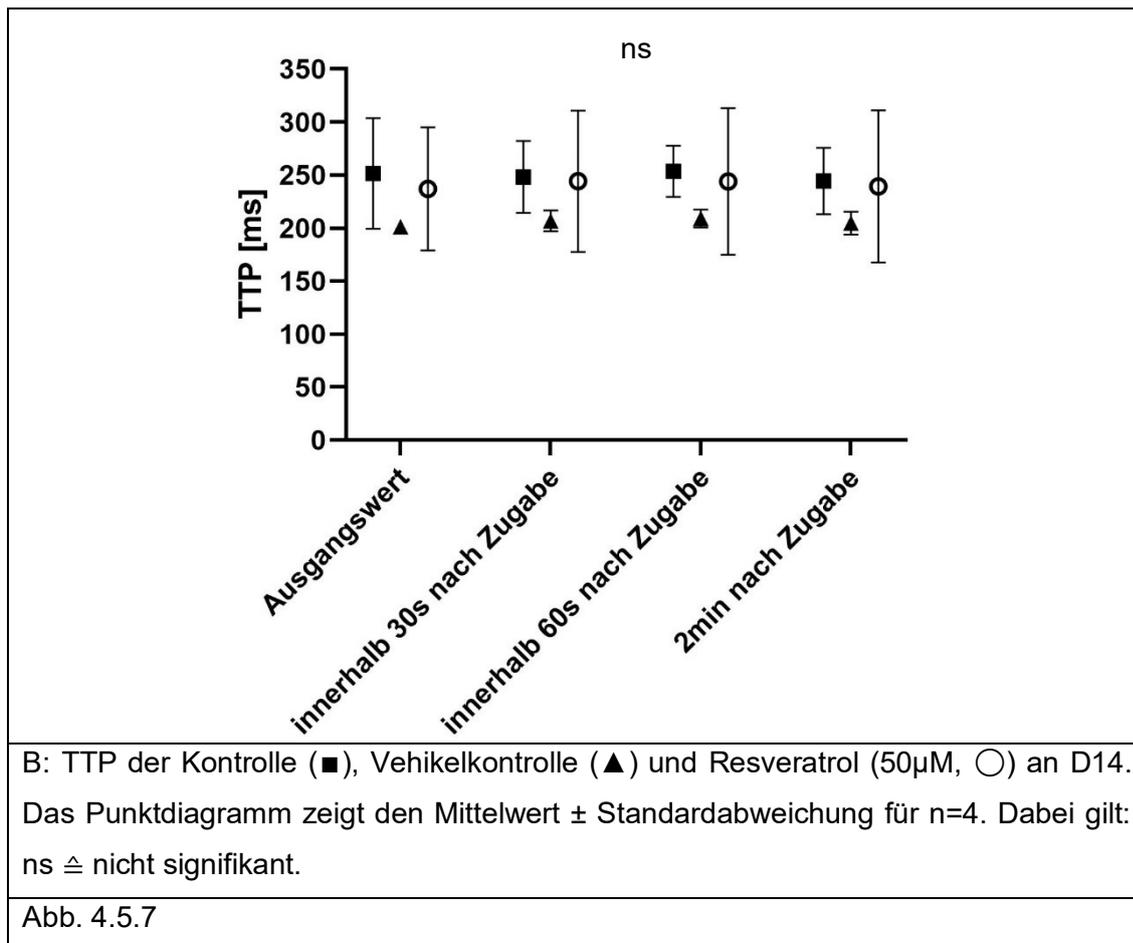


Abb. 4.5.7 A und B zeigen die TTP auf der Y-Achse für die Kontrolle, Vehikelkontrolle und Resveratrol (50µM) in Abhängigkeit der Messzeiträumen auf der X-Achse. Die TTP ist in Millisekunden angegeben. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Messzeiträumen oder bezüglich der Zugabe von Resveratrol.

Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen der Calcium-Oszillationen, dass Resveratrol (50µM) zu einem signifikanten Anstieg der Frequenz der Kardiomyozyten führte, welcher durch die Kulturdauer beeinflusst wurde. Die Betrachtung der Amplitude, Dauer der Calcium-Transienten oder TTP lieferte keine signifikanten Unterschiede, auch nicht im Vergleich zueinander (D12 zu D14).

4.6 Generierung funktionell gekoppelter, kardialer Monolayer

Während der Laktat-Versuche waren nach Dissoziation regelmäßig kleine Ansammlungen von Kardiomyozyten als funktionell gekoppeltes Areal sowohl lichtmikroskopisch, immunhistochemisch und auch bei den Calcium-Oszillationsmessungen nachweisbar. Um im Zuge der regenerativen Medizin Herzgewebe zu generieren und zu transplantieren, ist es nötig, größere Zellverbände aus Kardiomyozyten zu erzeugen. Daher war ein zentrales Ziel des experimentellen Teils dieser Arbeit, eine funktionell-gekoppelte, kardiale Monolayer aus embryonalen Stammzellen zu erzeugen.

In Kapitel 4.3 wurde beschrieben, dass bei Beginn der Laktat-Behandlung an D7 über 4d die besten Ergebnisse bezüglich der Reinheit an Kardiomyozyten (>95%) erzielt werden konnten. Die hohe Reinheit der Kardiomyozyten war Voraussetzung, dass die Ausbildung größerer Zellverbände nicht durch andere Zellen räumlich begrenzt wurde.

In weiteren Versuchen wurde die Konzentration der Kardiomyozyten für die Ausplattierung optimiert. Dabei erwiesen sich Zellzahlen $>10^5$ gelöst in $\leq 50\mu\text{l}$ Medium ($\cong 2 \times 10^6$ Zellen/ml) als ideal.

Um das Verlaufen der Zellsuspension nach Aufbringung auf die mit Gelatine-beschichteten Deckgläschen zu minimieren, wurden die neu-beschichteten Probengefäße für mindestens 60min vor Aufbringung der Zellsuspension bei 37°C getrocknet. Nach Aufbringung der Zellsuspension auf den Coverslip wurde erneut für 30-50min abgewartet, um die Zelladhäsion lokal an die Zellkulturplatte zu begünstigen.

Anschließend erfolgte die weitere CCE-Mediumzugabe und die Evaluierung des Zellverbandes 24h bzw. 48h nach Dissoziation.

Die Anwendung dieses Verfahrens ermöglichte die Generierung von kardialen Monolayern, die im Folgenden näher charakterisiert werden.

4.6.1 Lichtmikroskopische Darstellung eines kardialen Monolayers

Bereits 24h nach Dissoziation wurden im Lichtmikroskop wiederholte, spontane Kontraktionen kardialer Monolayer beobachtet. Dabei erstreckte sich die kontraktile Aktivität über das gesamte Areal, wobei die größten Bewegungen im Zuge der Kontraktion in den Randbereichen zu erkennen waren.

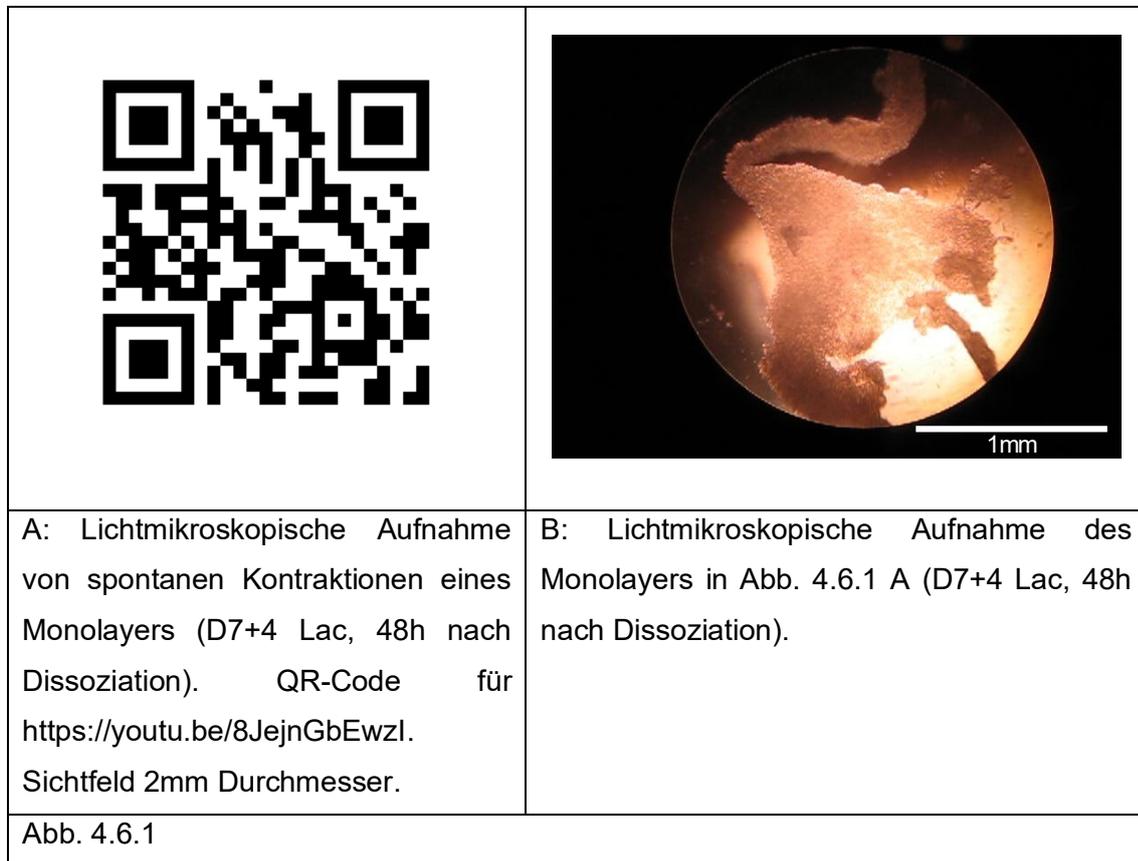


Abb. 4.6.1 A verlinkt zum YouTube-Videoportal, um Filmaufnahmen mittels Lichtmikroskop eines Monolayers zu zeigen. Abb. 4.6.1 B zeigt ein Standbild des in Abb. 4.6.1 A verlinkten Monolayers.

Die Lichtmikroskopische Filmaufnahme (Abb. 4.6.1) zeigt kontinuierliche Kontraktionen eines kardialen Monolayers. Die Kontraktion beginnt zunächst im oberen Bildteil und breitet sich in der Folge entlang des gesamten Areals aus.

4.6.2 Immunhistochemische Darstellung eines kardialen Monolayers

48h nach Dissoziation der EBs erfolgte die Darstellung der kardialen Monolayer durch immunhistochemische Färbung.

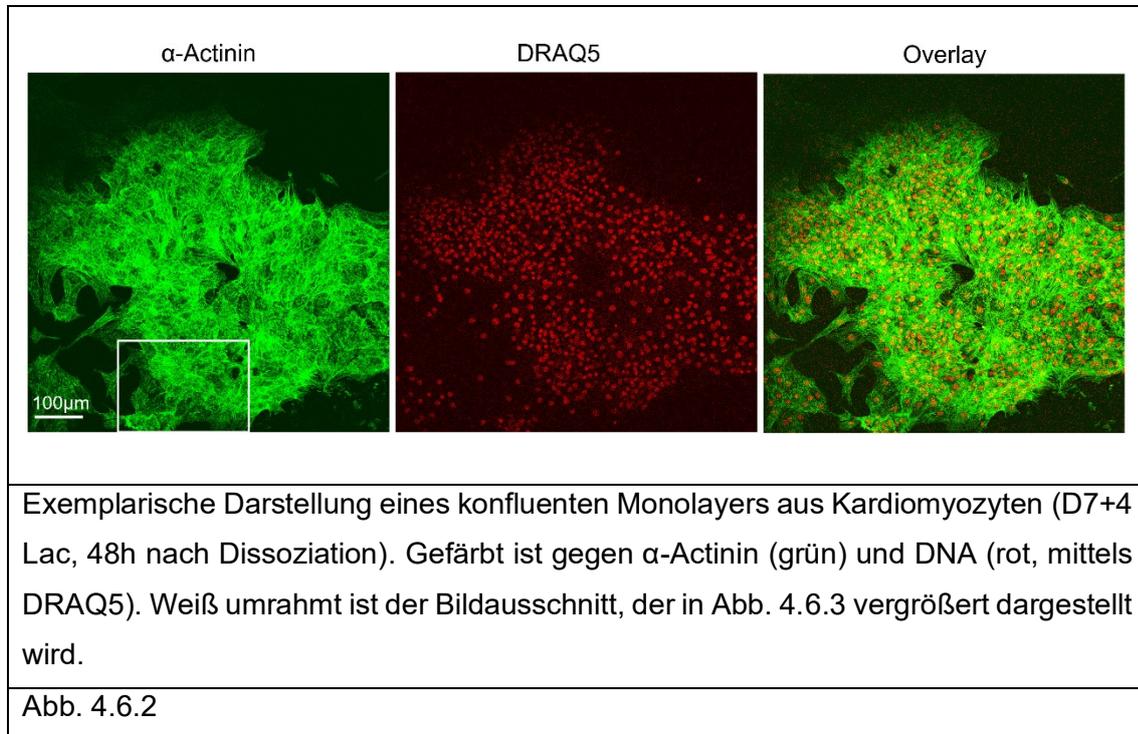
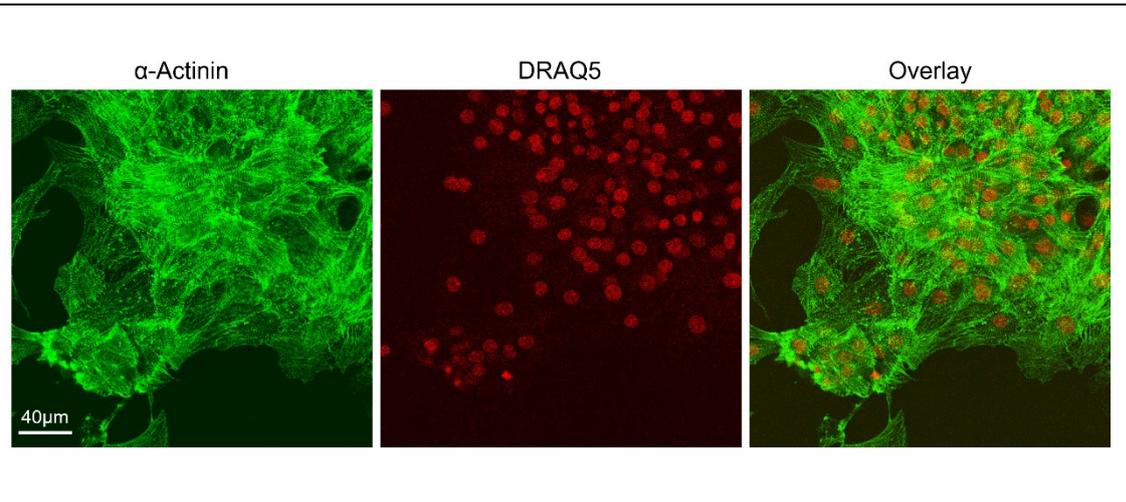


Abb. 4.6.2 zeigt eine immunhistochemische Übersichtsaufnahme eines kardialen Monolayers. Dabei waren in unmittelbarer Nähe des Zellverbandes aus Kardiomyozyten vereinzelte, nicht integrierte Herzmuskelzellen zu beobachten. Dies könnte auf eine möglich Zellmigration der Kardiomyozyten hinweisen.

Des Weiteren konnte anhand der immunhistochemischen Färbung auch die Organisationsstruktur der Kardiomyozyten innerhalb des Zellverbundes betrachtet werden. Hierbei zeigt sich bereits bei geringer Vergrößerung, dass sich die Kardiomyozyten, gemessen an der Ausrichtung ihrer Sarkomere, öfter lokal, aber nie in toto um ein gemeinsames Zentrum anordneten. Dies ist ebenfalls bei stärkerer Vergrößerung in Abb. 4.6.3 zu sehen.



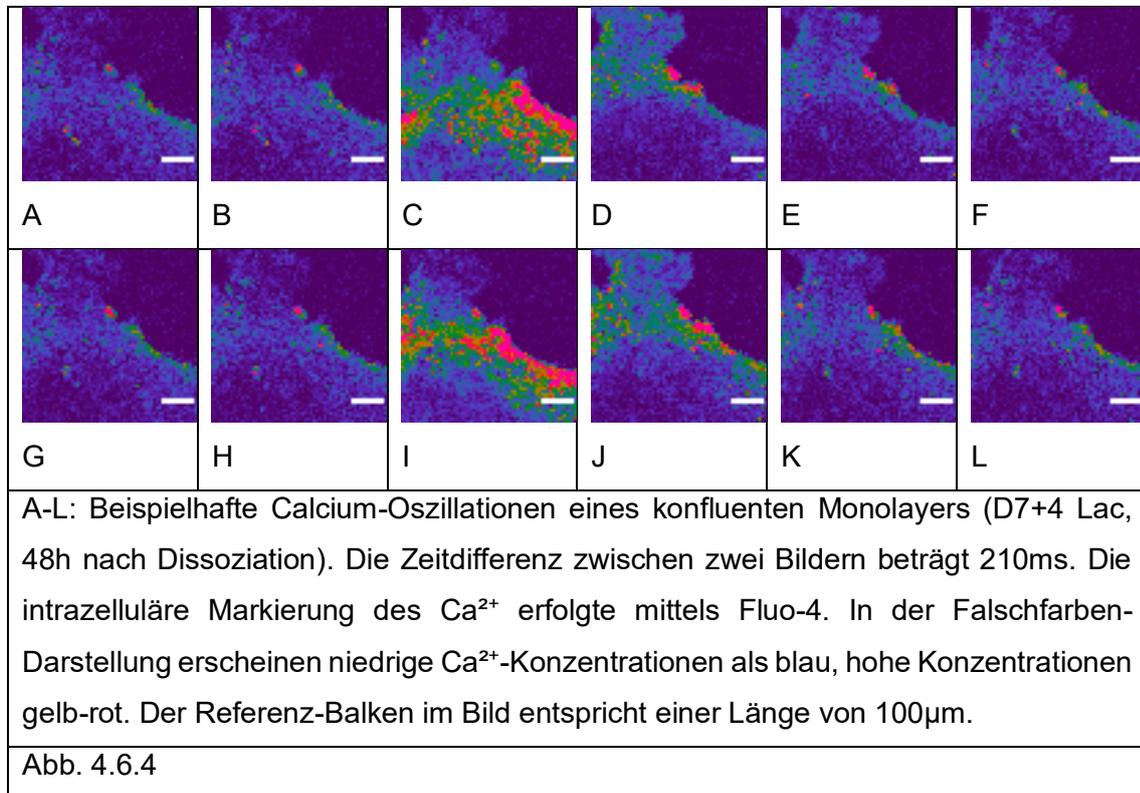
Darstellung des in Abb. 4.6.2 markierten Bereichs. Gefärbt ist gegen α -Actinin (grün) und DNA (rot, mittels DRAQ5).

Abb. 4.6.3

Abb. 4.6.3 zeigt vergrößerte Aufnahme des in Abb. 4.6.2 markierten Ausschnitts eines kardialen Monolayers. Zu erkennen war eine ungerichtete Organisation der Sarkomerstrukturen wie auch der Zellausrichtungen.

4.6.3 Calcium-Transienten in kardialen Monolayern

Bereits 24h nach Dissoziation der EBs konnten funktionell gekoppelte Zellverbände aus Kardiomyozyten nachgewiesen werden, welche synchron kontrahierten. Diese Monolayer zeigten auch an späteren Beobachtungszeitpunkten synchrone Kontraktionen.



Die Bilder in Abb. 4.6.4 zeigen Calcium-Oszillationen eines konfluenten Monolayers aus Kardiomyozyten, generiert aus embryonalen Stammzellen der CCE-Zelllinie. Die Zeitdifferenz zwischen zwei Bildern beträgt 210ms. Deutlich zu erkennen ist ein rapider Anstieg (blau zu rot) des Ca^{2+} im Monolayer in Abb. 4.6.4 C und Abb. 4.6.4 I sowie ein zügiges Absinken (wieder blau) in den darauffolgenden Aufnahmen.

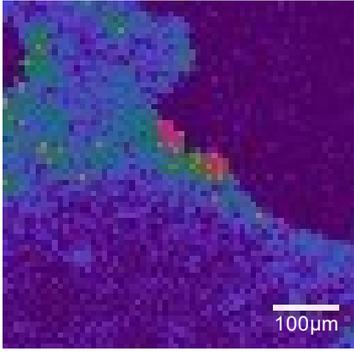
	
<p>A: Laser-Scanning-mikroskopische Aufnahme eines Monolayers (D7+4 Lac, 48h nach Dissoziation). QR-Code für https://youtube.com/shorts/zpGGT2ZkNgA. Die Seitenlängen betragen 500µm.</p>	<p>B: Laser-Scanning-mikroskopische Aufnahme des in Abb. 4.6.5 A gezeigten Monolayers (D7+4 Lac, 48h nach Dissoziation).</p>
<p>Abb. 4.6.5</p>	

Abb. 4.6.5 A verlinkt zum YouTube-Videoportal, um Filmaufnahmen mittels Laser-Scanning-Mikroskops eines Monolayers zu zeigen. Abb. 4.6.5 B zeigt ein Standbild des in Abb. 4.6.5 A verlinkten Monolayers.

Die Laser-Scanning-mikroskopische Aufnahme in Abb. 4.6.5 zeigt eine Calcium-Oszillationsmessung. Sie beinhaltet auch die in Abb. 4.6.4 gezeigte Bildserie. Die Seitenlänge, der in der Sequenz gezeigten Bilder, beträgt 500µm. Zu sehen ist der wellenartige Anstieg (blau zu gelb/rot) der intrazellulären Calcium-Konzentration von unten nach oben im Bild sowie der anschließende Abfall (gelb/rot zu blau) auf das vorherige Grundniveau.

5 Diskussion

5.1 Laktat-Selektion

Eine erprobte Methode zur Generierung hochreiner Kardiomyozyten-Populationen ist die metabolische Selektion. In neueren Arbeiten ist die Anwendung der Laktat-Selektion zur Gewinnung von Kardiomyozyten bei humanen Stammzellen beschrieben (Fuerstenau-Sharp et al., 2015; Laco et al., 2020; Tohyama et al., 2017). Im Zuge dieser Arbeit erfolgte die Anwendung und Optimierung der Laktat-Selektion für die hier verwendete CCE-Maus-Stammzelllinie.

5.1.1 Grenzen der Laktat-Selektion

Wie in Kapitel 1.6.3 beschrieben, führt die Verwendung von Zellkultur-Medium, welches Laktat als alleinigen Kohlenstoffenergieträger beinhaltet, zu einer metabolischen Selektion von Kardiomyozyten. Tohyama et al. zeigten dabei, dass es nach 4-tägiger Behandlung mit Laktat-Medium zu einer ausschließlichen Selektion von Kardiomyozyten (>95%) kommt (Tohyama et al., 2013).

In den ersten Experimenten erfolgte die Laktat-Behandlung an D10 der Differenzierung. D10 wurde ausgewählt, da bis zu diesem Zeitpunkt die spontane Differenzierung der Stammzellen zu Kardiomyozyten weitgehend abgeschlossen ist. Gleichzeitig kommt es bei längerer Zellkultur der EBs auch vermehrt zur Differenzierung nicht-kardialer Zellarten.

So führte die Behandlung ab D10 für 4d mit Laktat-Medium zu einem signifikanten Anstieg der Kardiomyozyten gegenüber der Kontrolle 24h nach Abschluss der Laktat-Behandlung. Dies deckte sich mit lichtmikroskopischen Beobachtungen. Die Bestimmung des Anteils an Kardiomyozyten 48h, 72h oder 96h nach Laktat-Behandlung und Dissoziation zeigte keine signifikanten Veränderungen. Ausbeuten an Kardiomyozyten von >25% konnten nicht nachgewiesen werden.

Der hohe Anteil an Nicht-Kardiomyozyten in den Proben für D10+4 L+B (>75%) spricht dafür, dass sich zu diesem Zeitpunkt bereits auch andere Zellarten aus den Stammzellen differenziert haben, die in der Lage waren, Laktat in begrenzter Form als Energieträger zu nutzen.

Neben Kardiomyozyten können dabei sowohl Hepatozyten als auch Nervenzellen Laktat für die Aufrechterhaltung ihres Energiestoffwechsels nutzen (Hui et al., 2017; Rabinowitz

& Enerbäck, 2020; Wohnsland et al., 2010). In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es in Gegenwart von Serum, neben einer spontanen Differenzierung embryonaler Mäuse-Stammzellen zu Kardiomyozyten, auch zu einer spontanen Differenzierung von Hepatozyten/ Hepatozyten-ähnlichen Zellen kommt (Novik et al., 2006; Pauwelyn et al., 2011). Auch eine spontane Differenzierung zu neuronalen Zellen bzw. deren Vorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen konnte in EBs gezeigt werden (Jing et al., 2011; Shparberg et al., 2019). Hingegen zeigten Tohyama et al., dass es innerhalb von 4d Behandlung mit Laktat-Medium zum Zelltod anderer Zellarten wie beispielsweise embryonaler Fibroblasten der Maus, embryonaler Stammzellen der Maus, fetaler Neurone, oder Nierenzellen kommt (Tohyama et al., 2013).

5.1.2 Optimierung der Laktat-Behandlung

Die Differenzierung von Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen vollzieht sich in verschiedenen Schritten über kardiale Vorläuferzellen, deren Stoffwechsel weitgehend glykolytisch ist und sich somit vom Metabolismus terminal differenzierter Kardiomyozyten unterscheidet (Hu et al., 2018; Lopaschuk & Jaswal, 2010; Pezhouman et al., 2021). Es wurde daher untersucht, ob auch frühere Differenzierungsstadien von Kardiomyozyten durch metabolische Selektion in Laktat-Medium isoliert und in Zellkultur gebracht werden können.

Hierzu erfolgte die experimentelle Laktat-Behandlung ab D5, um die Auswirkungen der metabolischen Selektion an kardialen Vorläuferzellen zu testen. Bei Umstellung des Nährmediums an D5 von Vollmedium auf Laktat-Medium konnten an D6 bzw. D7 vereinzelt spontane Kontraktionen der EBs beobachtet werden. Somit kam es zur Entwicklung von Kardiomyozyten. Folglich musste bereits vor Beginn der Laktat-Behandlung zumindest teilweise die Differenzierung der kardialen Vorläuferzellen in diesen Proben weit fortgeschritten sein, insbesondere bezüglich der Enzymausstattung der Mitochondrien. Diese mitochondriale Anpassung ist essentiell, um unter Laktat-Medium den Energiebedarf der Zelle weiter decken zu können (vgl. Kapitel 1.4, Kapitel 1.6.3; Tohyama et al., 2013). Da sich jedoch nach 4d Behandlung mit Laktat-Medium und anschließender Dissoziation keine Kardiomyozyten oder sonstige Zellen lichtmikroskopisch oder in der Immunhistochemie mehr nachweisen ließen, impliziert dies, dass die metabolische Ausstattung dieser kardialen Vorläuferzellen unzureichend zur Aufrechterhaltung der Zellintegrität über längere Zeit war und somit eine Fortsetzung der Differenzierung zu Kardiomyozyten in Laktat-Medium nicht möglich war.

Bei einem späteren Beginn der Laktat-Behandlung (vgl. Kapitel 4.3.1, Kapitel 4.3.2), konnten hohe, stabile Ausbeuten an Kardiomyozyten generiert werden. Dabei erwies sich der Behandlungsbeginn an D7 als optimal. So konnten 48h nach Dissoziation Ausbeuten an Kardiomyozyten von >95% an der Gesamtzellzahl nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Kardiomyogenese in EBs zeitlich vor anderen Laktat-verstoffwechselnden Zelltypen einsetzt.

Ein späterer Beginn (D8, D9, D10) der Laktat-Behandlung über 4d ist hingegen schon nicht mehr ausreichend, um zuverlässig einen hohen Anteil an Kardiomyozyten zu selektieren. Wie zuvor beschrieben, lässt dies darauf schließen, dass bereits ab D8 vermehrt andere differenzierte Zellarten vorliegen, welche ebenfalls Laktat als Energiequelle nutzen können. Diese Zellen überlebten unter den Kulturbedingungen der Laktat-Selektion und reduzierten somit den Prozentsatz der Kardiomyozyten an der Gesamtzellzahl.

Der Beginn der Laktat-Behandlung der verwendeten CCE-Stammzelllinie an D7 für 4d erwies sich somit als optimal und kann als Standard-Protokoll für zukünftige Experimente empfohlen werden.

Da die Kardiomyozyten nach Dissoziation oft in Form kleiner Cluster auftraten, kann eine Untersuchung des Proliferationspotentials der kardialen Progenitorzellen Ausgangspunkt weiterer Arbeiten sein. In der Literatur sind dabei proliferative Aktivitäten von kardialen Zellen über 15d Kulturdauer nachgewiesen (Buggisch et al., 2007; Xu et al., 2002).

Alternativ zur Proliferation kann die Entwicklung einer Polyploidie in den Kardiomyozyten verantwortlich für das Auftreten von Zellkernen in engem räumlichem Bezug sein. Tatsächlich ist die Polyploidie ein typisches Merkmal adulter Kardiomyozyten, die sich negativ auf die Proliferation von Zellen auswirkt (Patterson et al., 2017).

Des Weiteren zeigte die immunhistochemische Darstellung von Connexin 43 in Kardiomyozyten, dass es zu einer spontanen Ausbildung von Gap Junctions der experimentell gewonnenen Herzzellen kam. Neben der Rolle in der Erregungsausbreitung von Connexin 43, inhibiert dieses auch die Proliferation von Zellen bei Lokalisation im Zellkern (Dang et al., 2003) und ist an der Zellmigration im Zuge der Embryogenese beteiligt (Kotini et al., 2018). Dabei wirkt sich Connexin 43 hemmend auf die DNA-Synthese in Kardiomyozyten aus (Jeyaraman et al., 2013), wohingegen bei Ausschaltung von Connexin 43 mittels „short interfering RNA“ eine Zunahme der Proliferation neonataler Kardiomyozyten nachgewiesen werden konnte (Matsuyama & Kawahara, 2009). So führt der Nachweis von Connexin 43 72h nach

Dissoziation von D7+4 Lac in den Zellkernen der Kardiomyozyten (vgl. Abb. 4.3.8) zu dem Schluss, dass die proliferative Aktivität zu diesem Zeitpunkt bereits eingeschränkt war.

5.1.3 Effekt von BSA

Die verwendete Stammzelllinie der Maus wird in Serum-haltigen Medium kultiviert. Dabei hat sich in der Arbeitsgruppe etabliert, Serum-freies Medium mit BSA zu supplementieren, um eine bessere Zellviabilität und Funktionalität der Zellen zu erzielen.

Hinsichtlich der Auswirkungen auf den EB-Durchmesser konnten keine Unterschiede in Abhängigkeit von BSA nachgewiesen werden. Die Untersuchungen des prozentualen Anteils kontraktile EBs hingegen lieferte Hinweise auf einen Vorteil der Supplementierung mit BSA, aufgrund eines höheren Anteils kontraktile EBs nach mehrtägiger Behandlung mit Laktat-Medium (D10, D11; vgl. Kapitel 4.2)

Der Vergleich der Ausbeuten an Kardiomyozyten von Laktat-haltigem Medium mit und ohne BSA lieferte für 24h nach Dissoziation einen geringfügig niedrigeren Anteil an Kardiomyozyten an der Gesamtzellzahl bei Supplementierung mit BSA. 48h nach Dissoziation war hingegen kein Unterschied in Abhängigkeit von der Supplementierung mit BSA nachweisbar (vgl. Kapitel 4.3.2). Lichtmikroskopisch oder immunhistochemisch zeigten sich keine Unterschiede auf die so selektierten Kardiomyozyten in Abhängigkeit der Nährmedien.

5.1.4 Strukturelle Veränderungen unter Laktat-Medium

In der Literatur ist für Kardiomyozyten, die aus humanen Stammzellen gewonnen wurden, eine Abhängigkeit der Zellform sowie der Sarkomerlänge und -ausprägung je nach Reifungsgrad beschrieben. Es wurde nachgewiesen, dass im Zuge der Zellreifung die Sarkomerlänge zunimmt (1,6 μ m vs. 2,2 μ m), die Sarkomere eine höhere Organisation aufweisen und sich die Zellform von rund zu länglich wandelt (Yang et al., 2014a). Die metabolische Selektion von Kardiomyozyten wirkt dabei insgesamt fördernd auf die Zellreifung (Rupert et al., 2020).

Im Zuge dieser Arbeit konnten ebenfalls qualitativ strukturelle Veränderungen der metabolisch selektierten Kardiomyozyten der CCE-Stammzelllinie zeitabhängig nach Dissoziation beobachtet werden. Vor allem die Zunahme der Zellgröße und der Ausbau der Sarkomerstruktur wurden beobachtet (vgl. Abb. 4.3.7 und Abb. 4.3.8). Ebenfalls

wurde als Maß für eine fortgeschrittenere Zellreifung die Sarkomerlänge in Kardiomyozyten in CCE-Medium im Vergleich zu den in Laktat-haltigen Medien metabolisch selektierten Kardiomyozyten untersucht. Hierbei konnte jedoch kein signifikanter Unterschied der metabolischen Selektion bezüglich der Sarkomerlänge festgestellt werden.

5.2 Effekt des Calcium-Chelators BAPTA

Für die Entwicklung und Reifung sowie die Zellkontraktion von Kardiomyozyten spielt Ca^{2+} eine entscheidende Rolle. Mithilfe des intrazellulären Calcium-Chelators BAPTA-AM kann freies Ca^{2+} in der Zelle komplexiert werden. Das Ca^{2+} steht somit der Zelle nicht mehr zur Verfügung. Dies hat ein Ausbleiben der spontanen Kontraktionen zur Folge. Eine weitere Möglichkeit der Einflussnahme auf den Calcium-Haushalt liegt in der Blockade von Calcium-Kanälen der Kardiomyozyten, welche zu einem verminderten Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle führt. Dabei variiert die Bedeutung von Ca^{2+} je nach Entwicklungsstadium der Zelle.

Dabei führt die Applikation von BAPTA im Zygotenstadium zu ausgeprägten Herzfehlbildungen mit stark eingeschränkter Pumpleistung (Créton et al., 1998). Die pharmakologische Blockade von Calcium-Kanälen wie dem LTCC oder NCX in frühen Entwicklungsstadien bewirkt eine verminderte kardiale Genexpression, den Arrest der Kardiomyogenese, eine Abnahme der Zellproliferation und -größe sowie eine verminderte Organisation der Sarkomerstrukturen in Kardiomyozyten (Hotchkiss et al., 2014; Linask & Linask, 2010; Tyser et al., 2016). Allerdings zeigen sich Zellen/ Areale, die bereits erste Schritte im Zuge der kardialen Entwicklung durchlaufen haben, unbeeinflusst (Linask & Linask, 2010). Hingegen zeigen Woo et al., dass Calciumantagonisten wie Nitrendipin und Verapamil in Kardiomyozyten aus human iPS-Zellen auch einen positiven Effekt auf die Proliferation von Kardiomyozyten haben (Woo et al., 2019).

Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in frühen Entwicklungsstadien mittels Ionomycin führt ebenfalls zur Beeinträchtigung der Differenzierung (Linask et al., 2001).

Da die mit BAPTA behandelten, dissoziierten Kardiomyozyten bereits kontrahierten, wurde davon ausgegangen, dass bei den vorliegenden Zellen die Kardiomyogenese bereits fortgeschritten war. Dabei nehmen im Zuge der Differenzierung und Maturation von Kardiomyozyten u.a. die Strukturen des Kontraktionsapparates zu (Zhao et al., 2020), die Kontraktionskraft wird ferner durch eine bessere Organisation und Ausrichtung der Myofilamente unterstützt (Guo & Pu, 2020). Auch nehmen die Zell-Zell-Kontakte (Connexin 43) zu und es wird ein Einfluss der Integrine, welche Kardiomyozyten mit der Extrazellulärmatrix verbinden, auf die Maturation gezeigt (Giacomelli et al., 2020; Herron et al., 2016).

Nach Laktat-Behandlung und Dissoziation zeigte sich ein heterogenes Bild an Differenzierungsstadien der Kardiomyozyten. Neben Kardiomyozyten in typischer, länglicher Zellform lagen auch verschiedene Vorläuferstadien vor. Dabei dominierten insbesondere 24h nach Dissoziation kleine, sphärische kardiale Zellen mit nur rudimentär ausgebildetem Kontraktionsapparat. Eine frühzeitige, signifikante Abnahme der kleinen, sphäroidalen, kardialen Zellen konnte nach Supplementierung des Nährmediums mit dem Calcium-Chelator BAPTA nach Dissoziation gezeigt werden. Entsprechend kam es zu einer Steigerung des Anteils an Kardiomyozyten in fortgeschrittenen Differenzierungsstadien bezogen auf die Gesamtzahl der Kardiomyozyten. Ein Einfluss von BAPTA auf die Organisation der Sarkomere konnte nicht beobachtet werden. So ist neben der möglichen Beeinflussung der Differenzierung der kardialen Progenitorzellen durch BAPTA ferner eine verbesserte Adhäsion der Zellen zu erwägen.

Die vorübergehende Kontraktionshemmung der Kardiomyozyten nach Dissoziation durch BAPTA führt möglicherweise zu einer ausgeprägteren Verankerung der Zellen aufgrund reduzierter Zellbewegungen auf dem Coverslip. Eine Verbesserung der Zelladhäsion führt dabei zu einer verbesserten Reifung und Strukturierung der Sarkomere in Kardiomyozyten (DePalma et al., 2021; Taneja et al., 2020). Entscheidend an der Vermittlung zwischen der Interaktion der Kardiomyozyten mit der Umgebung und der Differenzierung sind die Focal Adhesion Kinase und Integrin-linked Kinase beteiligt (Robert et al., 2021). Die pharmakologische Hemmung der Kontraktion wird auch bei der Isolation adulter Kardiomyozyten genutzt. So führen BDM und Blebbistatin zu einer verbesserten Morphologie der Zellen, wobei sich BDM negativ auf die Adhäsion der Zellen auswirkt (Kabaeva et al., 2008). Martherus et al. hingegen berichten, dass die Kontraktionshemmung mit Blebbistatin die kardiale (Re-)Differenzierung negativ beeinflusst (Martherus et al., 2010).

5.3 Calcium-Oszillationsmessungen mit Resveratrol

Neben allgemein positiven Auswirkungen von Resveratrol auf die Gesundheit (Brito et al., 2021; Fraiz et al., 2021) ist auch ein Einfluss auf den Calcium-Haushalt von Kardiomyozyten bekannt (Sulaiman et al., 2010). Grundsätzlich sind bei der Untersuchung mit Resveratrol zwei Arten von Studien typisch: Untersuchungen des Einflusses von Resveratrol auf vorgeschädigte Zellen und Untersuchungen bei Zugabe von Resveratrol ohne vorherige Schädigung oder Beeinflussung, wie dies auch in dieser Arbeit der Fall war.

In vorgeschädigten Kardiomyozyten wurde gezeigt, dass es unter Supplementierung mit Resveratrol zu einer Restitution der erniedrigten SERCA2a-Proteinkonzentration kommt, welche für diastolische Funktionsstörungen der Kardiomyozyten verantwortlich gemacht wird. Hierbei wird eine Erhöhung der SERCA2a-mRNA-Konzentration beschrieben, wie auch eine Restitution erniedrigter NCX-Level (Das et al., 2015). Die Zugabe von Lipopolysaccharid, Bestandteil der Bakterienmembran, führt zur Verminderung der SERCA-Aktivität, der Zellverkürzung, der Calcium-Transienten-Amplitude und dem Vorliegen von PLN als Oligomer sowie zur Zunahme von Superoxidanionen. Diese Veränderungen werden allesamt durch Zugabe von Resveratrol neutralisiert (Bai et al., 2016). Auch ein antiarrhythmischer Effekt von Resveratrol wird durch Reduktion des späten Natrium-Einstroms gezeigt, welcher für Arrhythmien beim Long-QT-Syndrom relevant ist. Ein Effekt auf den NCX durch Resveratrol wird nicht nachgewiesen (Wallace et al., 2006). Ebenso neutralisiert Resveratrol Nachdepolarisations-ähnliche Veränderungen und Amplitudenzunahmen des Calcium-Transienten, die durch Zugabe von Wasserstoffperoxid induziert werden. Es wird eine Reduktion des späten Natrium- und Calcium-Stroms beobachtet. Auch die Aktivität der CaMKII und ROS-Produktion wird reduziert (Li et al., 2013; Qian et al., 2012). Im Tiermodell der pulmonal-arteriellen Hypertonie führt Resveratrol zu einer verbesserten Relaxation ohne vermehrte Expression von SERCA2a, was auf eine aktivitätssteigernde Wirkung schließen lässt (Bernal-Ramírez et al., 2021).

Liu et al. zeigen, dass die Gabe von Resveratrol zur Absenkung des intrazellulären Ca^{2+} durch Blockade des LTCC und RyR2 führt. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit und Dauer induzierter Calcium-Wellen sind reduziert (Liu et al., 2005). Zhang et al. zeigen eine Verminderung des späten Calcium-Stroms durch Inhibierung der Aktivierung der LTCC und Verlängerung der Refraktärzeit (Zhang et al., 2006). Während Resveratrol im Rahmen von Erkrankungen/ Schädigungen zu einer Normalisierung z.B. der Ca^{2+} -

Konzentration in der Diastole führt, zeigt Resveratrol ohne vorherige Schädigung/ vorbestehenden Schaden von Kardiomyozyten keinen Einfluss auf die Amplitude des Calcium-Transienten oder die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (Wallace et al., 2006).

Ein Einfluss von Resveratrol auf die Frequenz von Calcium-Transienten wurde in den obigen Publikationen nicht gezeigt, da die Beobachtungen unter externer elektrischer Stimulation erfolgten.

Die in dieser Arbeit untersuchten Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen der Maus zeigten spontane Kontraktionen, sodass auf eine externe, elektrische Stimulation verzichtet wurde. So konnte erstmals ein akuter Effekt von Resveratrol ($50\mu\text{M}$) auf die Frequenz der Calcium-Transienten in Kardiomyozyten beobachtet werden. Ferner wurde gezeigt, dass der Effekt von Resveratrol mit zunehmendem Alter der behandelten Zellen zunimmt. Die hierfür verwendeten Zellen unterschieden sich allein im Behandlungsbeginn mit Laktat-Medium und in der Folge dem Messtag entsprechend der Kulturdauer (D12 vs. D14). Dies bedeutet, dass das Alter der Zellen einen Einfluss auf die Reaktion der Kardiomyozyten gegenüber Resveratrol besitzt.

In anderen Arbeiten konnte ebenfalls ein Einfluss des Zellalters/ der Zellkulturdauer auf verschiedene Eigenschaften von Kardiomyozyten festgestellt werden. Diese gingen jedoch von einer kontinuierlichen Versorgung mit Nährstoffen aus, also ohne metabolische Selektion. Die verlängerte Kulturdauer der differenzierenden Kardiomyozyten führte dabei vor allem zu Veränderungen des Aktionspotentials und der Kontraktionsfrequenz (Boheler et al., 2002). Frequenzunterschiede zwischen Kardiomyozyten aus unterschiedlichen Passagen sind dabei analog zur Herzfrequenzvariabilität innerhalb einer Population und von verschiedenen Faktoren beeinflusst, wobei die Kulturdauer einen positiven Einfluss auf die Frequenz hat (Niehoff et al., 2022; Sauer et al., 2001). Auch eine vermehrte Expression kardialer Proteine konnte bei längerer Kulturdauer nachgewiesen werden (Guan et al., 1999).

Darüber hinaus zeigten sich keine signifikanten Effekte von Resveratrol bezüglich weiterer Parameter der Calcium-Oszillationen wie Amplitude, Dauer des Calcium-Transienten oder der TTP an D12 wie auch an D14.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die Zugabe von Resveratrol zu einer Steigerung der Frequenz der spontanen Calcium-Transienten in Kardiomyozyten führt. Dabei ist dieser Effekt positiv von der Kulturdauer beeinflusst. Ein Nachweis von Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration im Zuge der Calcium-Oszillationen konnte nicht beobachtet werden.

Um den Effekt von Resveratrol an D12 besser einordnen zu können, erfolgte zudem die Untersuchung der Kardiomyozyten mit Isoprenalin. Hierbei zeigte sich im Vergleich zu Resveratrol eine deutlich ausgeprägtere Steigerung (6-11x) der Frequenz der Calcium-Oszillationen der Kardiomyozyten. Ferner war die Frequenzzunahme bei Vergleich der absoluten Frequenzwerte signifikant. Die eindeutige Reaktion der Kardiomyozyten an D12 auf Isoprenalin zeigte, dass die geringe Frequenzsteigerung der Herzmuskelzellen nach Zugabe von Resveratrol im Vergleich zu D14 nicht in einer generalisierten Unreife der zellulären Signalkaskaden begründet war.

5.4 Generierung eines konfluenten, kardialen Zellverbandes

Aufbauend auf den Ergebnissen der Laktat-Selektion wurde untersucht, inwieweit eine Generierung konfluenter Zellverbände bestehend aus metabolisch selektierten Kardiomyozyten möglich ist. Ohne metabolische Selektion der Kardiomyozyten machen diese <3% aller Zellen in einem EB aus (vgl. Kapitel 4.3). Insofern war die Anpassung der Laktat-Selektion an die vorliegende CCE-Zellreihe essentiell. Die hohen Ausbeuten bei Behandlung der EBs ab D7 für 4d mit Laktat-Medium ermöglichten eine enge Aussaat von Herzmuskelzellen, ohne dass Nicht-Kardiomyozyten räumlich begrenzend auf die Vernetzung von Kardiomyozyten wirkten.

2003 selektierten Zweigerdt et al. mittels G418-Resistenz (vgl. Kapitel 1.6.2) Kardiomyozyten mit einer Reinheit von >95%. Die anschließende Aussaat der Kardiomyozyten mit einer Zelldichte von $7 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ermöglichte die Generierung zusammenhängender Zellverbände aus Kardiomyozyten. Lichtmikroskopisch waren synchrone Kontraktionen nachweisbar. Eine Aussage zur Größe der so generierten Monolayer wurde nicht gemacht (Zweigerdt et al., 2003). Eine Kultivierung und Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu Kardiomyozyten ist auch bei Anwachsen der Zellen an die Zellkulturfläche ohne die Entwicklung von EBs als Zwischenschritt möglich. Tohyama et al. zeigen, dass durch aktive Induktion der Kardiomyogenese (vgl. Kapitel 1.3.2) und anschließende metabolische Selektion (85,0% Kardiomyozyten vor Selektion, 99,3% Kardiomyozyten nach Selektion) eine Generierung konfluenter Monolayer möglich ist (Tohyama et al., 2017). Ein Nachweis über die funktionelle Kopplung der so selektierten Kardiomyozyten wurde nicht erbracht.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigten, dass die Größe der entstehenden Zellverbände entscheidend von der Zellzahl und der Dichte bzw. der Konzentration der Kardiomyozyten beim Ausplattieren abhängig war. Die größten konfluenten Zellverbände wurden dabei mit ca. 2×10^5 metabolisch selektierten Zellen/Well generiert (entspricht ca. 4×10^6 Zellen/ml). Die Konzentration der Kardiomyozyten ist dahingehend bedeutend, als dass es nach Dissoziation zur neuen Ausbildung von Zellkontakten kommen muss und somit eine räumliche Nähe der Kardiomyozyten untereinander entscheidend ist. Hierbei erfolgte auch eine Weiterentwicklung der Aussaatmethode nach Dissoziation, um eine hohe, lokale Konzentrierung von Kardiomyozyten zu erzielen. Experimente, bei denen auf eine solche Konzentrierung verzichtet wurde, zeigten eine Verteilung der dissoziierten Zellen im gesamten Well, mit nur lokal vereinzelt Zellansammlungen in geringer Zellzahl (vgl. Abb. 4.3.6, Abb. 4.3.7, Abb. 4.4.3).

Eine Steigerung in der Generierung kardialer Zellverbände bezüglich Größe und Anzahl/Passage kann durch gezielte Induktion der Kardiogenese im Zuge der Differenzierung weiter untersucht werden. Die hierfür nötigen Schritte sind in Kapitel 1.3.2 bereits näher erläutert. Eine weitere Möglichkeit die Ausbeute an Kardiomyozyten aus Stammzellen zu steigern, ist beispielsweise die Zugabe von Ascorbinsäure, Cardiotrophin-1 oder FGF10 (Khosravi et al., 2022; Mascheck et al., 2015; Perino et al., 2017; Sauer et al., 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden allein die metabolischen Besonderheiten der Kardiomyozyten für die Selektion und Anreicherung genutzt (vgl. Kapitel 1.6.3). Trotz Verzicht auf eine gezielte Induktion der Kardiogenese gelang es durch Optimierung der Laktat-Selektion Ausbeuten von >97% an Kardiomyozyten zu erzielen. Auf Basis von 4×10^6 Zellen/ml konnten flächige, kardiale Monolayer generiert werden. Lichtmikroskopisch wurden dabei synchrone Kontraktionen beobachtet. Ein Nachweis der funktionellen Kopplung erfolgte mittels Calcium-Oszillationsmessungen.

Im Rahmen der durchgeführten Calcium-Messungen ließ sich eine gerichtete Ausbreitung der Calcium-Oszillationen nachweisen. Ein Schrittmacherzentrum wurde nicht identifiziert. In der immunhistochemischen Färbung konnten mehrere lokale Zentren bezüglich der Ausrichtung der Zellen/ Sarkomere identifiziert werden. Eine gerichtete Orientierung innerhalb der generierten Monolayer konnte hingegen nicht festgestellt werden (vgl. Abb. 4.6.2, Abb. 4.6.3).

Um eine gezielte Ausrichtung der Kardiomyozyten zu fördern, ist eine Aufbringung auf Biomaterialien, die als extrazelluläre Matrix dienen, beschrieben (Tsan et al., 2021).

Auch eine externe elektrische Stimulation bzw. mechanische Belastung der Kardiomyozyten kann zur besseren Organisation und Ausrichtung der Zellen beitragen (Dou et al., 2021). Ferner ist eine Generierung kardialer Gewebe aus mehreren Zellarten Gegenstand aktueller Forschung. Giacomelli et al. zeigten eine vermehrte Genexpression von Strukturproteinen der Sarkomere und der Erregungsgenerierung von Kardiomyozyten und eine gleichzeitige Abnahme von fetalen Markergenen bei gemeinsamer Kultivierung mit Endothelzellen im Vergleich zur alleinigen Kultur von Kardiomyozyten (Giacomelli et al., 2017). Auch die gemeinsame Kultivierung von Kardiomyozyten und Fibroblasten führte vermehrt zu einem adulten Phänotyp gegenüber alleiniger Kultivierung von Kardiomyozyten, beispielsweise bezüglich der Zellform und der Troponin-Expression (Beauchamp et al., 2020).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Generierung eines kardialen Monolayers aus embryonalen Stammzellen der Maus ohne aktive Induktion der Kardiomyogenese mittels metabolischer Selektion möglich ist. Im Rahmen der metabolischen Selektion konnte eine starke Abhängigkeit des Erfolgs vom Behandlungsbeginn beobachtet werden. Ferner zeigten sich nach Selektion Kardiomyozyten in verschiedenen Differenzierungsstadien, wobei die Supplementierung mit BAPTA positiven Einfluss auf das Reifungsstadium der Kardiomyozyten hatte. Im Zuge der Calcium-Oszillationsmessungen konnte ein frequenzsteigernder Effekt von Resveratrol in Abhängigkeit der Kulturdauer nachgewiesen werden.

6 Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in Deutschland. Daher hat die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten eine hohe Priorität. So wurden in den letzten Jahrzehnten bedeutende Fortschritte im pharmazeutischen Bereich wie auch in der Herzchirurgie erzielt. Jedoch gilt die Herztransplantation immer noch als Ultima Ratio, wenn andere Therapien nicht den gewünschten Erfolg bringen. Eine vergleichsweise neue Alternative stellt die Erforschung und Entwicklung von Herzgewebe im Labor im Zuge der regenerativen Medizin dar.

Die vorliegende Arbeit gibt einen Überblick über den aktuellen Forschungsstand bezüglich embryonaler Stammzellen der Maus sowie des Menschen und der Differenzierung von Kardiomyozyten im Zuge der Embryonalentwicklung in vivo sowie in vitro. Ferner werden die metabolischen Anpassungsvorgänge während der Differenzierung der Stammzellen hin zu Kardiomyozyten detailliert betrachtet. Diese Unterschiede ermöglichen die in vitro Selektion von Kardiomyozyten vor anderen Zellarten durch Nutzung von Laktat-supplementiertem Zellkultur-Medium.

Im experimentellen Teil dieser Arbeit erfolgt die Anwendung und Optimierung der Laktat-Selektion auf die verwendeten CCE-Stammzellen der Maus. Dabei kann ein Einfluss der Zellkulturdauer auf den Erfolg der Selektion gezeigt werden. Der Behandlungsbeginn mit Laktat-Medium für 4 Tage ab Tag 7 der Differenzierung führt dabei zuverlässig zu Ausbeuten >95%. Es kann eine Reduktion des Anteils von frühen Differenzierungsstadien auf die Gesamtheit der Kardiomyozyten durch Zugabe des intrazellulären Calcium-Chelators BAPTA-AM gezeigt werden. Es erfolgt der Nachweis einer frequenzsteigernden Wirkung von Resveratrol auf metabolisch selektierte Kardiomyozyten. Dieser Effekt ist bei älteren Kardiomyozyten ausgeprägter, jedoch relativ gering im Vergleich zu Isoprenalin. Darüber hinaus werden konfluente, kardiale Monolayer experimentell hergestellt, welche eine funktionelle Kopplung der Erregungsausbreitung aufweisen. Als entscheidende Einflussfaktoren auf die Größe und Konfluenz der Monolayer können die verwendete Zellzahl und Konzentration der Zellen identifiziert werden.

7 Summary

Cardiovascular diseases are the most common cause of death in Germany. Therefore, the development of new therapy options has a high priority. Significant advances have been made in the pharmaceutical field as well as in heart surgery in the last few decades. However, heart transplantation is still considered the last resort when other therapies do not achieve the desired success. A comparatively new alternative is the research and development of heart tissue in the laboratory as part of regenerative medicine.

The present work provides an overview of the current state of research regarding mouse and human embryonic stem cells and the differentiation of cardiomyocytes during embryonic development *in vivo* and *in vitro*. Furthermore, the metabolic adaptation processes during the differentiation of stem cells into cardiomyocytes are discussed in detail. Thus, the difference in enzymatic capacity of cardiomyocytes is utilized in the *in vitro* selection of heart cells by using lactate-supplemented cell culture medium.

In the experimental part of this work, the application and optimization of the described lactate selection is carried out on mouse CCE stem cells. An influence of the cell culture duration on the success of the selection is demonstrated. The start of treatment on day 7 of differentiation with lactate medium for 4 days leads to yields >95% purity of cardiomyocytes. A significant influence of BSA on the proportion of cardiomyocytes is not shown. The addition of the intracellular calcium chelator BAPTA-AM inhibits spontaneous contractions of the dissociated cardiomyocytes. At the same time, a positive influence of BAPTA can be shown by reducing the proportion of early differentiation stages of total cardiomyocytes. A frequency-increasing effect of resveratrol on metabolically selected cardiomyocytes is demonstrated. This effect is more pronounced in older cardiomyocytes, but relatively small compared to isoprenaline. In addition, confluent cardiac monolayers are experimentally produced, which show a functional coupling of the excitation propagation. The number of cells used and the concentration of the cells are identified as decisive factors influencing the size and confluence of the monolayers.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
α -KG	α -Ketoglutarat
Abb.	Abbildung
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ACE-Hemmer	Angiotensin Converting Enzyme Hemmer
(Acetyl)-CoA	(Acetyl)-Coenzym A
ACO-2	Aconitase-2
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
AM	Acetoxymethyl
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP aktivierten Protein Kinase
ANOVA	Analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
AVE	anteriores viszerales Endoderm
Bax	Bcl-2 associated X-Protein
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
BDM	2,3-Butandion-monoxim
BIN-1	box-dependent-interacting protein 1
BiVAD	Bi-Ventricular Assist Device
BMP(2, 4)	Bone Morphogenetic Protein (2, 4)
BSA	Bovines Serum Albumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
c-Myc	Cellular-Myc
ca.	circa
Ca-CaM	Ca ²⁺ -Calmodulin-Komplex
CaMKII	Ca ²⁺ -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	Zyklische Adenosinmonophosphat
CD(36, 46, 55, 59)	Cluster of Differentiation (36, 46, 55, 59)
CDK(2)	cyclin-dependent kinase (2)
CER1	Cerberus 1

CICR	calcium induced calcium release
COX	Cyclooxygenase
CPT-1	Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1
CSQ	Calsequestrin
CXCR2/4	C-X-C motif chemokine Receptor 2/ 4
D-/L-	Rechts-/ Linksdrehend
D	Tag
d	Tage
dest.	destilliert
DHPR	Dihydropyridin-Rezeptor
Dkk1	Dickkopf-1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Drp1	Dynamamin-related protein 1
DVE	Distales viszerales Endoderm
E(7,5; 8)	embryonic day (7,5; 8)
EB	Embryoid Body
EBs	Embryoid Bodies
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
Engl.	englisch
EOMES	Eomesodermin
Epac1	Exchange Protein directly Activated by cAMP 1
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
ERR(α , β , γ)	Estrogen-Related Receptor (α , β , γ)
et al.	Und andere (et alii)
ExEk	extraembryonalen Ektoderm
F/F ₀	Relative Signalintensität
FCS	Fetales Kälberserum
FGF(8,10)	Fibroblast Growth Factor (8,10)
FHF	First heart field
FIS1	Fission protein 1
FOXO4	Forkhead-box-Protein O4
<i>g</i>	Erdbeschleunigung

G418	Geneticin
GATA4	GATA binding protein 4
ggf.	gegebenenfalls
GLUT(1, 4)	Glucose Transporter (1, 4)
GPO	Glutathion-Peroxidase
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
h	Stunde(n)
HCN(4)	Hyperpolarization-activated and Cyclic Nucleotide-gated ion channel (4)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
Hh	Hedgehog
HiF-1 α	Hypoxie induzierten Faktor 1 α
hiFCS	Hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum
HOPX	Homeodomain Only Protein homeobox
Id	Inhibitor of DNA-binding
IDH-2/3	Isocitrat-Dehydrogenase-2/3
IGF(1, 2)	Insulin-like Growth Factor (1, 2)
IgG, IgM	Immunglobulin Klasse G, M
IL(-1, -6)	Interleukin (-1, -6)
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
Isl1	Islet-1
JAK	Januskinase
K _{ir} 2.1	<u>inward-rectifier potassium channel</u>
Klf(4, 5)	Krüppel Like Factor (4, 5)
L+B	Lac+BSA-Medium
Lac	Laktat-Medium
LDH	Laktatdehydrogenase
LEFTY1	Left-right determination factor 1
LiF	Leukämie inhibierender Faktor
LKB1	Leber-Kinase-B 1
LTCC	L-Typ Calcium-Kanals
LVAD	Left-Ventricular Assist Device
M	Molar
μ g	Mikrogramm

μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
MAP	Mitogen Activated Protein
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCU	Mitochondrialer Uniporter
MDM2	Murine Double Minute 2
Mef2c	Myocyte-specific Enhancer Factor 2c
Meis1	Myeloid Ecotropic viral Integration Site 1
MEK(1)	MAP-ERK-Kinase (1)
Mesp1	Mesoderm Posterior factor 1
MFN2	Mitofusin-2
mg	Milligramm
MHC	Myosin Heavy Chain
MIF	Macrophage migration Inhibitory Factor
min	Minute(n)
miR	microRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ms	Millisekunden
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
mTORC(1, 2)	mTOR-Komplex (1, 2)
n	Anzahl der Versuche
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NEAA	Non-essential Amino Acids
NCX	Na ⁺ - Ca ²⁺ -Austauscher
NF-κB	Nuclear factor kappa B
Nkx2.5	Nk2 homeobox 5
nm	Nanometer
NRF(1, 2)	Nuclear Respiratory Factor (1, 2)
ns	nicht signifikant
Oct(3, 4)	Octamer-binding Transcription Factor (3, 4)
OPA1	Optic Atrophy-1
OXPPOS	oxidative Phosphorylierung

p	Wahrscheinlichkeit
PACE4	Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme 4
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung +Triton X
PDE4	Phosphodiesterase 4
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PGC-1 α	PPAR-Gamma Coactivator-1 α
Pi3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLN	Phospholamban
PPAR (α , β , δ)	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (α , β , δ)
Prickle1	Prickle planar cell polarity protein 1
PS	Primitivstreifen
QR-Code	Quick response Code
R	Rest
Ras	Rat Sarcoma
RasGRP3	Ras- Guanyl nucleotide Releasing Peptide 3
Rex1	Reduced Expression 1
RM-ANOVA	Repeated measures-ANOVA
ROI	region of interest
ROS	Reactive Oxygen Species
RVAD	Right-Ventricular Assist Device
RyR2	Ryanodin-Rezeptoren Typ 2
s	Sekunde
SERCA(2)	sarkoendoplasmatische Retikulum Calcium ATPase (2)
SGLT2	Sodium Glucose Transporter 2
SHF	second heart field
SIRT1	Sirtuin 1
Smad5	Mothers against decapentaplegic homolog 5
SOD	Superoxiddismutase
sog.	sogenannt
Sox(2, 17)	Sex determining region Y-box (2, 17)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STAT(3)	Signal Transducers and Activators of Transcription (3)
t	Zeit

T-Tubulus	Transverser Tubulus
Tbx(1, 5)	T-box transcription factor (1, 5)
Tcf3	Transcription Factor 3
TFAM	Mitochondrial Transcription Factor A
TLR4	Toll-Like Receptor 4
TTP	Time To Peak
u.a.	unter anderem
U/ml	Einheiten pro ml
UCP-2	Uncoupling protein 2
VE	viszerales Endoderm
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
v.a.	vor allem
Vol.-%	Volumenprozent
vs.	versus
Wnt (3)	Wingless/ Int-1 (3)
YAP(1)	Yes-associated Protein (1)
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
%	Prozent

9 Literaturverzeichnis

Ahmed RE, Tokuyama T, Anzai T, Chanthra N, Uosaki H. Sarcomere maturation: function acquisition, molecular mechanism, and interplay with other organelles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2022;377(1864):20210325. doi:10.1098/rstb.2021.0325

Ali SR, Hippenmeyer S, Saadat LV, Luo L, Weissman IL, Ardehali R. Existing cardiomyocytes generate cardiomyocytes at a low rate after birth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(24):8850-5. doi:10.1073/pnas.1408233111

Andersen P, Tampakakis E, Jimenez DV, et al. Precardiac organoids form two heart fields via Bmp/Wnt signaling. *Nat Commun.* 2018;9(1):3140. doi:10.1038/s41467-018-05604-8

Arnold SJ, Hofmann UK, Bikoff EK, Robertson EJ. Pivotal roles for eomesodermin during axis formation, epithelium-to-mesenchyme transition and endoderm specification in the mouse. *Development.* 2008;135(3):501-11. doi: 10.1242/dev.014357

Bai T, Hu X, Zheng Y, Wang S, Kong J, Cai L. Resveratrol protects against lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction by enhancing SERCA2a activity through promoting the phospholamban oligomerization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016;311(4):H1051-H1062. doi: 10.1152/ajpheart.00296.2016

Balshaw DM, Yamaguchi N, Meissner G. Modulation of intracellular calcium-release channels by calmodulin. *J Membr Biol.* 2002;185(1):1-8. doi: 10.1007/s00232-001-0111-4

Bar-Nun S, Shneyour Y, Beckmann JS. G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochim Biophys Acta.* 1983;741(1):123-7. doi: 10.1016/0167-4781(83)90018-0

Barnard CN. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S Afr Med J.* 1967;41(48):1271-4

Barrick SK, Greenberg MJ. Cardiac myosin contraction and mechanotransduction in health and disease. *J Biol Chem.* 2021;297(5):101297. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101297

Baur JA, Pearson KJ, Price NL, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature.* 2006;444(7117):337-342. doi:10.1038/nature05354

Beauchamp P, Jackson CB, Ozathil LC, et al. 3D Co-culture of hiPSC-Derived Cardiomyocytes With Cardiac Fibroblasts Improves Tissue-Like Features of Cardiac Spheroids. *Front Mol Biosci.* 2020;7:14. doi:10.3389/fmolb.2020.00014

Ben-Haim N, Lu C, Guzman-Ayala M, et al. The nodal precursor acting via activin receptors induces mesoderm by maintaining a source of its convertases and BMP4. *Dev Cell.* 2006;11(3):313-323. doi:10.1016/j.devcel.2006.07.005

Ben-Johny M, Yue DT. Calmodulin regulation (calmodulation) of voltage-gated calcium channels. *J Gen Physiol.* 2014;143(6):679-692. doi:10.1085/jgp.201311153

Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science.* 2009;324(5923):98-102. doi:10.1126/science.1164680

Bernal-Ramírez J, Silva-Platas C, Jerjes-Sánchez C, et al. Resveratrol Prevents Right Ventricle Dysfunction, Calcium Mishandling, and Energetic Failure via SIRT3 Stimulation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:9912434. doi:10.1155/2021/9912434

Berry MN, Friend DS, Scheuer J. Morphology and metabolism of intact muscle cells isolated from adult rat heart. *Circ Res.* 1970;26(6):679-87. doi: 10.1161/01.res.26.6.679

Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002;415(6868):198-205. doi: 10.1038/415198a

Bishop SP, Zhou Y, Nakada Y, Zhang J. Changes in Cardiomyocyte Cell Cycle and Hypertrophic Growth During Fetal to Adult in Mammals. *J Am Heart Assoc.* 2021;10(2):e017839. doi:10.1161/JAHA.120.017839

Bloomekatz J, Singh R, Prall OW, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF) signaling directs cardiomyocyte movement toward the midline during heart tube assembly. *Elife.* 2017;6:e21172. doi:10.7554/eLife.21172

Böttcher W, Woysch H; Die erste erfolgreiche herzchirurgische Operation mit Hilfe der Herz-Lungen-Maschine; *Z Herz- Thorax- Gefäßchir.* 2006;20:248–260. doi:10.1007/s00398-006-0551-3

Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res.* 2002;91(3):189-201. doi:10.1161/01.res.0000027865.61704.32

Boily G, He XH, Pearce B, Jardine K, McBurney MW. SirT1-null mice develop tumors at normal rates but are poorly protected by resveratrol. *Oncogene*. 2009;28(32):2882-2893. doi:10.1038/onc.2009.147

Bolli R, Mitrani RD, Hare JM, et al. A Phase II study of autologous mesenchymal stromal cells and c-kit positive cardiac cells, alone or in combination, in patients with ischaemic heart failure: the CCTRNCONCERT-HF trial. *Eur J Heart Fail*. 2021;23(4):661-674. doi:10.1002/ejhf.2178

Bondue A, Lapouge G, Paulissen C, et al. Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. *Cell Stem Cell*. 2008;3(1):69-84. doi:10.1016/j.stem.2008.06.009

Bourillot PY, Aksoy I, Schreiber V, et al. Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog. *Stem Cells*. 2009;27(8):1760-1771. doi:10.1002/stem.110

Brade T, Pane LS, Moretti A, Chien KR, Laugwitz KL. Embryonic heart progenitors and cardiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(10):a013847. doi:10.1101/cshperspect.a013847

Brennan J, Lu CC, Norris DP, Rodriguez TA, Beddington RS, Robertson EJ. Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo. *Nature*. 2001;411(6840):965-9. doi:10.1038/35082103

Briggs LE, Burns TA, Lockhart MM, Phelps AL, Van den Hoff MJ, Wessels A. Wnt/ β -catenin and sonic hedgehog pathways interact in the regulation of the development of the dorsal mesenchymal protrusion. *Dev Dyn*. 2016;245(2):103-13. doi:10.1002/dvdy.24339

Brito PM, Devillard R, Nègre-Salvayre A, et al. Resveratrol inhibits the mTOR mitogenic signaling evoked by oxidized LDL in smooth muscle cells [published correction appears in *Atherosclerosis*. 2019 Jun;285:178]. *Atherosclerosis*. 2009;205(1):126-134. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.11.011

Brito VB, Nascimento LVM, Moura DJ, Saffi J. Cardioprotective Effect of Maternal Supplementation with Resveratrol on Toxicity Induced by Doxorubicin in Offspring Cardiomyocytes. Efeito Cardioprotetor da Suplementação Materna com Resveratrol sobre a Toxicidade Induzida por Doxorubicina em Cardiomiócitos de Neonatos. *Arq Bras Cardiol*. 2021;117(6):1147-1158. doi:10.36660/abc.20200752

Brown CB, Wenning JM, Lu MM, Epstein DJ, Meyers EN, Epstein JA. Cre-mediated excision of *Fgf8* in the *Tbx1* expression domain reveals a critical role for *Fgf8* in cardiovascular development in the mouse [published correction appears in *Dev Biol*. 2004;271(1):223]. *Dev Biol*. 2004;267(1):190-202. doi:10.1016/j.ydbio.2003.10.024

Buggisch M, Ateghang B, Ruhe C, et al. Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 5):885-894. doi:10.1242/jcs.03386

Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem*. 2002;50(11):3337-40. doi: 10.1021/jf0112973

Butova XA, Myachina TA, Khokhlova AD. A combined Langendorff-injection technique for simultaneous isolation of single cardiomyocytes from atria and ventricles of the rat heart. *MethodsX*. 2020;8:101189. doi: 10.1016/j.mex.2020.101189

Camacho P, Fan H, Liu Z, He JQ. Small mammalian animal models of heart disease. *Am J Cardiovasc Dis*. 2016;6(3):70-80

Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009;458(7241):1056-1060. doi:10.1038/nature07813

Cardoso AC, Lam NT, Savla JJ, et al. Mitochondrial Substrate Utilization Regulates Cardiomyocyte Cell Cycle Progression. *Nat Metab*. 2020;2(2):167-178.

Carey BW, Finley LW, Cross JR, Allis CD, Thompson CB. Intracellular α -ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*. 2015;518(7539):413-6. doi: 10.1038/nature13981

Carrizzo A, Forte M, Damato A, et al. Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food Chem Toxicol*. 2013;61:215-226. doi:10.1016/j.fct.2013.07.021

Cassidy A, Hanley B, Lamuela-Raventos RM. Isoflavones, lignans and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to human health. *J Sci Food Agric*. 2000;80(7):1044-1062. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1044::AID-JSFA586>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1044::AID-JSFA586>3.0.CO;2-N)

Chen B, Guo A, Zhang C, et al. Critical roles of junctophilin-2 in T-tubule and excitation-contraction coupling maturation during postnatal development. *Cardiovasc Res*. 2013;100(1):54-62. doi:10.1093/cvr/cvt180

Cheng H, Lederer WJ. Calcium sparks. *Physiol Rev.* 2008;88(4):1491-545. doi:10.1152/physrev.00030.2007

Chiapparo G, Lin X, Lescroart F, et al. Mesp1 controls the speed, polarity, and directionality of cardiovascular progenitor migration. *J Cell Biol.* 2016;213(4):463-477. doi:10.1083/jcb.201505082

Colombe AS, Pidoux G. Cardiac cAMP-PKA Signaling Compartmentalization in Myocardial Infarction. *Cells.* 2021;10(4):922. doi:10.3390/cells10040922

Cooper DK, Ekser B, Ramsoondar J, Phelps C, Ayares D. The role of genetically engineered pigs in xenotransplantation research. *J Pathol.* 2016;238(2):288-299. doi:10.1002/path.4635

Cooper DKC, Gaston R, Eckhoff D, et al. Xenotransplantation-the current status and prospects. *Br Med Bull.* 2018;125(1):5-14. doi:10.1093/bmb/ldx043

Créton R, Speksnijder JE, Jaffe LF. Patterns of free calcium in zebrafish embryos. *J Cell Sci.* 1998;111 (Pt 12):1613-1622. doi:10.1242/jcs.111.12.1613

Cuello F, Herberg FW, Stathopoulou K, Henning P, Diering S. Regulation of Cardiac PKA Signaling by cAMP and Oxidants. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(5):663. doi:10.3390/antiox10050663

Dang X, Doble BW, Kardami E. The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Mol Cell Biochem.* 2003;242(1-2):35-38.

Das SK, Wang W, Zhabyeyev P, et al. Iron-overload injury and cardiomyopathy in acquired and genetic models is attenuated by resveratrol therapy. *Sci Rep.* 2015;5:18132. doi:10.1038/srep18132

Dasgupta B, Milbrandt J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(17):7217-22. doi:10.1073/pnas.0610068104

De La Mata A, Tajada S, O'Dwyer S, et al. BIN1 Induces the Formation of T-Tubules and Adult-Like Ca²⁺ Release Units in Developing Cardiomyocytes. *Stem Cells.* 2019;37(1):54-64. doi:10.1002/stem.2927

DePalma SJ , Davidson CD , Stis AE , Helms AS , Baker BM . Microenvironmental determinants of organized iPSC-cardiomyocyte tissues on synthetic fibrous matrices. *Biomater Sci.* 2021;9(1):93-107. doi:10.1039/d0bm01247e

Di Stefano V, Giacca M, Capogrossi MC, Crescenzi M, Martelli F. Knockdown of cyclin-dependent kinase inhibitors induces cardiomyocyte re-entry in the cell cycle. *J Biol Chem*. 2011;286(10):8644-8654. doi:10.1074/jbc.M110.184549

Ding H, Xu X, Qin X, Yang C, Feng Q. Resveratrol promotes differentiation of mouse embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Cardiovasc Ther*. 2016;34(4):283-9. doi:10.1111/1755-5922.12200

Ding Q, Qi Y, Tsang SY. Mitochondrial Biogenesis, Mitochondrial Dynamics, and Mitophagy in the Maturation of Cardiomyocytes. *Cells*. 2021;10(9):2463. doi:10.3390/cells10092463

Doevendans PA, Kubalak SW, An RH, Becker DK, Chien KR, Kass RS. Differentiation of cardiomyocytes in floating embryoid bodies is comparable to fetal cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32(5):839-851. doi:10.1006/jmcc.2000.1128

Dou W, Wang L, Malhi M, et al. A microdevice platform for characterizing the effect of mechanical strain magnitudes on the maturation of iPSC-Cardiomyocytes. *Biosens Bioelectron*. 2021;175:112875. doi:10.1016/j.bios.2020.112875

Dyer LA, Kirby ML. Sonic hedgehog maintains proliferation in secondary heart field progenitors and is required for normal arterial pole formation. *Dev Biol*. 2009;330(2):305-17. doi:10.1016/j.ydbio.2009.03.028

Dzeja PP, Chung S, Faustino RS, Behfar A, Terzic A. Developmental enhancement of adenylate kinase-AMPK metabolic signaling axis supports stem cell cardiac differentiation. *PLoS One*. 2011;6(4):e19300. doi:10.1371/journal.pone.0019300

Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ Res*. 2017;121(2):181-195. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.310230

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-6. doi:10.1038/292154a0

Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*. 1983;245(1):C1-14. doi:10.1152/ajpcell.1983.245.1.C1

Facucho-Oliveira JM, Alderson J, Spikings EC, Egginton S, St John JC. Mitochondrial DNA replication during differentiation of murine embryonic stem cells. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 22):4025-34. doi:10.1242/jcs.016972

Fearnley CJ, Roderick HL, Bootman MD. Calcium signaling in cardiac myocytes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(11):a004242. doi: 10.1101/cshperspect.a004242

Fiegle DJ, Volk T, Seidel T. Isolation of Human Ventricular Cardiomyocytes from Vibratome-Cut Myocardial Slices. *J Vis Exp.* 2020;(159). doi: 10.3791/61167

Folmes CD, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, et al. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab.* 2011;14(2):264-271. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.011

Fraiz GM, da Conceição AR, de Souza Vilela DL, Rocha DMUP, Bressan J, Hermsdorff HHM. Can resveratrol modulate sirtuins in obesity and related diseases? A systematic review of randomized controlled trials. *Eur J Nutr.* 2021;60(6):2961-2977. doi:10.1007/s00394-021-02623-y

Fu Q, Kim S, Soto D, et al. A long lasting β 1 adrenergic receptor stimulation of cAMP/protein kinase A (PKA) signal in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2014;289(21):14771-14781. doi:10.1074/jbc.M113.542589

Fu X, Li M, Tang C, Huang Z, Najafi M. Targeting of cancer cell death mechanisms by resveratrol: a review. *Apoptosis.* 2021;26(11-12):561-573. doi: 10.1007/s10495-021-01689-7

Fuerstenau-Sharp M, Zimmermann ME, Stark K, et al. Generation of highly purified human cardiomyocytes from peripheral blood mononuclear cell-derived induced pluripotent stem cells. *PLoS One.* 2015;10(5):e0126596. doi:10.1371/journal.pone.0126596

Funakoshi S, Fernandes I, Mastikhina O, et al. Generation of mature compact ventricular cardiomyocytes from human pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 2021;12(1):3155. doi:10.1038/s41467-021-23329-z

Gallego-Sandín S, Novalbos J, Rosado A, et al. Albumin prevents mitochondrial depolarization and apoptosis elicited by endoplasmic reticulum calcium depletion of neuroblastoma cells. *Eur J Pharmacol.* 2005;520(1-3):1-11. doi:10.1016/j.ejphar.2005.06.044

Giacomelli E, Bellin M, Sala L, et al. Three-dimensional cardiac microtissues composed of cardiomyocytes and endothelial cells co-differentiated from human pluripotent stem cells. *Development.* 2017;144(6):1008-1017. doi:10.1242/dev.143438

Giacomelli E, Meraviglia V, Campostrini G, et al. Human-iPSC-Derived Cardiac Stromal Cells Enhance Maturation in 3D Cardiac Microtissues and Reveal Non-cardiomyocyte

Contributions to Heart Disease. *Cell Stem Cell*. 2020;26(6):862-879.e11. doi:10.1016/j.stem.2020.05.004

Gilbert G, Demydenko K, Dries E, Puertas RD, Jin X, Sipido K, Roderick HL. Calcium Signaling in Cardiomyocyte Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2020;12(3):a035428. doi: 10.1101/cshperspect.a035428

Glaves JP, Primeau JO, Espinoza-Fonseca LM, Lemieux MJ, Young HS. The Phospholamban Pentamer Alters Function of the Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump SERCA. *Biophys J*. 2019;116(4):633-647. doi: 10.1016/j.bpj.2019.01.013.

Glaves JP, Primeau JO, Gorski PA, Espinoza-Fonseca LM, Lemieux MJ, Young HS. Interaction of a Sarcolipin Pentamer and Monomer with the Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump, SERCA. *Biophys J*. 2020;118(2):518-531. doi: 10.1016/j.bpj.2019.11.3385

Gomes BAQ, Silva JPB, Romeiro CFR, et al. Neuroprotective Mechanisms of Resveratrol in Alzheimer's Disease: Role of SIRT1. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:8152373. doi:10.1155/2018/8152373

Gong G, Song M, Csordas G, Kelly DP, Matkovich SJ, Dorn GW 2nd. Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation in mice. *Science*. 2015;350(6265):aad2459. doi: 10.1126/science.aad2459

Good AH, Cooper DK, Malcolm AJ, et al. Identification of carbohydrate structures that bind human antiporcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans. *Transplant Proc*. 1992;24(2):559-562.

Guan K, Rohwedel J, Wobus AM. Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *Cytotechnology*. 1999;30(1-3):211-226. doi:10.1023/A:1008041420166

Guo Y, Cao Y, Jardin BD, et al. Sarcomeres regulate murine cardiomyocyte maturation through MRTF-SRF signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(2):e2008861118. doi:10.1073/pnas.2008861118

Guo Y, Pu WT. Cardiomyocyte Maturation: New Phase in Development. *Circ Res*. 2020;126(8):1086-1106. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315862

Györke I, Hester N, Jones LR, Györke S. The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophys J*. 2004;86(4):2121-8. doi: 10.1016/S0006-3495(04)74271-X

Hara H, Long C, Lin YJ, et al. In vitro investigation of pig cells for resistance to human antibody-mediated rejection. *Transpl Int*. 2008;21(12):1163-1174. doi:10.1111/j.1432-2277.2008.00736.x

Haraguchi S, Kitajima S, Takagi A, Takeda H, Inoue T, Saga Y. Transcriptional regulation of *Mesp1* and *Mesp2* genes: differential usage of enhancers during development. *Mech Dev*. 2001;108(1-2):59-69. doi: 10.1016/s0925-4773(01)00478-6

Harary I, Farley B. In vitro studies of single isolated beating heart cells. *Science*. 1960;131(3414):1674-5. doi: 10.1126/science.131.3414.1674

Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 23):5479-87. doi: 10.1242/jcs.01540

He Y, Lu X, Chen T, et al. Resveratrol protects against myocardial ischemic injury via the inhibition of NF- κ B-dependent inflammation and the enhancement of antioxidant defenses. *Int J Mol Med*. 2021;47(3):29. doi:10.3892/ijmm.2021.4862

Heallen T, Zhang M, Wang J, et al. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science*. 2011;332(6028):458-461. doi:10.1126/science.1199010

Herron TJ, Rocha AM, Campbell KF, et al. Extracellular Matrix-Mediated Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Monolayer Structure and Electrophysiological Function. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2016;9(4):e003638. doi:10.1161/CIRCEP.113.003638

Hong T, Shaw RM. Cardiac T-Tubule Microanatomy and Function. *Physiol Rev*. 2017;97(1):227-252. doi: 10.1152/physrev.00037.2015

Hoong CWS, Chua MWJ. SGLT2 Inhibitors as Calorie Restriction Mimetics: Insights on Longevity Pathways and Age-Related Diseases. *Endocrinology*. 2021;162(8):bqab079. doi: 10.1210/endo/bqab079

Hoque A, Sivakumaran P, Bond ST, et al. Mitochondrial fission protein Drp1 inhibition promotes cardiac mesodermal differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Death Discov*. 2018;4:39. doi:10.1038/s41420-018-0042-9

Hoshino H, Shioi G, Aizawa S. AVE protein expression and visceral endoderm cell behavior during anterior-posterior axis formation in mouse embryos: Asymmetry in OTX2 and DKK1 expression. *Dev Biol*. 2015;402(2):175-91. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.03.023

Hotchkiss A, Feridooni T, Zhang F, Pasumarthi KB. The effects of calcium channel blockade on proliferation and differentiation of cardiac progenitor cells. *Cell Calcium*. 2014;55(5):238-51. doi: 10.1016/j.ceca.2014.02.018

Hou X, Xu S, Maitland-Toolan KA, et al. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2008;283(29):20015-20026. doi:10.1074/jbc.M802187200

Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 2003;425(6954):191-6. doi: 10.1038/nature01960

Hsich EM, Blackstone EH, Thuita LW, et al. Heart Transplantation: An In-Depth Survival Analysis. *JACC Heart Fail*. 2020;8(7):557-568. doi:10.1016/j.jchf.2020.03.014

Hu D, Linders A, Yamak A, et al. Metabolic Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes by Inhibition of HIF1 α and LDHA. *Circ Res*. 2018;123(9):1066-1079. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313249

Huang TC, Lu KT, Wo YY, Wu YJ, Yang YL. Resveratrol protects rats from A β -induced neurotoxicity by the reduction of iNOS expression and lipid peroxidation. *PLoS One*. 2011;6(12):e29102. doi: 10.1371/journal.pone.0029102

Huang Y, Lu J, Zhan L, et al. Resveratrol-induced Sirt1 phosphorylation by LKB1 mediates mitochondrial metabolism. *J Biol Chem*. 2021;297(2):100929. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100929

Hue L, Taegtmeyer H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297(3):E578-91. doi: 10.1152/ajpendo.00093.2009

Hui S, Ghergurovich JM, Morscher RJ, et al. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature*. 2017;551(7678):115-118. doi: 10.1038/nature24057

Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest*. 2003;111(6):843-50. doi: 10.1172/JCI16502

Ilagan R, Abu-Issa R, Brown D, et al. Fgf8 is required for anterior heart field development. *Development*. 2006;133(12):2435-45. doi: 10.1242/dev.02408

Intlekofer AM, Finley LWS. Metabolic signatures of cancer cells and stem cells. *Nat Metab*. 2019;1(2):177-188. doi: 10.1038/s42255-019-0032-0

Inoue R, Nishiyama K, Li J, et al. The Feasibility and Applicability of Stem Cell Therapy for the Cure of Type 1 Diabetes. *Cells*. 2021;10(7):1589. doi:10.3390/cells10071589

Ito K, Ito K. Metabolism and the Control of Cell Fate Decisions and Stem Cell Renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2016;32:399-409. doi: 10.1146/annurev-cellbio-111315-125134

Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(29):12017-22. doi: 10.1073/pnas.0705070104

Jain R, Li D, Gupta M, et al. HEART DEVELOPMENT. Integration of Bmp and Wnt signaling by Hopx specifies commitment of cardiomyoblasts. *Science*. 2015;348(6242):aaa6071. doi: 10.1126/science.aaa6071

Jang H, Kim TW, Yoon S, et al. O-GlcNAc regulates pluripotency and reprogramming by directly acting on core components of the pluripotency network. *Cell Stem Cell*. 2012;11(1):62-74. doi: 10.1016/j.stem.2012.03.001

Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997;275(5297):218-20. doi: 10.1126/science.275.5297.218

Jeyaraman MM, Fandrich RR, Kardami E. Together and apart: inhibition of DNA synthesis by connexin-43 and its relationship to transforming growth factor β . *Front Pharmacol*. 2013;4:90. doi: 10.3389/fphar.2013.00090

Jing Y, Machon O, Hampl A, et al. In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells into neurons of the dorsal forebrain. *Cell Mol Neurobiol*. 2011;31(5):715-27. doi: 10.1007/s10571-011-9669-2

Jing Y, Ren Y, Witzel HR, Dobrova G. A BMP4-p38 MAPK signaling axis controls ISL1 protein stability and activity during cardiogenesis. *Stem Cell Reports*. 2021;16(8):1894-1905. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.06.017

Jones NR, Roalfe AK, Adoki I, Hobbs FDR, Taylor CJ. Survival of patients with chronic heart failure in the community: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Heart Fail*. 2019;21(11):1306-1325. doi: 10.1002/ejhf.1594

Kabaeva Z, Zhao M, Michele DE. Blebbistatin extends culture life of adult mouse cardiac myocytes and allows efficient and stable transgene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(4):H1667-74. doi: 10.1152/ajpheart.01144.2007

Kadokia S, Moore R, Ambur V, Toyoda Y. Current status of the implantable LVAD. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2016;64(9):501-8. doi: 10.1007/s11748-016-0671-y

Kalantari H, Das DK. Physiological effects of resveratrol. *Biofactors*. 2010;36(5):401-6. doi: 10.1002/biof.100

Kasahara A, Cipolat S, Chen Y, Dorn GW 2nd, Scorrano L. Mitochondrial fusion directs cardiomyocyte differentiation via calcineurin and Notch signaling. *Science*. 2013;342(6159):734-7. doi: 10.1126/science.1241359

Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, et al. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell*. 2011;8(2):228-40. doi: 10.1016/j.stem.2010.12.008

Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7(6):862-9. doi: 10.1016/0955-0674(95)80071-9

Kempf H, Andree B, Zweigerdt R. Large-scale production of human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;96:18-30. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.016

Kenessey A, Ojamaa K. Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways. *J Biol Chem*. 2006;281(30):20666-20672. doi: 10.1074/jbc.M512671200

Khosravi F, Ahmadvand N, Wartenberg M, Sauer H. Induction of Stem-Cell-Derived Cardiomyogenesis by Fibroblast Growth Factor 10 (FGF10) and Its Interplay with Cardiotrophin-1 (CT-1). *Biology (Basel)*. 2022;11(4):534. doi: 10.3390/biology11040534

Kim H, Jang H, Kim TW, et al. Core Pluripotency Factors Directly Regulate Metabolism in Embryonic Stem Cell to Maintain Pluripotency. *Stem Cells*. 2015;33(9):2699-711. doi: 10.1002/stem.2073

Kim TY, Chung HM, Lee KH, et al. The Cardioprotective Effects of Resveratrol via Anti-Apoptosis in Hypoxic Injury of Myocardial Cells. *Korean Circ J*. 2007;37(9):408-413. doi: 10.4070/kcj.2007.37.9.408

Kirby ML, Gale TF, Stewart DE. Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science*. 1983;220(4601):1059-61. doi: 10.1126/science.6844926

Kirklin JK, Naftel DC, Bourge RC, et al. Evolving trends in risk profiles and causes of death after heart transplantation: a ten-year multi-institutional study. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;125(4):881-90. doi: 10.1067/mtc.2003.168

Kitajima S, Takagi A, Inoue T, Saga Y. MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development*. 2000;127(15):3215-26. doi: 10.1242/dev.127.15.3215

Klaus A, Müller M, Schulz H, et al. Wnt/ β -catenin and Bmp signals control distinct sets of transcription factors in cardiac progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(27):10921-6. doi: 10.1073/pnas.1121236109

Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest*. 1996;98(1):216-24. doi: 10.1172/JCI118769

Kotini M, Barriga EH, Leslie J, et al. Gap junction protein Connexin-43 is a direct transcriptional regulator of N-cadherin in vivo [published correction appears in *Nat Commun*. 2018 Nov 1;9(1):4633]. *Nat Commun*. 2018;9(1):3846. doi:10.1038/s41467-018-06368-x

Kottmair S, Frye C, Ziegenhagen DJ. Germany's disease management program: improving outcomes in congestive heart failure. *Health Care Financ Rev*. 2005;27(1):79-87

Kotz D. In memoriam: David Bennett, Sr. (2022), Textquelle, URL: <https://www.medschool.umaryland.edu/news/2022/IN-MEMORIAM-David-Bennett-Sr.html> (Stand: 20.03.2022) **[a]**

Kotz D. University of Maryland School of Medicine Faculty Scientists and Clinicians Perform Historic First Successful Transplant of Porcine Heart into Adult Human with End-Stage Heart Disease (2022), Textquelle, URL: <https://www.medschool.umaryland.edu/news/2022/University-of-Maryland-School-of-Medicine-Faculty-Scientists-and-Clinicians-Perform-Historic-First-Successful-Transplant-of-Porcine-Heart-into-Adult-Human-with-End-Stage-Heart-Disease.html> (Stand: 14.02.2022) **[b]**

Kowalski WJ, Garcia-Pak IH, Li W, et al. Sympathetic Neurons Regulate Cardiomyocyte Maturation in Culture. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:850645. doi: 10.3389/fcell.2022.850645

Krishnan A, Samtani R, Dhanantwari P, et al. A detailed comparison of mouse and human cardiac development. *Pediatr Res*. 2014;76(6):500-7. doi: 10.1038/pr.2014.128

Krishnan J, Ahuja P, Bodenmann S, et al. Essential role of developmentally activated hypoxia-inducible factor 1alpha for cardiac morphogenesis and function. *Circ Res.* 2008;103(10):1139-46. doi: 10.1161/01.RES.0000338613.89841.c1

Krüger M, Sachse C, Zimmermann WH, et al. Thyroid hormone regulates developmental titin isoform transitions via the phosphatidylinositol-3-kinase/ AKT pathway. *Circ Res.* 2008;102(4):439-47. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.162719

Kwon C, Qian L, Cheng P, et al. A regulatory pathway involving Notch1/beta-catenin/Isl1 determines cardiac progenitor cell fate. *Nat Cell Biol.* 2009;11(8):951-7. doi: 10.1038/ncb1906

Laco F, Lam AT, Woo TL, et al. Selection of human induced pluripotent stem cells lines optimization of cardiomyocytes differentiation in an integrated suspension microcarrier bioreactor. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):118. doi: 10.1186/s13287-020-01618-6

Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell.* 2006;127(6):1109-22. doi: 10.1016/j.cell.2006.11.013

Lahmers S, Wu Y, Call DR, Labeit S, Granzier H. Developmental control of titin isoform expression and passive stiffness in fetal and neonatal myocardium. *Circ Res.* 2004;94(4):505-13. doi: 10.1161/01.RES.0000115522.52554.86

Laks JA, Dipchand AI. Cardiac allograft vasculopathy: A review. *Pediatr Transplant.* 2022;26(3):e14218. doi:10.1111/petr.14218

Langendorff, O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch.* 1895;61, 291–332.

Larue L, Antos C, Butz S, et al. A role for cadherins in tissue formation. *Development.* 1996;122(10):3185-94. doi: 10.1242/dev.122.10.3185

Lee WJ, Kim M, Park HS, et al. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;340(1):291-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.12.011

Leong DP, McMurray JJV, Joseph PG, Yusuf S. From ACE Inhibitors/ARBs to ARNIs in Coronary Artery Disease and Heart Failure (Part 2/5). *J Am Coll Cardiol.* 2019;74(5):683-698. doi: 10.1016/j.jacc.2019.04.068

Leu M, Ehler E, Perriard JC. Characterisation of postnatal growth of the murine heart. *Anat Embryol (Berl).* 2001;204(3):217-24. doi: 10.1007/s004290100206

Lew M. Good statistical practice in pharmacology. Problem 2. *Br J Pharmacol*. 2007 Oct;152(3):299-303. doi: 10.1038/sj.bjp.0707372

Lewis SL, Tam PP. Definitive endoderm of the mouse embryo: formation, cell fates, and morphogenetic function. *Dev Dyn*. 2006;235(9):2315-29. doi: 10.1002/dvdy.20846

Lexer G, Cooper DK, Rose AG, et al. Hyperacute rejection in a discordant (pig to baboon) cardiac xenograft model. *J Heart Transplant*. 1986;5(6):411-8

Li H, Liu C, Bao M, et al. Optimized Langendorff perfusion system for cardiomyocyte isolation in adult mouse heart. *J Cell Mol Med*. 2020;24(24):14619-14625. doi: 10.1111/jcmm.15773 **[a]**

Li M, Iismaa SE, Naqvi N, et al. Thyroid hormone action in postnatal heart development. *Stem Cell Res*. 2014;13(3 Pt B):582-91. doi: 10.1016/j.scr.2014.07.001

Li P, Cavallero S, Gu Y, et al. IGF signaling directs ventricular cardiomyocyte proliferation during embryonic heart development. *Development*. 2011;138(9):1795-805. doi: 10.1242/dev.054338

Li W, Han JL, Entcheva E. Syncytium cell growth increases Kir2.1 contribution in human iPSC-cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2020;319(5):H1112-H1122. doi: 10.1152/ajpheart.00148.2020 **[b]**

Li W, Wang YP, Gao L, et al. Resveratrol protects rabbit ventricular myocytes against oxidative stress-induced arrhythmogenic activity and Ca²⁺ overload. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(9):1164-73. doi: 10.1038/aps.2013.82

Li W, Zheng NZ, Yuan Q, et al. NFAT5-mediated CACNA1C expression is critical for cardiac electrophysiological development and maturation. *J Mol Med (Berl)*. 2016;94(9):993-1002. doi: 10.1007/s00109-016-1444-x

Lietz K, Long JW, Kfoury AG, et al. Outcomes of left ventricular assist device implantation as destination therapy in the post-REMATCH era: implications for patient selection. *Circulation*. 2007;116(5):497-505. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.691972

Lieu DK, Fu JD, Chiamvimonvat N, et al. Mechanism-based facilitated maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2013;6(1):191-201. doi: 10.1161/CIRCEP.111.973420

Liew R, Stagg MA, MacLeod KT, Collins P. The red wine polyphenol, resveratrol, exerts acute direct actions on guinea-pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol*. 2005;519(1-2):1-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.06.017

Lin B, Lin X, Stachel M, et al. Culture in Glucose-Depleted Medium Supplemented with Fatty Acid and 3,3',5-Triiodo-L-Thyronine Facilitates Purification and Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:253. doi: 10.3389/fendo.2017.00253

Lin L, Cui L, Zhou W, et al. Beta-catenin directly regulates Islet1 expression in cardiovascular progenitors and is required for multiple aspects of cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(22):9313-8. doi: 10.1073/pnas.0700923104

Lin Z, von Gise A, Zhou P, et al. Cardiac-specific YAP activation improves cardiac function and survival in an experimental murine MI model. *Circ Res*. 2014;115(3):354-63. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.303632

Linask KK, Han MD, Artman M, Ludwig CA. Sodium-calcium exchanger (NCX-1) and calcium modulation: NCX protein expression patterns and regulation of early heart development. *Dev Dyn*. 2001;221(3):249-64. doi: 10.1002/dvdy.1131

Linask KL, Linask KK. Calcium channel blockade in embryonic cardiac progenitor cells disrupts normal cardiac cell differentiation. *Stem Cells Dev*. 2010;19(12):1959-65. doi: 10.1089/scd.2010.0192

Liu SY, Chen CL, Yang TT, et al. Albumin prevents reactive oxygen species-induced mitochondrial damage, autophagy, and apoptosis during serum starvation. *Apoptosis*. 2012;17(11):1156-69. doi: 10.1007/s10495-012-0758-6

Liu Z, Zhang LP, Ma HJ, et al. Resveratrol reduces intracellular free calcium concentration in rat ventricular myocytes. *Sheng Li Xue Bao*. 2005;57(5):599-604.

Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1776-83. doi: 10.1172/JCI29044

Lopaschuk GD, Jaswal JS. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010;56(2):130-40. doi: 10.1097/FJC.0b013e3181e74a14

Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*. 2010;90(1):207-58. doi: 10.1152/physrev.00015.2009

Louch WE, Bito V, Heinzel FR, et al. Reduced synchrony of Ca²⁺ release with loss of T-tubules—a comparison to Ca²⁺ release in human failing cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2004;62(1):63-73. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.12.031

Lu V, Dahan P, Ahsan FM, et al. Mitochondrial metabolism and glutamine are essential for mesoderm differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Res.* 2019;29(7):596-598. doi: 10.1038/s41422-019-0191-2

Lui JC, Baron J. Evidence that Igf2 down-regulation in postnatal tissues and up-regulation in malignancies is driven by transcription factor E2f3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(15):6181-6. doi: 10.1073/pnas.1219079110

Lynch AT, Mazzotta S, Hoppler S. Cardiomyocyte Differentiation from Mouse Embryonic Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 2018;1816:55-66. doi: 10.1007/978-1-4939-8597-5_4

Madabhushi M, Lacy E. Anterior visceral endoderm directs ventral morphogenesis and placement of head and heart via BMP2 expression. *Dev Cell.* 2011;21(5):907-919. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.027

Mahmoud AI, Kocabas F, Muralidhar SA, et al. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature.* 2013;497(7448):249-253. doi: 10.1038/nature12054

Manabe M, Nishida T, Imai T, et al. Cortisol levels in umbilical vein and umbilical artery with or without antenatal corticosteroids. *Pediatr Int.* 2005;47(1):60-3. doi: 10.1111/j.1442-200x.2004.02002.x

Marambaud P, Zhao H, Davies P. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *J Biol Chem.* 2005 Nov;280(45):37377-82. doi: 10.1074/jbc.M508246200

Marsboom G, Zhang GF, Pohl-Avila N, et al. Glutamine Metabolism Regulates the Pluripotency Transcription Factor OCT4. *Cell Rep.* 2016;16(2):323-332. doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.089

Martello G, Sugimoto T, Diamanti E, et al. Esrrb is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal [published correction appears in *Cell Stem Cell.* 2013 May 2;12(5):630]. *Cell Stem Cell.* 2012;11(4):491-504. doi:10.1016/j.stem.2012.06.008

Martherus RS, Vanherle SJ, Timmer ED, et al. Electrical signals affect the cardiomyocyte transcriptome independently of contraction. *Physiol Genomics.* 2010;42A(4):283-9. doi: 10.1152/physiolgenomics.00182.2009

Martin GR, Evans MJ. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72(4):1441-5. doi: 10.1073/pnas.72.4.1441

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(12):7634-8. doi: 10.1073/pnas.78.12.7634

Mascheck L, Sharifpanah F, Tsang SY, Wartenberg M, Sauer H. Stimulation of cardiomyogenesis from mouse embryonic stem cells by nuclear translocation of cardiotrophin-1. *Int J Cardiol*. 2015;193:23-33. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.05.019

Matsuyama D, Kawahara K. Proliferation of neonatal cardiomyocytes by connexin43 knockdown via synergistic inactivation of p38 MAPK and increased expression of FGF1. *Basic Res Cardiol*. 2009;104(6):631-42. doi: 10.1007/s00395-009-0029-z

Mattiazzi A, Bassani RA, Escobar AL, et al. Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;308(10):H1177-91. doi: 10.1152/ajpheart.00007.2015

McMullen JR, Shioi T, Huang WY, et al. The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *J Biol Chem*. 2004;279(6):4782-93. doi: 10.1074/jbc.M310405200

Meissner G. Regulation of mammalian ryanodine receptors. *Front Biosci*. 2002;7:d2072-80. doi: 10.2741/A899

Miki K, Deguchi K, Nakanishi-Koakutsu M, et al. ERRγ enhances cardiac maturation with T-tubule formation in human iPSC-derived cardiomyocytes. *Nat Commun*. 2021;12(1):3596. doi: 10.1038/s41467-021-23816-3

Miura S, Singh AP, Mishina Y. Bmpr1a is required for proper migration of the AVE through regulation of Dkk1 expression in the pre-streak mouse embryo. *Dev Biol*. 2010;341(1):246-54. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.02.038

Mollova M, Bersell K, Walsh S, et al. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(4):1446-51. doi: 10.1073/pnas.1214608110

Moman RN, Gupta N, Varacallo M. *Physiology, Albumin*. (Updated 2022), Textquelle, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459198/> (Stand: 16.05.2022)

Monahan DS, Flaherty E, Hameed A, Duffy GP. Resveratrol significantly improves cell survival in comparison to dexrazoxane and carvedilol in a h9c2 model of doxorubicin induced cardiotoxicity. *Biomed Pharmacother*. 2021;140:111702. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111702

Montessuit C, Palma T, Viglino C, Pellieux C, Lerch R. Effects of insulin-like growth factor-I on the maturation of metabolism in neonatal rat cardiomyocytes. *Pflugers Arch.* 2006;452(4):380-6. doi: 10.1007/s00424-006-0059-4

Moussaieff A, Rouleau M, Kitsberg D, et al. Glycolysis-mediated changes in acetyl-CoA and histone acetylation control the early differentiation of embryonic stem cells. *Cell Metab.* 2015;21(3):392-402. doi: 10.1016/j.cmet.2015.02.002

Nakano H, Minami I, Braas D, et al. Glucose inhibits cardiac muscle maturation through nucleotide biosynthesis. *Elife.* 2017;6:e29330. doi: 10.7554/eLife.29330

Niederwieser D, Baldomero H, Atsuta Y, et al. One and Half Million Hematopoietic Stem Cell Transplants (HSCT). Dissemination, Trends and Potential to Improve Activity By Telemedicine from the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBMT). *BLOOD.* 2019; 134 (Supplement_1): 2035. doi: 10.1182/blood-2019-125232

Niehoff J, Matzkies M, Nguemo F, Hescheler J, Reppel M. The influence of light on the beat rate variability of murine embryonic stem cell derived cardiomyocytes. *Biomed Pharmacother.* 2022;146:112589. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112589

Novik EI, Maguire TJ, Orlova K, Schloss RS, Yarmush ML. Embryoid body-mediated differentiation of mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage: insights from gene expression profiles. *Tissue Eng.* 2006;12(6):1515-25. doi: 10.1089/ten.2006.12.1515

O'Hara J: Mayo Clinic Q&A podcast: Ventricular assist devices aid heart failure patients (2021), Textquelle, URL: <https://newsnetwork.mayoclinic.org/discussion/mayo-clinic-qa-podcast-ventricular-assist-devices-aid-heart-failure-patients/> (Stand: 14.02.2022)

Ojo AO, Held PJ, Port FK, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med.* 2003;349(10):931-40. doi: 10.1056/NEJMoa021744

Oliveira MA, Brandi AC, Dos Santos CA, et al. The calcium paradox - what should we have to fear? *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2014;29(2):249-54. doi: 10.5935/1678-9741.20140054

Ottolia M, John S, Hazan A, Goldhaber JI. The Cardiac Na⁺-Ca²⁺ Exchanger: From Structure to Function. *Compr Physiol.* 2021;12(1):2681-2717. doi: 10.1002/cphy.c200031

Paling NR, Wheadon H, Bone HK, Welham MJ. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J Biol Chem.* 2004;279(46):48063-70. doi: 10.1074/jbc.M406467200

Papadopoli D, Pollak M, Topisirovic I. The role of GSK3 in metabolic pathway perturbations in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2021;1868(8):119059. doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.119059

Parikh SS, Blackwell DJ, Gomez-Hurtado N, et al. Thyroid and Glucocorticoid Hormones Promote Functional T-Tubule Development in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circ Res.* 2017;121(12):1323-1330. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311920

Park SJ, Ahmad F, Philp A, et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell.* 2012;148(3):421-33. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.017

Park SJ, Ahmad F, Bahde RJ, et al. Potent PDE4 inhibitor activates AMPK and Sirt1 to induce mitochondrial biogenesis. *PLoS One.* 2021;16(6):e0253269. doi: 10.1371/journal.pone.0253269

Park SJ, Kim RY, Park BW, et al. Dual stem cell therapy synergistically improves cardiac function and vascular regeneration following myocardial infarction. *Nat Commun.* 2019;10(1):3123. doi: 10.1038/s41467-019-11091-2

Parton RG, Way M, Zorzi N, Stang E. Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol.* 1997;136(1):137-54. doi: 10.1083/jcb.136.1.137

Patterson M, Barske L, Van Handel B, et al. Frequency of mononuclear diploid cardiomyocytes underlies natural variation in heart regeneration. *Nat Genet.* 2017;49(9):1346-1353. doi: 10.1038/ng.3929

Pauwelyn K, Roelandt P, Notelaers T, et al. Culture of mouse embryonic stem cells with serum but without exogenous growth factors is sufficient to generate functional hepatocyte-like cells. *PLoS One.* 2011;6(8):e23096. doi: 10.1371/journal.pone.0023096

Pereira PN, Dobreva MP, Maas E, et al. Antagonism of Nodal signaling by BMP/Smad5 prevents ectopic primitive streak formation in the mouse amnion. *Development.* 2012;139(18):3343-54. doi: 10.1242/dev.075465

Periasamy M, Bhupathy P, Babu GJ. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res.* 2008;77(2):265-73. doi: 10.1093/cvr/cvm056

Perino MG, Yamanaka S, Riordon DR, Tarasova Y, Boheler KR. Ascorbic acid promotes cardiomyogenesis through SMAD1 signaling in differentiating mouse embryonic stem cells. *PLoS One.* 2017;12(12):e0188569. doi: 10.1371/journal.pone.0188569

Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ, et al. Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science*. 1979;204(4393):643-7. doi: 10.1126/science.571147

Pezhouman A, Nguyen NB, Sercel AJ, et al. Transcriptional, Electrophysiological, and Metabolic Characterizations of hESC-Derived First and Second Heart Fields Demonstrate a Potential Role of TBX5 in Cardiomyocyte Maturation. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:787684. doi: 10.3389/fcell.2021.787684

Pineda-Sanabria SE, Robertson IM, Sykes BD. Structure of trans-resveratrol in complex with the cardiac regulatory protein troponin C. *Biochemistry*. 2011;50(8):1309-20. doi: 10.1021/bi101985j

Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*. 2011;331(6020):1078-80. doi: 10.1126/science.1200708

Poulet C, Sanchez-Alonso J, Swiatlowska P, et al. Junctophilin-2 tethers T-tubules and recruits functional L-type calcium channels to lipid rafts in adult cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2021;117(1):149-161. doi: 10.1093/cvr/cvaa033

Powell T, Twist VW. A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and a tolerance to calcium. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976;72(1):327-33. doi: 10.1016/0006-291x(76)90997-9

Price NL, Gomes AP, Ling AJ, et al. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab*. 2012;15(5):675-90. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.003

Probst S, Sagar, Tomic J, et al. Spatiotemporal sequence of mesoderm and endoderm lineage segregation during mouse gastrulation. *Development*. 2021;148(1):dev193789. doi: 10.1242/dev.193789

Provinciali M, Re F, Donnini A, et al. Effect of resveratrol on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Int J Cancer*. 2005;115(1):36-45. doi: 10.1002/ijc.20874

Puente BN, Kimura W, Muralidhar SA, et al. The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response [published correction appears in *Cell*. 2014 May 22;157(5):1243]. *Cell*. 2014;157(3):565-579. doi:10.1016/j.cell.2014.03.032

Qi X, Li TG, Hao J, et al. BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(16):6027-32. doi: 10.1073/pnas.0401367101

Qian C, Ma J, Zhang P, et al. Resveratrol attenuates the Na(+)-dependent intracellular Ca(2+) overload by inhibiting H(2)O(2)-induced increase in late sodium current in ventricular myocytes. *PLoS One*. 2012;7(12):e51358. doi: 10.1371/journal.pone.0051358

Rabinowitz JD, Enerbäck S. Lactate: the ugly duckling of energy metabolism. *Nat Metab*. 2020;2(7):566-571. doi: 10.1038/s42255-020-0243-4

Raso A, Dirx E, Sampaio-Pinto V, et al. Author Correction: A microRNA program regulates the balance between cardiomyocyte hyperplasia and hypertrophy and stimulates cardiac regeneration. *Nat Commun*. 2022;13(1):4977. doi:10.1038/s41467-022-32785-0

Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992;339(8808):1523-6. doi: 10.1016/0140-6736(92)91277-f

Reul RM Jr, Zhang TS, Rana AA, Rosengart TK, Goss JA. Consistent improvements in short- and long-term survival following heart transplantation over the past three decades. *Clin Transplant*. 2021;35(4):e14241. doi: 10.1111/ctr.14241

Riba A, Deres L, Sumegi B, et al. Cardioprotective Effect of Resveratrol in a Postinfarction Heart Failure Model. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:6819281. doi: 10.1155/2017/6819281

Robert S, Flowers M, Ogle BM. Kinases of the Focal Adhesion Complex Contribute to Cardiomyocyte Specification. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19):10430. doi: 10.3390/ijms221910430

Rodriguez TA, Srinivas S, Clements MP, Smith JC, Beddington RS. Induction and migration of the anterior visceral endoderm is regulated by the extra-embryonic ectoderm. *Development*. 2005;132(11):2513-20. doi: 10.1242/dev.01847

Rog-Zielinska EA, Craig MA, Manning JR, et al. Glucocorticoids promote structural and functional maturation of foetal cardiomyocytes: a role for PGC-1 α . *Cell Death Differ*. 2015;22(7):1106-16. doi: 10.1038/cdd.2014.181

Rohdewohld, H, Wobus, AM. Embryonale Stammzellen der Maus. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 2002;45(2), 113–122. doi:10.1007/s00103-001-0349-0

Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ, et al. Randomized Evaluation of Mechanical Assistance for the Treatment of Congestive Heart Failure (REMATCH) Study Group. Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure. *N Engl J Med*. 2001;345(20):1435-43. doi: 10.1056/NEJMoa012175

Rupert CE, Irofula C, Coulombe KLK. Practical adoption of state-of-the-art hiPSC-cardiomyocyte differentiation techniques. *PLoS One*. 2020;15(3):e0230001. doi: 10.1371/journal.pone.0230001

Rupprecht A, Sittner D, Smorodchenko A, et al. Uncoupling protein 2 and 4 expression pattern during stem cell differentiation provides new insight into their putative function. *PLoS One*. 2014;9(2):e88474. doi: 10.1371/journal.pone.0088474

Sachlos E, Auguste DT. Embryoid body morphology influences diffusive transport of inductive biochemicals: a strategy for stem cell differentiation. *Biomaterials*. 2008;29(34):4471-80. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.08.012

Sajini AA, Greder LV, Dutton JR, Slack JM. Loss of Oct4 expression during the development of murine embryoid bodies. *Dev Biol*. 2012;371(2):170-9. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.08.008

Salt IP, Hardie DG. AMP-Activated Protein Kinase: An Ubiquitous Signaling Pathway With Key Roles in the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2017;120(11):1825-1841. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309633

Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*. 2004;10(1):55-63. doi: 10.1038/nm979

Sauer H, Neukirchen W, Rahimi G, et al. Involvement of reactive oxygen species in cardiotrophin-1-induced proliferation of cardiomyocytes differentiated from murine embryonic stem cells. *Exp Cell Res*. 2004;294(2):313-24. doi: 10.1016/j.yexcr.2003.10.032

Sauer H, Rahimi G, Hescheler J, Wartenberg M. Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *FEBS Lett*. 2000;476(3):218-23. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01747-6

Sauer H, Theben T, Hescheler J, et al. Characteristics of calcium sparks in cardiomyocytes derived from embryonic stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(1):H411-21. doi: 10.1152/ajpheart.2001.281.1.H411

Schober P, Vetter TR. Repeated Measures Designs and Analysis of Longitudinal Data: If at First You Do Not Succeed-Try, Try Again. *Anesth Analg*. 2018;127(2):569-575. doi: 10.1213/ANE.0000000000003511

Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell*. 2010;40(2):310-22. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.026

Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53(1):115-28. doi: 10.1002/mnfr.200800148

Sharma A, Li G, Rajarajan K, et al. Derivation of highly purified cardiomyocytes from human induced pluripotent stem cells using small molecule-modulated differentiation and subsequent glucose starvation. *J Vis Exp*. 2015;(97):52628. doi: 10.3791/52628

Shi M, Li YY, Xu RN, et al. Mesenchymal stem cell therapy in decompensated liver cirrhosis: a long-term follow-up analysis of the randomized controlled clinical trial. *Hepatol Int*. 2021;15(6):1431-1441. doi: 10.1007/s12072-021-10199-2

Shparberg RA, Glover HJ, Morris MB. Embryoid Body Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Neurectoderm and Neural Progenitors. *Methods Mol Biol*. 2019;2029:273-285. doi: 10.1007/978-1-4939-9631-5_21

Stankunas K, Ma GK, Kuhnert FJ, Kuo CJ, Chang CP. VEGF signaling has distinct spatiotemporal roles during heart valve development. *Dev Biol*. 2010;347(2):325-36. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.08.030

Stanley-Hasnain S, Hauck L, Grothe D, et al. p53 and Mdm2 act synergistically to maintain cardiac homeostasis and mediate cardiomyocyte cell cycle arrest through a network of microRNAs. *Cell Cycle*. 2017;16(17):1585-1600. doi: 10.1080/15384101.2017.1346758

Stehlik J, Kobashigawa J, Hunt SA, Reichenspurner H, Kirklin JK. Honoring 50 Years of Clinical Heart Transplantation in Circulation: In-Depth State-of-the-Art Review. *Circulation*. 2018;137(1):71-87. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029753

Stincone A, Prigione A, Cramer T, et al. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2015;90(3):927-63. doi: 10.1111/brv.12140

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002;106(15):1913-8. doi: 10.1161/01.cir.0000034046.87607.1c

Sulaiman M, Matta MJ, Sunderesan NR, et al. Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298(3):H833-43. doi: 10.1152/ajpheart.00418.2009

Suliman HB, Zobi F, Piantadosi CA. Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide System and Embryonic Stem Cell Differentiation and Maturation into Cardiomyocytes. *Antioxid Redox Signal*. 2016;24(7):345-60. doi: 10.1089/ars.2015.6342

Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY. Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol*. 2010;41(2-3):375-83. doi: 10.1007/s12035-010-8111-y

Sutton MV, McKinley M, Kulasekharan R, Popik VV. Photo-cleavable analog of BAPTA for the fast and efficient release of Ca²⁺. *Chem Commun (Camb)*. 2017;53(41):5598-5601. doi: 10.1039/c7cc02056b

Sztretye M, Yi J, Figueroa L, et al. Measurement of RyR permeability reveals a role of calsequestrin in termination of SR Ca(2+) release in skeletal muscle. *J Gen Physiol*. 2011;138(2):231-47. doi: 10.1085/jgp.201010592

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024

Takano AP, Diniz GP, Barreto-Chaves ML. AMPK signaling pathway is rapidly activated by T3 and regulates the cardiomyocyte growth. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;376(1-2):43-50. doi: 10.1016/j.mce.2013.05.024

Takemura H, Yasui K, Opthof T, et al. Subtype switching of L-Type Ca²⁺ channel from Cav1.3 to Cav1.2 in embryonic murine ventricle. *Circ J*. 2005;69(11):1405-11. doi: 10.1253/circj.69.1405

Taneja N, Neining AC, Burnette DT. Coupling to substrate adhesions drives the maturation of muscle stress fibers into myofibrils within cardiomyocytes. *Mol Biol Cell*. 2020;31(12):1273-1288. doi: 10.1091/mbc.E19-11-0652

Tarkowski AK. Experiments on the development of isolated blastomers of mouse eggs. *Nature*. 1959;184:1286-7. doi: 10.1038/1841286a0

ten Berge D, Koole W, Fuerer C, et al. Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies. *Cell Stem Cell*. 2008;3(5):508-18. doi: 10.1016/j.stem.2008.09.013

Terai S, Ishikawa T, Omori K, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells*. 2006;24(10):2292-8. doi: 10.1634/stemcells.2005-0542

Thomas LW, Ashcroft M. Exploring the molecular interface between hypoxia-inducible factor signalling and mitochondria. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(9):1759-1777. doi: 10.1007/s00018-019-03039-y

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [published correction appears in *Science* 1998;282(5395):1827]. *Science*. 1998;282(5391):1145-1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145

Thum T, Borlak J. Butanedione monoxime increases the viability and yield of adult cardiomyocytes in primary cultures. *Cardiovasc Toxicol*. 2001;1(1):61-72. doi: 10.1385/ct:1:1:61

Tian W, Yang L, Liu Y, et al. Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats by up-regulation of vascular endothelial growth factor B. *J Nutr Biochem*. 2020;79:108132. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.01.018

Tohyama S, Hattori F, Sano M, et al. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell*. 2013;12(1):127-37. doi: 10.1016/j.stem.2012.09.013

Tohyama S, Fujita J, Hishiki T, et al. Glutamine Oxidation Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Metab*. 2016;23(4):663-74. doi: 10.1016/j.cmet.2016.03.001

Tohyama S, Fujita J, Fujita C, et al. Efficient Large-Scale 2D Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cells and Differentiated Cardiomyocytes. *Stem Cell Reports*. 2017;9(5):1406-1414. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.08.025

Tsan YC, DePalma SJ, Zhao YT, et al. Physiologic biomechanics enhance reproducible contractile development in a stem cell derived cardiac muscle platform. *Nat Commun*. 2021;12(1):6167. doi: 10.1038/s41467-021-26496-1

Tyser RC, Miranda AM, Chen CM, et al. Calcium handling precedes cardiac differentiation to initiate the first heartbeat. *Elife*. 2016;5:e17113. doi: 10.7554/eLife.17113

Tzahor E, Lassar AB. Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis. *Genes Dev*. 2001;15(3):255-60. doi: 10.1101/gad.871501

Välimäki MJ, Ruskoaho HJ. Targeting GATA4 for cardiac repair. *IUBMB Life*. 2020 Jan;72(1):68-79. doi: 10.1002/iub.2150.

van den Aemele J, Tiberi L, Bondue A, et al. Eomesodermin induces *Mesp1* expression and cardiac differentiation from embryonic stem cells in the absence of Activin. *EMBO Rep*. 2012;13(4):355-62. doi: 10.1038/embor.2012.23

van den Brink SC, Baillie-Johnson P, Balayo T, et al. Symmetry breaking, germ layer specification and axial organisation in aggregates of mouse embryonic stem cells. *Development*. 2014;141(22):4231-42. doi: 10.1242/dev.113001

Van Keer JM, Van Aelst LNL, Rega F, et al. Long-term outcome of cardiac allograft vasculopathy: Importance of the International Society for Heart and Lung Transplantation angiographic grading scale. *J Heart Lung Transplant*. 2019;38(11):1189-1196. doi: 10.1016/j.healun.2019.08.005

Vassalli G, Gallino A, Weis M, et al. Alloimmunity and nonimmunologic risk factors in cardiac allograft vasculopathy. *Eur Heart J*. 2003;24(13):1180-1188. doi:10.1016/s0195-668x(03)00237-9

Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res*. 2008;79(2):208-17. doi: 10.1093/cvr/cvn098

Vlavcheski F, Den Hartogh DJ, Giacca A, Tsiani E. Amelioration of High-Insulin-Induced Skeletal Muscle Cell Insulin Resistance by Resveratrol Is Linked to Activation of AMPK and Restoration of GLUT4 Translocation. *Nutrients*. 2020;12(4):914. doi: 10.3390/nu12040914

Voza A, Parisi G, De Leonardis F, et al. UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(3):960-5. doi: 10.1073/pnas.1317400111

Vreeker A, van Stuijvenberg L, Hund TJ, et al. Assembly of the cardiac intercalated disk during pre- and postnatal development of the human heart. *PLoS One*. 2014;9(4):e94722. doi: 10.1371/journal.pone.0094722

Wallace CH, Baczkó I, Jones L, Fercho M, Light PE. Inhibition of cardiac voltage-gated sodium channels by grape polyphenols. *Br J Pharmacol*. 2006;149(6):657-65. doi: 10.1038/sj.bjp.0706897

Wang L, Zhang T, Wang L, Cai Y, Zhong X, He X, Hu L, Tian S, Wu M, Hui L, Zhang H, Gao P. Fatty acid synthesis is critical for stem cell pluripotency via promoting mitochondrial fission. *EMBO J.* 2017;36(10):1330-1347. doi: 10.15252/embj.201695417

Wang X. Stem cells in tissues, organoids, and cancers. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(20):4043-4070. doi: 10.1007/s00018-019-03199-x

Watanabe Y, Zaffran S, Kuroiwa A, et al. Fibroblast growth factor 10 gene regulation in the second heart field by Tbx1, Nkx2-5, and Islet1 reveals a genetic switch for down-regulation in the myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(45):18273-80. doi: 10.1073/pnas.1215360109

Wheelwright M, Mikkila J, Bedada FB, et al. Advancing physiological maturation in human induced pluripotent stem cell-derived cardiac muscle by gene editing an inducible adult troponin isoform switch. *Stem Cells.* 2020;38(10):1254-1266. doi: 10.1002/stem.3235

Wilkinson DG, Bhatt S, Herrmann BG. Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature.* 1990;343(6259):657-9. doi: 10.1038/343657a0

Williams RL, Hilton DJ, Pease S, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature.* 1988;336(6200):684-7. doi: 10.1038/336684a0

Wobus AM, Rohwedel J, Maltsev V, Hescheler J. In vitro cellular models for cardiac development and pharmacotoxicology. *Toxicol In Vitro.* 1995;9(4):477-88. doi: 10.1016/0887-2333(95)00023-2

Wohnsland S, Bürgers HF, Kuschinsky W, Maurer MH. Neurons and neuronal stem cells survive in glucose-free lactate and in high glucose cell culture medium during normoxia and anoxia. *Neurochem Res.* 2010;35(10):1635-42. doi: 10.1007/s11064-010-0224-1

Woo LA, Tkachenko S, Ding M, et al. High-content phenotypic assay for proliferation of human iPSC-derived cardiomyocytes identifies L-type calcium channels as targets. *J Mol Cell Cardiol.* 2019;127:204-214. doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.12.015

Wood BM, Simon M, Galice S, et al. Cardiac CaMKII activation promotes rapid translocation to its extra-dyadic targets. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;125:18-28. doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.10.010

Xiang L, Xiao L, Wang Y, et al. Health benefits of wine: don't expect resveratrol too much. *Food Chem.* 2014;156:258-63. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.01.006

- Xiong H, Luo Y, Yue Y, et al. Single-Cell Transcriptomics Reveals Chemotaxis-Mediated Intraorgan Crosstalk During Cardiogenesis. *Circ Res.* 2019;125(4):398-410. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315243
- Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res.* 2002;91(6):501-8. doi: 10.1161/01.res.0000035254.80718.91
- Yamaguchi N, Xu L, Pasek DA, Evans KE, Meissner G. Molecular basis of calmodulin binding to cardiac muscle Ca(2+) release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem.* 2003;278(26):23480-6. doi: 10.1074/jbc.M301125200
- Yanes O, Clark J, Wong DM, et al. Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nat Chem Biol.* 2010;6(6):411-7. doi: 10.1038/nchembio.364
- Yang X, Pabon L, Murry CE. Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res.* 2014;114(3):511-23. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.300558 **[a]**
- Yang X, Rodriguez M, Pabon L, et al. Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;72:296-304. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.04.005 **[b]**
- Yasuhara T, Kameda M, Sasaki T, Tajiri N, Date I. Cell Therapy for Parkinson's Disease. *Cell Transplant.* 2017;26(9):1551-1559. doi: 10.1177/0963689717735411
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 2004;23(12):2369-80. doi: 10.1038/sj.emboj.7600244
- Ying QL, Wray J, Nichols J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature.* 2008;453(7194):519-23. doi: 10.1038/nature06968
- Yoo B, Lemaire A, Mangmool S, et al. Beta1-adrenergic receptors stimulate cardiac contractility and CaMKII activation in vivo and enhance cardiac dysfunction following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(4):H1377-86. doi: 10.1152/ajpheart.00504.2009
- Yoon J, Min BG, Kim YH, et al. Differentiation, engraftment and functional effects of pre-treated mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarct model. *Acta Cardiol.* 2005;60(3):277-84. doi: 10.2143/AC.60.3.2005005

- Yoon Y, Huang T, Tortelote GG, et al. Extra-embryonic Wnt3 regulates the establishment of the primitive streak in mice. *Dev Biol.* 2015;403(1):80-8. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.04.008
- Yoshida-Koide U, Matsuda T, Saikawa K, et al. Involvement of Ras in extraembryonic endoderm differentiation of embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313(3):475-81. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.138
- Yue Q, Wagstaff L, Yang X, Weijer C, Münsterberg A. Wnt3a-mediated chemorepulsion controls movement patterns of cardiac progenitors and requires RhoA function. *Development.* 2008;135(6):1029-37. doi: 10.1242/dev.015321
- Zadegan FG, Ghaedi K, Kalantar SM, et al. Cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells is influenced by a PPAR γ /PGC-1 α -FNDC5 pathway during the stage of cardiac precursor cell formation. *Eur J Cell Biol.* 2015;94(6):257-66. doi: 10.1016/j.ejcb.2015.04.002
- Ziaeeian B, Fonarow GC. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2016;13(6):368-78. doi: 10.1038/nrcardio.2016.25
- Ziegler N, Bader E, Epanchintsev A, et al. AMPK β 1 and AMPK β 2 define an isoform-specific gene signature in human pluripotent stem cells, differentially mediating cardiac lineage specification. *J Biol Chem.* 2020;295(51):17659-17671. doi: 10.1074/jbc.RA120.013990
- Zhang C, Li Y, Cao J, et al. Hedgehog signalling controls sinoatrial node development and atrioventricular cushion formation. *Open Biol.* 2021;11(6):210020. doi: 10.1098/rsob.210020
- Zhang LP, Yin JX, Liu Z, et al. Effect of resveratrol on L-type calcium current in rat ventricular myocytes. *Acta Pharmacol Sin.* 2006;27(2):179-83. doi: 10.1111/j.1745-7254.2006.00250.x
- Zhang T, Chi Y, Ren Y, et al. Resveratrol Reduces Oxidative Stress and Apoptosis in Podocytes via Sir2-Related Enzymes, Sirtuins1 (SIRT1)/Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Co-Activator 1 α (PGC-1 α) Axis. *Med Sci Monit.* 2019;25:1220-1231. doi: 10.12659/MSM.911714
- Zhao MT, Ye S, Su J, Garg V. Cardiomyocyte Proliferation and Maturation: Two Sides of the Same Coin for Heart Regeneration. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:594226. doi: 10.3389/fcell.2020.594226

Zheng B, Wang J, Tang L, Shi J, Zhu D. mTORC1 and mTORC2 play different roles in regulating cardiomyocyte differentiation from embryonic stem cells. *Int J Dev Biol.* 2017;61(1-2):65-72. doi: 10.1387/ijdb.160207dz

Zhou Q, Xu H, Yan L, et al. PGC-1 α promotes mitochondrial respiration and biogenesis during the differentiation of hiPSCs into cardiomyocytes. *Genes Dis.* 2020;8(6):891-906. doi: 10.1016/j.gendis.2020.12.006 [a]

Zhou R, Li J, Zhang L, et al. Role of Parkin-mediated mitophagy in glucocorticoid-induced cardiomyocyte maturation. *Life Sci.* 2020;255:117817. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117817 [b]

Ziman AP, Gómez-Viquez NL, Bloch RJ, Lederer WJ. Excitation-contraction coupling changes during postnatal cardiac development. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(2):379-86. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.09.016

Zweigerdt R, Burg M, Willbold E, Abts H, Ruediger M. Generation of confluent cardiomyocyte monolayers derived from embryonic stem cells in suspension: a cell source for new therapies and screening strategies. *Cytotherapy.* 2003;5(5):399-413. doi: 10.1080/14653240310003062

9.1 Weitere Quellen

AAT Bioquest: Fluo-4 (o.J.), Textquelle, URL: https://www.aatbio.com/catalog/fluo-4?gclid=EAlalQobChMIIsi17ZDy9AIV2I9oCR386gKyEAAAYASAAEgIkPD_BwE (Stand: 22.02.2022)

AAT Bioquest: What is an AM-Ester? (2021), Textquelle, URL: <https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/What-is-an-AM-ester> (Stand: 22.10.2022)

Abcam: Fluo-4-AM, Fluorescent labeling reagent (ab241082) (o.J.), Bildquelle, URL: <https://www.abcam.com/fluo-4-am-fluorescent-labeling-reagent-ab241082.html> (Stand: 22.02.2022)

Dojindo: BAPTA-AM (o.J.), Bildgrundlage, URL: <https://www.dojindo.eu.com/store/p/560-BAPTA-AM.aspx> (Stand: 13.04.2022)

Eurotransplant: Eurotransplant region (o.J.), Textquelle, URL: <https://www.eurotransplant.org/about-eurotransplant/region/> (Stand: 12.02.2022)

Eurotransplant: Eurotransplant – Statistics Report Library (o.J.), Daten- & Textquelle, URL: https://statistics.eurotransplant.org/index.php?search_type=overview&search_text=9023 (Stand: 12.02.2022)

National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information: Compound Summary for CID 6409633, 2,3-Butanedione monoxime (Updated 2022), Textquelle, URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_3-Butanedione-monoxime (Stand: 23.10.2022)

Sigma Aldrich: Product Information - Albumin From Bovine Serum (2000), Textquelle, URL: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/261/593/a2153pis.pdf> (Stand: 16.05.2022)

Statistisches Bundesamt (Destatis): Gesundheit – Todesursachen, Grafiken (2023), Bildquelle, URL: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/inhalt.html#rsiilum53> (Stand: 12.03.2023)

Statistisches Bundesamt (Destatis): 23211-0004: Gestorbene: Deutschland, Jahre, Todesursachen, Geschlecht, Altersgruppen (2022), Textquelle, URL: https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=previous&levelindex=2&step=2&titel=Erg_ebnis&levelid=1678622126739&acceptscookies=false#abreadcrumb (Stand: 12.03.2023)

Thermo Fisher Scientific: Molecular Probes – invitrogen detection technologies: Fluo Calcium Indicators (2011), Textquelle, URL: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fmp01240.pdf> (Stand: 22.10.2022)

10 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/ Datum

Unterschrift

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heinrich Sauer für die spannende Themenstellung, die wissenschaftliche Betreuung und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt ferner meinen Kolleginnen und Kollegen in der Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sowie Frau Barbara Arnold für ihre Unterstützung im Labor.

Weiter bedanke ich mich auch bei allen Institutsangehörigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und Geschwistern für ihre Unterstützung.