

Die Effekte adrenerger und angiotensinerger  
Stimuli auf hiPSC-abgeleitete Herzzellen  
und der Bezug zum Hippo-Signalweg

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Florian Menz

geboren am 12.09.1994 in Schmalkalden

### **Gutachter**

1. Prof. Dr. med. Christian Schulze, Jena
2. Prof. Dr. med. Christoph Maack, Würzburg
3. Prof. Dr. rer. nat. Volker Adams, Dresden

**Tag der öffentlichen Verteidigung:** 07.02.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	
<b>II</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>2.1</b>	<b>Notwendigkeit kardiologischer Forschung</b>	<b>5</b>
<b>2.2</b>	<b>hiPSC-abgeleitete Herzzellen</b>	<b>6</b>
<b>2.3</b>	<b>Physiologische Grundlagen</b>	<b>8</b>
2.3.1	Herzentwicklung	8
2.3.2	Kardiale Kontraktion	9
2.3.3	Adrenerges System	11
2.3.4	Angiotensinerges System	13
2.3.5	Herzinsuffizienz	15
2.3.6	Zellulärer Energiestoffwechsel	17
2.3.7	Hippo-Signalweg	19
<b>3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>Material</b>	<b>23</b>
4.1.1	Zellkultur	23
4.1.2	Mausgewebe	23
4.1.3	Substanzen und Chemikalien	23
4.1.4	Verbrauchsmaterialien	23
4.1.5	Geräte und Software	23
<b>4.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>24</b>
4.2.1	Kultivierung der hiPSC	24
4.2.2	Differenzierung der hiPSC zu Kardiomyozyten	24
4.2.3	Stimulationsexperiment	25
4.2.4	Herzfrequenzanalyse	26
4.2.5	Genexpressionsanalyse	26
4.2.6	Proteinanalytik	29
4.2.7	Mitochondrienfunktionsmessung	32

## Inhaltsverzeichnis

4.2.8	Immunfluoreszenzmikroskopie .....	33
4.2.9	Immunhistochemiemikroskopie.....	35
4.2.10	Statistik.....	36
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>Kardiomyogenese der hiPSC .....</b>	<b>37</b>
5.1.1	Expressionsanalysen während der Kardiomyogenese .....	37
5.1.2	Proteinlevel während der Kardiomyogenese .....	40
5.1.3	Immunfluoreszenz während der Kardiomyogenese .....	44
<b>5.2</b>	<b>Effekte von adrenergen Substanzen auf hiPSC Herzellen .....</b>	<b>47</b>
5.2.1	Beeinflussung der Herzfrequenz unter adrenergen Stimuli.....	47
5.2.2	Expressionsanalysen nach adrenerger Stimulation .....	49
5.2.3	Kalziummessung unter Einfluss adrenergen Stimuli .....	51
<b>5.3</b>	<b>Effekte von angiotensinergen Substanzen auf hiPSC Herzellen .....</b>	<b>53</b>
5.3.1	Expressionsanalysen nach angiotensinergem Stimulation .....	53
5.3.2	Proteinlevel nach angiotensinergem Stimulation .....	57
5.3.3	Immunfluoreszenz der YAP Translokation.....	60
5.3.4	Messung der Mitochondrienfunktion .....	61
<b>5.4</b>	<b>In-vivo Mausexperiment.....</b>	<b>64</b>
<b>5.5</b>	<b>Zusammenfassung der wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit.....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>68</b>
6.1	Kultivierung der hiPSC und Differenzierung zu Kardiomyozyten .....	68
6.2	Erkenntnisse über den Hippo-Signalweg.....	72
6.3	Effekte adrenerger Substanzen.....	74
6.4	Effekte angiotensinergem Substanzen .....	77
6.5	In-vivo Mausexperiment.....	81
6.6	Statistische Auswertung.....	82
6.7	Limitationen der Arbeit .....	82
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen.....</b>	<b>84</b>
<b>III</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>86</b>
<b>IV</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>91</b>

## Abkürzungsverzeichnis

### II Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ 1-AR	Alpha 1 Adrenorezeptor
$\alpha$ 2-AR	Alpha 2 Adrenorezeptor
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
AMI	akuter Herzinfarkt
Ang II	Angiotensin II
ATII-R1	Angiotensin II Rezeptor Typ 1
ATII-R2	Angiotensin II Rezeptor Typ 2
$\beta$ 1-AR	Beta 1 Adrenorezeptor
$\beta$ 2-AR	Beta 2 Adrenorezeptor
BMP-4	Differenzierungsfaktor
CHIR-99021	Enzyminhibitor der Glykogen-Synthase-Kinase 3
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ion
CCN1	Hippo-Signalweg assoziiertes Gen
CCN2	Hippo-Signalweg assoziiertes Gen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cMYC	Transkriptionsfaktor der Stammzellinduktion nach Yamanaka
CVD	kardiovaskuläre Erkrankungen
E8+S	Essential 8 Basal Medium + Essential 8 Supplement
FADH <sub>2</sub>	Redoxmolekül der Atmungskette
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase - interne Proteinkontrolle
Gata4	Transkriptionsfaktor der kardialen Entwicklung
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
hiPSC	humane induzierte pluripotente Stammzellen
HCN4	Isoform des Schrittmacherkanals am Herzen
iPSC	induzierte pluripotente Stammzellen
KHK	koronare Herzkrankheit

## Abkürzungsverzeichnis

KLF4	Transkriptionsfaktor der Stammzellinduktion nach Yamanaka
LATS	Komponente des Hippo-Signalwegs
$\mu\text{M}$	Stoffmengenkonzentration; mikromolar = mikromol pro Liter
mM	Stoffmengenkonzentration; millimolar = millimol pro Liter
MLC2v	ventrikelspezifische kardiale Myosin-leichte-Kette
MST	Komponente des Hippo-Signalwegs
MYH7	Isoform der kardialen Myosin-schwere-Kette
NADH	Redoxmolekül der Atmungskette
NF2	Komponente des Hippo-Signalwegs
Oct-4	Transkriptionsfaktor der Stammzellinduktion nach Yamanaka
OCR	Sauerstoffverbrauchsrate
pYAP	phosphoryliertes YAP am Serin-127
qrtPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
PD123319	selektiver Angiotensin II Rezeptor Typ 2 Antagonist
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SOX2	Transkriptionsfaktor der Stammzellinduktion nach Yamanaka
TEAD	Transkriptionsfaktor des Hippo-Signalwegs
unpYAP	unphosphoryliertes YAP am Serin-127
YAP	Transkriptionsaktivator des Hippo-Signalwegs
Y-27632	Inhibitor der Apoptose
WS	Waschschritt
vs.	versus

### 1 Zusammenfassung

Hintergrund: Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die weltweit häufigste Todesursache unserer Zeit und stellen bereits über viele Jahrzehnte eine Herausforderung an die Medizin dar. In den letzten Jahren konnte die Akutversorgung optimiert und damit das Überleben unmittelbar nach dem kardialen Ereignis verbessert werden. Allerdings zeigt sich eine stetige Zunahme der Morbidität von kardiovaskulären Erkrankungen mit Ausbildung einer chronischen Herzinsuffizienz. Prognosen zufolge wird die Zahl der Patienten mit einer Herzinsuffizienz in Zukunft weiter ansteigen. Um die Herzinsuffizienz auf zellulärer Ebene zu verstehen und neue Therapien zu entwickeln, ist die Erforschung humaner Herzzellen von zentraler Bedeutung. Die Kultivierung biotisch entnommener, menschlicher Kardiomyozyten gestaltete sich bislang jedoch kompliziert und ineffektiv. Eine elegantere Alternativmethode ist die Verwendung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen (hiPSC). Da adrenerge und angiotensinerge Stimuli mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert sind, wurden diese im Rahmen dieser Dissertation an hiPSC abgeleiteten Herzzellen untersucht. Des Weiteren wurde der Hippo-Signalweg analysiert, da dieser mit Proliferation und Herzumbau in Verbindung gebracht wird.

Methodik: Ziel dieses Projekts war es, neben dem Nachweis der erfolgreichen Herzzelldifferenzierung und der Untersuchung des Hippo-Signalwegs, die Effekte von adrenergen und angiotensinergen Stimuli zu charakterisieren. Dafür wurden neben Expressions-, Proteinanalysen und der Immunfluoreszenz auch Messungen der Mitochondrienfunktion und des Energiestoffwechsels angewendet.

Ergebnisse: Im ersten Schritt konnte die erfolgreiche Kardiomyogenese aus hiPSC mittels typischen embryonalen, mesodermalen und kardialen Markern bewiesen werden. Weiterhin konnte diese Arbeit den Einfluss des Hippo-Signalweges während der Kardiomyogenese charakterisieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die zentralen Komponenten des Signalwegs auf dem Weg von Stammzelle zur mesodermalen Vorläuferzelle vermehrt exprimiert werden, wohingegen die weitere Differenzierung zur Herzzelle eine sinkende Expression der Hippo-Komponenten zur Folge hatte. Dieses Ergebnis bewies das Proliferationspotential in den Vorläuferzellen und eine Minderung dieser Fähigkeit in differenzierten Kardiomyozyten. Die Stimulation der Herzzellen mit Adrenalin zeigte positiv chronotrope Effekte, während durch den  $\beta$ -Blocker Propranolol die Kontraktionsfrequenz gesenkt werden konnte. Weiterhin zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Expression des  $\beta$ 1-Adrenorezeptors

## Zusammenfassung

nach Stimulation mit Adrenalin, welcher wiederum durch die Vorbehandlung mit Propranolol verhindert werden konnte. Darüber hinaus konnte die Kalzium-Oszillationsfrequenz durch adrenerge Stimuli beeinflusst werden. Dabei konnte Dobutamin die Wirkung von Atenolol durchbrechen und die Kontraktionen der Zellen wiederherstellen. Die Stimulation mit Angiotensin II und Angiotensin-Rezeptorblockern löste Effekte auf die Expression ausgewählter Hippo-Komponenten aus. Dabei regulierte Angiotensin II die Expression dieser Proteine hoch, während Losartan als ATII-R1 Antagonist den gegenteiligen Einfluss offenbarte. Mithilfe von Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass der zentrale Transkriptionsfaktor YAP unter dem Einfluss von Angiotensin II in den Zellkern transloziert. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass Angiotensin II den Energiestoffwechsel der Zelle u.a. über den basalen Sauerstoffverbrauch, die Stress-Energiereserve und die ATP-Produktion signifikant steigert. Durch den selektiven Einsatz von Losartan und PD123319 konnte gezeigt werden, dass spezifisch das ATII-R2 Signal für diese Steigerung verantwortlich war und das ATII-R1 Signal gegenteilige Effekte hervorrief.

Schlussfolgerungen: Die Ergebnisse der Dissertation bestätigen, dass hiPSC erfolgreich zu Herzzellen differenziert, physiologische Stimuli untersucht und in-vitro Effekte ausgelöst werden können, die auch in-vivo zu erwarten sind. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse den aktivierenden Effekt von Angiotensin II auf den Hippo-Signalweg, welcher zentral an Differenzierungs- und Proliferationsprozessen beteiligt ist. Losartan offenbarte dabei den gegenteiligen Effekt auf die Komponenten dieses Signalwegs. In den letzten 20 Jahren konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass ATII-R1-Blocker die Mortalität von Herzpatienten senken und ein pathologisches Remodeling verhindern konnten. Die Ergebnisse dieser Dissertation legen die Vermutung nahe, dass dabei die Komponenten des Hippo-Signalwegs von Bedeutung sind, welche durch Losartan gehemmt werden können. Der Hippo-Signalweg ist möglicherweise in die Pathogenese des Herzremodeling involviert und stellt somit einen potenziellen Behandlungsansatz dar. Darüber hinaus zeigt das Projekt, dass Angiotensin II die Mitochondrienfunktion der Herzzellen modulieren kann. Womöglich ist der Verlust von ATII-R2 und damit ein Überwiegen des ATII-R1 Signals, ein Aspekt der mitochondrialen Dysfunktion, welche bei kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet wird. Die hiPSC abgeleiteten Herzzellen stellen ein einzigartiges in-vitro Modell dar, welches zum Verständnis der kardialen Pathophysiologie beitragen und als Alternative zu Tierversuchen und für pharmakologische Testungen angewendet werden kann.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Notwendigkeit kardiologischer Forschung**

Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) waren im Jahr 2014 die häufigste Todesursache in den USA. Laut Sterbestatistik forderten die CVD 2014 mehr Tote als Krebserkrankungen oder Erkrankungen des Respirationstrakts (NCHS 2016). Die CVD stellen schon über viele Jahrzehnte eine enorme Herausforderung an die moderne Medizin dar. Trotz der Tatsache, dass kardiovaskuläre Erkrankungen weiterhin die häufigste Todesursache darstellen, konnten in den vergangenen Jahrzehnten Fortschritte in der Akutversorgung erzielt werden. Die Sterbeziffer für den akuten Herzinfarkt (AMI) in Deutschland sank beispielsweise von 107 auf 59 vom Jahr 1990 zum Jahr 2014. Einen ähnlichen Trend gibt es bei der Sterbeziffer für die koronare Herzkrankheit (KHK) (Deutsche Herzstiftung 2016). Der verbesserten Akutversorgung von CVD steht jedoch eine steigende Zahl der stationären Morbidität der Herzinsuffizienz gegenüber, die sich im Zeitraum zwischen 1995 und 2015 von 275 auf 541 fast verdoppelt hat (Deutsche Herzstiftung 2016). Zusammenfassend zeigt sich eine Abnahme der Mortalität durch CVD u.a. durch verbessertes präklinisches Management und moderne Behandlungsmethoden. Demgegenüber steht eine Zunahme der Morbidität, welche durch die gesteigerte Lebenserwartung des Menschen und die Ausbildung einer chronischen Herzschwäche nach Überleben eines Akutereignisses zustande kommt. Prognosen zufolge wird die Zahl der Patienten mit Herzinsuffizienz bis 2030 in den USA auf 8 Millionen Menschen ansteigen, was etwa einem von 33 US-Bürgern entsprechen würde. Die damit verbundenen Gesamtkosten werden vermutlich von 31 Milliarden US-Dollar aus dem Jahr 2012 auf 70 Milliarden US-Dollar im Jahr 2030 steigen (Heidenreich et al. 2013). Diese Zahlen zeigen eindrucksvoll die Belastung und zukünftige Mehrbelastung des Gesundheitssystems durch die CVD. Ziel der zukünftigen Forschung sollte es sein, Faktoren auszumachen, die es ermöglichen noch früher zu intervenieren. Die Verhinderung des Akutereignisses im Sinne einer Primär- oder Sekundärprävention ist dafür essenziell. Weiterhin bedarf es einem besseren Verständnis der Ätiologie und Pathophysiologie der Herzinsuffizienz, um die Folgen des Akutereignisses und weitere Krankheitsmanifestationen von CVD abwenden zu können. Die Erforschung humaner Herzzellen ist für das Verständnis molekularer Zusammenhänge und bei der Entwicklung neuer Therapien von zentraler Bedeutung.

In den folgenden Abschnitten wird die Verwendung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen (hiPSC) genauer erörtert und zwei grundlegende Signalwege vorgestellt, die von physiologischer und pathophysiologischer Relevanz für die Entwicklung von CVD sind.

### **2.2 hiPSC-abgeleitete Herzzellen**

Um an menschlichen Herzzellen forschen zu können, muss man das Gewebe zunächst gewinnen und anschließend kultivieren. Zur Gewebegewinnung eignet sich aufgrund der anatomischen Lage des Herzens nur eine Biopsie. Die Herzmuskelbiopsie als eine invasive Methode ist jedoch mit zahlreichen Komplikationen wie z.B. mit der Entstehung eines Perikardergusses oder mit dem Hervorrufen von Herzrhythmusstörungen verbunden (Singh et al. 2018). Die häufigsten Gründe für eine Biopsie sind der Verdacht auf eine Kardiomyopathie, eine Herzinsuffizienz ohne kardialen Schock oder die Myokarditis (Singh et al. 2018). Zusätzlich ist die Kultivierung von bioptisch entnommenen, menschlichen Kardiomyozyten bisher unzureichend gelungen, da sich die gewonnenen Zellen ungenügend vermehren und nur noch bedingt spontan kontrahieren können (Louch et al. 2011). Aufgrund der komplikationsreichen Entnahme und der erschwerten Kultivierung, der auch meist kranken Herzzellen, ist eine kritische Indikationsstellung essenziell. Der reine Forschungszweck würde die möglichen Komplikationen der Herzmuskelbiopsie nicht rechtfertigen. Aufgrund der bereits beschriebenen Notwendigkeit zur kardiologischen Forschung, sollte eine Alternativmethode zur Gewebegewinnung genutzt werden.

Eine schonende und nicht invasive Alternative zur Herzmuskelbiopsie stellt die Herzzelldifferenzierung über humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) dar. Shinya Yamanaka generierte 2006 erstmals induzierte pluripotente Stammzellen (Takahashi und Yamanaka 2006) und revolutionierte damit die regenerative Medizin, wofür er 2012 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde (Liebau et al. 2014). Zur Erstellung einer Stammzelllinie kann die Yamanaka-Methode genutzt und beispielsweise menschliche Hautfibroblasten mit einem Sendai-Virus behandelt werden. Der Sendai-Virus aktiviert die Expression der vier Transkriptionsfaktoren: SOX2, Oct-4, KLF4 und cMYC („Yamanaka-Faktoren“), welche zur Reprogrammierung notwendig sind (Takahashi und Yamanaka 2006). Dieses Verfahren zeigt kein Risiko für eine Veränderung des Wirtsgenoms, da das RNA-Virus nur im Zytoplasma repliziert, keine Integrasefunktion besitzt und anschließende

## Einleitung

Zellteilungen der Stammzellen die Viruslast reduzieren (Fusaki et al. 2009). Humane Fibroblasten können so zu Stammzellen reprogrammiert werden und besitzen anschließend die Fähigkeit erneut zu differenzieren. Mithilfe dieser Zellen können Krankheiten, durch Erstellung von in-vitro Modellen, zuverlässig untersucht werden und neue Behandlungsstrategien entwickelt werden (Liu et al. 2020). Die Erzeugung von hiPSC aus menschlichen adulten Zellen hat in den letzten Jahren große Hoffnung in der translationalen Medizin geweckt. Aus leicht zugänglichen Hautzellen können mittels Biopsie und Reprogrammierung, Zellen aus allen drei Keimblättern (Entoderm, Mesoderm oder Ektoderm) hergestellt werden (Fusaki et al. 2009). Neben der Forschung an Krankheitsmodellen, können hiPSC für Arzneimitteltests und als Alternative für Tierversuche verwendet werden. Aktueller Gegenstand der Forschung ist die Fragestellung, ob sich hiPSC als Quelle für personalisierte Zellen für regenerative Therapien und autologen Transplantationen eignen (de Lazaro et al. 2014).

Die hiPSC werden zunächst in einem Basalmedium kultiviert, welches die vorzeitige Differenzierung verhindert. Mithilfe eines geeigneten Differenzierungsprotokolls können die Zellen z.B. zu Kardiomyozyten differenziert werden. Nach erfolgreicher Kultivierung induziert die Zugabe von BMP-4 die spontane Differenzierung. Das weitere Hinzugeben von CHIR-99021 und Insulin begünstigt die mesodermale Spezifikation der Zellen. Die Zugabe von Activin-A fördert die Differenzierung zur Herzzelle (Peischard et al. 2017, Bekhite et al. 2020). Zusätzlich ist der Rock-Inhibitor Y-27632 im Medium enthalten, um apoptotische Zellsignale zu reduzieren und das Überleben der Zelle zu begünstigen (Peischard et al. 2017). Innerhalb von 8 Tagen entsteht unter geeigneten Bedingungen eine pulsierende Monoschicht. Dabei ist eine Reinheit der Herzzellkultur von mehr als 99% möglich (Rojas et al. 2017) und wird u.a. durch einen Wechsel von glukosehaltigem Medium zu laktosehaltigem Medium erreicht, da so nichtmuskuläre Zellen die Fähigkeit verlieren, den Energiehaushalt aufrechtzuerhalten und folglich in Apoptose geraten (Bekhite et al. 2020). Nach 28 Tagen entstehen unter optimalen Voraussetzungen reife, hochreine, adulte Kardiomyozyten. Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen die erfolgreiche Herzzelldifferenzierung der hiPSC anhand reifer Herzstrukturproteine und der Aktivität metabolischer Gene. Das Differenzierungsprotokoll ist in Jena etabliert und bereits erfolgreich publiziert worden (Bekhite et al. 2020).

### 2.3 Physiologische Grundlagen

#### 2.3.1 Herzentwicklung

Die Herzentwicklung beginnt früh in der menschlichen Embryogenese und ist ein hochkomplexer Vorgang. In diesem Gliederungspunkt soll nur eine kurze Übersicht zur Herzentwicklung gegeben werden.

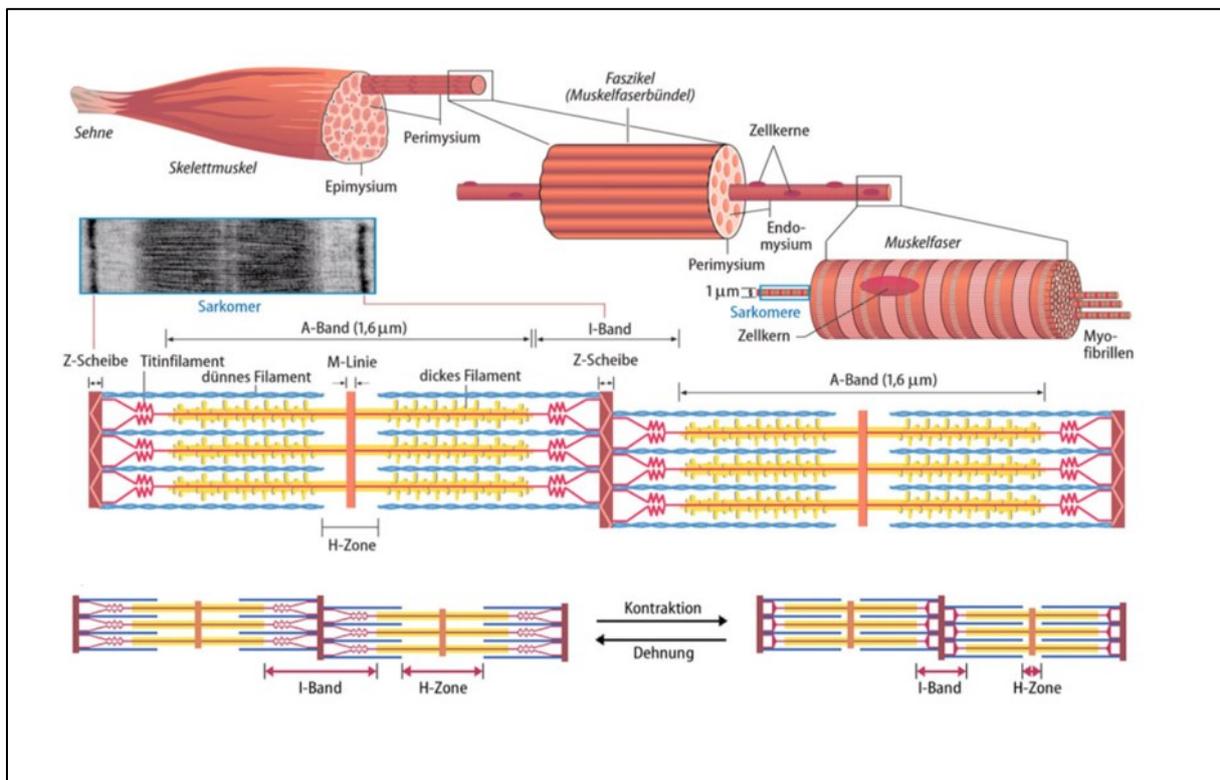
*„...Die ersten noch unregelmäßigen Kontraktionen des Herzens können bereits zu Beginn der 4. Woche beobachtet werden. Bis zum 20. Entwicklungstag ist das Herz ein in der Medianebene gelegener Schlauch...“ (Zilles und Tillmann 2010)*

Die paarig angelegten Herzanlagen entwickeln sich, während der lateralen Abfaltung zu einem Herzschlauch, welcher bereits rhythmische Kontraktionen initiiert (Christoffels et al. 2000). Ausgehend vom embryonalen Herzschlauch entsteht durch Wachstum und Drehungen die Herzschleife, welche durch komplexe morphogenetische Abläufe zum synchron kontrahierenden Herz reift. Während dieses Prozesses entstehen vier Kammern, ein getrennter pulmonaler und systemischer Blutfluss und ein funktionierendes Reizleitungssystem (Christoffels et al. 2000). Neben der makroskopischen Morphogenese ist v.a. die Histogenese des Zellgewebes interessant, da für verschiedene Stadien Gewebemarkern nachweisbar sind. Aus dem embryonalen Gewebe entstehen zunächst mesodermale Zellen, welche sich dann weiter in Herzzellen differenzieren können. Während die Vorläuferzellen noch teilungsfähig sind, verliert das differenzierte Herzgewebe diese Fähigkeit größtenteils und es bleibt nur eine minimale Proliferationsfähigkeit adulter Kardiomyozyten (Pasumarthi und Field 2002). Das erfolgreiche Durchlaufen der Differenzierungsstufen kann anhand von Gewebemarkern nachgewiesen werden. Für den Nachweis des embryonalen Gewebes eignen sich z.B. die Yamanaka Faktoren: SOX2, Oct-4, KLF4 und cMYC (Takahashi und Yamanaka 2006). Die hiPSC können sich aus dem undifferenzierten Zustand, in jede Richtung aus den drei möglichen Keimblättern entwickeln (Fusaki et al. 2009). Gelingt die Selektion von mesodermalen Zellen, so kann man die Expression der Marker Brachyury und Gata4 nachweisen (Stennard et al. 2003). Die erfolgreiche Kardiomyogenese kann schließlich durch herzspezifische Sarkomerproteine wie zum Beispiel  $\alpha$ -Actinin, die kardiale Myosin-schwere-Kette (cMHC) oder die kardiale ventrikuläre Myosin-leichte-Kette (MLC2v) nachgewiesen werden. Diese Strukturbestandteile des Sarkomers sind für die nachfolgend beschriebene Herzkontraktion notwendig (Schmidt et al. 2010).

## Einleitung

### 2.3.2 Kardiale Kontraktion

Abbildung 1 zeigt schematisch den Aufbau des quergestreiften Muskels. Dieser besteht aus Muskelfasern, welche wiederum aus Myofibrillen aufgebaut sind. Die Myofibrille ist eine Aneinanderreihung von Sarkomeren, welche die funktionellen Einheiten darstellen. Im Sarkomer befinden sich u.a. Aktin- und Myosinfilamente. Diese beiden Filamente gleiten bei einer Kontraktion aneinander vorbei, ohne sich dabei selbst zu verkürzen. Dies wurde erstmalig in der sog. Gleitfilamenttheorie von H.E. Huxley und J. Hanson im Jahr 1954 beschrieben und bildet die Grundlage des Verständnisses über die Muskelkontraktion (Huxley und Niedergerke 1954, Huxley und Hanson 1954).



**Abbildung 1: Aufbau des quergestreiften Muskels**

Quelle: Schmidt et al. (2010)

Den molekularen Mechanismus der Muskelkontraktion beschrieben R.W. Lymn und E.W. Taylor im Jahr 1971 als Querbrückenzyklus (Lymn und Taylor 1971). Die Ausgangsstellung des Myosinkopfs, welcher an das Aktinfilament gebunden ist, wird durch ATP gelöst. Die ATPase-Aktivität des Myosinkopfs spaltet ATP in ADP und ein anorganisches Phosphat. Diese Reaktion führt zur Ablösung und Vorspannung des Myosinkopfs. In Anwesenheit von Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) am Troponin C in der Zelle,

## Einleitung

liegt die Myosinbindungsstelle am Aktin frei. Der Myosinkopf kann daraufhin an Aktin binden und eine Querbrücke bilden. Durch die Abgabe des Phosphats wird Energie frei, welche den Kraftschlag auslöst. Der Myosinkopf bewegt sich dabei in Richtung Ausgangsstellung. Ein zweiter Kraftschlag erfolgt anschließend durch das sich ablösende ADP. Die Ablösung des Myosins vom Aktin ist nun wieder ATP abhängig (Schmidt et al. 2010).

*„...Der Herzmuskel besitzt mit Myosin, Aktin, Troponin und Tropomyosin Proteine des Sarkomers, die in Aufbau und Funktionen mit denen des Skelettmuskels grundsätzlich vergleichbar sind. Auch die Wechselwirkungen zwischen Myosinkopf und Aktinfilament (Querbrückenzyklus) sind im Prinzip ähnlich denen des Skelettmuskels...“ (Klinke et al. 2010)*

Der grundsätzliche Aufbau und die Theorie des Querbrückenzyklus lassen sich auf den Herzmuskel übertragen. Die Besonderheit ist aber die intrinsische autonome Kontraktion (Goss 1942). Die physiologische Grundlage dafür stellt der HCN-Kanal dar, welcher einen „Schrittmacherstrom“ erzeugt und so die spontane Aktivität ermöglicht (Schmidt et al. 2010). Des Weiteren spielt Kalzium eine entscheidende Rolle, da es von Troponin C gebunden wird und nur so die Myosinbindungsstelle am Aktin freiwerden kann.  $\text{Ca}^{2+}$  ist ebenfalls bedeutend bei elektrophysiologischen Prozessen am Herzen und ein wichtiger second messenger verschiedener Signaltransduktionen wie z.B. durch  $\beta$ -adrenergen Stimulation (Bers 2008). Die intrazelluläre Kalziumkonzentration unterliegt dabei einer strengen Regulation, da diese u.a. die Kontraktionsfrequenz als auch die Kontraktionsintensität beeinflusst (Triposkiadis et al. 2009). Der extrazelluläre Zufluss von  $\text{Ca}^{2+}$  beziehungsweise dessen Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) erhöht dabei die intrazelluläre Kalziumkonzentration, welche sich durch vermehrte Troponin-C Bindung durch eine Kontraktion äußert. Weiterhin existieren Transporter, welche  $\text{Ca}^{2+}$  in den Extrazellularraum, in das SR oder in das Mitochondrium zurückpumpen und somit Kontraktionen reduzieren bzw. verhindern können. Durch den ständigen Wechsel aus intrazellulärem Zu- und Abfluss ergibt sich eine oszillierend veränderliche intrazelluläre Kalziumkonzentration (Bers 2008). Die Kalzium-Oszillation kann in lebenden Kardiomyozyten über Immunfluoreszenz mit Fluo-4 als Kalziumindikator nachgewiesen werden. Fluo-4-AM ist zellwandpermeabel (Gee et al. 2000). Intrazellulär spaltet eine Esterase den AM-Teil ab und Fluo-4 kann anschließend durch 494nm Licht angeregt werden und emittiert daraufhin Licht im Spektrum von 516nm.

## Einleitung

Kommt es zur Bindung von Fluo-4 mit  $\text{Ca}^{2+}$  verstärkt sich diese Emission (Gee et al. 2000). Neben der Aufzeichnung der intrazellulären Ruhekalziumspur, kann auch die Modulation der Kalzium-Oszillation durch adrenerge Stimuli untersucht werden.

### 2.3.3 Adrenerges System

Das adrenerge System ist von essenzieller Bedeutung für die physiologische Regulation des Menschen und stellt den Großteil des sympathischen Nervensystems dar. Der Sympatikus beeinflusst den Körper, indem er die Leistungsbereitschaft einzelner Organe erhöht. Dabei werden Energiereserven abgebaut und der Körper wird in einen Alarmzustand gebracht. Diese Reaktion beschrieb W.B. Cannon im Jahr 1915 erstmalig als „fight or flight“ bzw. Kampf-oder-Flucht-Reaktion. Der Körper reagiert auf ein potenziell schädliches Ereignis mit einer vermehrten Ausschüttung von Adrenalin aus dem Nebennierenmark (Cannon 1915). Das sympathische Nervensystem ist heute anatomisch, physiologisch und biochemisch gut verstanden. Der Sympatikus leistet einen wesentlichen Beitrag zur Homöostase, welche u.a. durch die Regulation von Herzfrequenz und Blutdruck, die Kontraktion der Harnblasensphinkter, die Fokussierung der Augen und die Thermoregulation aufrechterhalten wird (McCorry 2007). Die afferente Wahrnehmung des Nervensystems erfolgt über verschiedene Rezeptoren in den Organen im Thorax und Abdomen und wird durch afferente Fasern auf Hirnstamm und Hypothalamus übertragen. Das Kontrollzentrum des Hypothalamus verarbeitet die Reize und leitet Signale über efferente Fasern ins Rückenmark zurück und anschließend kommt es über die Verbindung zu den Erfolgsorgane zur Erhöhung der adrenergen Signaltransduktion (McCorry 2007). Dabei liegen in den Seitenhörnern des Rückenmarks die ersten, sog. präganglionären Neurone, des Sympatikus. Die Impulse werden von dort auf die zweiten, sog. postganglionären Neurone im paravertebralen Grenzstrang übertragen und von dort über den Transmitter Noradrenalin ins Zielorgan geleitet. Eine Ausnahme stellen die Schweißdrüsen dar, die über den Transmitter Acetylcholin beeinflusst werden (McCorry 2007). Das Nebennierenmark wird als modifiziertes postganglionäres Neuron bezeichnet, da es direkt über das präganglionäre Neuron angesteuert wird und als Reaktion 20% Noradrenalin und 80% Adrenalin sekretiert (McCorry 2007). Noradrenalin und Adrenalin werden als Katecholamine bezeichnet und vermitteln ihre Effekte über G-Protein gekoppelte Rezeptoren in den Zellmembranen der Erfolgsorgane. Die Stimulation des Rezeptors von extrazellulär verursacht über ein gekoppeltes G-Protein ein intrazelluläres Signal.

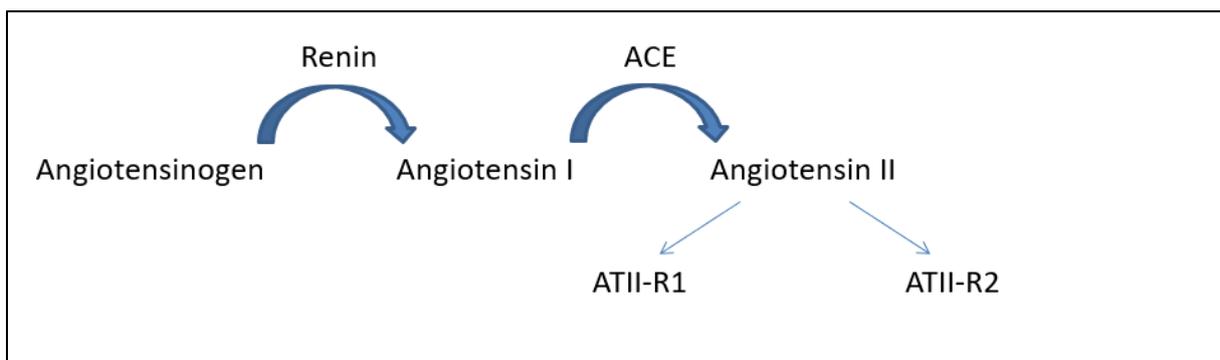
## Einleitung

Dabei werden in verschiedenen Geweben unterschiedliche Typen von Adrenorezeptoren exprimiert (McCorry 2007). Die Stimulation des Alpha 1 Adrenorezeptors ( $\alpha$ 1-AR) vermittelt an Gefäßen eine Vasokonstriktion. Ein Antagonist, welcher diese Rezeptoren blockiert, verursacht gegenteilig eine Vasodilatation und kann somit beispielsweise zur Bluthochdrucktherapie eingesetzt werden. Die Aktivierung des  $\alpha$ 2-AR vermittelt eine Reduktion der Transmitterausschüttung und wirkt hemmend im sympathischen Nervensystem. Beta 1 Adrenorezeptoren ( $\beta$ 1-AR) sind vorrangig am Herzen exprimiert und erhöhen bei Stimulation die Herzaktivität. Dazu zählen eine Herzfrequenzerhöhung (Chronotropie), die Steigerung der Kontraktionskraft (Inotropie) und eine beschleunigte Relaxation (Lusitropie) und Erregungsleitung (Dromotropie) (Triposkiadis et al. 2009). Die Aktivierung des  $\beta$ 2-AR erschafft die Gefäßmuskulatur und die glatte Atemwegsmuskulatur und führt somit konträr zum  $\alpha$ 1-AR zu einer Vasodilatation bzw. Bronchodilatation. Die Expression der Rezeptoren unterscheidet sich im Körper, so dass der Sympatikus über die beschriebenen Mechanismen ein gewebespezifisches Ereignis in der Zielzelle auslösen kann (McCorry 2007).

Adrenorezeptoren stellen Zielstrukturen für eine Vielzahl pharmakologischer Therapien dar. Adrenalin besitzt eine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Aktivität und stellt somit ein unselektives Sympatomimetikum dar. Dobutamin wirkt selektiv als Agonist am  $\beta$ 1-AR. Propranolol blockiert  $\beta$ 1-AR und  $\beta$ 2-AR und ist somit ein nicht herzselektives Sympatolytikum. Atenolol wirkt herzselektiv als Antagonist am  $\beta$ 1-AR (Bekhite et al. 2020). Die kardialen sympathischen Nervenfasern wandern entlang der Koronararterien und erzielen eine Vielzahl von Wirkungen am Herzen, welche vorrangig über die  $\beta$ 1-Signaltransduktion vermittelt werden. Die Regulation der Herzaktion über den Sympatikus ist für die Pathophysiologie von Herzerkrankungen von zentraler Bedeutung. Kommt es aufgrund einer Pathologie zur Verminderung des Schlagvolumens, wird kompensatorisch die Sympatikusaktivität erhöht, um ein ausreichendes Herzminutenvolumen für den Körper zu gewährleisten (Triposkiadis et al. 2009). Diese gesteigerte Signaltransduktion führt im Verlauf zu einer Desensibilisierung des Systems, welche beispielsweise durch Herunterregulierung der G-Protein gekoppelten Adrenorezeptoren hervorgerufen wird (Rajagopal und Shenoy 2018). Die entstehende Dysregulation der kardialen sympathischen Signaltransduktion ist ein Schlüsselmerkmal der Herzinsuffizienz (Triposkiadis et al. 2009).

### 2.3.4 Angiotensinerges System

Neben der Dyslipidämie, der Hypertonie, dem Diabetes mellitus und der erhöhten Sympathikusignaltransduktion ist eine erhöhte Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ein bedeutender Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse (Triposkiadis et al. 2009, Yusuf et al. 2000). H. Goldblatt beschäftigte sich im 20. Jahrhundert intensiv mit dem Mechanismus der arteriellen Hypertonie und entdeckte, dass eine verminderte Perfusion der Niere sekundär zum Bluthochdruck führt (Goldblatt et al. 1933). Über den sog. Goldblatt-Mechanismus kommt es bei mangelnder Perfusion der Niere zur reaktiven Freisetzung von Renin. Abbildung 2 zeigt schematisch den Aufbau des RAAS. Die renale Protease Renin spaltet das Leberprotein Angiotensinogen zu Angiotensin I, welches durch das Angiotensin konvertierende Enzym (ACE) zu Angiotensin II (Ang II) prozessiert wird. Ang II entfaltet seine Wirkung über zwei membranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, den ATII-R1 und den ATII-R2 (Dostal und Baker 1999).



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Renin-Angiotensin-Systems**

Der ATII-R1 ist der am häufigsten untersuchte Angiotensin II Rezeptor und wird mit zahlreichen Effekten in Verbindung gebracht. Dazu gehören u.a. die Vasokonstriktion, die Natriumretention, die Zellproliferation, die Induktion einer Herz- und Gefäßhypertrophie sowie die Assoziation zu oxidativem Stress und einer Entzündungsreaktion. Außerdem erhöht der ATII-R1 die Freisetzung von Aldosteron, welches die Volumen- und Elektrolythomöostase reguliert (Faria-Costa et al. 2014). Dem ATII-R2 werden entgegengesetzte Wirkungen zum ATII-R1 zugeschrieben, u.a. kommt es zur Protektion vor Bluthochdruck und zur Reduktion der Infarktgröße nach Myokardinfarkt (Faria-Costa et al. 2014). Das RAAS wird mit Herz- und Gefäßpathologien, der koronaren Herzkrankheit und der Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht (Dostal und Baker 1999) und kann pharmakologisch z.B. mit

## Einleitung

einem ACE-Hemmer beeinflusst werden. Die Behandlung mit Ramipril zeigte signifikant reduzierte kardiovaskulär bedingte Sterberaten (651 vs. 826;  $p < 0,001$ ), Myokardinfarkte (459 vs. 570;  $p < 0,001$ ) und Schlaganfälle. Darüber hinaus entwickelte sich signifikant weniger eine Herzinsuffizienz in der Interventionsgruppe gegenüber der Placebogruppe (Yusuf et al. 2000). Die Therapie mit einem ATII-R1 Blocker zeigte in Studien vergleichbare Effekte wie die Behandlung mit einem ACE-Hemmer (Omboni und Volpe 2019). ACE-Hemmer und ATII-R1 Blocker gehören aufgrund dieser prognostisch relevanten Erkenntnisse zu den Medikamenten der ersten Wahl bei arterieller Hypertonie (Chen et al. 2018). Diese Medikamente wirken sich lebensverlängernd bei Risikopatienten aus, stellen somit die enorme Bedeutung des RAAS heraus und begründen die Relevanz diesen Signalweg genauer zu untersuchen. Trotz vieler und umfangreicher Studien zur pharmakologischen Beeinflussung des RAAS, ist die zelluläre Wirkung von Angiotensin II noch nicht komplett entschlüsselt. Bestandteile des RAAS wurden in den letzten Jahren lokal in Geweben, wie z.B. im Herz nachgewiesen (Dostal und Baker 1999). Es stellte sich dabei die Frage, wie Ang II in die Herzzelle gelangt bzw. ob eine lokale Synthese vorliegt. An Schweineherzen zeigte die ventrikuläre Infusion eine Aufnahme des verabreichten radioaktiv-markiertem Angiotensin II. Da ATII-R1 Antagonisten diese Aufnahme fast vollständig blockieren konnten, spricht dieses Ergebnis dafür, dass die Internalisierung von Ang II eine wichtige Rolle spielt (van Kats et al. 1997). Neri Serneri et al. konnten in Untersuchungen die Existenz eines lokalen kardialen RAAS im menschlichen Herz zeigen, die Angiotensin II Internalisierung beweisen und vermuteten zusätzlich eine lokale kardiale Synthese von RAAS Komponenten (Neri Serneri et al. 1996). Des Weiteren zeigte sich, dass eine myokardiale Druckbelastung die Expression des ATII-R1 im linken Ventrikel erhöht (Wang et al. 1997). Eine Überexpression des ATII-R1 im Mausmodell, ergab wiederum einen Herzumbau (Remodeling), eine Herzhypertrophie und folglich eine Herzinsuffizienz (Paradis et al. 2000). Verknüpft man diese Erkenntnisse, liegt die Vermutung nahe, dass das lokale kardiale Angiotensin II an der Pathogenese des Remodelings und der Entstehung der Herzinsuffizienz beteiligt ist. Wennmann et al. zeigten, dass Angiotensin II über den ATII-R1 die nukleäre Translokation von YAP, einem zentralen Faktor des Hippo-Signalwegs, verstärkt (Wennmann et al. 2014). Der Hippo-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei Wachstums- und Proliferationsprozessen (Harvey et al. 2003) und wird weiter unten genauer ausgeführt.

## Einleitung

Zusammenfassend lässt sich die Kausalkette wie folgt vermuten. Über den Goldblatt-Mechanismus wird Angiotensin II prozessiert. Anschließend wird Ang II am Herzen internalisiert und lokal der Hippo-Signalweg aktiviert, welcher Proliferationsvorgänge beeinflusst und im Verlauf einen pathologischen Herzbau und eine Herzinsuffizienz begünstigen kann. Schließlich umgeht die pharmakologische Therapie im RAAS diesen Pathomechanismus, senkt das lokale kardiale Ang II und das Hippo-Signal ab. Korrelierend konnte diese Therapie bereits in zahlreichen Studien signifikant reduzierte Sterberaten und Myokardinfarkte zeigen (Yusuf et al. 2000).

### 2.3.5 Herzinsuffizienz

R. Virchow beschäftigte sich in seiner Veröffentlichung „Die Cellularpathologie“ im Jahr 1858 u.a. mit Erkrankungen des Herzmuskels.

*„...Die Myocarditis erzeugt ganz analoge Formen der fettigen Degeneration innerhalb des Herzfleisches, wie die übermässige Dilatation der Herzhöhlen. Wenn eine der letzteren z.B. durch Hemmung des Blutstromes oder Insufficienz der Klappen dauernd sehr ausgespannt wird, so tritt an dem am meisten gespannten Theile constant eine fettige Degeneration des Muskelfleisches ein. Diese Form gleicht morphologisch vollständig den Anfangsstadien der Myocarditis, und in vielen Fällen ist überhaupt gar nicht mit Sicherheit zu sagen, auf welche Weise der Prozess entstanden sein mag...“ (Virchow 1858)*

In seiner 16. Vorlesung beschrieb Virchow die Fettmetamorphose des Herzens anhand histologischer Beobachtungen und erkannte Lipidakkumulationen als chronische Veränderungen des Herzmuskels aufgrund entzündlicher Reize und anderer Ätiologien wie zum Beispiel aufgrund einer Klappeninsuffizienz. Zahlreiche Herzerkrankungen, wie z.B. Herzvitien, Herzrhythmusstörungen oder auch Infektionen belasten den Herzmuskel. Geht diese Beanspruchung über die physiologische Grenze hinaus, kommt es zur Dysfunktion. Zugrunde liegt dabei u.a. die dauerhafte Exposition mit zahlreichen Risikofaktoren, wie z.B. eine erhöhte Sympathikussignaltransduktion und eine verstärkte RAAS Aktivität (Yusuf et al. 2000, Triposkiadis et al. 2009). Die Kardiomyozyten adaptieren und verändern sich nicht nur klinisch in Größe und Form, sondern auch zellulär und molekular. Es kommt zu Aberrationen im Stoffwechsel und zu Akkumulationen von Stoffwechselprodukten, wie z.B. der Ansammlung von Lipidzwischenprodukten. Die Akkumulationen sind wiederum an der Entwicklung der Herzinsuffizienz beteiligt (Chen et al. 2019). Die Lipidakkumulation erkannte und

## Einleitung

beschrieb Virchow schon im 19. Jahrhundert als Fettmetamorphose. Heute wird der pathologische Umbauprozess des Herzens, welcher sich molekular, zellulär und metabolisch äußert und u.a. durch Risikofaktoren ausgelöst wird, als pathologisches Remodeling beschrieben. Das klinische Korrelat dieses Prozesses ist die Herzschwäche bzw. Herzinsuffizienz, die durch Abnahme der systolischen oder diastolischen Herzfunktion gekennzeichnet ist und dazu führt, dass das Herz nicht genug Blut für den Erhalt der physiologischen Funktionen pumpt (Chen et al. 2019). Bereits 1939 beschrieben G. Herrmann und G. Decherd einen signifikant reduzierten Kreatingehalt beim Herzversagen (Herrmann und Descherd 1939). Neubauer postulierte auf Grundlage dieser Erkenntnis, dass das versagende Herz mechanistisch mit einem Motor, dessen Kraftstoff ausgeht, verglichen werden kann (Neubauer 2007). Heute ist der Energiestoffwechsel des Herzens ein Thema von großem Interesse, da die Behandlung der Herzinsuffizienz mit  $\beta$ -AR-Blockern, ACE-Hemmern oder auch AT-II-Rezeptorblockern die Prognose verbessert und dabei energiesparende Effekte ausübt (Neubauer 2007). Stoffwechselveränderungen sind eine Eigenschaft der Herzinsuffizienz, manifestieren sich u.a. in einer Abnahme der ATP-Konzentration um bis zu 30% und in einer Umstellung des Hauptenergiesubstrats von Fettsäuren auf Glucose (Chen et al. 2019). Wenn nicht genügend Energie erzeugt wird, führt dies zu einem mechanischen Versagen des Herzens. Dabei wird ungenügend chemische Energie in mechanische Energie umgewandelt, der Kraftstoff geht aus und somit ist u.a. die Aktin-Myosin-Wechselwirkung beeinträchtigt (Neubauer 2007). Die entstehende linksventrikuläre Dysfunktion mit unzureichendem Schlagvolumen wird mit Gegenmaßnahmen des Körpers zur Wiederherstellung des Herzzeitvolumens beantwortet. Diese Reaktionen sind zunächst kompensatorisch (Chen et al. 2019). Zu den Anpassungen gehören u.a. die Aktivierung des sympathischen Nervensystems, welches das Herz inotrop unterstützt, das Schlagvolumen erhöht und den arteriellen Perfusionsdruck über periphere Vasokonstriktion aufrechterhält. Kompensatorisch kommt es ebenfalls zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Die reaktiv erhöhte adrenerge und angiotensinerge Signaltransduktion führt schließlich zum Fortschreiten der Krankheit und beeinflusst das Überleben negativ (Yusuf et al. 2000, Triposkiadis et al. 2009). Die Herzinsuffizienz manifestiert sich dann als Endstation aufgrund einer Überkompensation von verschiedenen kardiovaskulären Grunderkrankungen. In den westlichen Ländern zählt die koronare Herzkrankheit zu den häufigsten Ursachen der Herzinsuffizienz (Lip et al. 2000). Die KHK ist

## Einleitung

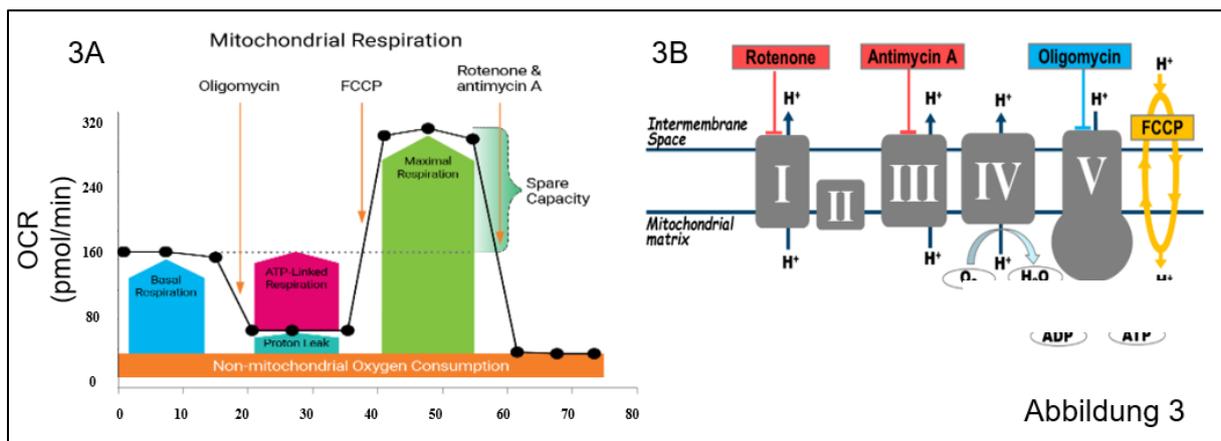
charakterisiert durch eine stetig progressive, arteriosklerotisch bedingte Verengung der Koronargefäße und eine damit verbundene begrenzte Blutversorgung des Herzgewebes. Wenn plötzlich der Sauerstoffbedarf des Herzgewebes nicht mehr gedeckt werden kann, kommt es zum Herzinfarkt (Frangogiannis 2015). Bleibt dabei die rechtzeitige Reperfusion aus, gehen die unversorgten Myokardzellen irreversibel verloren. Überlebt der Herzinfarktpatient dieses Ereignis, heilt das betroffene Areal als Narbe aus. Im weiteren Verlauf kommt es zu den beschriebenen Kompensationsprozessen, zum Umbau des Herzens und nach Jahren zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz durch Herzremodeling (Frangogiannis 2015). Die Framingham-Herz-Studie zeigte eine deutliche Progredienz an Patienten mit Herzinsuffizienz in den letzten Jahrzehnten und bestätigte eine 5-Jahres-Überlebensrate dieser Erkrankung von unter 50% (Ho et al. 1993). Um diese enorme medizinische und wirtschaftliche Belastung eindämmen zu können, sind Strategien erforderlich, die der Entstehung der Herzinsuffizienz präventiv entgegenwirken. Weiterhin sollten neue Ansätze gefunden werden, den Krankheitsprogress zu verlangsamen und das Remodeling zu verhindern. Vor allem die zugrundeliegenden Stoffwechselaberrationen gilt es zu verstehen, da diese oftmals wesentlich früher im Krankheitsverlauf auftreten (Chen et al. 2019). Die Therapie der metabolischen Dysfunktion der erkrankten Herzzellen könnte ein enormer Schritt in der Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen sein und eventuell zahlreiche Folgeerscheinungen und Todesfälle der Herzinsuffizienz verhinderbar machen.

### 2.3.6 Zellulärer Energiestoffwechsel

Es wurde bereits beschrieben, dass ATP essenziell für den Querbrückenzyklus und der damit verbundenen kardialen Kontraktion ist. Weiterhin wurde verdeutlicht, dass die Herzinsuffizienz mit Stoffwechselveränderungen einhergeht und es dabei zu einer Abnahme der ATP-Konzentration um bis zu 30% kommt (Chen et al. 2019). Der kardiale Energiestoffwechsel hat somit eine direkte Verbindung zu Herzpathologien und kann in drei Prozesse unterteilt werden. Man unterscheidet die Substratverwertung, die oxidative Phosphorylierung und die ATP Verwendung. Dabei umfasst die Substratverwertung: die Substrataufnahme, den Substratabbau (z. B.  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, Glykolyse von Glucose) und die anschließende Verwertung des Substrats im Citratzyklus (Chen et al. 2019). In der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung werden NADH und FADH<sub>2</sub> verwertet, welche während des Substratabbaus generiert worden. Dabei wird ein Protonengradient in der

## Einleitung

Atmungskette aufgebaut und mithilfe dieser Triebkraft ADP zu ATP phosphoryliert (Chen et al. 2019). Letztlich wird das ATP u.a. für die Herzkontraktion verwendet. Bei der Herzinsuffizienz kommt es zu Aberrationen im Energiestoffwechsel (Chen et al. 2019). Die hiPSC abgeleiteten Herzzellen ermöglichen die in-vitro Messung der Mitochondrienfunktion als zentralen Bestandteil des Energiestoffwechsels. Dabei lassen sich typische Kompensationsmechanismen, welche wie oben beschrieben in-vivo bei Herzpathologien auftreten, am hiPSC-Modell simulieren. Die hiPSC abgeleiteten Herzzellen werden dafür einem Mito-Stresstest unterzogen. Zentraler Bestandteil dieser Messung ist die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR), welche in Echtzeit über der Zellschicht registriert wird. Mithilfe von dem im Test integrierten Sensorsonden und Abgabesystemen können die Änderungen der OCR im Medium und nach sequenzieller Behandlung mit Oligomycin, FCCP, Rotenon bzw. Antimycin A gemessen werden (Divakaruni et al. 2014). Abbildung 3 zeigt den schematischen Ablauf des Mito-Stresstests und die Angriffspunkte der darin injizierten Substanzen (Agilent Technologies 2019).



**Abbildung 3: Schematischer Ablauf des Mito-Stresstests**

3A Messung der Sauerstoffverbrauchsrate über die Zeit; 3B Angriffspunkte der injizierten Substanzen  
Quelle: Agilent Technologies (2019)

Mithilfe der aufgenommenen Daten kann die basale Sauerstoffverbrauchsrate, die ATP-Produktion, der Protonleak, der maximale Sauerstoffverbrauch und die Spare Respiratory Capacity ermittelt werden (Agilent Technologies 2019). Der Protonleak beschreibt dabei den minimalen Protonenverlust durch Undichtigkeit der inneren Mitochondrienmembran und ist bisher noch nicht vollständig verstanden (Divakaruni et al. 2014). Die Spare Respiratory Capacity zeigt die freisetzbare Energiereserve der Mitochondrien an und ist ein Parameter für die Fähigkeit auf Stressreize zu reagieren (Divakaruni et al. 2014). Die Messung der beschriebenen Parameter gibt Auskunft

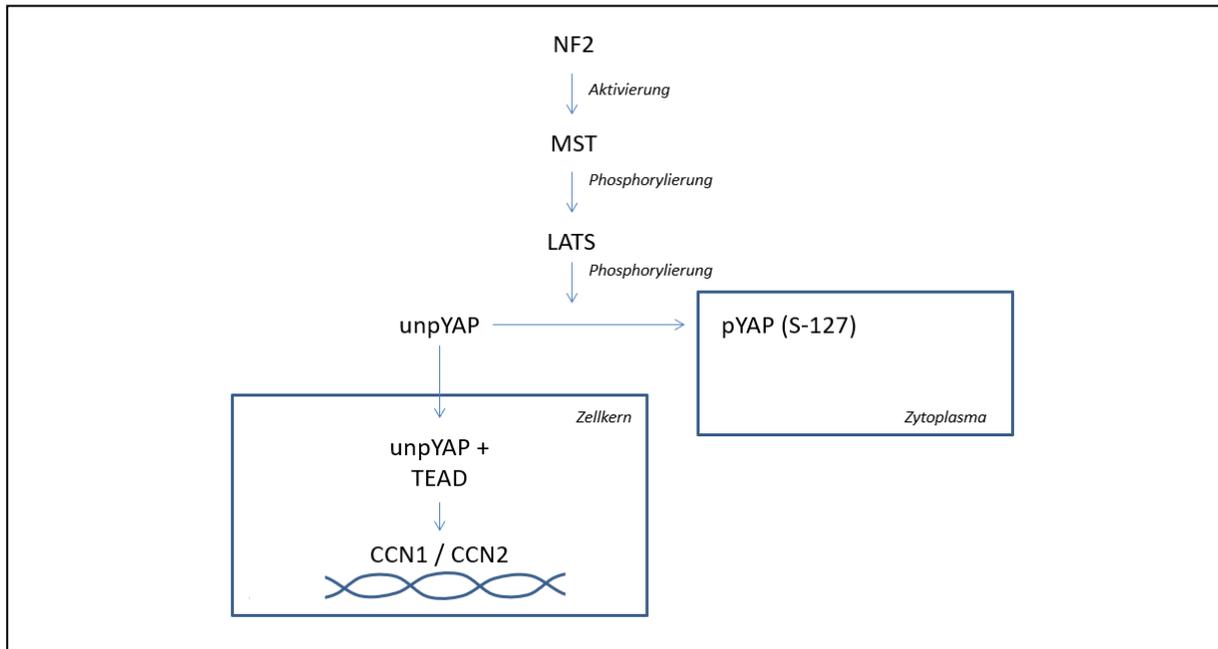
## Einleitung

über die Funktion der Mitochondrien und den Energiestoffwechsel der Zelle. Dabei gilt es zu beachten, dass jeweils immer die gleiche Anzahl von hiPSC Herzzellen miteinander verglichen werden, um keinen systematischen Fehler zu begehen. Die Untersuchung von verschiedenen kardialen Risikofaktoren, wie zum Beispiel über eine angiotensinerge Stimulation, könnte dabei Informationen über die Induktion einer möglichen Dysfunktion bringen. Die mitochondriale Dysfunktion ist wiederum ein Aspekt in der Pathogenese der Herzinsuffizienz (Zhou und Tian 2018). Da die langfristige Angiotensin II Exposition nachgewiesen eine Herzinsuffizienz begünstigt (Yusuf et al. 2000, Paradis et al. 2000), ist die Untersuchung der mitochondrialen Effekte von Angiotensin II ein Thema von großem Interesse.

### 2.3.7 Hippo-Signalweg

Das Herz besitzt nur ein begrenztes Regenerationspotential, weshalb ein Herzinfarkt dauerhaft zum Kontraktilitätsverlust des Herzens führt. Wie bereits oben beschrieben, kommt es in Folge des Herzinfarkts zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz. (Lip et al. 2000, Xin et al. 2013, Chen et al. 2019). Der Hippo-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei Wachstums-, Proliferations- und Apoptoseprozessen. Eine Mutation in diesem Signalweg kann mit einem überschießenden Wachstum einhergehen (Harvey et al. 2003). Ein Mausmodell, welches den zentralen Hippo-Transkriptionsfaktor YAP experimentell ausschaltete, konnte ein stagnierendes Herzwachstum mit letaler Kardiomyopathie erzeugen (Xin et al. 2013). Im Gegensatz dazu konnte im Mausmodell eine überaktive Form von YAP die Herzregeneration und die Kontraktilität nach Myokardinfarkt verbessern. Die Autoren dieser Studie nahmen an, dass YAP den Zellzyklus in Kardiomyozyten reaktiviert und so die Regeneration nach Herzinfarkt begünstigt (Xin et al. 2013). Lin et al. untersuchten die herzspezifische YAP-Aktivierung nach Myokardinfarkt und zeigten ein signifikant verbessertes Überleben der Mäuse (Lin et al. 2014). Hou et al. untersuchten menschliche Herzgewebeproben und zeigten, dass u.a. YAP bei Herzinsuffizienz im Vergleich zu gesunden Kontrollen, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant erhöht waren (Hou et al. 2017). Kombiniert man diese Erkenntnisse lässt sich ableiten, dass eine Aktivierung des Hippo-Signalwegs nach einem Akutereignis positive Wirkungen ausübt, die Herzregeneration verbessert und das Überleben begünstigt. Eine chronische Hippo-Aktivierung könnte jedoch negative Folgen haben, welche sich durch überschießende Proliferation manifestieren. Schließlich könnte eine Hypertrophie entstehen, welche eine Herzinsuffizienz zur Folge hat.

## Einleitung



**Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Hippo-Signalwegs**

In Abbildung 4 sind die zentralen Bestandteile des Signalwegs dargestellt. In einer Kinasenkaskade werden nachfolgend NF2, MST und LATS aktiviert (Zhao et al. 2010). pLATS kann den Transkriptionsfaktor YAP am Serin-127 phosphorylieren (Hou et al. 2017). pYAP verbleibt anschließend inaktiv im Zytoplasma. Nur die unphosphorylierte Form von YAP (unpYAP) kann durch Translokation in den Zellkern transportiert werden und dabei die Proteinbiosynthese aktivieren (Hou et al. 2017). UnpYAP aktiviert im Zellkern mithilfe von TEAD die Transkription von verschiedenen Genen, wie z.B. CCN1 oder CCN2, welche wachstumsfördernde und proliferatorische Signale zur Folge haben (Hou et al. 2017). Die Aktivierung der Gentranskription, ausgelöst durch unpYAP, wird in dieser Arbeit unter Hippo-Aktivierung verstanden, während die Phosphorylierung von YAP (pYAP) als inaktive Form bezeichnet wird.

Hou et al. konnten, wie bereits erwähnt, eine verstärkte Hippo-Signaltransduktion bei Herzinsuffizienz nachweisen. Interessanterweise war dabei das Verhältnis von pYAP/unpYAP zugunsten der unphosphorylierte Form verändert (Hou et al. 2017). Es müsste dabei also eine verstärkte nukleäre unpYAP Translokation mit erhöhter Transkription von proliferatorischen Genen vorliegen. Der Hippo-Signalweg wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst, u.a. ist die Regulation durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) beschrieben (Yu et al. 2012). Die YAP-Phosphorylierung wird u.a. bei der Überexpression des  $\alpha$ 1-Adrenorezeptor und des ATII-R1 reduziert, wohingegen die  $\beta$ 1-AR Überexpression das pYAP-Level erhöht (Yu et al. 2012).

## Einleitung

Wennmann et al. zeigten, dass Angiotensin II über den ATII-R1 die nukleäre Translokation von YAP verstärkt (Wennmann et al. 2014). Da der Hippo-Signalweg u.a. über den ATII-R1 aktiviert wird, lässt sich schlussfolgern, dass dieser Signalweg bei der Entstehung der Herzinsuffizienz eine Rolle spielt. Wie bereits beschrieben, existieren zahlreiche Risikofaktoren, welche die Entstehung der Herzinsuffizienz begünstigen. Ein Teil dieser Risikofaktoren entfalten ihre Wirkung ebenfalls über GPCR-Signalkaskaden, welche wiederum eine Verbindung zum Hippo-Signalweg zeigen (Yu et al. 2012, Wang et al. 2018). Des Weiteren werden Metabolite wie z.B. Fettsäuren mit der Regulation des Hippo-Signalwegs in Verbindung gebracht beziehungsweise beeinflusst dieser wiederum den Stoffwechsel der Zelle (Koo und Guan 2018). Die genauen molekularen Mechanismen des Hippo-Signalwegs, dessen Beeinflussung durch kardiale Risikofaktoren und deren Relevanz für die Pathogenese der Herzinsuffizienz sind jedoch noch nicht abschließend untersucht. Die hiPSC abgeleiteten Herzzellen bieten dafür ein einzigartiges in-vitro Modell, um mithilfe von pharmakologischen Stimuli mögliche Zusammenhänge zur Pathogenese der Herzinsuffizienz abzuleiten und den Hippo-Signalweg als möglichen Therapieansatz dieser Volkskrankheit zu untersuchen.

### 3 Ziele der Arbeit

Um den Pathomechanismus der Herzinsuffizienz auf zellulärer Ebene detaillierter nachvollziehen zu können, wurden in dieser Arbeit hiPSC abgeleiteten Herzzellen als elegante Alternative zur Herzmuskelbiopsie mit Herzzellkultivierung verwendet. Um die erfolgreiche Kardiomyogenese der hiPSC zu beweisen, sollten gewebspezifische Differenzierungsmarker nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgte neben quantitativen Analysen über Expressions- und Proteinanalyse auch als qualitative Methode über die Messung der Immunfluoreszenz. Folglich stellte sich die Frage, ob hiPSC abgeleitete Herzzellen auf physiologisch relevante, externe Stimuli reagieren und diese Effekte mit in-vivo Daten übereinstimmen. Eine technisch einfache Untersuchung, die lichtmikroskopische Ermittlung der Herzfrequenz unter adrenerger Stimulation, konnte dabei erste Hinweise geben. Durch Vorbehandlung mit Betablockern konnten diese Effekte umkehrt werden. Zusätzlich sollten Kalziummessungen unter adrenergen Stimuli an lebenden hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten durchgeführt werden. Weiterhin wurde der Einfluss von Angiotensin II auf den Hippo-Signalweg untersucht. Dazu wurden Expressionsanalysen, Proteinanalysen und Immunfluoreszenzmessungen durchgeführt. Schließlich sollte der Einfluss angiotensinerger Stimuli auf den Energiestoffwechsel der Herzzellen untersucht werden, um pathogenetische Überlegungen zur Entstehung der Herzinsuffizienz und des kardialen Remodelings abzuleiten. Folgende Fragestellungen sollten im Rahmen dieses Projekts untersucht werden:

- Ist die Kardiomyogenese der hiPSC möglich?
- Wie verhalten sich die Hippo-Komponenten während der Kardiomyogenese der hiPSC?
- Sind adrenerge und angiotensinerge Rezeptoren auf den differenzierten hiPSC abgeleiteten Herzzellen vorhanden?
- Beeinflussen adrenerge und angiotensinerge Substanzen den Hippo-Signalweg?
- Reagieren die hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten auf externe Stimuli wie man es bei Herzzellen in-vivo erwartet?
- Welchen Einfluss haben Angiotensin II und ATII-Rezeptorblocker auf die Mitochondrienfunktion der Herzzellen?
- Stellt der Hippo-Signalweg einen möglichen Behandlungsansatz der Herzinsuffizienz und des Remodelingprozess dar?

### **4 Material und Methoden**

#### **4.1 Material**

##### 4.1.1 Zellkultur

Für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden humane induzierte pluripotente Stammzellen verwendet, die aus humanen Fibroblasten generiert wurden. Diese hiPSC stammen vom Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin in Münster und wurden über Herrn PD Dr. Boris Greber bezogen, für dessen Experimente eine Zustimmung der Ethikkommission vorlag. Im Labor in Münster wurden die Fibroblasten über einen Sendai-Virus Reprogramming-Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zu hiPSC induziert (Zhang et al. 2014, Peischard et al. 2017). Die hiPSC wurden bis zum Beginn der Experimente im Kryofroster bei  $-170^{\circ}\text{C}$  gelagert.

##### 4.1.2 Mausegewebe

Zur Übertragung von in-vitro Erkenntnissen auf einen lebenden Organismus, wurden Leber-, Milz- und Herzgewebe einer Wildtyp-Maus und das Herzgewebe einer experimentellen CerS2-Überexpression-Maus untersucht. Die CerS2 Überexpression ist an eine doxycyclinhaltige Ernährung gekoppelt, welche über 4 Wochen gegeben wurde. Die Mäuse wurden von Frau Jasmine Wu genotypisiert, nach wissenschaftlichen Standards betreut und für ihre Experimente liegt eine Zustimmung der Ethikkommission vor.

##### 4.1.3 Substanzen und Chemikalien

Die verwendeten Substanzen und Chemikalien sind tabellarisch im Anhang aufgeführt.

##### 4.1.4 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind tabellarisch im Anhang aufgeführt.

##### 4.1.5 Geräte und Software

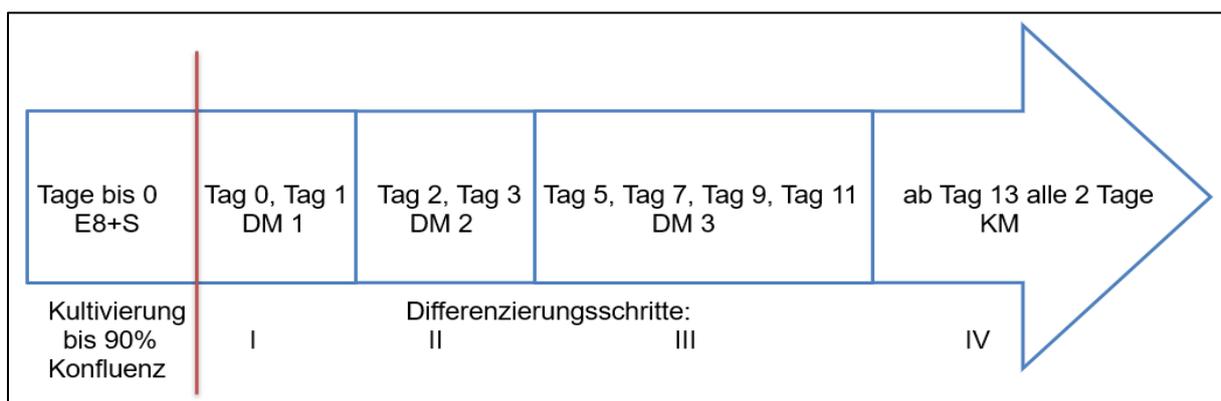
Die verwendeten Geräte und die benutzte Software sind tabellarisch im Anhang aufgeführt.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Kultivierung der hiPSC

Die hiPSC wurden mit Essential 8 Basal Medium + Essential 8 Supplement (E8+S), bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Die Zellkulturflaschen, welche mit 0,1%igem Matrigel (in 1x DMEM verdünnt) beschichtet wurden, dienten dabei als steriler Kulturort. Das Matrigel simuliert dabei die Basalmembranmatrix (Hughes et al. 2010). Im Rhythmus von 2 Tagen wurden 12 ml E8+S Medium je Zellkulturflasche gewechselt und ab einer Konfluenz von 80-90% passagiert. Dafür wurden die Zellen mit 6 ml PBS gewaschen und mit 3 ml ReLeSR für 1 min trypsinisiert. Nach der Abnahme des ReLeSRs wurden die abgelösten Zellen in 9 ml E8+S resuspendiert und je 3 ml Zellsuspension in eine Zellkulturflasche, welche mit 9 ml E8+S Medium vorgelegt und mit Matrigel beschichtet war, hinzugegeben. Am nächsten Tag wurden die nicht adhärenen Zellen mit 6 ml PBS abgewaschen und die neue Passage mit 12 ml frischem E8+S Medium versorgt. Das E8+S Medium wurde während der Zellkultivierung jeden zweiten Tag gewechselt. Die Zellen verblieben somit im pluripotenten Stadium, welches in dieser Arbeit als Tag 0 der Differenzierung bezeichnet wird. Während der Differenzierung zur Herzzelle wurde das vorliegende Medium durch das jeweilige Differenzierungsmedium (DM) analog der Darstellung in Abbildung 5 ersetzt. Zwischen jedem Differenzierungsschritt erfolgte ein Waschschritt mit PBS, um nicht adhärenen und apoptotischen Zellen zu entfernen.

### 4.2.2 Differenzierung der hiPSC zu Kardiomyozyten



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der hiPSC Differenzierung**

In eine 12-Wellplatte, die mit 0,1%igem Matrigel beschichtet wurde, wurden je 0,625 ml E8+S vorgelegt. Nach Passagieren einer konfluenten Zellkulturflasche wurden aus 9 ml Zellsuspension, je 4,5 ml pro 12-Wellplatte bzw. je 0,375 ml Zellsuspension pro

## Material und Methoden

Well hinzugegeben und bis zu einer Konfluenz von 90% E8+S Medium gewechselt. Die Differenzierung der Zellen erfolgte analog Abbildung 5. Die Differenzierungsmedien (DM) wurden täglich frisch und mit den im Anhang beschriebenen Differenzierungsprotokoll mit den dort aufgeführten Zusätzen angesetzt. An den aufgeführten Tagen erhielten die Zellen je 1 ml pro Well vom jeweiligen DM bzw. vom kardialen Medium (KM). Zwischen jedem Differenzierungsschritt wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Die erfolgreiche Differenzierung konnte ab Tag 8 durch autonome Kontraktionen der noch jungen Kardiomyozyten unter dem Lichtmikroskop nachgewiesen werden. Mit zunehmender Reifung konnte ein regelmäßiges und rhythmischer-werdendes Kontraktionsmuster beobachtet werden. Die autonomen Kontraktionen wurden als Video aufgezeichnet.

### 4.2.3 Stimulationsexperiment

An verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung wurden einige Wells für bestimmte Zeit mit verschiedenen Konzentrationen adrenerger oder angiotensinerner Stimuli behandelt. Die verwendeten Substanzen sind im Anhang unter Medikamente aufgelistet. Die Lagerung dieser Stimulantien erfolgte nach Herstelleranweisungen. Das jeweilige Pulver wurde mit der Analysenwaage (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) abgewogen und daraus mithilfe von destilliertem Wasser bei Adrenalin und Dobutamin bzw. mithilfe von DMSO bei Losartan, PD123319, Propranolol und Atenolol eine 10 millimolare (mM) Stammlösung erzeugt. Diese Lösungen wurden jeweils in 20 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Angiotensin II wurde aufgrund der kurzen Haltbarkeit täglich neu mit destilliertem Wasser angesetzt. Dabei wurde eine 1 mM Stammlösung erzeugt, welche anschließend direkt für die Stimulation verwendet wurde. Die Stimulationsexperimente erfolgten durch Verdünnung der Stammlösung mit dem jeweils vorliegenden Zellkulturmedium. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Medien für die Stimulationszeit serumfrei waren, um mögliche Interferenzen zu meiden. Die jeweiligen Endkonzentrationen sind bei den einzelnen Experimenten aufgeführt und im Ergebnisteil angegeben. Zur Beeinflussung der Kontraktionsfrequenz und für die adrenergen Expressionsanalysen wurden 1 µM Adrenalin, 1 µM Propranolol und die Kombination beider verwendet, wobei an Tag 9 DMEM und an Tag 28 das kardiale serumfreie Medium als Verdünnungsmedium für die Stammlösungen dienten. Als Grundlage für die Kalziummessung am Differenzierungstag 28 diente serumfreies kardiales Medium. In diesem Medium wurden die Medikamente Propranolol 4 µM und 50 µM; Adrenalin 50 µM und 100 µM;

## Material und Methoden

Atenolol 40  $\mu\text{M}$  und 120  $\mu\text{M}$  und Dobutamin 200  $\mu\text{M}$  verdünnt und die Herzzellen untersucht. Für die angiotensinergen Expressions- und Proteinanalysen wurden 1  $\mu\text{M}$  Angiotensin II, 1  $\mu\text{M}$  Losartan und 1  $\mu\text{M}$  PD123319 verwendet. Die YAP Translokation wurde unter 10  $\mu\text{M}$  Angiotensin II Stimulation gemessen. Die Mitochondrienfunktionsmessung wurde unter verschiedenen Angiotensin II Konzentrationen (1  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) und unter verschiedene Kombinationen von 1  $\mu\text{M}$  Angiotensin II, 1  $\mu\text{M}$  Losartan und 1  $\mu\text{M}$  PD123319 untersucht.

### 4.2.4 Herzfrequenzanalyse

In diesem Experiment wurde die Kontraktionsfrequenz der hiPSC abgeleiteten Herzzellen in Ruhe, nach 3-stündiger und nach 24-stündiger adrenerger Stimulation ermittelt. Dafür wurde serumfreies Medium zur Verdünnung der Stammlösungen genutzt. Die Kardiomyozyten wurden in der 12-Wellplatte belassen und direkt unter dem Lichtmikroskop Axiovert25 (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) untersucht. Zur Zählung wurden jeweils 3 Passagen und innerhalb jeder Passage jeweils 3 unterschiedliche Wells pro Gruppe untersucht. Neben der Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  Adrenalin, 1  $\mu\text{M}$  Propranolol und der Lösungsmittelkontrolle H<sub>2</sub>O, wurden einige Wells mit Kardiomyozyten für 3h mit 1  $\mu\text{M}$  Propranolol vorbehandelt und anschließend mit 1  $\mu\text{M}$  Adrenalin stimuliert. Es wurden jeweils in Ruhe, 3h und 24h nach Stimulation die Kontraktionen pro Minute notiert. Die Zählung erfolgte dabei an jungen hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten am Differenzierungstag 9 und an reifen hiPSC abgeleiteten Herzzellen am Differenzierungstag 28. Aus den ermittelten Kontraktionsfrequenzen wurden jeweils anschließend Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet. Die Darstellung erfolgte schließlich als Herzfrequenz in Kontraktionen pro Minute.

### 4.2.5 Genexpressionsanalyse

#### *Probengewinnung und RNA Isolation*

An den in Abbildung 5 angegebenen Differenzierungsschritten und nach erfolgter Behandlung mit adrenergen bzw. angiotensinergen Stimuli wurden Proben zur Expressionsanalyse gewonnen. Dafür wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und die Adhäsion vom Untergrund mithilfe eines Zellschabers entfernt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C auf Trockeneis, um spontane und enzymatische Prozesse zu reduzieren. Die gelösten Zellen wurden in PBS resuspendiert und anschließend 4 min bei 4000 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert. Nach

## Material und Methoden

Abnahme des Überstands konnte mit dem ersten Schritt der RNA Isolation begonnen werden. Dafür wurde das NucleoSpin® RNA Midi Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet und die Herstelleranweisung befolgt (Macherey-Nagel 2015). Zu Beginn wurden die Schreddersäulen aufgebaut. Anschließend wurde jedes Zellpellet separat in 350 µl RA1 Puffer, welcher 3,5 µl β-Mercaptoethanol beinhaltet, gelöst und in die aufgebauten Säulen pipettiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 1 min bei 11000 U/min wurde die Schreddersäule entfernt und zum Zentrifugat 350 µl 70%iger Ethanol hinzugegeben. Die gesamte 700 µl Lösung wurde dann in die Isolationssäule pipettiert. Durch weitere Zentrifugation für 30 s bei 11.000 U/min konnte die RNA in der Membran der Isolationssäule gebunden werden. Im nächsten Schritt wurde 350 µl MDB hinzugegeben und für 1 min bei 11.000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA mithilfe von 95 µl DNase reaction mixture Lösung für 15 min bei Raumtemperatur verdaut. Es folgten anschließend 3 Waschschrte (WS). Für den ersten WS wurde 200 µl RAW2 pipettiert und für 30 s bei 11.000 U/min zentrifugiert. Im 2. WS wurde 600 µl RA3 verwendet und ebenfalls bei 30 s bei 11.000 U/min zentrifugiert. Der letzte WS erfolgte mit 250 µl RA3, dabei wurde für 2 min bei 11.000 U/min zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die RNA aus der Membran gelöst. Dafür wurde 25 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O pipettiert und anschließend zentrifugiert (30 s, 11.000 U/min). Die RNA Lösung wurde nachfolgend in RNase-freie Tubes überführt. Die Konzentration wurde für jede RNA Probe am NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemessen. Dafür wurden jeweils 2 Messungen je Probe mit 1 µl RNA Isolat durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

### *cDNA Synthese, qrtPCR und Quantifizierung*

Das RevertAid First Strand Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurde verwendet, um cDNA aus der isolierten RNA zu synthetisieren (Thermo Fisher Scientific 2013). Dabei wurden RNase-freie Tubes verwendet und anschließend je Probe 500ng RNA eingesetzt. Als Grundlage für die Berechnung des Volumens diente die Konzentration, die aus der NanoDrop 2000 Messung ermittelt wurde. Nachfolgend wurde 1 µl OligoPrimer ergänzt und die Lösung je Probe auf 12 µl mithilfe RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Nach Vortexen und kurzer Zentrifugation wurde die Lösung im ThermoCycler (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 65°C für 5 min erhitzt und darin anschließend wieder auf 4°C abgekühlt. Danach wurden 4 µl ReactionBuffer, 2 µl dNTP Mix, 1 µl RiboLook RNase Inhibitor und 1 µl Reverse Transkriptase je Probe ergänzt. Nach erneutem Vortexen und kurzer Zentrifugation wurden die Lösungen für

## Material und Methoden

die cDNA Synthese für 60 min bei 42°C im ThermoCycler inkubiert. Die Reaktion konnte darin anschließend für 5 min bei 70°C beendet werden. Nach Zentrifugation und Abkühlung auf 4°C, wurde die synthetisierte cDNA mithilfe von 30 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O jeweils von 20 µl auf 50 µl Lösung verdünnt. Im weiteren Verlauf wurde zur Quantifizierung der Expression eine quantitative Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) durchgeführt. Als Grundlage dienten dafür 96-Wellplatten (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA). Es wurden je Well 9 µl Mastermix, bestehend aus 5 µl SYBR-Green, 0,5 µl Forward-Primer, 0,5 µl Reverse-Primer und 3 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O, pipettiert und anschließend wurde in jedes Well 1 µl cDNA hinzugefügt. Pro Probe wurden entweder Duplikate oder Triplikate pipettiert, um die Genauigkeit zu erhöhen und methodische Fehler zu reduzieren. Die 96-Wellplatte wurde nach dem Pipettieren mit einer optisch durchlässigen Folie abgedichtet, in einer Zentrifuge (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) für 3 min zentrifugiert und nachfolgend am StepOnePlus (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA) gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe von GAPDH als interne Kontrolle (Panina et al. 2018). Dabei wurden aus den ausgegebenen CT-Werten für die Duplikate bzw. Triplikate jeweils die Mittelwerte gebildet und die Differenz mit GAPDH errechnet. In Tabelle 1 sind die Primer aufgeführt, welche in diesem Projekt verwendet wurden. Diese wurden über die Datenbank NCBI-Primerblast selbstständig generiert und über Thermo Fisher Scientific bezogen.

**Tabelle 1: Verwendete Primer**

Genname	Forward-Primer 5' -> 3'	Reverse-Primer 5' -> 3'
Oct-4	AGATGGTCGTTTGGCTGAAT	AGCTGGAGAAGGAGAAGCT
Nanoq	CAGAAGGCCTCAGCACCTAC	ATTGTTCCAGGTCTGGTTGC
Brachyury	TGTCCCAGGTGGCTTACAGATGA	GGTGTGCCAAAGTTGCCAATACA
Gata4	GACAATCTGGTTAGGGGAAGC	GAGAGATGCAGTGTGCTCGT
MYH7	GGCAAGACAGTGACCGTGAAG	CGTAGCGATCCTTGAGGTTGT
NF2	TGTGCTCCTGGCTTCTTACG	CCTCCACATTTCCGGAGTC
MST	GGAGACGGTACAGCTGAGGA	TGCCATAGGACCCTTCTCCA
LATS1	CAGCAGCTGCCAGACCTATT	CACTTTCTCCTAGTGGCGGG
YAP	CCCTCGTTTTGCCATGAACC	GTTGCTGCTGGTTGGAGTTG
TEAD1	CCATTCAGGGTTTGAGCCT	GCTTGTTGTGCCAATGGAG
CCN1	CGCCTTGTGAAAGAAACCCG	GGTTCGGGGGATTTCTTGGT
CCN2	GTGGAGTATGTACCGACGGC	TCCGGGACAGTTGTAATGGC
α1-AR	CTTTCACGAGGACACCCTTAGC	GCCCAACGTCTTAGCTGCTT
α2-AR	TCGTCATCATCGCCGTGTTT	AAGCCTTGCCGAAGTACCAG
β1-AR	AGGGGAACGAGGAGATCTGT	ACAAGGAACATCAGCAAGCC
β2-AR	TTGTGTCAGGCCTTACCTCC	GATCACCAGGGGAACGTAGA
ATII-R1	TTGGAAGGCCCTAAAGAAGGC	CATGGCCGTGTCCACAATATC
ATII-R2	AACCTCGCTGTGGCTGATTT	CACAGGTCCAAAGAGCCAGT
GAPDH	GTGGACCTGACCTGCCGTCT	GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT

### 4.2.6 Proteinanalytik

#### *Probenentnahme, Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung*

An den in Abbildung 5 angegebenen Differenzierungsschritten und nach erfolgter Behandlung mit adrenergen bzw. angiotensinergen Stimuli wurden Proben zur Proteinanalyse gewonnen. Dafür wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und die Adhäsion vom Untergrund mithilfe eines Zellschabers entfernt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C auf Trockeneis, um spontane und enzymatische Prozesse zu reduzieren. Die gelösten Zellen wurden in 250 µl gekühlten RIPA-Lysispuffer, welcher Phosphataseinhibitor und Proteaseinhibitor enthielt, resuspendiert und in ein Eppendorftube überführt. Die Suspension wurde mit Hilfe von 10 Sekunden Ultraschall aufgeschlossen und anschließend 20 min bei 4°C gekühlt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen erneut mit 10 Sekunden Ultraschall behandelt und daraufhin für 15 min bei 15000 U/min in einer Kühlzentrifuge (Hettich, Kirchlingern, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand, welcher das Proteinextrakt enthielt, wurde nachfolgend in ein neues Eppendorftube überführt und die Proteinkonzentration mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Hierfür wurde BSA abgewogen und daraus verschiedene Eichkonzentrationen angesetzt. Die Proteinextrakte wurden in 1:10 Verdünnungen pipettiert. In einer 96-Wellplatte wurde pro Well 180 µl Bradford Reagenz mit 20 µl destilliertes Wasser (Nullreferenz), 20 µl Eichkonzentrationen bzw. Proteinlösungen gemischt. Pro Probe wurden Duplikate pipettiert und anschließend am ClarioStar (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) gemessen. Nach Anfertigung einer Eichkurve, konnten die Konzentrationen der Proteinextrakte bestimmt werden.

#### *SDS-Page*

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde die Methode der Elektrophorese nach Laemmli genutzt (Laemmli 1970). Hierfür wurde das Mini-PROTEAN® Tetra Handcast System (BioRad, Hercules, USA) verwendet und das Herstellerprotokoll befolgt (Bio-Rad Laboratories Inc. 2000). Nach Zusammensetzung der Gelkammern konnten sowohl das Trenngel als auch das Sammelgel gegossen werden. Für das 12%ige Trenngel wurden 3,75 ml 40%ige Acrylamid-Lösung; 3,75 ml 1,5 M Tris-HCl; 150 µl 10%iges SDS und 7,2 ml destilliertes H<sub>2</sub>O mit 10 µl TEMED und 150 µl 10%igem APS gemischt. Nach dessen Polymerisierung konnte das 4%ige Sammelgel mit 3 ml 40%ige Acrylamid-Lösung; 3,75 ml 0,5 M Tris-HCl; 150 µl 10%iges SDS und 7,95 ml destilliertes H<sub>2</sub>O mit 10 µl TEMED und 150 µl 10%igem APS

## Material und Methoden

gegossen werden. Das Sammelgel wurde anschließend mit dem Probenkamm abgedichtet. Die Vorbereitung der Proteinproben erfolgte während der Polymerisierung des Sammelgels. Dafür wurden 30 µg Gesamtprotein in ein Eppendorftube eingesetzt. Nachfolgend wurde 4 µl SDS-Ladepuffer ergänzt und die Lösung mithilfe von PBS auf 20 µl aufgefüllt. Die Proteinansätze wurden für 5 min bei 95°C erhitzt und denaturiert. In einem anderen Eppendorftube wurden 10 µl biotinylierter Detektionsmarker mit 2 µl SDS-Ladepuffer versetzt, für 2 min bei 95°C erhitzt und anschließend mit 10 µl Kaleidoskopmarker vermischt. Nach Vortexen und kurzer Zentrifugation wurden die Tubes auf Eis gelagert. Die polymerisierten Gele konnten in die Mini-PROTEAN® Elektrophoresekammer (BioRad, Hercules, USA) überführt werden, welche daraufhin mit SDS Laufpuffer befüllt wurde. Nach Entfernung des Probenkamms, konnte 10 µl Markergemisch in die erste Geltasche pipettiert werden. In die folgenden Taschen wurden jeweils die Probenansätze hinzugegeben. Im Anschluss daran wurde der Deckel auf die Elektrophoresekammer aufgesetzt und die Elektroden am PowerSupply (BioRad, Hercules, USA) angeschlossen. Die Auftrennung der Proteine durch das Trenngel erfolgte bei einer Spannung von 130 V für 90 min.

### *Proteintransfer und Antikörperinkubation*

Im weiteren Verlauf wurde die Westernblot Methode, welche durch W.N. Burnette erstmals beschrieben wurde, verwendet (Burnette 1981). Die aufgetrennten Proteine im Gel wurden mit dem Blotting System Trans-Blot Cell® (BioRad, Hercules, USA) transferiert. Der folgende Aufbau der Blotting Kassette wurde in einer Wanne mit 4°C gekühlten Transferpuffer durchgeführt. Zu Beginn wurde das Gel auf eine Nitrozellulosemembran gelegt und die beiden Außenseiten konnten daraufhin mit jeweils zwei Filterpapieren abgedeckt werden. Um die Kassette zu komplettieren, wurde beidseitig ein Schaumstoffpad auf das äußere Filterpapier gelegt. Am Ende wurde das Sandwich mit einem Falcontube ausgestrichen, um gegebenenfalls entstandene Luftblasen zu entfernen. Nach Einlegen der Kassetten in das Blotting System, konnte der Transferpuffer eingefüllt werden und der Deckel aufgesetzt werden. Im Anschluss daran wurden die Elektroden am PowerSupply angeschlossen und der Transfer konnte bei 22 V über Nacht bei 4°C im Kühlhaus begonnen werden. Am nächsten Tag konnte die Membran mithilfe eines Einwegskalpells anhand der Marker geschnitten werden. Die Schnitte ermöglichten die spätere Detektion von mehreren Proteinen. Es folgten 3 Waschschriffe (WS) mit 0,1%igem TBS-T Puffer.

## Material und Methoden

Unspezifische Bindungsstellen der Teilstücke wurden anschließend mit 5%igem BSA, welches in 0,1% TBS-T gelöst war, für 1 h auf dem Schüttler blockiert. Daraufhin folgten erneut 3 WS. Die eingesetzten primären und sekundären Antikörper wurden in 5%igem BSA in 0,1% TBS-T verdünnt und sind mit den verwendeten Konzentrationen in Tabelle 2 aufgeführt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C im Kühlhaus. Am nächsten Tag erfolgten erneut 3 WS. Nachfolgend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h auf dem Schüttler. Schließlich erfolgten erneut 3 WS.

**Tabelle 2: Verwendete Antikörper für die Proteinanalytik**

Antigen	Spezies	Katalognummer	Hersteller	Konzentration
SOX2	Hase	ab97959	Abcam	1:1000
Nanog	Hase	ab21624	Abcam	1:500
HCN4	Hase	ab32675	Abcam	1:500
MHC	Maus	ab50967	Abcam	1:1000
pYAP	Hase	ab76252	Abcam	1:500
YAP	Hase	ab52771	Abcam	1:500
TEAD	Hase	13295	Cell signaling	1:1000
ATII-R1	Hase	ab124505	Abcam	1:500
Vinculin	Hase	ab129002	Abcam	1:1000
IgG-Hase	Ziege	ab6721	Abcam	1:5000
IgG-Maus	Ziege	ab97023	Abcam	1:2000
Biotin	Ziege	7075S	Cell signaling	1:2000

### *Proteindetektion und Quantifizierung*

Um die Proteinbanden auf der Membran zu detektieren, wurde das Chemilumineszenzkit (Merck Millipore, Burlington, USA) verwendet. Analog der Herstellerangabe wurde pro Membran je 1 ml der beiden Detektionslösungen pipettiert. Die Membranen wurden anschließend unter lichtgeschützten Bedingungen zum LAS4000 (Quansys Bioscience Inc., Logan, USA) zur Messung transportiert. Die Messung der Bandenintensität erfolgte dabei über die Detektion der Intensität der Chemilumineszenz. Die anschließende Auswertung erfolgte mit der Software MultiGauge (Fujifilm, Tokio, Japan). Zur Quantifizierung wurden die jeweiligen Proteinbanden markiert und deren Intensität vom Hintergrund abgezogen. Die Bandenintensität wurde anschließend mit der internen Kontrolle Vinculin ins Verhältnis gesetzt (Johnson 2012), statistisch ausgewertet und in den Ergebnissen dargestellt. Einige Membranen wurden nach der Detektion durch Behandlung mit Stripping-Buffer wiederverwendet, um andere Proteine zu analysieren. Nach 25 min Behandlung bei 37° wurden die Membranen wie oben beschrieben erneut blockiert, mit Antikörpern inkubiert und erneut detektiert und ausgewertet.

### 4.2.7 Mitochondrienfunktionsmessung

Die nachfolgende Messung der Mitochondrienfunktion wurde mithilfe des Seahorse-Mito-Stresstests (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) nach den angegebenen Herstelleranweisungen durchgeführt (Agilent Technologies 2019). An Tag 20 der hiPSC Differenzierung wurde ein Teil der Kardiomyozyten aus der 12-Wellplatte in eine, mit Matrigel beschichtete, 96 Well-Zellkulturplatte (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) transferiert. Dafür wurde die Adhäsion der Zellen mit 1 ml TrypLE pro Well vom Untergrund gelöst. Das Zellpellet wurde anschließend in ein Falcontube aufgenommen und so lange in TrypLE resuspendiert, bis die Zellen sich vereinzelt und das Pellet verschwand. Die enzymatische Reaktion konnte durch Zugabe von DMEM gestoppt werden. Anschließend wurde die Suspension für 5 min bei 900 U/min zentrifugiert und nach Abnahme des Überstands wurde das Zellzentrifugat in 1 ml kardialen Medium resuspendiert. Danach wurden 20 µl der Lösung entnommen und in einem Eppendorftube mit 20 µl TrypanBlau vermischt. 10 µl dieses Gemischs konnten dann auf ein Auszählglas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gegeben und am Zählgerät Countess II FL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gezählt werden. Die Zählung ermöglichte es, näherungsweise 15.000 lebende Kardiomyozyten pro Well in die 96-Well-Zellkulturplatte zu pipettieren. Die 4 Ecken der Platte blieben dabei zellfrei, um darin die spätere Nullreferenzmessung zu ermöglichen. Mithilfe einer Mehrkanalpipette konnte in jedes Well 100 µl KM Medium vorgelegt werden, welches dann jeden zweiten Tag gewechselt wurde. Am Tag 26 wurden die Herzzellen mit Angiotensin II bzw. ATII-Rezeptorblockern für 48h, wie oben beschrieben, stimuliert. Einige Wells wurden bereits am Tag 25 für 24h mit Blockern vorbehandelt und dann mit Ang II stimuliert, um später selektive Rezeptorwirkungen messen zu können. Am Ende der Stimulation erfolgte die Messung des Mito-Stresstest am Seahorse Analyser XF96 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) nach Herstelleranweisungen. Aus jeweils 7 untersuchten Wells wurden mindestens 3 pro Gruppe ausgewertet. Die Auswahl der Wells erfolgte nach dem Vorhandensein von kontrahierenden Zellen und Fehlen von Zellkonglomeraten. Da die Herzzellen ein funktionelles Synzytium bilden und so manchmal Zellen nicht vereinzelt vorlagen, sollte die Auswahl sicherstellen, dass 15.000 Kardiomyozyten untersucht und somit vergleichbare Ergebnisse aufgenommen wurden.

### 4.2.8 Immunfluoreszenzmikroskopie

#### *Immunfluoreszenz*

*Ein Teil des Immunfluoreszenzexperimentes wurde gemeinsam mit Herrn Dr. Mohamed Bekhite aufgenommen und die Ergebnisse wurden gemeinsam im Journal: "Basic Research in Cardiology" publiziert (Bekhite et al. 2020).*

Die Stammzellen am Differenzierungstag 0 wurden direkt von der Zellkulturflasche in eine 24-Wellplatte, welche mit 0,1%igem Matrigel beschichtet und mit Deckglas versehen war, transferiert und nach Anwachsen, E8+S Mediumwechsel und PBS-Waschen, fixiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte für 1h mit -20°C gekühltem Methanol/Aceton im Verhältnis 7:3, welches direkt über die Zellen gegeben wurde. Im folgenden Schritt wurden die Zellen dreimal mit 0,01% PBS-Triton Lösung gewaschen. Anschließend erfolgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen mithilfe von 5%igem BSA, welches in 0,01% PBS-Triton gelöst wurde. Dafür wurden die Wells 1h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit dem Gemisch behandelt. Nach drei weiteren WS, erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler. Am nächsten Tag erfolgten erneut 3 WS und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1h bei Raumtemperatur. Die verwendeten primären und sekundären Antikörper wurden in 5%igem BSA in 0,01% PBS-Triton gelöst und sind in Tabelle 3 mit den verwendeten Konzentrationen aufgeführt. Nach einem erneuten WS erfolgte die Färbung der Zellkerne mittels DAPI, welches 1:5000 in 0,01% PBS-Triton verdünnt wurde. Nach 10 min Inkubation folgte ein letzter WS. Die Proben konnten anschließend am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM510 Meta (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) gemessen werden.

In einem weiteren Experiment wurden hiPSC abgeleitete Kardiomyozyten aus 12-Wellplatten in 24-Wellplatte transferiert und danach ebenfalls wie beschrieben fixiert. Der Transfer erfolgte analog dem oben beschriebenen Prozedere. Einige Wells wurden vor Fixation mit 10 µM Angiotensin II über 20 min stimuliert. Als Kontrolle wurde dafür das Lösungsmittel H<sub>2</sub>O genutzt. Weiterhin wurden auch Herzzellen ohne Stimulation fixiert, um herzspezifische Marker bzw. den Angiotensin II Rezeptor Typ 1 darzustellen. Die nachfolgenden Messungen erfolgten ebenfalls am LSM510 Meta. Zum Auswerten wurde die Software Zen2012 (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) genutzt. Die Methode der Immunfluoreszenz ermöglichte es die in Tabelle 3 aufgeführten Antigene zu visualisieren.

<b>Tabelle 3: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie</b>				
<b>Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>
Oct-4	Hase	ab19857	Abcam	1:100
SOX2	Hase	ab97959	Abcam	1:100
MLC2v	Hase	ab79935	Abcam	1:100
$\alpha$ -Actinin	Hase	cs3134S	Cell signaling	1:100
ATII-R1	Hase	ab124505	Abcam	1:50
YAP	Hase	ab52771	Abcam	1:50
IgG Hase	Ziege (an Cy2)	ab6940	Abcam	1:150
IgG Maus	Ziege (an Cy5)	ab6563	Abcam	1:150

Die beschriebenen Arbeitsschritte wurden unter lichtgeschützten Bedingungen durchgeführt, um vorherige Anregungen zu verhindern. Tabelle 4 zeigt die verwendeten Farbstoffe und Laser. Die Aufnahmen erfolgten unter einem 10-fachen bzw. 40-fachen Objektiv. Nachträglich wurden die Farben der verschiedenen Antigene für eine bessere Unterscheidung verändert und in den Abbildungen im Ergebnisteil mit Größenangabe dargestellt.

<b>Tabelle 4: Verwendete Laser für die Immunfluoreszenzmikroskopie</b>		
<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Laser</b>	<b>Emissionsfilter</b>
Cy2	Argon Laser (488nm)	LP 505
Cy5	Helium/Neon Laser (633nm)	LP 650

### *Intrazelluläre Kalzium Messung*

*Ein Teil des Kalziumexperiments wurde gemeinsam mit Herrn Dr. Mohamed Bekhite aufgenommen und die Ergebnisse wurden gemeinsam im Journal: "Basic Research in Cardiology" publiziert (Bekhite et al. 2020).*

Gegenteilig zur Immunfluoreszenzmessung mit fixierten Zellen, wurde in diesem Experiment das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal an lebenden hiPSC abgeleiteten Herzzellen untersucht. Nach erfolgreicher Kultivierung und Differenzierung wurden die Herzzellen am Differenzierungstag 20 von der 12-Wellplatte in eine 24-Wellplatte transferiert, welche mit 0,1%igem Matrigel beschichtet und mit Deckgläschen versehen war. Der Transfer erfolgte analog dem oben beschriebenen Prozedere. Nach Anwachsen und PBS-Waschen wurden die Kardiomyozyten alle 2 Tage mit 500  $\mu\text{l}$  serumfreien kardialen Medium versorgt. Am Differenzierungstag 28 erfolgte erneut ein WS und anschließend die Inkubation im Brutschrank für 20 min bei 37°C mit 10  $\mu\text{M}$  Fluo-4-AM, welches in DMEM verdünnt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit einer Tyrode-Pufferlösung gewaschen und lichtgeschützt zum konfokalen Laser-Scanning-

## Material und Methoden

Mikroskop 900 (LSM900) (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) zur Messung transportiert. Die Kalziumoszillation wurde in Ruhe, unter verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen aus Adrenalin, Propranolol, Dobutamin und Atenolol ermittelt. Die Anzahl der Peaks wurde für mindestens 20 Zellen aus drei repräsentativen Experimenten gemessen und mit den Kontroll-Peakwerten verglichen. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als relatives Fluo-4 Signal ( $F/F_0$  = gemessene Fluoreszenz  $F$  / Hintergrundfluoreszenz  $F_0$ ) gegenüber der Zeit. Die Auswertung erfolgte durch Herrn Dr. Mohamed Bekhite. Letztlich wurden die Resultate in den jeweiligen Abbildungen im Ergebnissteil dargestellt. Zusätzlich wurde ein Video der  $Ca^{2+}$ -Oszillation aufgezeichnet.

### 4.2.9 Immunhistochemiemikroskopie

*Das Immunhistochemieexperiment wurde gemeinsam mit Frau Jasmine Wu durchgeführt. Frau Wu war im Rahmen ihrer Forschungsarbeit für die Mäuse verantwortlich und unterstützte mich bei der methodischen Durchführung.*

Neben Wildtyp-Mäusen wurden experimentelle CerS2-Überexpression-Mäuse, welche an einer Fettstoffwechselstörung erkranken, untersucht. Das Herz-, Leber- und Milzgewebe der Maus wurde nach Entnahme fixiert und paraffiniert. Anschließend wurden mithilfe eines Mikrotoms 4-5  $\mu$ m dicke Paraffinschnitte angefertigt und auf ein Objektträger aufgezogen. Die Entparaffinierung erfolgte durch eine absteigende Alkoholkonzentrationsreihe. Daraufhin erfolgte eine Inkubation der Objektträger mit einer Antigen-Retrieval Lösung zur Epitopdemaskierung für 15 min bei 98°C im Wasserbad. Es folgten 3 WS mit 0,1%igem PBS-T. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Schnittpräparate anschließend mit 5%igem BSA, welches in 0,1% PBS-T gelöst war, für 1 h inkubiert. Nach drei weiteren WS, erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag erfolgten erneut 3 WS und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1h bei Raumtemperatur. Die verwendeten primären und sekundären Antikörper wurden in 5%igem BSA in 0,1% PBS-T gelöst und sind in Tabelle 5 mit den verwendeten Konzentrationen aufgeführt. Nach einem erneuten WS erfolgte die Färbung der Zellkerne mittels DAPI, welches 1:5000 und die Färbung der Zellmembranen mittels WGA, welches 1:200 in 0,1% PBS-T verdünnt wurde. Nach 10 min Inkubation folgte ein letzter WS. Die Objektträger konnten anschließend am LSM900 ausgewertet werden.

<b>Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemiemikroskopie</b>				
<b>Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konzentration</b>
Troponin-T	Maus	ab8295	Abcam	1:200
UnpYAP	Hase	ab205270	Abcam	1:200
pYAP	Hase	ab76252	Abcam	1:200
IgG Hase	Ziege	ab6939	Abcam	1:400
IgG Maus	Ziege	A10679	Invitrogen	1:400

#### 4.2.10 Statistik

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Tabellen- und Kalkulationsprogramm Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Albuquerque, USA). Für die statistische Auswertung dieser Daten wurden mindestens 3 Zellkulturpassagen untersucht und stets unabhängige Gruppen miteinander verglichen. Das Programm SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA) wurde zur Signifikanzüberprüfung verwendet. Zunächst wurden der Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung und der Brown-Forsythe Test auf Varianzgleichheit durchgeführt. Bei Normalverteilung und Varianzgleichheit wurde die Signifikanz mit einem t-Test überprüft, während bei Normalverteilung und Ablehnung von Varianzgleichheit die Signifikanz mit einem Welch-Test ermittelt wurde. Bei Ablehnung der Normalverteilung erfolgte die Auswertung mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Die graphische Darstellung beinhaltet die Abbildung von Mittelwert und Standardabweichung. Eine Übersicht über alle ermittelten Daten ist im Anhang aufgeführt. Die Signifikanz zwischen zwei Zeitpunkten bzw. zwei Proben wurde mit: \*  $\triangleq p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq p < 0,001$  gekennzeichnet.

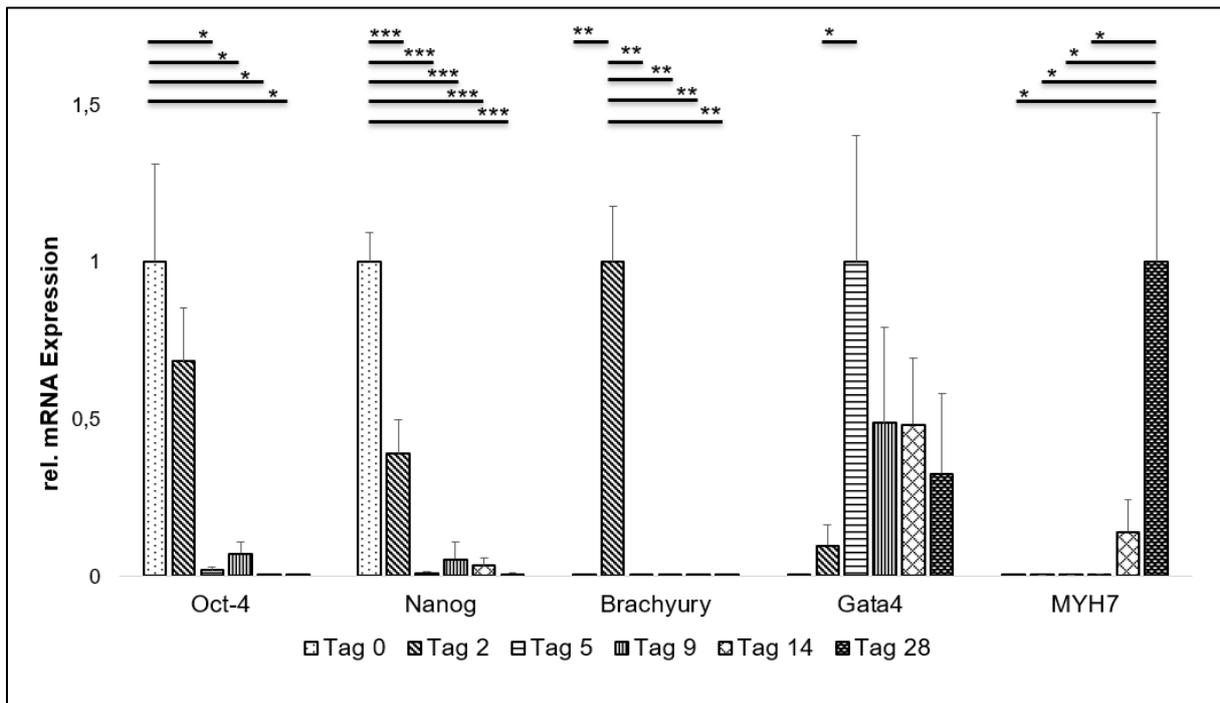
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Kardiomyogenese der hiPSC

#### 5.1.1 Expressionsanalysen während der Kardiomyogenese

##### *Ausgewählte embryonale Gene*

Zum Nachweis der erfolgreichen Differenzierung wurden typische embryonale (Oct-4 und Nanog), mesodermale (Brachyury und Gata4) und ein kardialer Marker (MYH7) mittels Expressionsanalyse in einer qrtPCR an verschiedenen Tagen untersucht.



**Abbildung 6: Expressionslevel verschiedener Differenzierungsgene während der Kardiomyogenese**

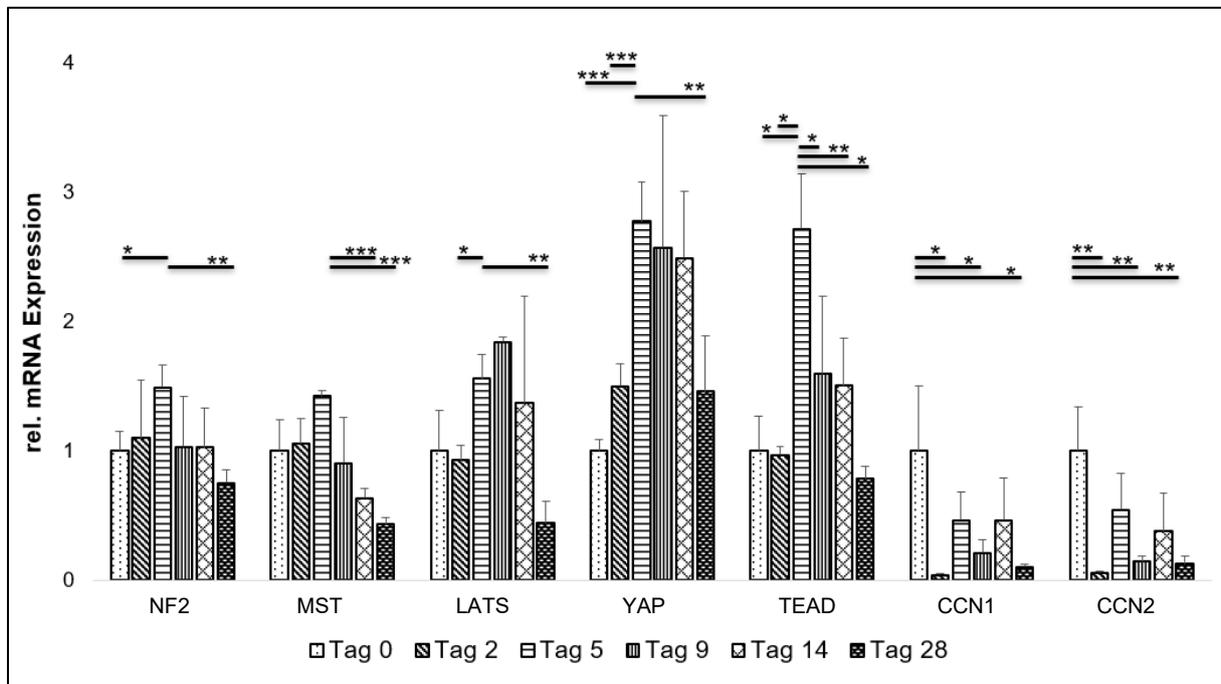
Dargestellt sind die mRNA Expressionslevel relativ zu GAPDH an den verschiedenen Tagen der hiPSC Differenzierung. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Experimenten. Die Signifikanz zwischen 2 Zeitpunkten wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

Abbildung 6 zeigt eine signifikant erhöhte Expression von Oct-4 (Tag 0  $1,00 \pm 0,31$  vs. Tag 5  $0,02 \pm 0,01$ ;  $p = 0,011$ ) und Nanog (Tag 0  $1,00 \pm 0,09$  vs. Tag 5  $0,01 \pm 0,01$ ;  $p < 0,001$ ) an Tag 0 gegenüber den folgenden Differenzierungstagen. Der signifikante Anstieg von Brachyury von Tag 0 ( $< 0,1 \pm 0,1$ ) auf Tag 2 ( $1,00 \pm 0,18$ ;  $p = 0,001$ ) zeigte die Selektion mesodermaler Zellen aus den vorherigen Stammzellen. Gata4 stieg signifikant von Tag 2 ( $0,10 \pm 0,07$ ) zu Tag 5 ( $1,0 \pm 0,4$ ;  $p = 0,035$ ) an und zeigte die Entwicklung von kardialen mesodermalen Progenitorzellen an. Der kardiale Marker MYH7 bewies die Differenzierung von Vorläuferzelle zum reifen Kardiomyozyt durch den signifikanten Anstieg von Tag 5 ( $< 0,1 \pm 0,1$ ) zum Tag 28 ( $1,00 \pm 0,47$ ;  $p = 0,041$ ).

## Ergebnisse

### Ausgewählte Hippo-Gene

Um die Rolle des Hippo-Signalwegs im Differenzierungsprozess zu ermitteln, wurden einige Komponenten dieses Signalwegs mittels Expressionsanalyse in einer qRT-PCR an verschiedenen Tagen der Herzzelldifferenzierung untersucht.



#### **Abbildung 7: Expressionslevel verschiedener Hippo-Gene während der Kardiomyogenese**

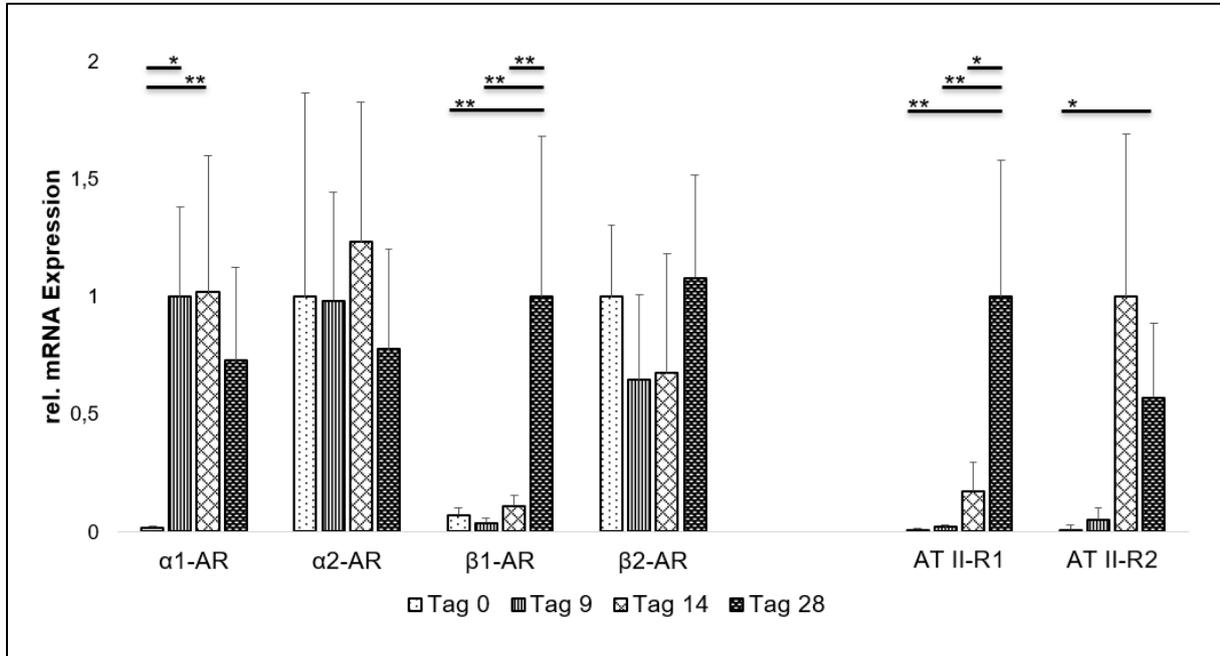
Dargestellt sind die mRNA Expressionslevel relativ zu GAPDH an den verschiedenen Tagen der hiPSC Differenzierung. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Experimenten. Die Signifikanz zwischen 2 Zeitpunkten wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

Abbildung 7 zeigt die Komponenten des Hippo-Signalwegs an den Tagen der Differenzierung. NF2, MST, LATS, YAP (Tag 0  $1,00 \pm 0,09$  vs. Tag 5  $2,77 \pm 0,30$ ;  $p < 0,001$ ) und TEAD (Tag 0  $1,00 \pm 0,26$  vs. Tag 5  $2,72 \pm 0,42$ ;  $p = 0,029$ ) wurden im Vergleich zur Stammzelle vermehrt in den kardialen mesodermalen Progenitorzellen exprimiert. Der signifikante Anstieg der Hippo-Komponenten von Tag 0 bis Tag 5 verdeutlichte diesen Aspekt. In der weiteren Differenzierung der Herzzellen kehrte sich dieser Verlauf um und die Expression sank von Tag 5 zu Tag 28. Beispielsweise sanken YAP (Tag 5  $2,77 \pm 0,30$  vs. Tag 28  $1,46 \pm 0,43$ ;  $p = 0,005$ ) und TEAD (Tag 5  $2,72 \pm 0,42$  vs. Tag 28  $0,78 \pm 0,10$ ;  $p = 0,029$ ) signifikant in dieser Differenzierungsphase. Die Expression von CCN1 war von Tag 0 ( $1,0 \pm 0,5$ ) zu Tag 2 ( $0,04 \pm 0,02$ ;  $p = 0,029$ ) signifikant vermindert. Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich beim CCN2 Gen.

## Ergebnisse

### Adrenerge und angiotensinerge Rezeptoren

Die Grundlage für späteren Stimulationsversuche ist der Nachweis der zugrundeliegenden Rezeptoren, über welche die Stimulantien wirken. Die Adrenorezeptoren und Angiotensin II Rezeptoren wurden mittels Expressionsanalyse in einer qrtPCR an verschiedenen Tagen der Herzzelldifferenzierung untersucht.



**Abbildung 8: Expressionslevel adrenerger und angiotensinerger Rezeptoren während der Kardiomyogenese**

Dargestellt sind die mRNA Expressionslevel relativ zu GAPDH an den verschiedenen Tagen der hiPSC Differenzierung. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Experimenten. Die Signifikanz zwischen 2 Zeitpunkten wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

Abbildung 8 zeigt eine signifikante Zunahme der Expression vom  $\alpha$ 1-AR (Tag 0  $0,02 \pm 0,01$  vs. Tag 9  $1,00 \pm 0,38$ ;  $p = 0,029$ ) und  $\beta$ 1-AR (Tag 0  $0,07 \pm 0,03$  vs. Tag 28  $1,00 \pm 0,68$ ;  $p = 0,006$ ) an den späteren Differenzierungstagen im Vergleich zum Tag 0. Die Expression des Alpha 2 und des Beta 2 Adrenorezeptoren zeigte diesen kardio-selektiven Verlauf nicht.

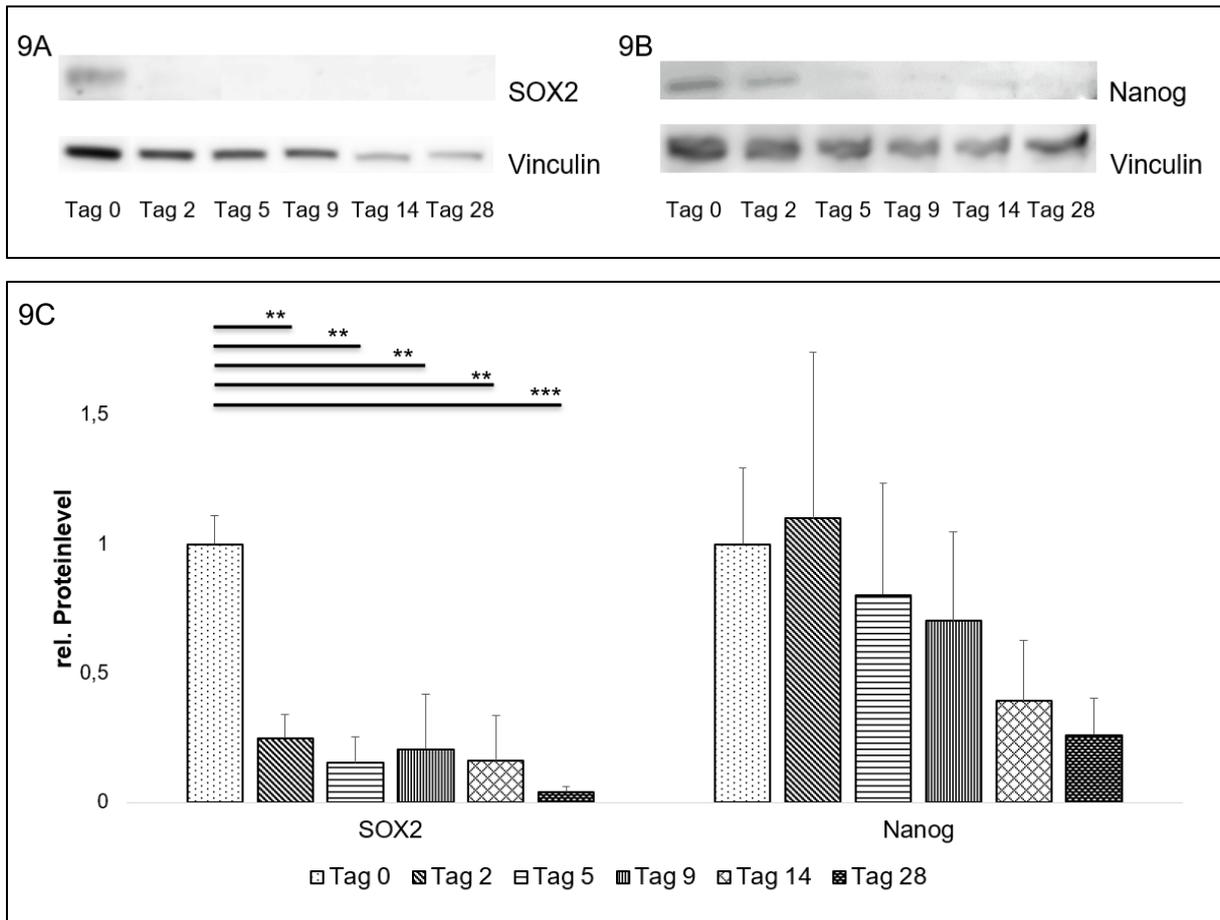
Sowohl der Angiotensin II Rezeptor Typ 1, als auch der ATII-R2 zeigten eine herzspezifische Expression während der hiPSC Differenzierung. Der ATII-R1 (Tag 0  $0,01 \pm 0,01$  vs. Tag 28  $1,00 \pm 0,58$ ;  $p = 0,024$ ) und ATII-R2 (Tag 0  $0,01 \pm 0,02$  vs. Tag 28  $0,57 \pm 0,32$ ;  $p = 0,016$ ) stiegen signifikant mit der fortschreitenden Kardiomyogenese an.

## Ergebnisse

### 5.1.2 Proteinlevel während der Kardiomyogenese

#### Embryonale Proteine

Zum Nachweis der erfolgreichen Differenzierung wurden typische embryonale Proteine mittels Westernblot an verschiedenen Tagen der hiPSC Differenzierung untersucht.



#### **Abbildung 9: embryonale Proteinlevel während der Kardiomyogenese**

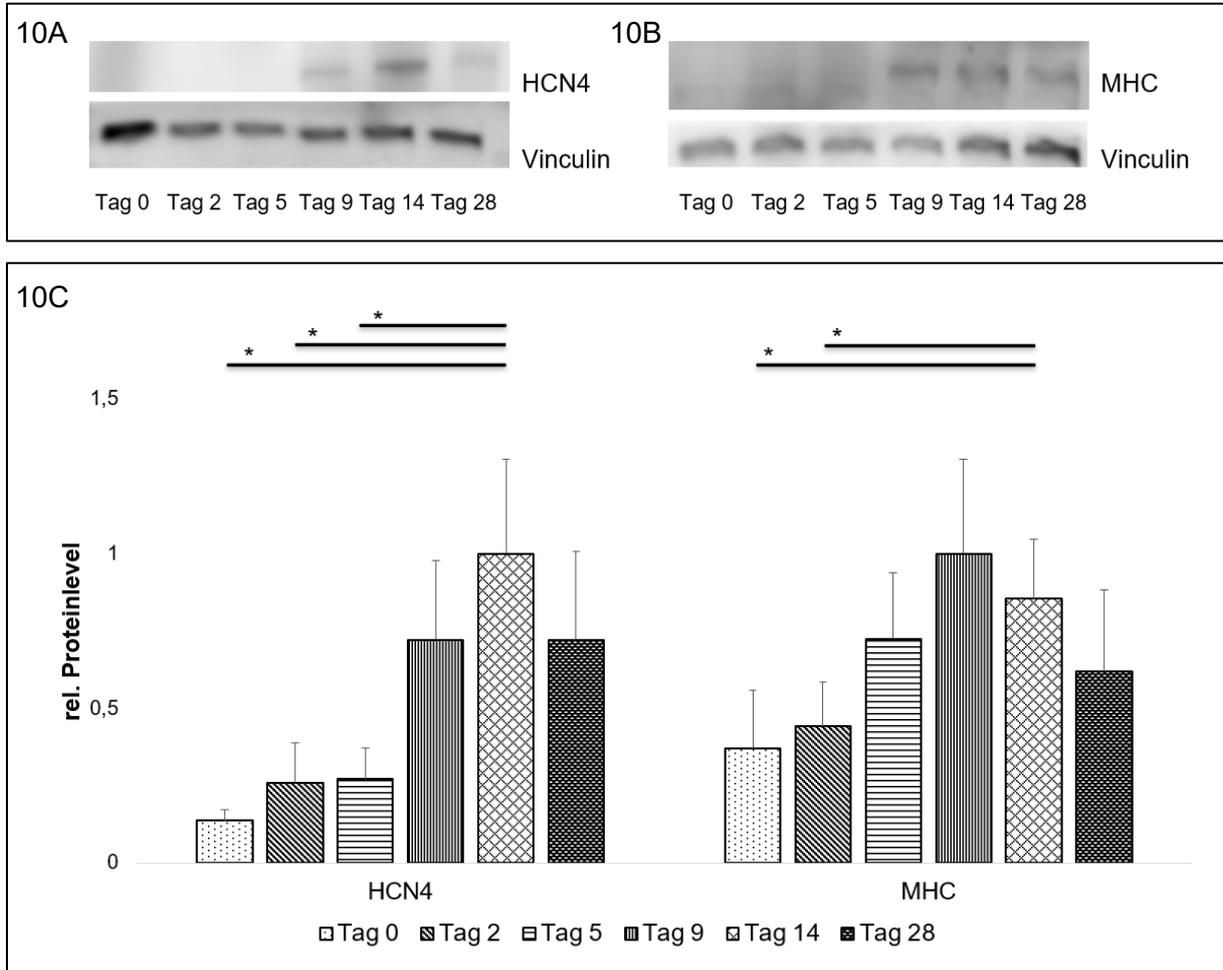
Dargestellt sind repräsentative Westernblots in 9A von SOX2 und in 9B von Nanog mit der Referenz Vinculin an den verschiedenen Tagen der hiPSC Differenzierung. 9C zeigt die Proteinlevel SOX2 und Nanog jeweils relativ zu Vinculin. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Experimenten. Die Signifikanz zwischen 2 Zeitpunkten wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

Es zeigte sich ein signifikant erhöhtes Proteinlevel von SOX2 von Tag 0 gegenüber den folgenden Tagen der Differenzierung (Tag 0  $1,00 \pm 0,11$  vs. Tag 5  $0,15 \pm 0,10$ ;  $p = 0,001$ ). Nanog zeigte ebenfalls tendenziell einen Abfall von Tag 0 und Tag 2 zu den späteren Differenzierungstagen.

## Ergebnisse

### Kardiale Proteine

Zum Nachweis der erfolgreichen Differenzierung wurden typische kardiale Proteine mittels Westernblot an verschiedenen Tagen der hiPSC Differenzierung untersucht.



#### Abbildung 10: kardiale Proteinlevel während der Kardiomyogenese

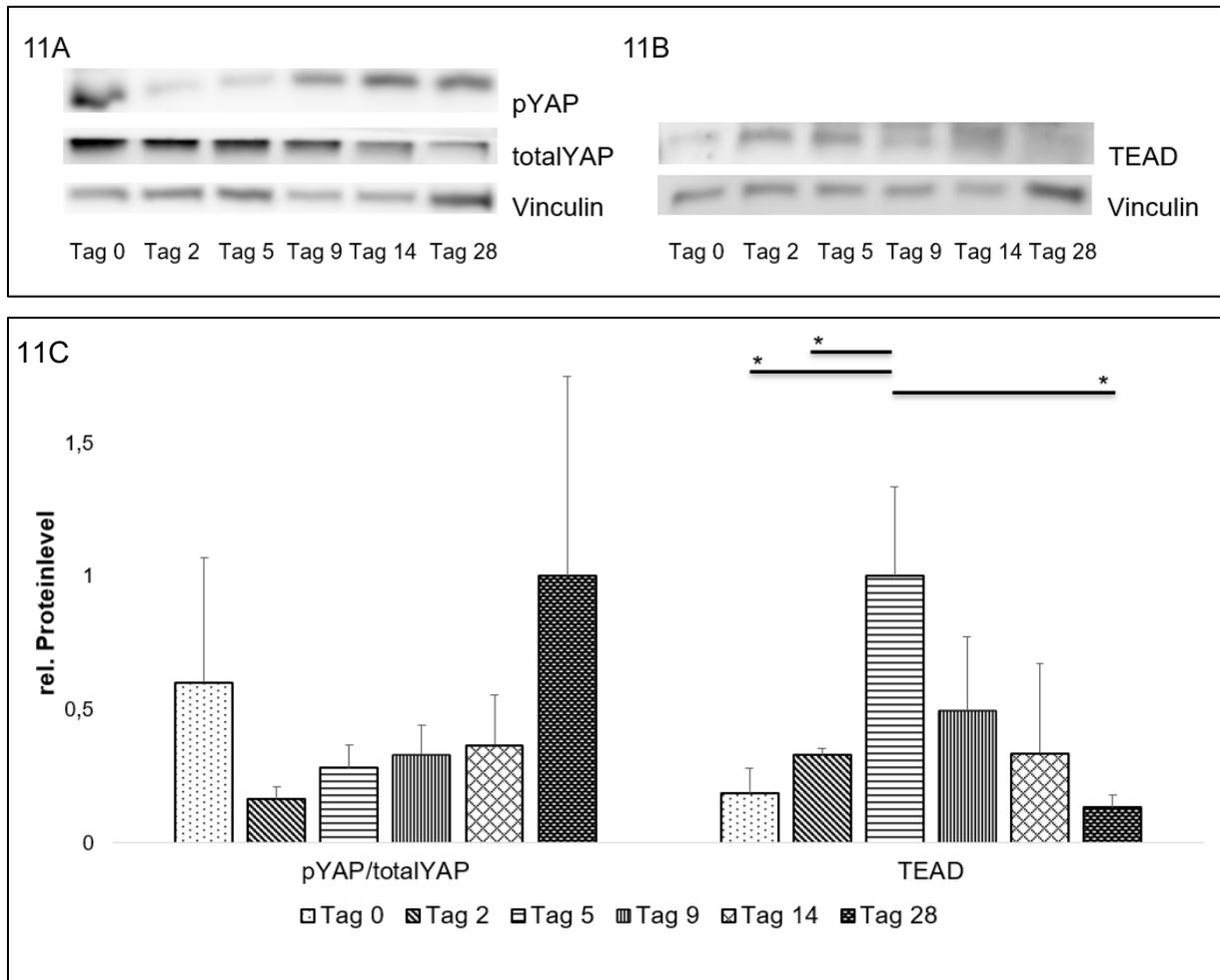
Dargestellt sind repräsentative Westernblots in 10A von HCN4 und in 10B von MHC mit der Referenz Vinculin an den verschiedenen Tagen der hiPSC Differenzierung. 10C zeigt die Proteinlevel von HCN4 und MHC jeweils relativ zu Vinculin. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Experimenten. Die Signifikanz zwischen 2 Zeitpunkten wurde mit den von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

Es zeigten sich signifikant erhöhte Proteinlevel vom HCN4 (Tag 0  $0,14 \pm 0,03$  vs. Tag 14  $1,00 \pm 0,31$ ;  $p = 0,017$ ) und der MHC (Tag 0  $0,37 \pm 0,19$  vs. Tag 14  $0,86 \pm 0,19$ ;  $p = 0,021$ ) an den späteren Differenzierungstagen gegenüber den früheren Tagen.

## Ergebnisse

### Hippo-Proteine

Nachdem die Differenzierung erfolgreich nachgewiesen wurde, sollten typische Hippo-Signalweg Proteine mittels Westernblot an verschiedenen Differenzierungstagen untersucht werden.



#### **Abbildung 11: Hippo-Proteinlevel während der Kardiomyogenese**

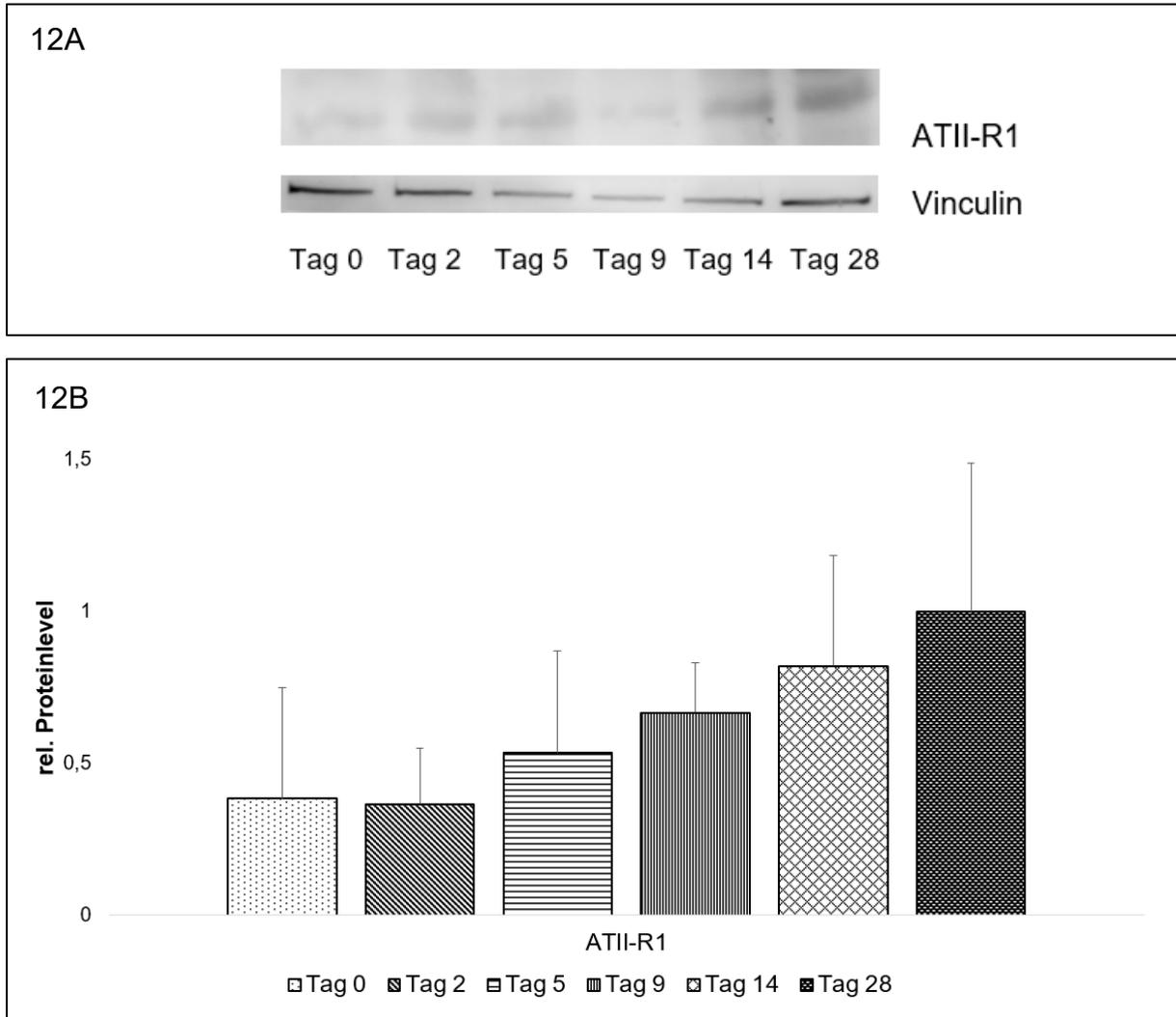
Dargestellt sind repräsentative Westernblots in 11A von pYAP und total YAP und in 11B von TEAD mit der Referenz Vinculin an den verschiedenen Tagen der hiPSC Differenzierung. 11C zeigt das Verhältnis pYAP/totalYAP und das Proteinlevel von TEAD jeweils relativ zu Vinculin. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Experimenten. Die Signifikanz zwischen 2 Zeitpunkten wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

In Abbildung 11 zeigt sich eine abfallende Tendenz des Phosphorylierungslevels von YAP von Tag 0 zum Tag 2. In der weiteren Differenzierung stieg pYAP wieder an und unphosphoryliertes YAP nahm relativ gesehen ab. Das Proteinlevel von TEAD zeigte einen signifikanten Anstieg von Tag 0 ( $0,18 \pm 0,10$ ) zu Tag 5 ( $1,00 \pm 0,34$ ;  $p = 0,03$ ), während es im Verlauf von Tag 5 ( $1,00 \pm 0,34$ ) auf Tag 28 ( $0,13 \pm 0,05$ ;  $p = 0,022$ ) signifikant abfiel.

## Ergebnisse

### Angiotensin II Rezeptor Typ 1 Proteinlevel

Nachdem die Expression des ATII-R1 erfolgreich nachgewiesen wurde, sollte dieser Rezeptor auch auf Proteinebene mittels Westernblot an den verschiedenen Differenzierungstagen bestätigt werden.



#### **Abbildung 12: ATII-R1-Proteinlevel während der Kardiomyogenese**

Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot in 12A vom ATII-R1 mit der Referenz Vinculin an den verschiedenen Tagen der hiPSC Differenzierung. 12B zeigt das Proteinlevel des Angiotensin II Rezeptor Typ 1 jeweils relativ zu Vinculin. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Experimenten. Die Signifikanz zwischen 2 Zeitpunkten wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

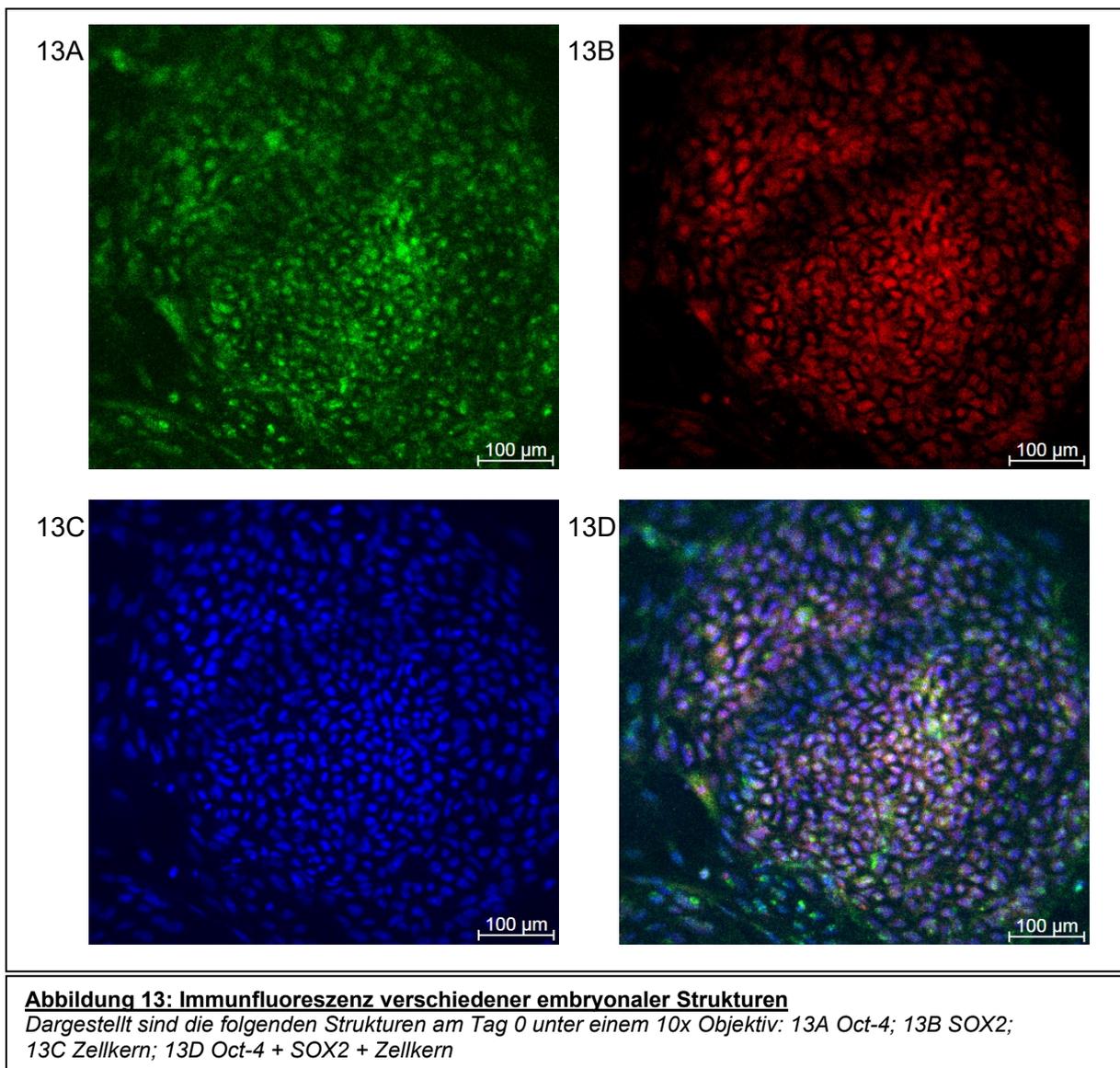
In Abbildung 12 zeigt sich ein tendenziell erhöhtes Proteinlevel vom Angiotensin II Rezeptor Typ 1 am Tag 28 gegenüber den früheren Tagen der Differenzierung (Tag 0  $0,38 \pm 0,37$  vs. Tag 28  $1,00 \pm 0,49$ ;  $p = 0,13$ ).

## Ergebnisse

### 5.1.3 Immunfluoreszenz während der Kardiomyogenese

#### *Embryonale Marker*

Zur Charakterisierung der hiPSC als Ausgangszelle wurde neben quantitativen Analysen über qrtPCR und Westernblot auch eine qualitative Methode durchgeführt. Abbildung 13 zeigt embryonale Marker der hiPSC am Tag 0 der Differenzierung.



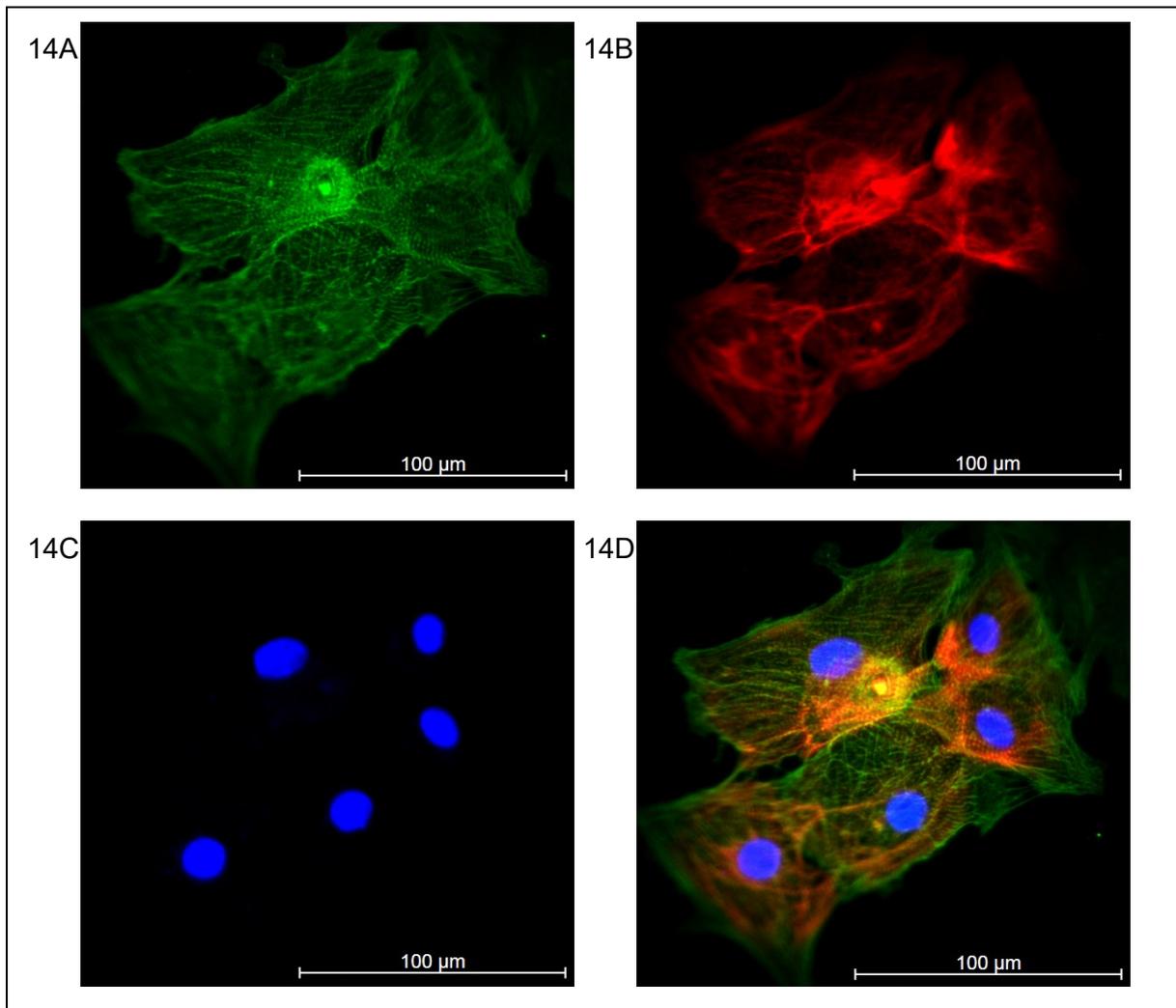
Es konnten typische Stammzellmarker über die Immunfluoreszenzuntersuchung nachgewiesen werden.

*Die Bildreihe 13A-13D wurde gemeinsam mit Herrn Dr. Mohamed Bekhite aufgenommen und die Ergebnisse wurden gemeinsam im Journal: "Basic Research in Cardiology" publiziert (Bekhite et al. 2020).*

## Ergebnisse

### Kardiale Marker

Zur Charakterisierung der hiPSC abgeleiteten Herzzelle wurde neben quantitativen Analysen über qrtPCR und Westernblot auch eine qualitative Methode durchgeführt. Abbildung 14 zeigt die erfolgreiche Kardiomyogenese anhand der Marker  $\alpha$ -Actinin und Myosin-leichte-Kette (MLC2v) am Tag 28 der Differenzierung.



**Abbildung 14: Immunfluoreszenz verschiedener kardialer Strukturen**

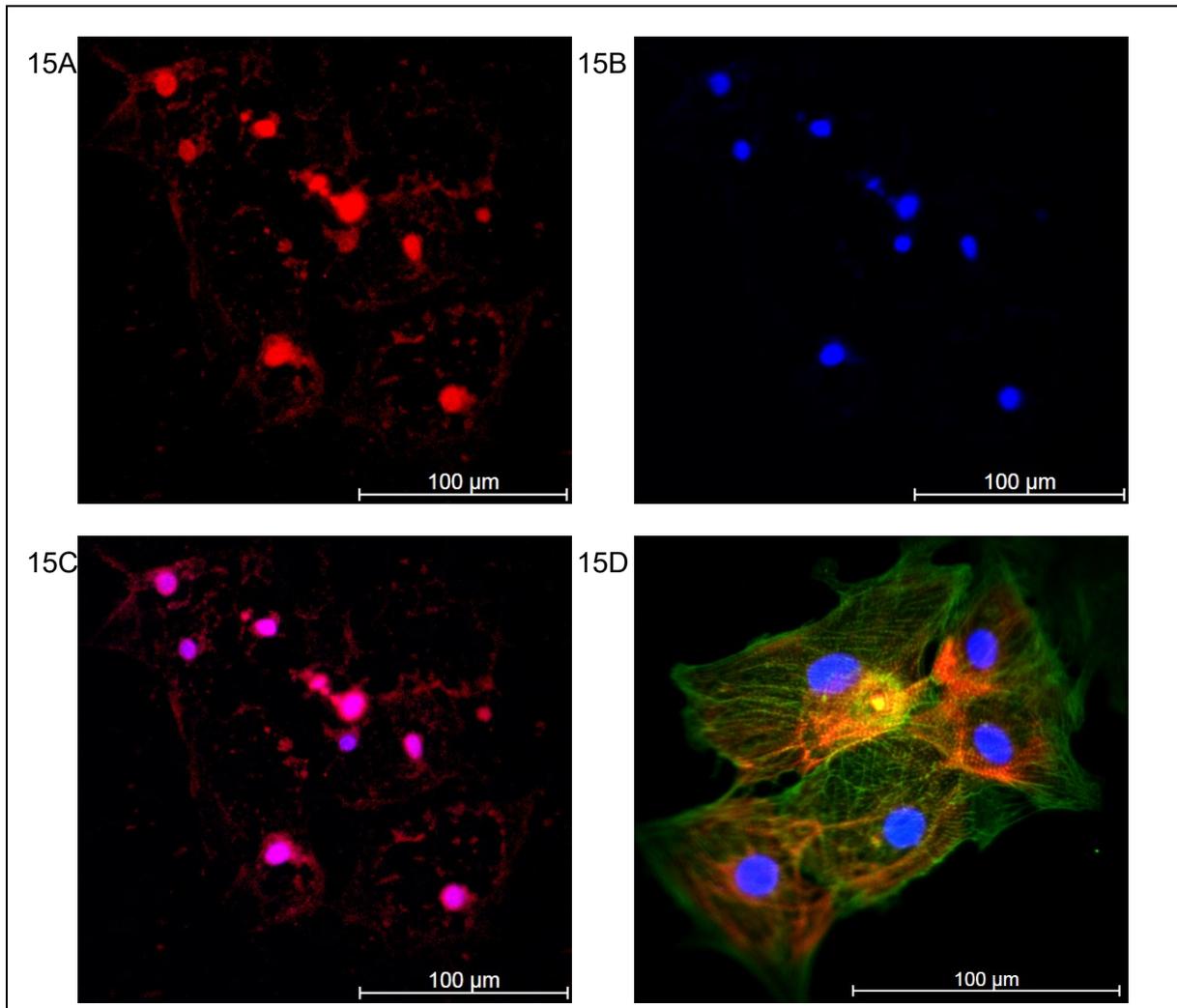
Dargestellt sind die folgenden Strukturen am Tag 28 unter einem 40x Objektiv: 14A  $\alpha$ -Actinin; 14B MLC2v; 14C Zellkern; 14D  $\alpha$ -Actinin + MLC2v + Zellkern

In Abbildung 14 konnten typische kardiale Proteine über die Immunfluoreszenzuntersuchung nachgewiesen werden.

## Ergebnisse

### *Angiotensin II Rezeptor Typ 1*

Zur Charakterisierung des Angiotensin II Rezeptor Typ 1 auf der hiPSC abgeleiteten Herzzelle wurde neben quantitativen Analysen über qrtPCR und Westernblot auch eine qualitative Methode durchgeführt. Abbildung 15 zeigt den ATII-R1.



**Abbildung 15: Immunfluoreszenz des Angiotensin II Rezeptor Typ 1**

Dargestellt sind die folgenden Strukturen am Tag 28 der Differenzierung unter einem 40x Objektiv:  
15A ATII-R1; 15B Zellkern; 15C ATII-R1 + Zellkern; zum Vergleich 15D  $\alpha$ -Actinin + MLC2v + Zellkern

Der Angiotensin II Rezeptor Typ 1 ließ sich visuell an der Zellmembran, intrazellulär und am Zellkern der hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten nachweisen.

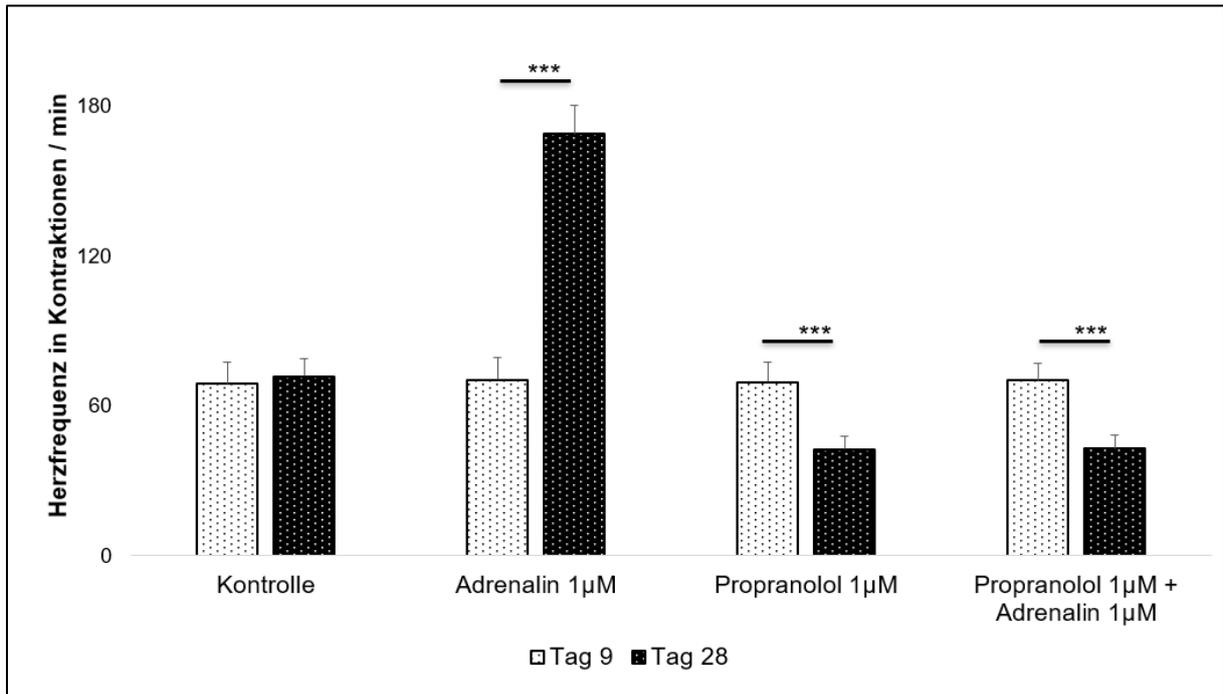
## Ergebnisse

### 5.2 Effekte von adrenergen Substanzen auf hiPSC Herzzellen

#### 5.2.1 Beeinflussung der Herzfrequenz unter adrenergen Stimuli

##### *Adrenerge Stimulation über 3 Stunden*

Im folgenden Experiment wurden die hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten am Differenzierungstag 9 und Differenzierungstag 28 für 3h mit 1 $\mu$ M Adrenalin bzw. 1 $\mu$ M Propranolol stimuliert, um chronotrope Effekte zu untersuchen.



#### **Abbildung 16: Herzfrequenzanalyse unter 3h adrenerger Stimulation**

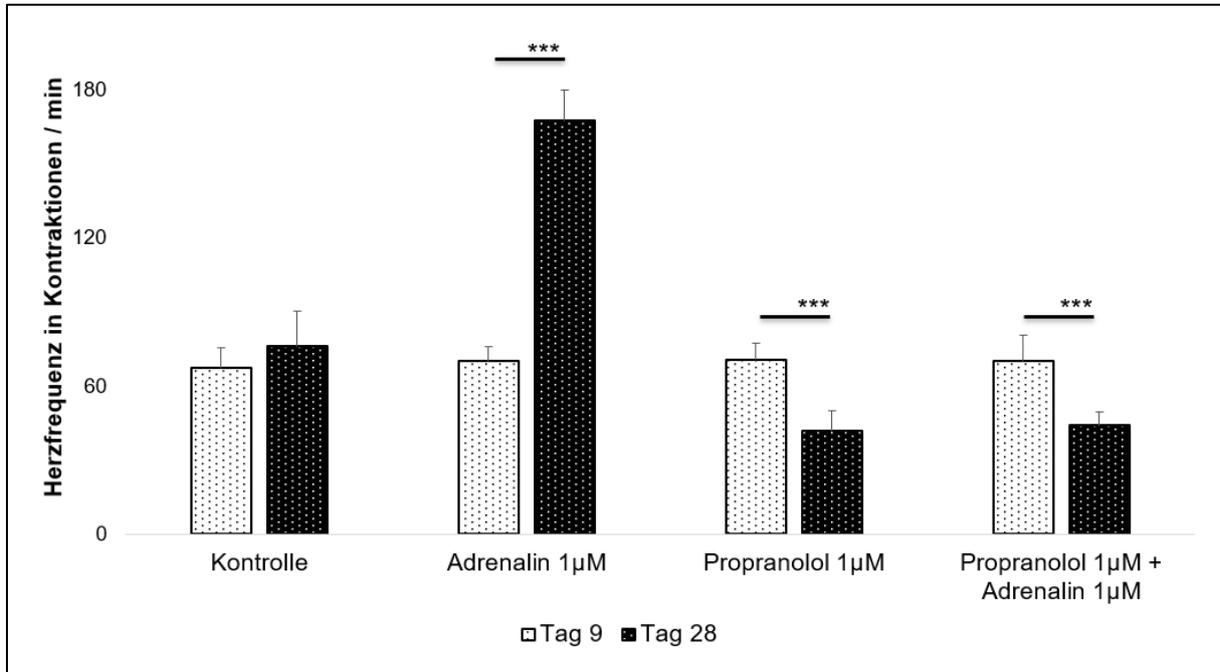
Dargestellt ist die Herzfrequenz in Kontraktionen pro Minute an Tag 9 und Tag 28 der hiPSC Differenzierung unter verschiedenen adrenergen Stimuli. Adrenalin und Propranolol wurden jeweils in einer Konzentration von 1 $\mu$ M zur Stimulation verwendet. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Experimenten. Die Signifikanz zwischen 2 Zeitpunkten wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001 gekennzeichnet.

Die hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten zeigten an Tag 9 und an Tag 28 eine ähnliche Ruheherzfrequenz (Tag 9 69 $\pm$ 9 vs. Tag 28 72 $\pm$ 7;  $p$ =0,44). Der positiv chronotrope Effekt von Adrenalin war nach 3h Stimulation nur bei den adulten Kardiomyozyten an Tag 28 nachweisbar (Tag 9 70 $\pm$ 9  $p$ =0,69; Tag 28 169 $\pm$ 11  $p$ <0,001). Ebenfalls reagierten nur die adulten Kardiomyozyten signifikant auf Propranolol mit einer Reduktion der Frequenz (Tag 9 69 $\pm$ 8  $p$ =0,88; Tag 28 43 $\pm$ 5  $p$ <0,001). Die 3-stündige Vorbehandlung mit Propranolol verhinderte effektiv den Effekt von Adrenalin bei adulten Herzzellen (Tag 9 70 $\pm$ 7  $p$ =0,74; Tag 28 43 $\pm$ 5  $p$ <0,001).

## Ergebnisse

### Adrenerge Stimulation über 24 Stunden

Im folgenden Experiment wurden die hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten am Differenzierungstag 9 und Differenzierungstag 28 für 24h mit 1µM Adrenalin bzw. 1µM Propranolol stimuliert, um chronotrope Effekte zu untersuchen.



#### **Abbildung 17: Herzfrequenzanalyse unter 24h adrenerger Stimulation**

Dargestellt ist die Herzfrequenz in Kontraktionen pro Minute an Tag 9 und Tag 28 der hiPSC Differenzierung unter verschiedenen adrenergen Stimuli. Adrenalin und Propranolol wurden jeweils in einer Konzentration von 1µM zur Stimulation verwendet. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Experimenten. Die Signifikanz zwischen 2 Zeitpunkten wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

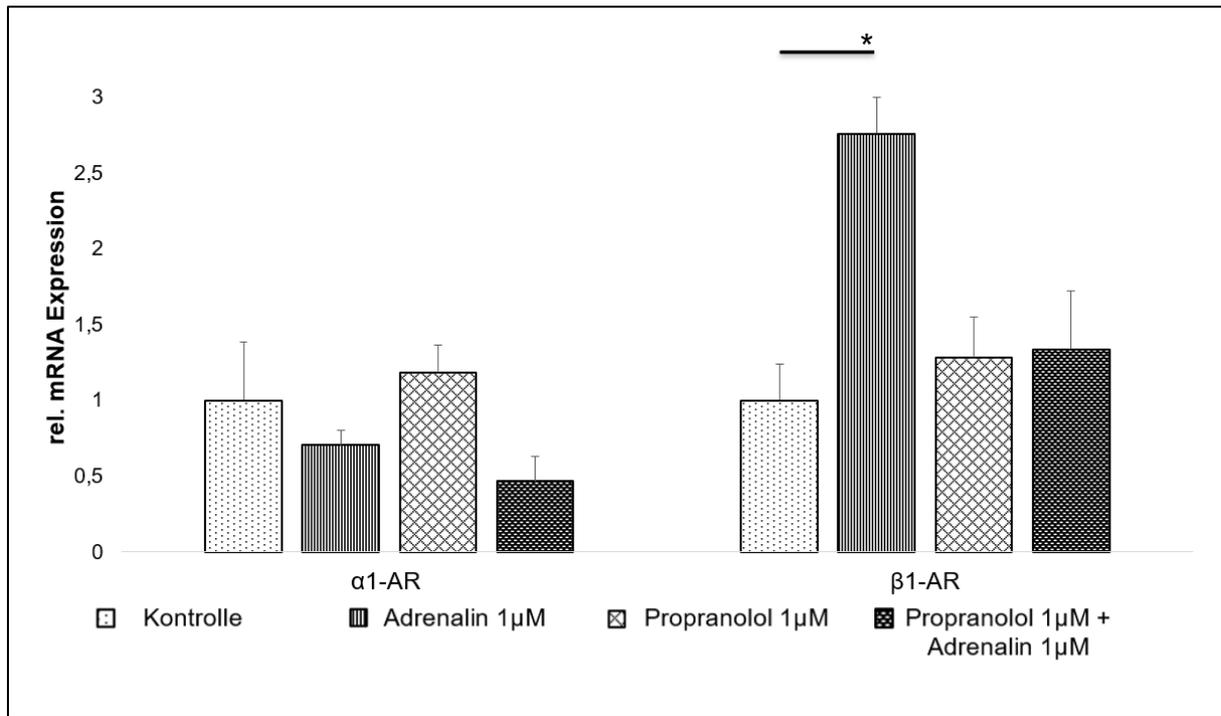
Nach 24h Stimulation blieben die beschriebenen Effekte aus Abbildung 16 bestehen. Die hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten zeigten an Tag 9 und an Tag 28 eine ähnliche Ruheherzfrequenz (Tag 9  $67 \pm 8$  vs. Tag 28  $76 \pm 14$ ;  $p = 0,14$ ). Der positiv chronotrope Effekt von Adrenalin war nach 24h Stimulation nur bei den adulten Kardiomyozyten an Tag 28 nachweisbar (Tag 9  $70 \pm 6$   $p = 0,44$ ; Tag 28  $167 \pm 13$   $p < 0,001$ ). Ebenfalls reagierten nur die adulten Kardiomyozyten signifikant auf Propranolol mit einer Reduktion der Frequenz (Tag 9  $70 \pm 7$   $p = 0,39$ ; Tag 28  $42 \pm 8$   $p < 0,001$ ). Die 3-stündige Vorbehandlung mit Propranolol verhinderte effektiv den Effekt von Adrenalin bei adulten Herzzellen (Tag 9  $70 \pm 10$   $p = 0,55$ ; Tag 28  $44 \pm 5$   $p < 0,001$ ).

## Ergebnisse

### 5.2.2 Expressionsanalysen nach adrenerger Stimulation

#### *$\alpha$ 1-AR und $\beta$ 1-AR Expression nach adrenerger Stimulation*

Nachdem der Nachweis über die Wirksamkeit der adrenergen Stimulation über die Herzfrequenzanalyse gezeigt wurde, erfolgte die Expressionsanalyse des  $\alpha$ 1-AR und des  $\beta$ 1-AR nach Stimulation am Differenzierungstag 28.



**Abbildung 18: Expressionslevel adrenerger Rezeptoren am Tag 28 nach adrenerger Stimulation**

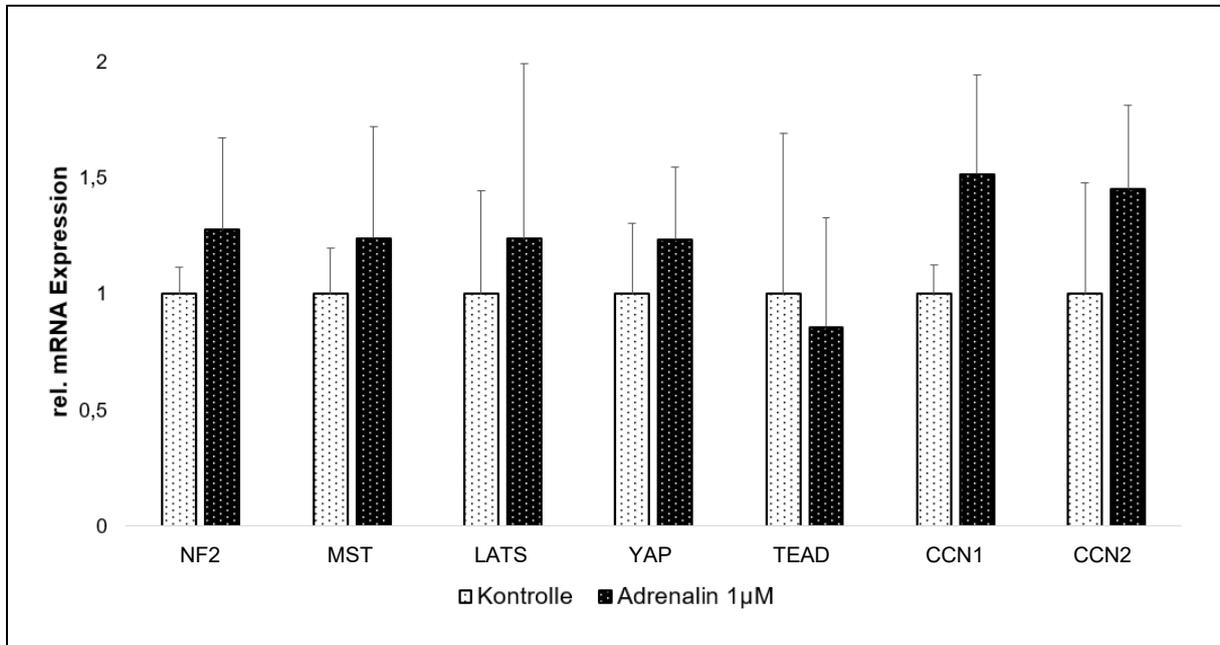
Dargestellt sind die mRNA Expressionslevel relativ zu GAPDH nach 48h Stimulation mit 1µM Adrenalin, 1µM Propranolol und deren Kombination am Tag 28 der hiPSC Differenzierung. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Experimenten. Die Signifikanz zwischen 2 Gruppen wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

In Abbildung 18 zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Expression des  $\beta$ 1-Adrenorezeptors nach 48h Stimulation mit 1µM Adrenalin (Kontrolle  $1,00 \pm 0,24$ ; Adrenalin  $2,76 \pm 0,24$   $p = 0,002$ ). Dieser Effekt konnte durch die 3-stündige Vorbehandlung mit 1µM Propranolol verhindert werden (Kontrolle  $1,00 \pm 0,24$ ; Propranolol+Adrenalin  $1,34 \pm 0,39$   $p = 0,35$ ). 1µM Adrenalin, 1µM Propranolol und deren Kombination zeigten keinen Einfluss auf die Expression des  $\alpha$ 1-AR.

## Ergebnisse

### *Hippo-Expression unter adrenergen Einfluss*

Nachdem der Nachweis über die Wirksamkeit der adrenergen Stimulation über die Herzfrequenzanalyse gezeigt wurde, erfolgte die Expressionsanalyse ausgewählter Hippo-Komponenten nach Stimulation mit Adrenalin am Differenzierungstag 28.



**Abbildung 19: Expressionslevel ausgewählter Hippo-Targets am Tag 28 nach adrenerger Stimulation**

Dargestellt sind die mRNA Expressionslevel relativ zu GAPDH nach 48h Stimulation mit 1µM Adrenalin am Tag 28 der hiPSC Differenzierung. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Experimenten. Die Signifikanz zwischen 2 Gruppen wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

In Abbildung 19 zeigt sich tendenziell ein Anstieg der Expression der untersuchten Hippo-Komponenten nach 48h 1µM Stimulation mit Adrenalin. NF2 (Kontrolle  $1,00 \pm 0,12$ ; Adrenalin  $1,27 \pm 0,40$   $p = 0,401$ ); YAP (Kontrolle  $1,00 \pm 0,30$ ; Adrenalin  $1,23 \pm 0,31$   $p = 0,489$ ); CCN1 (Kontrolle  $1,00 \pm 0,12$ ; Adrenalin  $1,52 \pm 0,43$   $p = 0,175$ ) zeigten eine ansteigende Tendenz. TEAD bildete dabei eine Ausnahme und zeigte keinen tendenziellen Anstieg (Kontrolle  $1,00 \pm 0,69$ ; Adrenalin  $0,85 \pm 0,47$   $p = 0,819$ ).

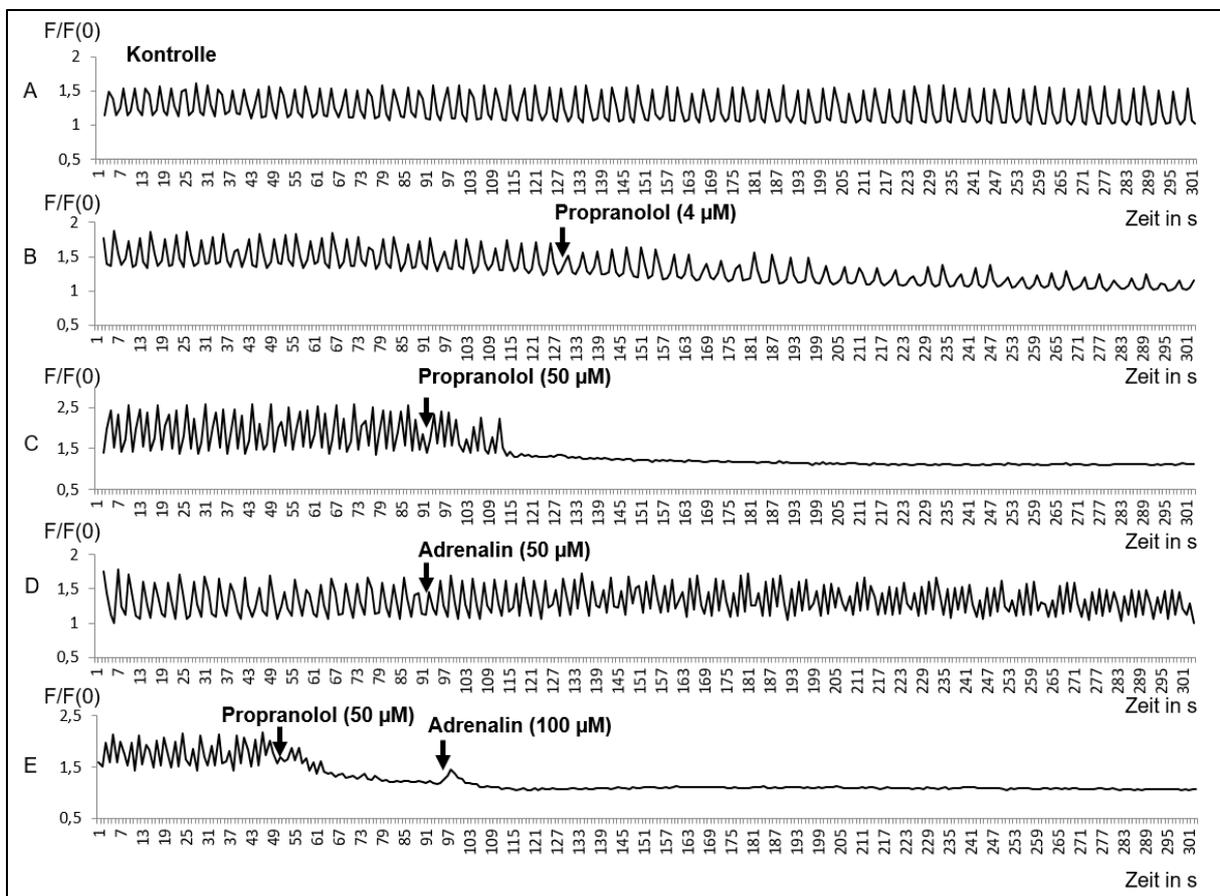
## Ergebnisse

### 5.2.3 Kalziummessung unter Einfluss adrenerger Stimuli

#### *unselektive adrenerge Stimulation*

Das nachfolgende Experiment wurde gemeinsam mit Herrn Dr. Mohamed Bekhite aufgenommen und die Ergebnisse wurden gemeinsam im Journal: "Basic Research in Cardiology" publiziert (Bekhite et al. 2020). Die Auswertung erfolgte durch Herrn Dr. Mohamed Bekhite.

Nach Aufzeichnung der spontanen Kalziumoszillation wurden die Zellen mit den unselektiven adrenergen Substanzen Adrenalin ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Agonist) und Propranolol ( $\beta$ -Antagonist) behandelt.



**Abbildung 20: Ca<sup>2+</sup>-Oszillation hiPSC Herzellen am Tag 28 unter unselektiver adrenerger Stimulation**  
Dargestellt ist die relative Fluoreszenzänderungen der Kalziumoszillation von 28 Tage alten Kardiomyozyten: (A) spontane Kalziumoszillationen; (B) nach Behandlung mit 4  $\mu$ M Propranolol; (C) nach Behandlung mit 50  $\mu$ M Propranolol; (D) nach Behandlung mit 50  $\mu$ M Adrenalin; (E) nach Vorbehandlung mit 50  $\mu$ M Propranolol und anschließender 100  $\mu$ M Adrenalin Stimulation. Das Verhältnis (F/F<sub>0</sub>) aus Fluo4 Signal (F) und Hintergrundfluoreszenz (F<sub>0</sub>) ist gegen die Zeit in Sekunden (s) dargestellt. Die Daten zeigen ein repräsentatives Beispiel, welches in mindestens drei unabhängigen Versuchen repliziert wurde.

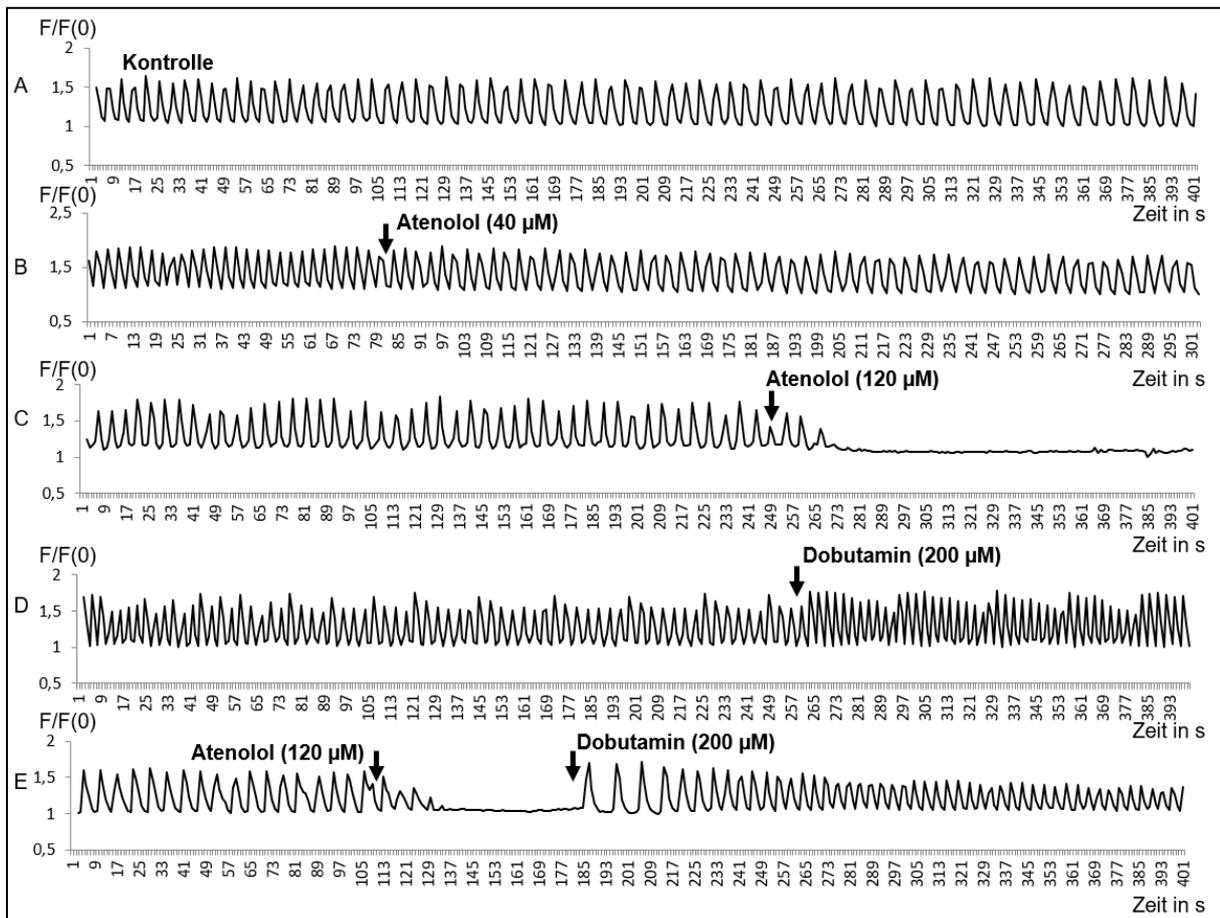
Adrenalin zeigte positiv chronotrope und inotrope Effekte, während Propranolol einen negativen Einfluss auf die Ca<sup>2+</sup>-Oszillation entfaltete. Adrenalin konnte den Antagonist Propranolol nicht verdrängen und die Ca<sup>2+</sup>-Oszillation nicht wiederherstellen.

## Ergebnisse

### selektive adrenerge Stimulation

Das nachfolgende Experiment wurde gemeinsam mit Herrn Dr. Mohamed Bekhite aufgenommen und die Ergebnisse wurden gemeinsam im Journal: "Basic Research in Cardiology" publiziert (Bekhite et al. 2020). Die Auswertung erfolgte durch Herrn Dr. Mohamed Bekhite.

Nach der Aufzeichnung der spontanen Kalziumoszillation wurden die Zellen mit den selektiven adrenergen Substanzen Dobutamin ( $\beta_1$ -Agonist) und Atenolol ( $\beta_1$ -Antagonist) behandelt.



**Abbildung 21: Ca<sup>2+</sup>-Oszillation hiPSC Herzzellen am Tag 28 unter selektiver adrenerger Stimulation**

Dargestellt ist die relative Fluoreszenzänderungen (F/F<sub>0</sub>) der Kalziumoszillation an Herzzellen am Tag 28:

(A) spontane Kalziumoszillationen; (B) nach Behandlung mit 40  $\mu$ M Atenolol; (C) nach Behandlung mit 120  $\mu$ M Atenolol; (D) nach Behandlung mit 200  $\mu$ M Dobutamin; (E) nach Vorbehandlung mit 120  $\mu$ M Atenolol und anschließender Stimulation mit 200  $\mu$ M Dobutamin. Das Verhältnis (F/F<sub>0</sub>) aus Fluo4 Signal (F) und Hintergrundfluoreszenz (F<sub>0</sub>) ist gegen die Zeit in Sekunden (s) dargestellt. Die Daten zeigen ein repräsentatives Beispiel, welches in mindestens drei unabhängigen Versuchen repliziert wurde.

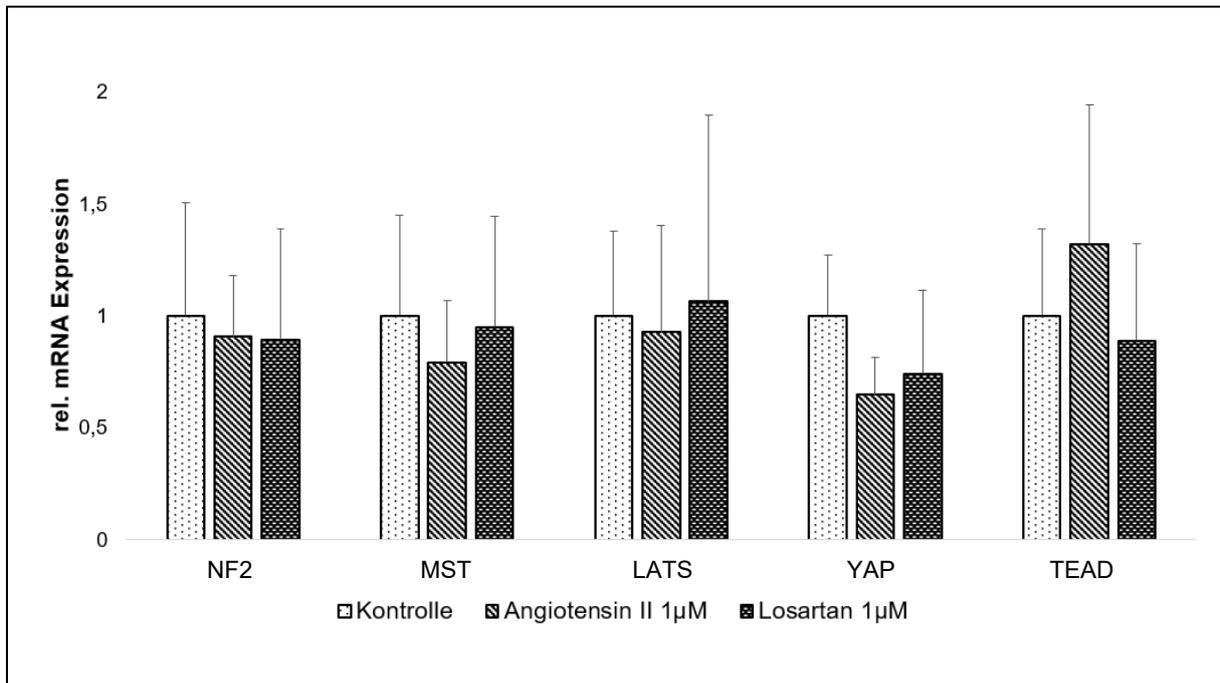
Dobutamin zeigte positiv chronotrope und inotrope Effekte, während Atenolol einen negativen Einfluss auf die Ca<sup>2+</sup>-Oszillation entfaltete. Dobutamin konnte den Antagonist Atenolol verdrängen und die Ca<sup>2+</sup>-Oszillation wiederherstellen.

### 5.3 Effekte von angiotensinergen Substanzen auf hiPSC Herzzellen

#### 5.3.1 Expressionsanalysen nach angiotensinerner Stimulation

##### *Hippo-Expression unter angiotensinergen Einfluss am Differenzierungstag 9*

Im folgenden Experiment sollte die Wirkung von Angiotensin II auf ausgewählte Hippo-Komponenten der Kardiomyozyten am Differenzierungstag 9 untersucht werden.



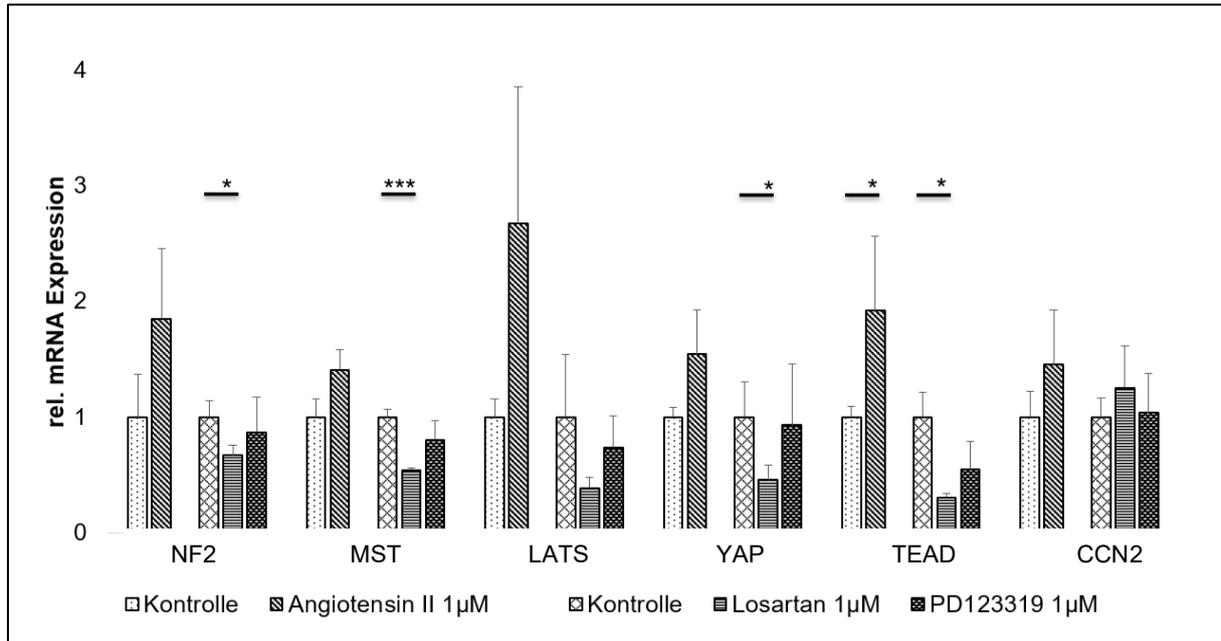
**Abbildung 22: Expressionslevel ausgewählter Hippo-Gene nach angiotensinerner Stimulation am Tag 9**  
 Dargestellt sind die mRNA Expressionslevel relativ zu GAPDH nach 48h 1µM Ang II bzw. 1µM AT1R1 Blocker Losartan. Als Kontrolle dienten die Lösungsmittel. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Experimenten. Die Signifikanz zwischen 2 Gruppen wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

Die fehlende Rezeptorexpression am Differenzierungstag 9 wurde bereits im Experiment zur Abbildung 8 nachgewiesen. Es konnte keine signifikante Wirkung durch die Stimulation mit 1 µM Angiotensin II auf ausgewählte Hippo-Signalweg Komponenten: NF2 (Kontrolle  $1,00 \pm 0,51$ ; Ang II  $0,91 \pm 0,27$   $p = 0,787$ ); YAP (Kontrolle  $1,00 \pm 0,27$ ; Ang II  $0,65 \pm 0,17$   $p = 0,105$ ) und TEAD (Kontrolle  $1,00 \pm 0,39$ ; Ang II  $1,32 \pm 0,62$   $p = 0,568$ ) bei jungen Kardiomyozyten am Differenzierungstag 9 festgestellt werden. Die Stimulation mit 1µM Losartan löste ebenfalls keine signifikanten Effekte auf ausgewählte Hippo Komponenten: NF2 (Kontrolle  $1,00 \pm 0,51$ ; Losartan  $0,89 \pm 0,49$   $p = 0,802$ ); YAP (Kontrolle  $1,00 \pm 0,27$ ; Losartan  $0,74 \pm 0,37$   $p = 0,367$ ) und TEAD (Kontrolle  $1,00 \pm 0,39$ ; Losartan  $0,89 \pm 0,43$   $p = 0,801$ ) aus.

## Ergebnisse

### Hippo-Expression unter angiotensinerger Einfluss am Differenzierungstag 28

Im folgenden Experiment sollte die Wirkung von Angiotensin II auf ausgewählte Hippo-Komponenten der Kardiomyozyten am Differenzierungstag 28 untersucht werden.



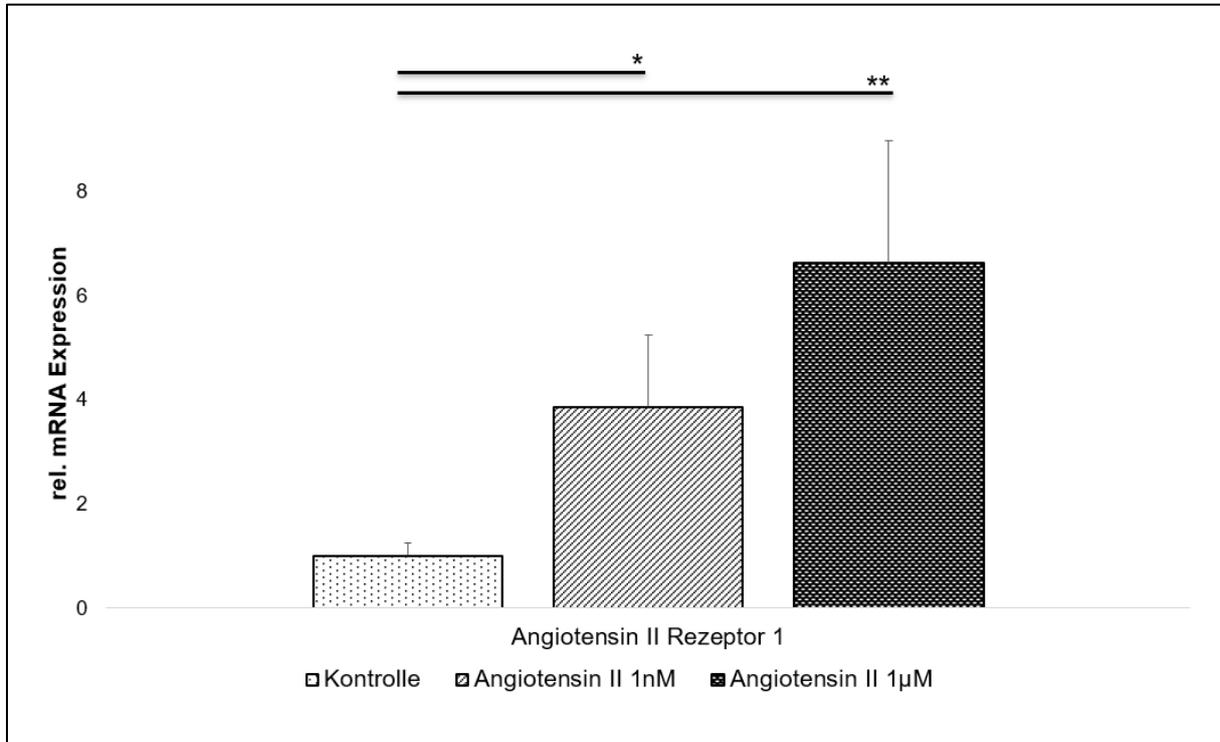
**Abbildung 23: Expressionslevel ausgewählter Hippo-Gene nach angiotensinerger Stimulation am Tag 28**  
 Dargestellt sind die mRNA Expressionslevel relativ zu GAPDH nach 48h 1µM Ang II bzw. 1µM AT1IR1 Blocker Losartan und 1µM AT1IR2 Blocker PD123319. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel H2O bzw. DMSO. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Experimenten. Die Signifikanz zwischen 2 Gruppen wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

Die Rezeptorexpression am Tag 28 wurde bereits im Experiment zur Abbildung 8 nachgewiesen. Entgegen der Ergebnisse aus Abbildung 22 zeigten die Ergebnisse aus Abbildung 23 eine Wirkung von Angiotensin II auf ausgewählte Hippo-Komponenten auf adulte Herzzellen am Differenzierungstag 28. Nach 48h Stimulation mit 1µM Angiotensin II zeigte sich tendenziell eine Steigerung der Expression ausgewählter Hippo-Komponenten und des Hippo-assoziierten Gens CCN2. Des Weiteren wurde eine signifikant erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors TEAD (Kontrolle  $1,00 \pm 0,09$ ; Ang II  $1,92 \pm 0,64$   $p = 0,049$ ) nachgewiesen. Außerdem konnte eine signifikante Senkung der Expression zahlreicher Hippo-Komponenten z.B. YAP (Kontrolle  $1,00 \pm 0,30$ ; Losartan  $0,46 \pm 0,13$   $p = 0,03$ ) und TEAD (Kontrolle  $1,00 \pm 0,22$ ; Losartan  $0,31 \pm 0,03$   $p = 0,011$ ) unter der Behandlung mit 1µM des ATII-R1 Antagonist Losartan ermittelt werden. Durch den selektiven AT2R2 Blocker PD123319 konnten diese Effekt nach 48h Stimulation mit 1µM nicht ausgelöst werden.

## Ergebnisse

### Angiotensin II Rezeptorexpression unter Einfluss von Angiotensin II am Tag 28

Nachdem ein Effekt von Angiotensin II auf den Hippo-Signalweg nachgewiesen wurde, sollte der Effekt von Ang II auf den Angiotensin II Rezeptor Typ 1 untersucht werden.



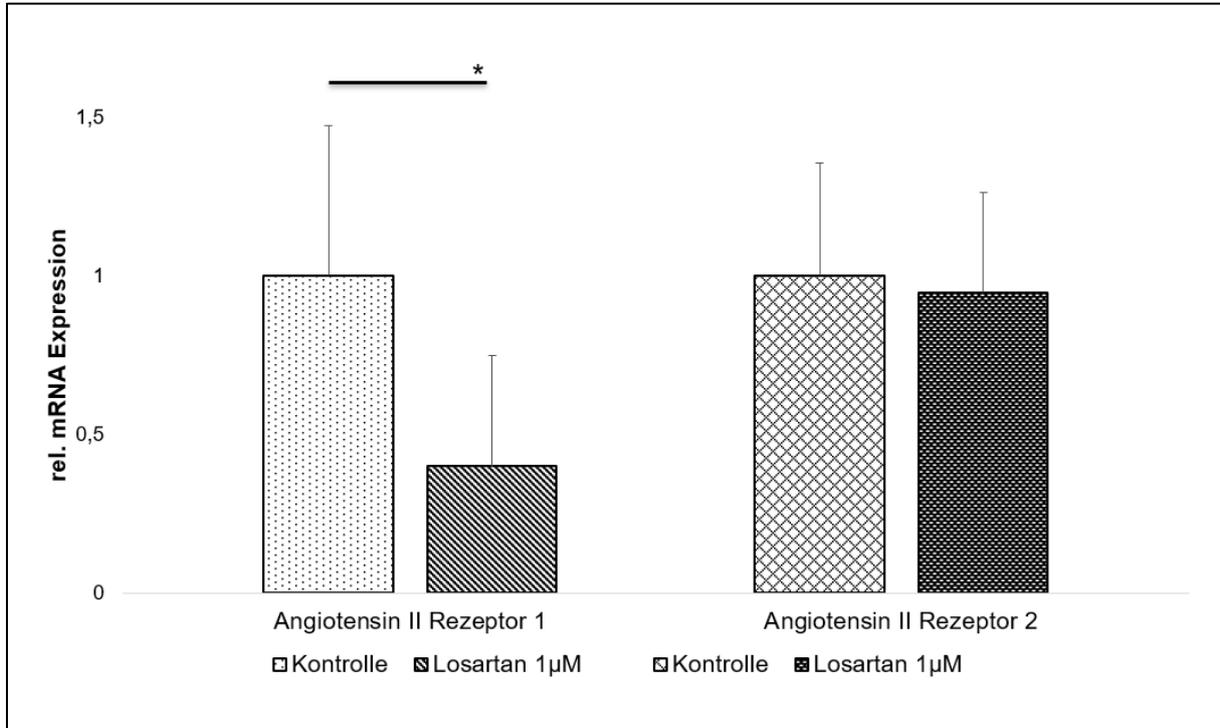
**Abbildung 24: Expressionslevel des Angiotensin II Rezeptor Typ 1 nach 48h Angiotensin II Stimulation**  
Dargestellt sind die mRNA Expressionslevel relativ zu GAPDH nach 48h 1nM Ang II bzw. 1µM Ang II. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel H<sub>2</sub>O. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Experimenten. Die Signifikanz zwischen 2 Gruppen wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

In Abbildung 24 konnte ein signifikanter Anstieg der ATII-R1 Expression nach Angiotensin II Stimulation nachgewiesen werden. Dabei konnte ein dosisabhängiger Effekt unter 1nM bzw. 1µM Angiotensin II Behandlung ermittelt werden (Kontrolle  $1,00 \pm 0,24$ ; Ang II 1nM  $3,86 \pm 1,38$   $p = 0,012$ ; Ang II 1µM  $6,62 \pm 2,35$   $p = 0,006$ ).

## Ergebnisse

### Angiotensin II Rezeptorexpression unter Einfluss von Losartan am Tag 28

Der selektive Effekt von Losartan sollte anhand der Expression beider Angiotensin II Rezeptoren nach 48h Stimulation untersucht werden.



**Abbildung 25: Expressionslevel des Angiotensin II Rezeptor Typ 1 nach 48h Losartan Stimulation**

Dargestellt sind die mRNA Expressionslevel relativ zu GAPDH nach 48h 1µM Losartan. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel DMSO. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Experimenten. Die Signifikanz zwischen 2 Gruppen wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

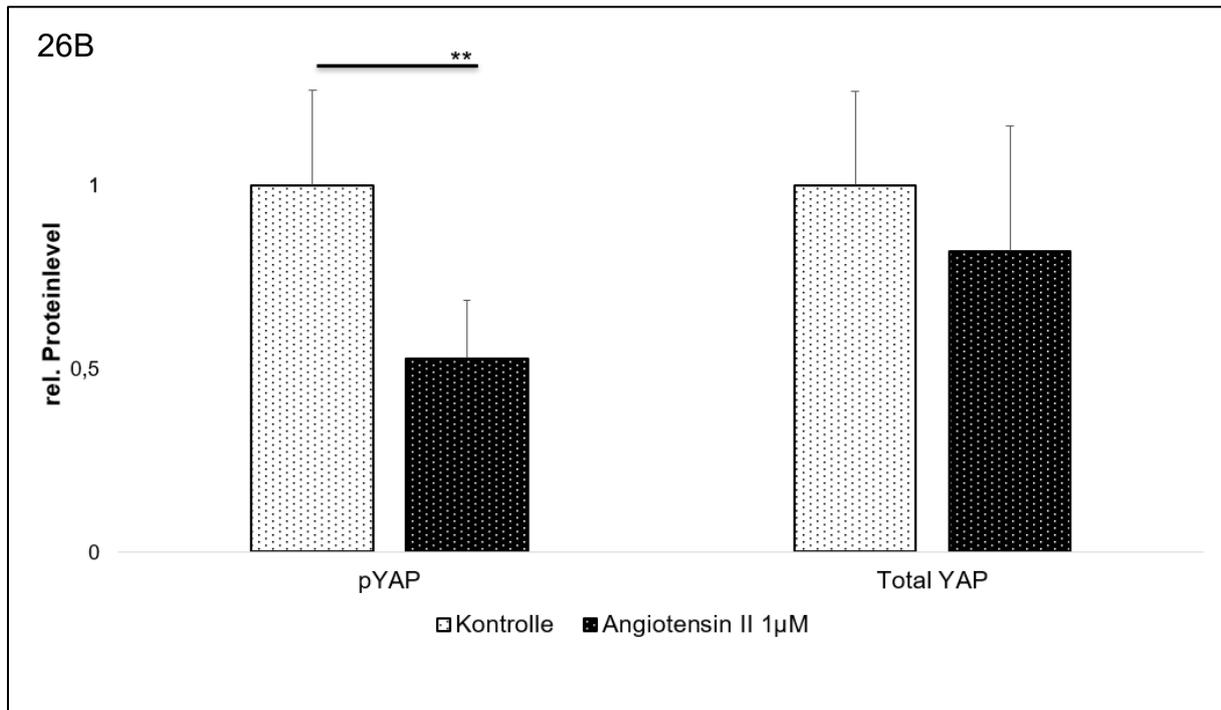
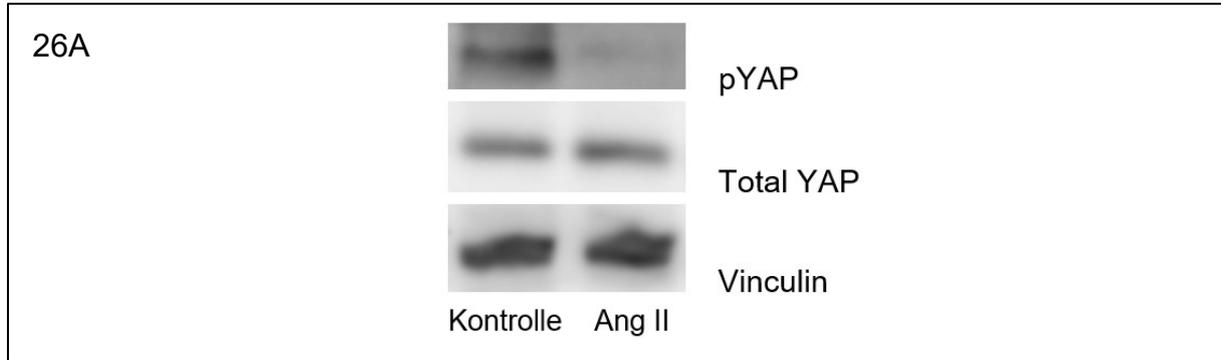
Es zeigte sich, dass der ATII-R1 Antagonist Losartan den gegenteiligen Effekt der Ergebnisse von Angiotensin II aus Abbildung 24 auslöste. Die ATII-R1 Expression wurde signifikant durch 1µM Losartan gesenkt (Kontrolle  $1,00 \pm 0,47$ ; Losartan  $0,40 \pm 0,35$   $p = 0,045$ ). Die Stimulation mit 1µM Losartan über 48h löste keinen Effekt auf die ATII-R2 Expression aus (Kontrolle  $1,00 \pm 0,35$ ; Losartan  $0,95 \pm 0,31$   $p = 0,81$ ).

## Ergebnisse

### 5.3.2 Proteinlevel nach angiotensinenger Stimulation

#### *pYAP und Gesamt-YAP Proteinlevel nach 48h Angiotensin II Stimulation*

Nachdem ein Effekt von Angiotensin II auf den Hippo-Signalweg nachgewiesen wurde, sollte untersucht werden, ob sich eine Veränderung im Phosphorylierungslevel und im Gesamtproteinlevel von YAP nachweisen lässt.



#### **Abbildung 26: pYAP / Total YAP-Proteinlevel nach 48h Angiotensin II Stimulation**

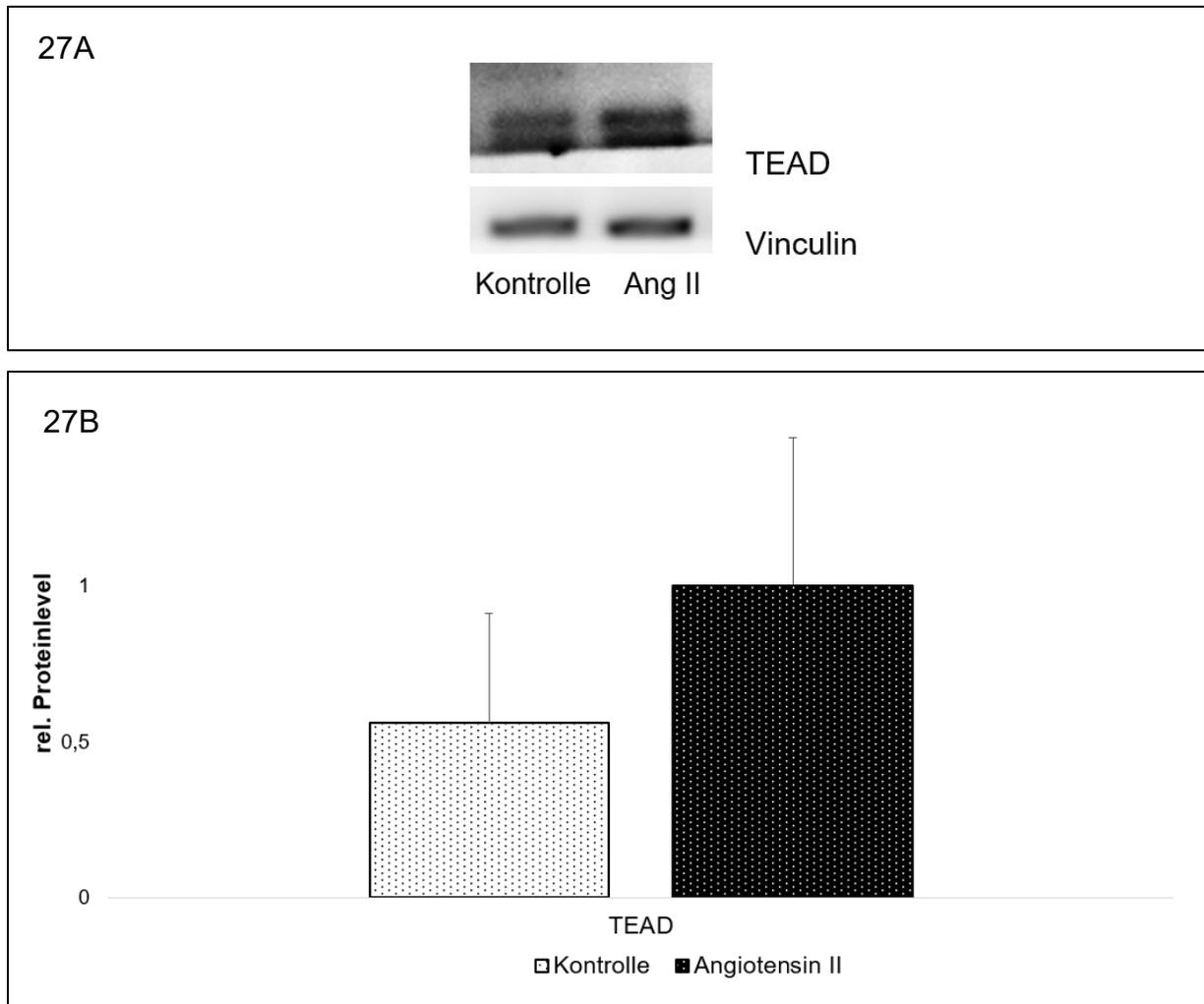
Dargestellt sind repräsentative Westernblots in 26A von pYAP und Total YAP mit der Referenz Vinculin von einer Lösungsmittelkontrolle und nach 48h 1µM Angiotensin II Stimulation. 26B zeigt das Proteinlevel von pYAP bzw. Gesamt-YAP jeweils relativ zu Vinculin. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Passagen. Die Signifikanz zwischen 2 Gruppen wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

Die Stimulation mit 1 µM Angiotensin II führte zu einer signifikanten Reduktion des pYAP Proteinlevels (Kontrolle  $1,00 \pm 0,26$ ; Ang II  $0,53 \pm 0,16$   $p = 0,006$ ) und keinem signifikanten Unterschied im Gesamt-YAP (Kontrolle  $1,00 \pm 0,26$ ; Ang II  $0,79 \pm 0,34$   $p = 0,43$ ). Es zeigte sich somit eine Verschiebung von pYAP zu unpYAP.

## Ergebnisse

### TEAD Proteinlevel nach 48h Angiotensin II Stimulation

Nachdem ein Effekt von Angiotensin II auf den Hippo-Signalweg nachgewiesen wurde, sollte untersucht werden, ob sich eine Veränderung im TEAD Proteinlevel nachweisen lässt.



#### **Abbildung 27: TEAD-Proteinlevel nach 48h Angiotensin II Stimulation**

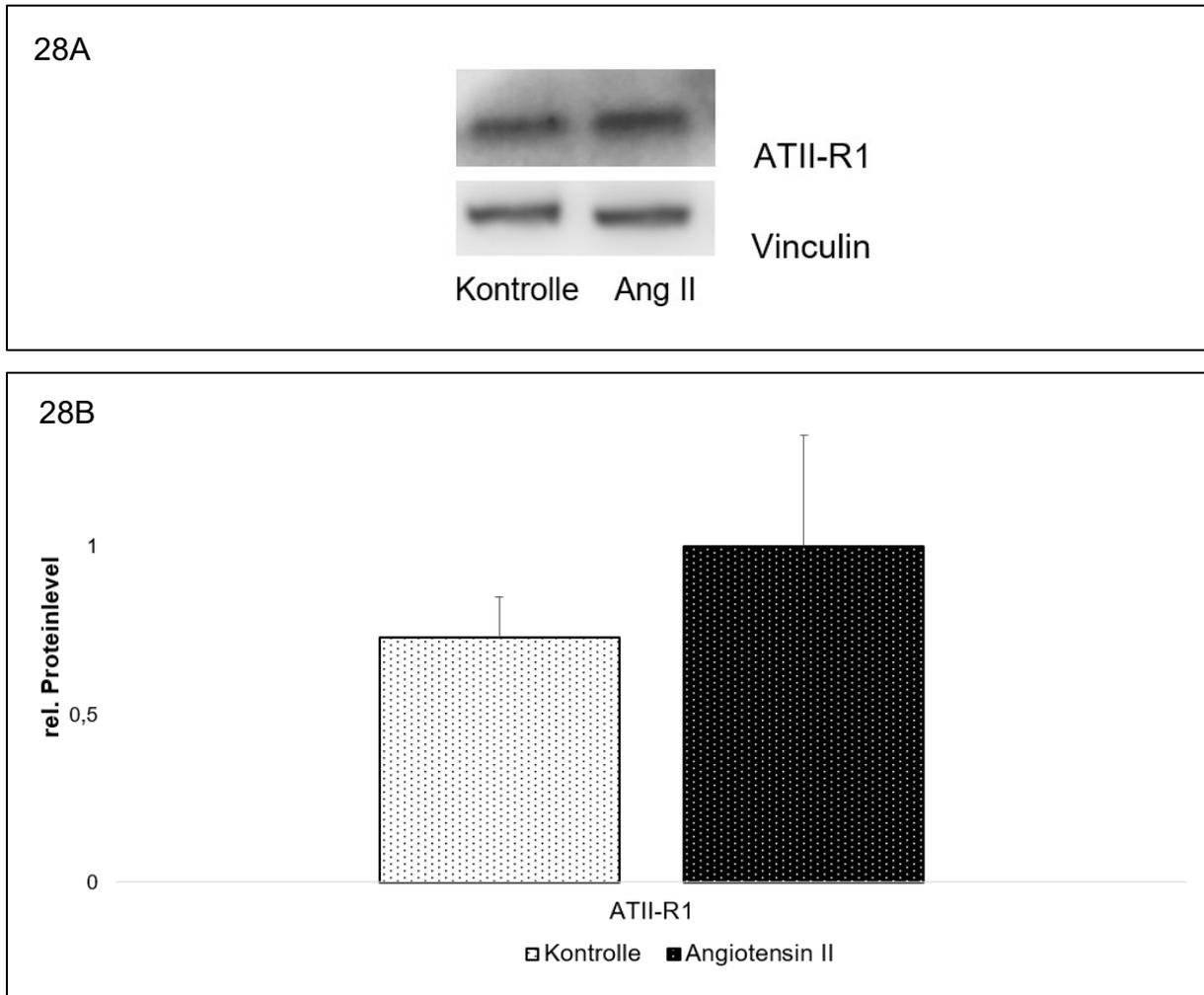
Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblots in 27A von TEAD mit der Referenz Vinculin von einer Lösungsmittelkontrolle und nach 48h 1 $\mu$ M Angiotensin II Stimulation. 27B zeigt das Proteinlevel von TEAD relativ zu Vinculin. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Passagen. Die Signifikanz zwischen 2 Gruppen wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

Die Behandlung mit 1  $\mu$ M Angiotensin über 48h zeigte tendenziell eine Steigerung des TEAD Proteinlevels auf hiPSC abgeleitete Kardiomyozyten am Differenzierungstag 28 (Kontrolle  $0,56 \pm 0,35$ ; Ang II  $1,00 \pm 0,47$   $p = 0,092$ ).

## Ergebnisse

### ATII-R1 Proteinlevel nach 48h Angiotensin II Stimulation

Nachdem ein Effekt von Angiotensin II auf die ATII-R1 Expression nachgewiesen wurde, sollte dieses Ergebnis im ATII-R1 Proteinlevel nachvollzogen werden.



#### **Abbildung 28: ATII-R1-Proteinlevel nach 48h Angiotensin II Stimulation**

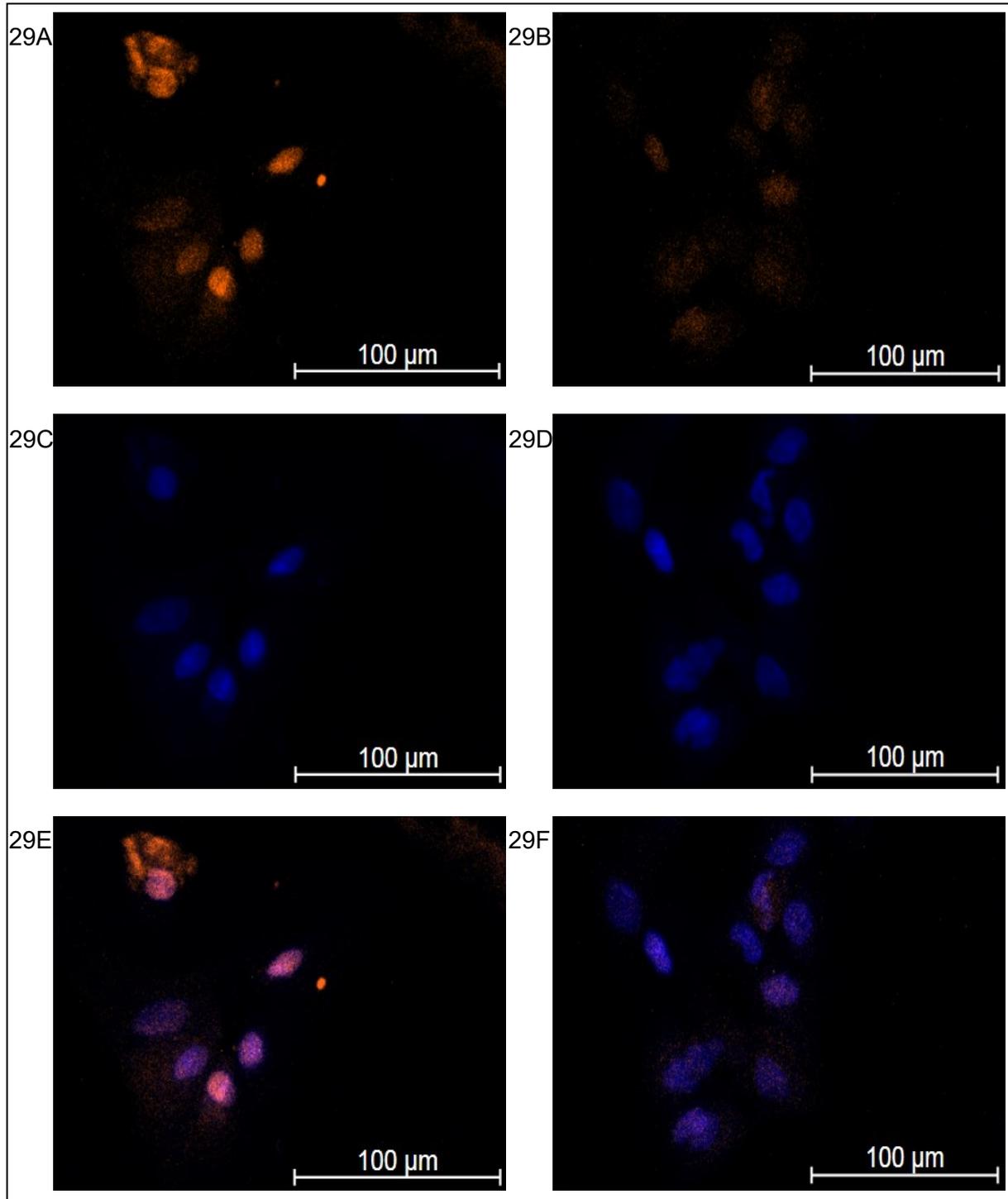
Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblots in 28A vom Angiotensin II Rezeptor Typ 1 mit der Referenz Vinculin von einer Lösungsmittelkontrolle und nach 48h 1 $\mu$ M Angiotensin II Stimulation. 28B zeigt das Proteinlevel des ATII-R1 relativ zu Vinculin. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen und mindestens 3 Passagen. Die Signifikanz zwischen 2 Gruppen wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

Die Behandlung mit 1  $\mu$ M Angiotensin über 48h zeigte tendenziell eine Steigerung des Angiotensin II Rezeptor Typ 1 Proteinlevels auf hiPSC abgeleitete Kardiomyozyten am Differenzierungstag 28 (Kontrolle  $0,73 \pm 0,12$ ; Ang II  $1,00 \pm 0,33$   $p = 0,083$ ).

## Ergebnisse

### 5.3.3 Immunfluoreszenz der YAP Translokation

Abbildung 26 veranschaulichte eine Verschiebung von pYAP zu unYAP in der Proteinanalyse. Dieser Effekt sollte qualitativ mithilfe der Immunfluoreszenz gezeigt werden. Nach 20min Stimulation mit 10  $\mu$ M Angiotensin II zeigte sich übereinstimmend eine zunehmende Anreicherung von unYAP im Nukleus.



**Abbildung 29: Immunfluoreszenz der YAP Translokation nach 20min Angiotensin II Stimulation**

Dargestellt sind die folgenden Strukturen unter einem 40x Objektiv

linke Reihe: nach 20 min Stimulation mit 10  $\mu$ M Ang II

rechte Reihe: nach 20 min H<sub>2</sub>O Kontrolle

links: 29A: unYAP; 29C: Zellkern; 29E: unYAP+Zellkern

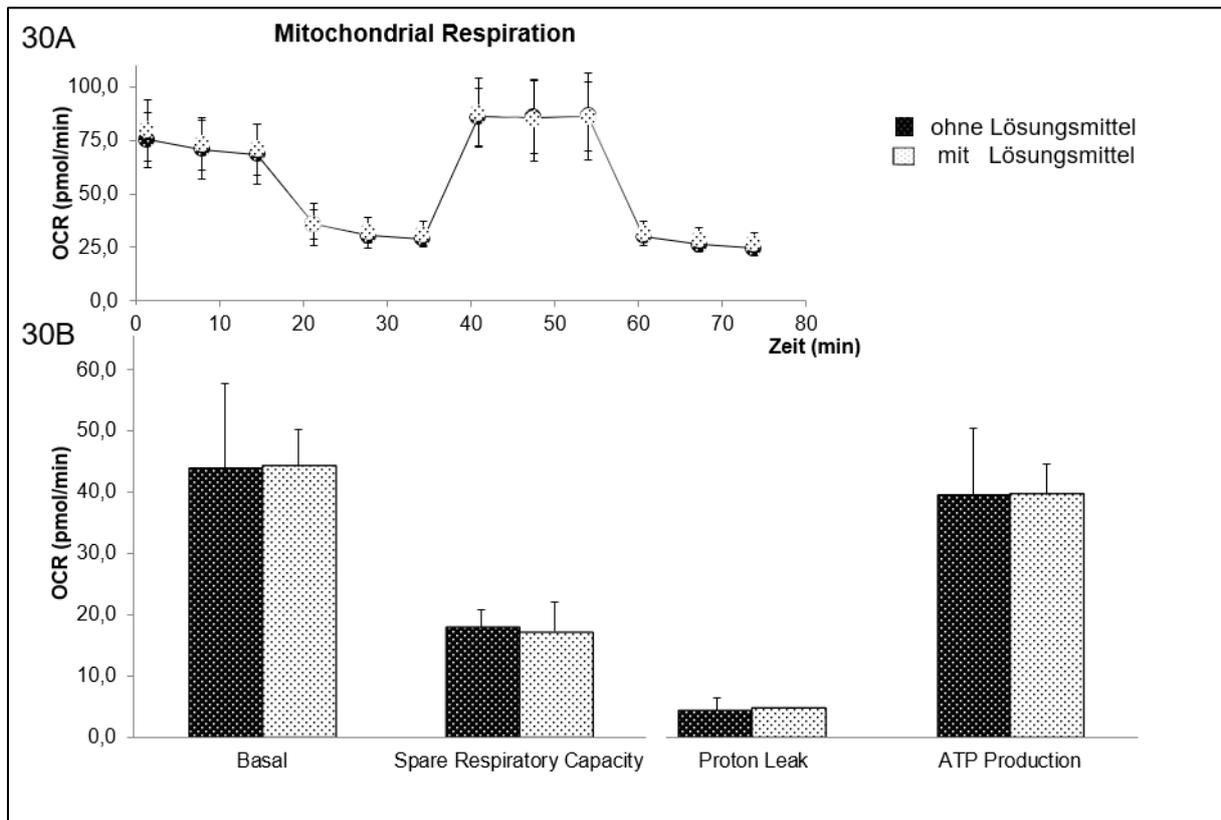
rechts: 29B: unYAP; 29D: Zellkern; 29F unYAP+Zellkern

## Ergebnisse

### 5.3.4 Messung der Mitochondrienfunktion

#### Lösungsmittelkontrolle

Im folgenden Experiment sollten die mitochondrialen Effekte von angiotensinergen Substanzen ermittelt werden. Im ersten Schritt wurde dabei zunächst das Lösungsmittel untersucht, um mögliche falsch positive Effekte durch das Lösungsmittel selbst auszuschließen.



#### **Abbildung 30: Mitochondrienfunktion nach Lösungsmittel Stimulation**

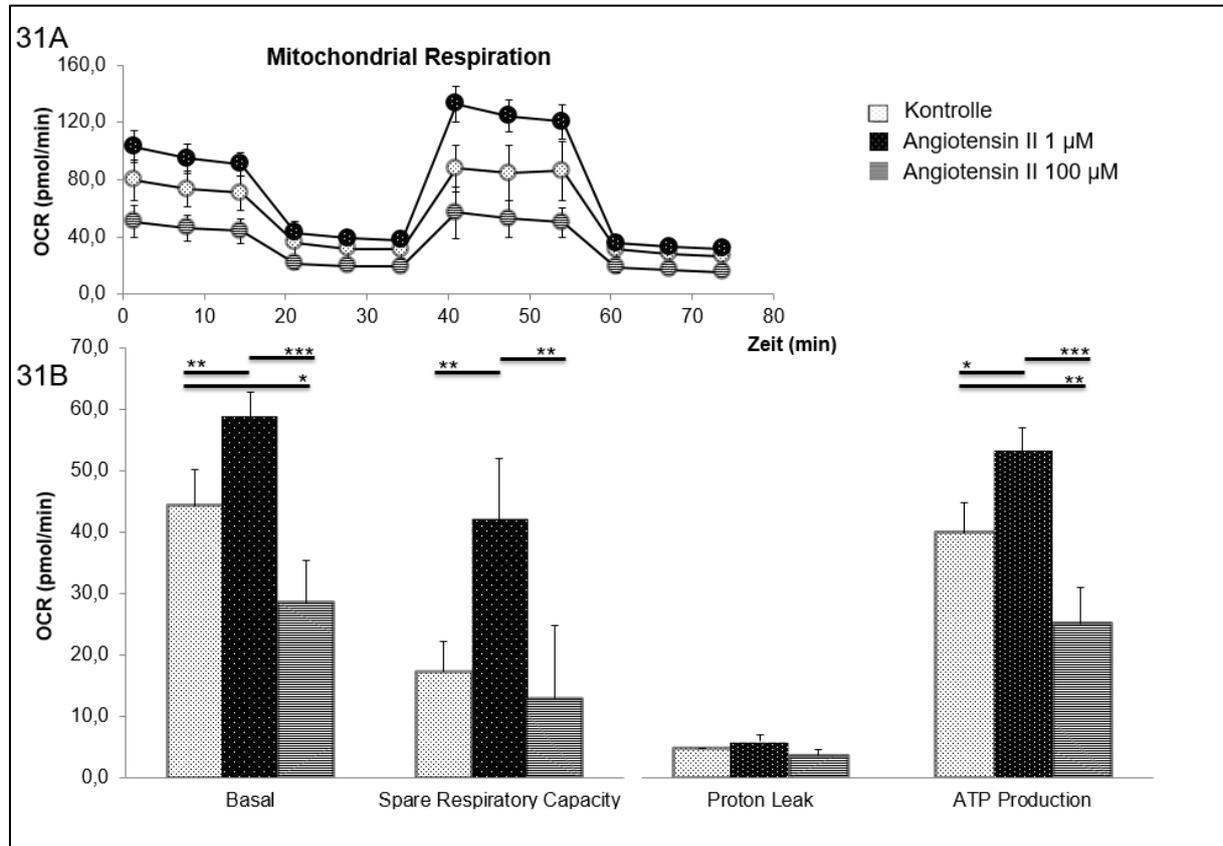
Dargestellt ist in 30A der Sauerstoffverbrauch (OCR) über die Zeit während des Mito-Stresstests. 30B zeigt den basalen mitochondrialen Sauerstoffverbrauch, die Spare Respiratory Capacity, den Protonleak und die ATP Produktion ohne Lösungsmittel und nach Stimulation mit  $1\mu\text{M}$  Lösungsmittel DMSO. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen eines Stresstests. Zur Verifizierung wurden mindestens 3 unabhängige Stresstests durchgeführt. Die Signifikanz zwischen 2 Gruppen wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit  $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ ;  $***p<0,001$  gekennzeichnet.

Durch das Lösungsmittel konnte kein signifikanter Effekt auf die Mitochondrienfunktion ausgelöst werden. Der basale Sauerstoffverbrauch (ohne LM  $43,9\pm 12,3$  mit LM  $44,3\pm 5,6$ ;  $p=0,96$ ), die Spare Respiratory Capacity, der Protonleak sowie die ATP-Produktion (ohne LM  $39,5\pm 10,3$  mit LM  $39,6\pm 4,8$ ;  $p=0,99$ ) unterschieden sich im Mito-Stresstest nicht signifikant voneinander. Nachfolgend ermittelte Effekte sind somit nicht durch das Lösungsmittel bedingt.

## Ergebnisse

### Verschiedene Konzentrationen von Angiotensin II

Im zweiten Schritt wurden verschiedene Konzentrationen von Angiotensin II (1  $\mu\text{M}$  / 100  $\mu\text{M}$ ) im Mito-Stresstest untersucht.



#### Abbildung 31: Mitochondrienfunktion nach verschiedenen Konzentrationen angiotensinergener Stimuli

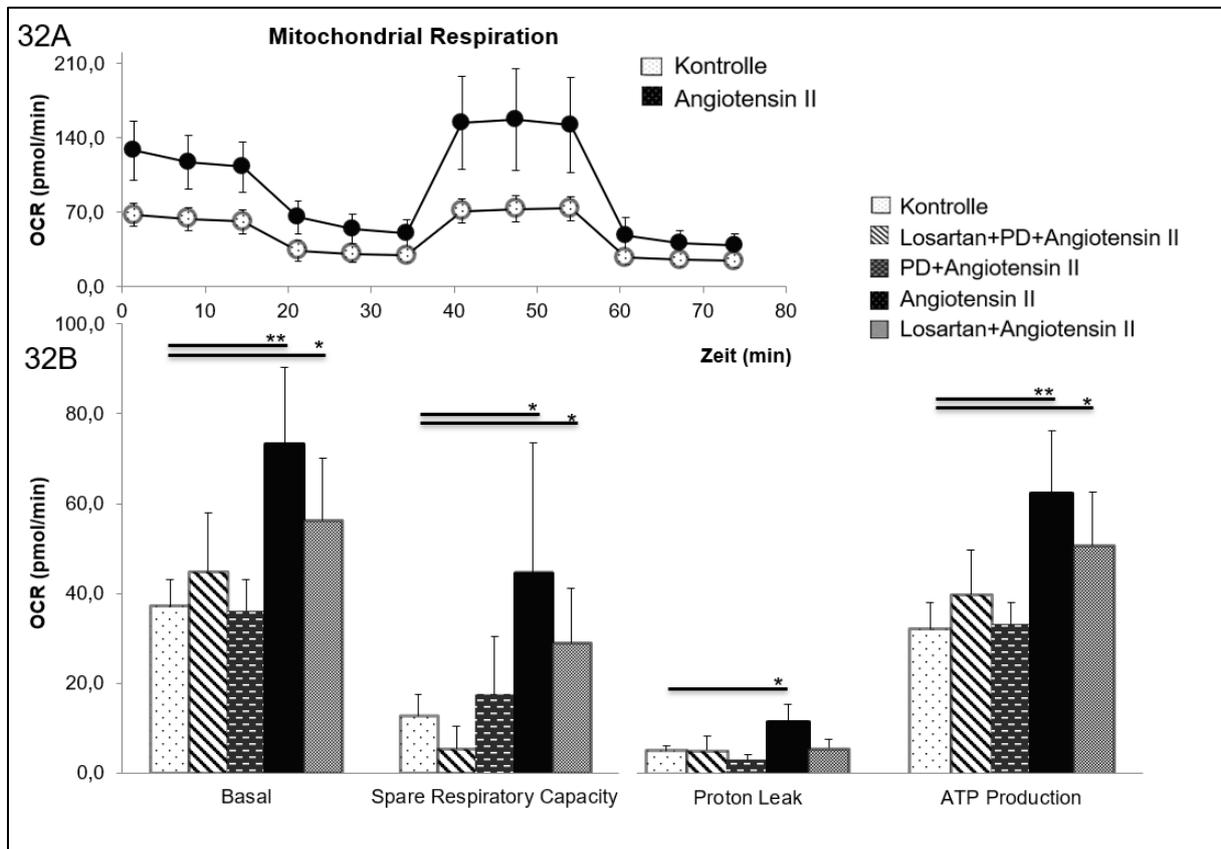
Dargestellt ist in 31A der Sauerstoffverbrauch (OCR) über die Zeit während des Mito-Stresstests. 31B zeigt den basalen mitochondrialen Sauerstoffverbrauch, die Spare Respiratory Capacity, den Protonleak und die ATP Produktion unter  $\text{H}_2\text{O}$  (Kontrolle); 1  $\mu\text{M}$  Ang II und 100  $\mu\text{M}$  Ang II Stimulation. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen eines Stresstests. Zur Verifizierung wurden mindestens 3 unabhängige Stresstests durchgeführt. Die Signifikanz zwischen 2 Gruppen wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

Das Ergebnis des Mito-Stresstests zeigte eine Konzentrationsabhängigkeit der Mitochondrienfunktion von Angiotensin II. Während die niedrige Konzentration Ang II den basalen Sauerstoffverbrauch (Kontrolle  $44,3 \pm 5,6$ ; 1  $\mu\text{M}$  Ang II  $58,8 \pm 3,9$   $p = 0,005$ ), die Spare Respiratory Capacity und die ATP Produktion signifikant steigerte, zeigte die höhere Konzentration gegenteilige Effekte (Basal Respiration: Kontrolle  $44,3 \pm 5,6$ ; 100  $\mu\text{M}$  Ang II  $28,4 \pm 6,9$   $p = 0,019$ ). Die beiden Konzentrationen von Angiotensin II, 1  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ , unterschieden sich zudem signifikant im basalen Sauerstoffverbrauch (1  $\mu\text{M}$  Ang II  $58,8 \pm 3,9$ ; 100  $\mu\text{M}$  Ang II  $28,4 \pm 6,9$   $p < 0,001$ ), der Spare Respiratory Capacity (1  $\mu\text{M}$  Ang II  $42,0 \pm 9,9$ ; 100  $\mu\text{M}$  Ang II  $12,8 \pm 11,7$   $p = 0,002$ ) und der ATP Produktion (1  $\mu\text{M}$  Ang II  $52,9 \pm 4,0$ ; 100  $\mu\text{M}$  Ang II  $24,9 \pm 5,5$   $p < 0,001$ ).

## Ergebnisse

### Kombination Angiotensin II und ATII-Rezeptorblocker

Zuletzt wurden Kombinationen von Angiotensin II und selektiven Rezeptorblockern im Mito-Stresstest untersucht, um spezifische Rezeptoreffekte zu untersuchen.



#### Abbildung 32: Mitochondrienfunktion nach verschiedenen Kombinationen angiotensinerger Stimuli

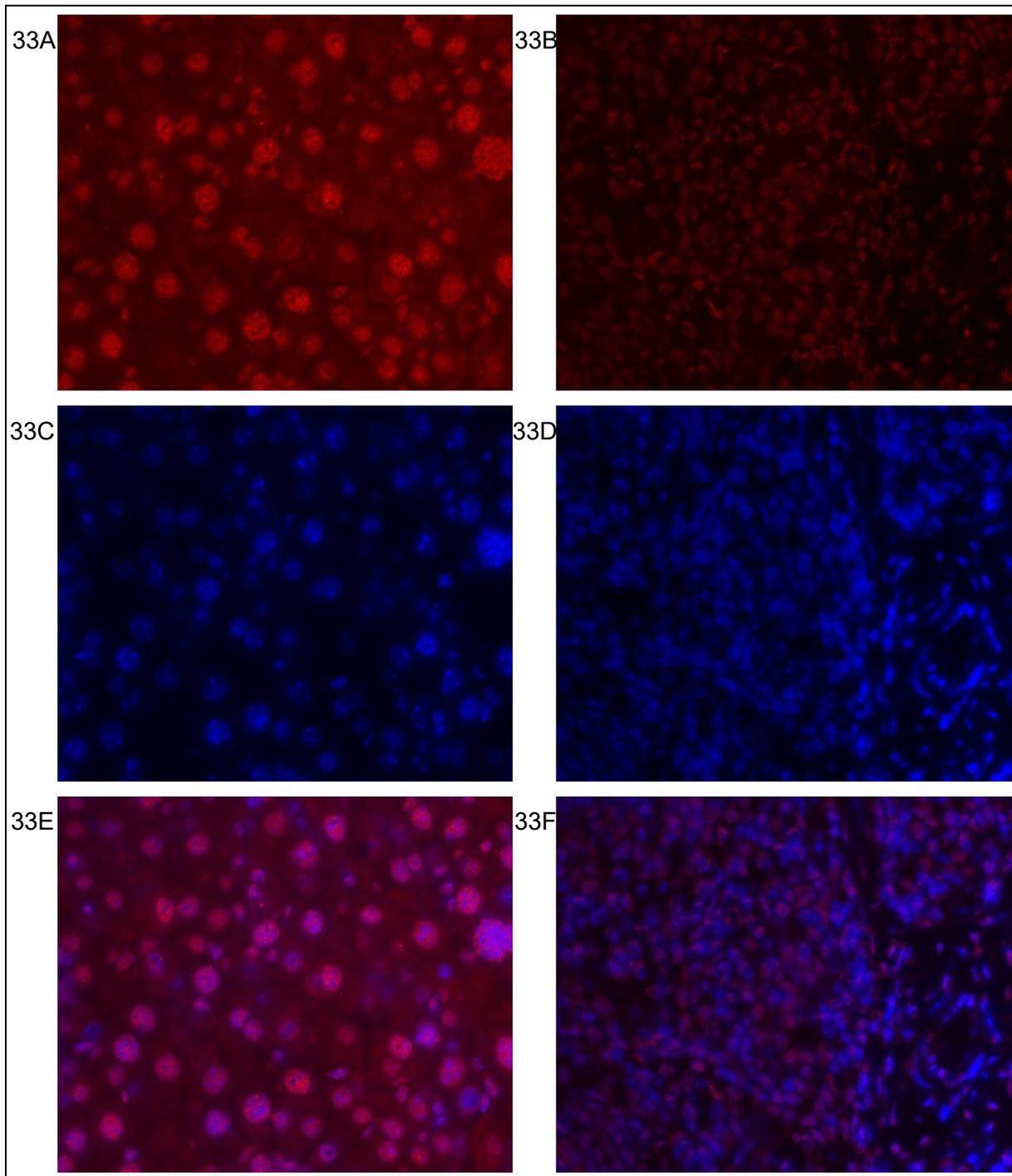
Dargestellt ist in 32A der Sauerstoffverbrauch (OCR) über die Zeit während des Mito-Stresstests. 32B zeigt den basalen mitochondrialen Sauerstoffverbrauch, die Spare Respiratory Capacity, den Protonleak und die ATP Produktion unter H<sub>2</sub>O (Kontrolle); 1  $\mu$ M Ang II; 1  $\mu$ M ATII-R1 Blocker Losartan; 1  $\mu$ M ATII-R2 Blocker PD123319 (PD) Stimulation, welche verschieden kombiniert wurden. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen eines Stresstests. Zur Verifizierung wurden mindestens 3 unabhängige Stresstests durchgeführt. Die Signifikanz zwischen 2 Gruppen wurde mit dem von Sigmaplot vorgeschlagenen Test überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

Die Stimulation durch Angiotensin II (schwarzer Balken) steigerte signifikant den basalen Sauerstoffverbrauch (Kontrolle  $37,0 \pm 5,6$ ; Ang II  $73,3 \pm 15,4$   $p = 0,002$ ), die Spare Respiratory Capacity, den Protonleak und die ATP Produktion im Vergleich zur Kontrolle (weiß gepunktet). Die Kombination aus Losartan und Angiotensin II (grau gepunktet) aktivierte selektiv das ATII-R2 Signal und zeigte ebenfalls einen signifikanten Anstieg von mehreren Parametern (Basal Respiration: Kontrolle  $37,0 \pm 5,6$ ; Losartan + Ang II  $56,2 \pm 12,5$   $p = 0,031$ ). Das isolierte ATII-R1 Signal („Backsteinmuster“) zeigte diese Effekte nicht (Basal Respiration: Kontrolle  $37,0 \pm 5,6$ ; PD123319 + Ang II  $36,1 \pm 6,7$   $p = 0,827$ ). Beide ATII-Rezeptorblocker konnten die Angiotensin II Wirkung effektiv zurückhalten (graugestrichelter Balken), da sich hier kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle zeigte.

#### 5.4 In-vivo Mausexperiment

##### *In-vivo Nachweis von YAP in murinen Leber- und Milzgewebe*

Im folgenden Experiment sollte der Transkriptionsfaktor YAP mittels Immunhistochemiemikroskopie in murinen Leber- und Milzgewebe untersucht werden. Hier konnte jeweils YAP im Nukleus und im Zytoplasma detektiert werden.



**Abbildung 33: Immunhistochemie von murinen Leber- und Milzgewebe**

*Dargestellt sind die folgenden Strukturen unter einem 10x Objektiv*

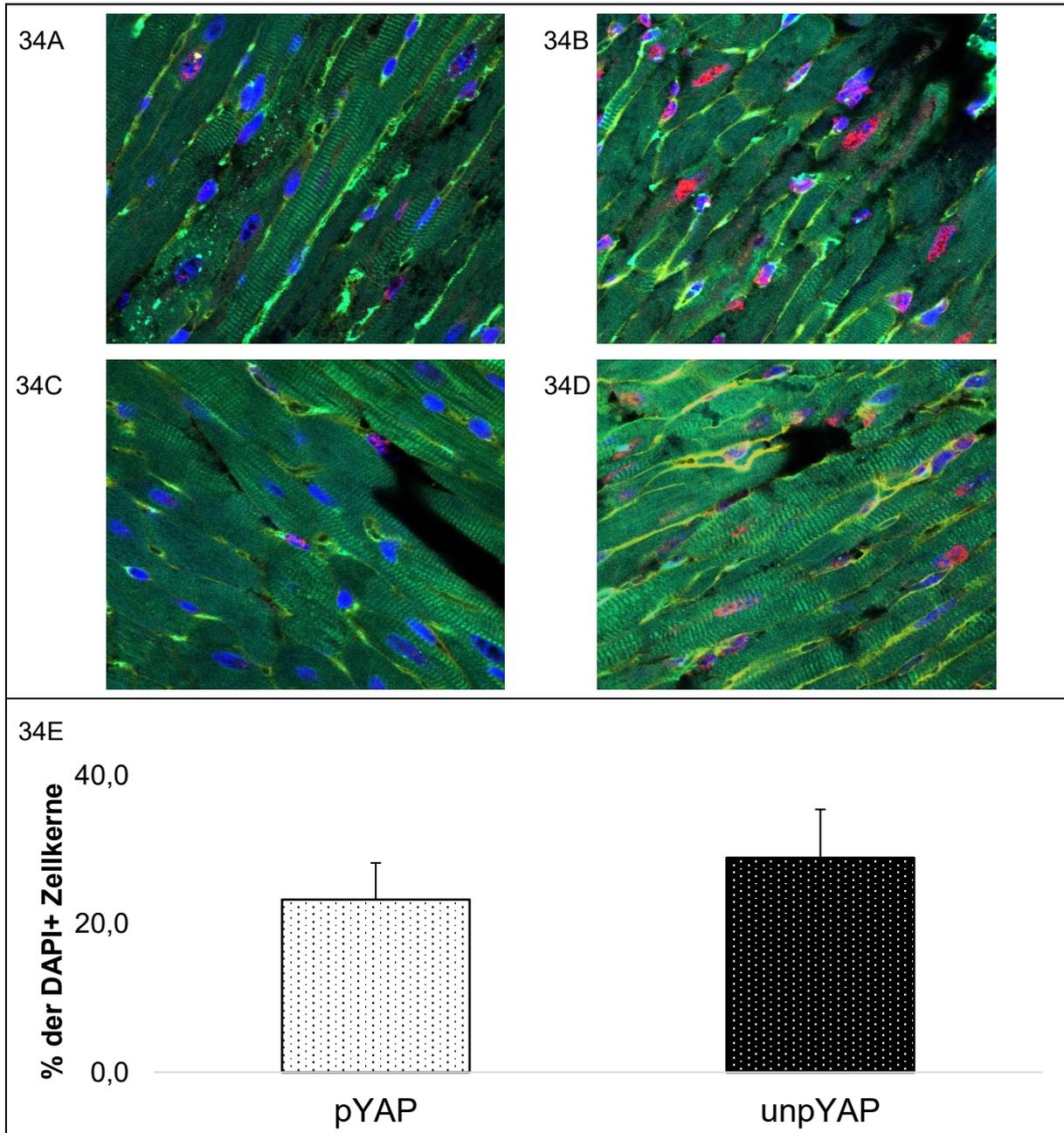
*linke Reihe murines Lebergewebe: 33A: YAP; 33C: Zellkern; 33E: YAP+Zellkern*

*rechte Reihe murines Milzgewebe: 33B: YAP; 33D: Zellkern; 33F: YAP+Zellkern*

## Ergebnisse

### *In-vivo* Nachweis von YAP in murinen Herzgewebe

Im folgenden Experiment wurde die aktive Form (unpYAP) und die inaktive Form (pYAP) mittels Immunhistochemiemikroskopie in Herzgeweben untersucht. UnpYAP ( $28,9\% \pm 6,5$ ) zeigte tendenziell häufiger ein nukleäres Signal als pYAP ( $23,3\% \pm 4,9$ ;  $p=0,06$ ). Es konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp-Maus und Überexpression-Maus gefunden werden.



#### **Abbildung 34: Immunhistochemie von murinen Herzgewebe**

Dargestellt sind die folgenden Strukturen unter einem 40x Objektiv

34A: pYAP (rot) + kardiales Troponin C (grün) + Zellkern (blau) + Zellmembran (gelb)

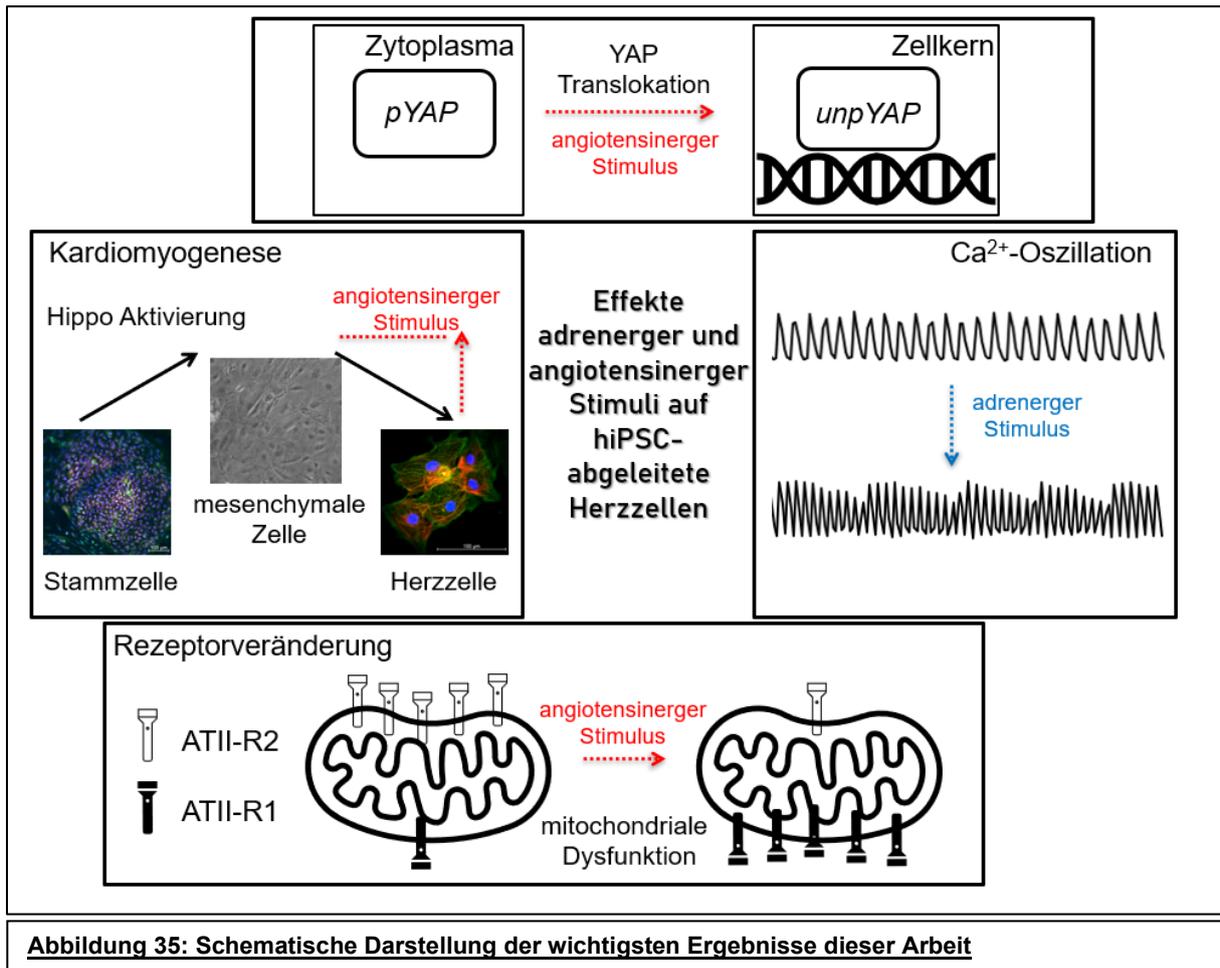
34B: unpYAP (rot) + kardiales Troponin C (grün) + Zellkern (blau) + Zellmembran (gelb)

34C: pYAP (rot) + kardiales Troponin C (grün) + Zellkern (blau) + Zellmembran (gelb)

34D: unpYAP (rot) + kardiales Troponin C (grün) + Zellkern (blau) + Zellmembran (gelb)

34E zeigt das Verhältnis pYAP / unpYAP positiver Zellkerne zu allen detektierten Zellkernen. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von unabhängigen Gruppen von 10 Mäusen. Die Signifikanz wurde mit Sigmaplot überprüft und mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gekennzeichnet.

5.5 Zusammenfassung der wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit



Die wichtigsten Ergebnisse dieser Dissertation sind noch einmal in Abbildung 35 zusammengefasst. Neben der erfolgreich nachgewiesenen Differenzierung und Kardiomyogenese der hiPSC, konnte der Hippo-Signalweg während der Differenzierung charakterisiert werden. Es zeigte sich ein Anstieg der Expression ausgewählter Hippo-Faktoren während der Differenzierung der Stammzelle zur mesodermalen Herzvorläuferzelle. Im weiteren Verlauf der Kardiomyogenese kam es zum Abfall der Expression dieser Hippo-Komponenten. Aus diesen Resultaten konnte das erhöhte Proliferationspotential der Herzvorläuferzellen und das eingeschränkte Proliferationspotential der differenzierten Herzzelle abgeleitet werden. Die Stimulation mit Angiotensin II zeigte eine signifikante Steigerung der Expression ausgewählter Hippo Komponenten in diesen Herzzellen. Es kam zur direkten Beeinflussung des Hippo-Signalwegs durch Angiotensin II.

## Ergebnisse

Daraus ließ sich ableiten, dass Angiotensin II, Hippo-Signalweg abhängige Effekte auslöst, wie z.B. Proliferations- und Wachstumsreize. Womöglich ist das kardiale Remodeling, welches mit Angiotensin II assoziiert ist, ebenfalls mit dem Hippo-Signalweg verknüpft.

Der direkte Zusammenhang zwischen dem kardialen Risikofaktor Angiotensin II und dem Hippo-Signalweg konnte ebenfalls durch eine verstärkte nukleäre YAP Translokation nach Stimulation mit Ang II nachgewiesen werden. Weiterhin konnte die Mitochondrienfunktion der hiPSC abgeleiteten Herzzellen durch angiotensinerge Stimuli beeinflusst werden. Hieraus ging hervor, dass positive Effekte über den ATII-R2 und negative Effekte über den ATII-R1 vermittelt werden. Außerdem wurde die These aufgestellt, dass die mitochondriale Dysfunktion, welche in kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet wird und mit dem Prozess des Remodelings verknüpft ist, mit dem Verlust mitochondrialer ATII-R2 und dem Überwiegen des ATII-R1 Signals einhergeht. Die adrenerge Stimulation der hiPSC abgeleiteten Herzzellen zeigte Effekte, welche mit in-vivo Erfahrungen übereinstimmen. Die Beeinflussung durch Adrenalin und Dobutamin rief positiv inotrope und positiv chronotrope Effekte in den Kardiomyozyten hervor, während die Betablocker Propranolol und Atenolol negativ inotrope und negativ chronotrope Auswirkungen verursachten.

Schließlich konnte der zentrale Transkriptionsfaktor YAP des Hippo-Signalwegs auch in-vivo in murinen Leber-, Milz- und Herzgewebe nachgewiesen werden. Es zeigte sich tendenziell häufiger ein nukleäres Signal bei der aktiven YAP Form als bei der inaktiven-phosphorylierten Form, wobei keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Überexpressionsmaus detektiert wurden.

### **6 Diskussion**

Ein Teil der Ergebnisse aus dieser Dissertation wurde im Journal: "Basic Research in Cardiology" publiziert (Bekhite et al. 2020). Weitere Resultate dieser Arbeit wurden in Form von Abstracts auf der 86. Jahrestagung 2020 und der 87. Jahrestagung 2021 der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim veröffentlicht (Menz et al. 2020, Menz et al. 2021).

In der Diskussion sollen die Zielstellungen dieser Dissertation systematisch beantwortet und die Ergebnisse mit der aktuellen Studienlage verglichen werden.

#### **6.1 Kultivierung der hiPSC und Differenzierung zu Kardiomyozyten**

Die humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC), welche in diesem Projekt verwendet wurden, stammen von Herrn Boris Greber aus dem Max-Planck-Institut Münster und wurden dort mithilfe eines Sendai-Virus Reprogramming-Kits aus Hautfibroblasten generiert (Zhang et al. 2014, Peischard et al. 2017). Zunächst soll die Methode der Stammzellgewinnung, deren Alternativen und der Hauptkritikpunkt der hiPSC Methode diskutiert werden. Die hiPSC stellen eine mögliche Methode der Forschung mit Stammzellen dar. Mögliche Alternativen wären u.a. die Entnahme von embryonalen Stammzellen, von adulten Stammzellen oder die Generierung von Kerntransfer-Stammzellen (Liu et al. 2020). Die Entnahme von embryonalen Stammzellen aus einer befruchteten Eizelle bzw. Folgestadien wird ethisch kontrovers diskutiert, da dies gleichbedeutend mit einer Abtreibung gesehen werden kann. Außerdem ist das gewonnene Gewebe nicht genetisch identisch mit dem Spender und damit immunogen bei autologer Verwendung (Liu et al. 2020). Die Entnahme von adulten Stammzellen erfordert eine invasive Gewinnung, da die Quellen hierfür u.a. im Gehirn oder Rückenmark liegen. Des Weiteren zeigen die Zellen Probleme in ihrer Pluripotenz, somit ist die Differenzierung in andere Keimblätter erschwert (Liu et al. 2020). Eine weitere Methode ist die Generierung einer Kerntransfer-Stammzelle, welche aus der Fusion einer kernfreien Eizelle und einer somatischen Zelle erzeugt wird. Diese Methode ist gleichzusetzen mit dem Prozess des Klonens und wurde beim Schaf Dolly im Jahr 1996 erstmalig gezeigt (Campbell et al. 1996). Es können lebende Organismen erzeugt werden, was neben zu diskutierenden ethischen Fragen auch das Problem des möglichen Missbrauchs aufwirft. Außerdem erfordert die Methode ein enorm hohen technologischen und finanziellen Aufwand (Liu et al. 2020).

## Diskussion

Die Nutzung von hiPSC ist eine geeignete Alternative zu den oben beschriebenen Methoden, da die Entnahme von Hautfibroblasten oder von Zellen aus Blut oder Urin ein wenig invasiver Eingriff ist (Jiang et al. 2018), jeder Typ von Gewebe erzeugt werden kann, bei autologer Transplantation keine Immunantwort zu erwarten und es ethisch weniger kontrovers ist. Es findet dabei kein Klonungsprozess über die Entstehung eines lebenden Organismus statt, da nur ein Gewebe erzeugt wird (Liu et al. 2020). Aufgrund dieser beschriebenen Vorteile und eines bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Differenzierungsprotokolls wurden die hiPSC als grundlegende Methode für die Forschung an Stammzellen und davon abgeleiteten Herzzellen in dieser Dissertation genutzt.

Die Erzeugung von iPSC wurde erstmalig von Shinya Yamanaka durch 4 notwendige Reprogrammierungsfaktoren beschrieben (Takahashi und Yamanaka 2006). Diese Faktoren werden entweder über genetisch nicht integrierende Vektoren oder über genetisch integrierenden Vektoren in die Wirtszelle gebracht (Singh et al. 2015). Die Integration von Fremdgenen in das Genom und die damit verbundenen genetischen Modifikationen stellen den Hauptkritikpunkt an der hiPSC Methode dar (Liu et al. 2020). In dieser Arbeit wurden jedoch hiPSC verwendet, welche mithilfe eines Sendai-Virus erzeugt wurden, welcher zur Gruppe, der nicht genetisch integrierenden Vektoren gehört. Der Sendai-Virus zeigt kein Risiko der Veränderung des Wirtsgenoms, ist leicht durch Antikörper-vermittelte negative Selektion zu entfernen und stellt somit eine effiziente und sichere Methode der Generierung von hiPSC dar (Fusaki et al. 2009). Mithilfe des Sendai-Virus konnte der methodisch-beschriebene Nachteil und Hauptkritikpunkt an der hiPSC Methode umgangen werden.

Die Ergebnisse dieses Projekts, welche in den Abbildungen 6, 9 und 13 dargestellt sind, zeigten die tatsächliche Verwendung von Stammzellen anhand Stammzellmarker am Differenzierungstag 0 an. Weiterhin konnte die erfolgreiche Kardiomyogenese anhand mesodermaler und kardialer Marker an den folgenden Differenzierungstagen in den Abbildungen 6, 10 und 14 nachgewiesen werden. Als Stammzellmarker wurden die „Yamanaka-Faktoren“: Oct-4 und SOX2 und ein weiterer Stammzellmarker Nanog in Expression-, Proteinanalysen und mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (Takahashi und Yamanaka 2006, Zhang et al. 2014). Die gesteigerte Expression der Marker Brachyury und Gata4 zeigten die erfolgreiche Selektion von mesodermalen Zellen aus den hiPSC an und ermöglichten die Entwicklung von Herzvorläuferzellen an den folgenden Differenzierungstagen (Stennard et al. 2003). Die erfolgreiche

## Diskussion

Kardiomyogenese konnte durch die herzspezifischen Strukturproteine  $\alpha$ -Actinin und MLC2v über Immunfluoreszenz und die Expression von MHC7 am Tag 28 nachgewiesen werden (Schmidt et al. 2010). Da die Ergebnisse anhand von Expressionsanalysen, Proteinanalyse und Immunfluoreszenz-Messungen in drei voneinander unabhängigen Methoden nachgewiesen wurden und zu kohärenten Resultaten führten, liegt eine hohe statistische Sicherheit vor, dass tatsächlich humane induzierte Stammzellen verwendet wurden und diese in 28 Tagen zu Herzzellen differenziert wurden. Das Kontrahieren der Herzzelle stellt einen weiteren Beweis der erfolgreichen Differenzierung dar, konnte hier jedoch nicht in Schriftform gezeigt werden. Der Nachweis des HCN4-Kanals in Abbildung 10 als „Taktgeber für die elektrische Automatie“ ab Tag 14 beweist indirekt das Vorhandensein von autonomen Kontraktionen (Schmidt et al. 2010).

Die Differenzierungsanalyse der hiPSC abgeleiteten Herzzellen unserer Arbeitsgruppe zeigte, dass über 90% der hiPSC mit dem Differenzierungsprotokoll zu Kardiomyozyten differenzieren (Bekhite et al. 2020). Diese hohe Reinheit erfordert eine sterile Arbeit, einen erheblichen zeitlichen Aufwand und die exakte Befolgung des Differenzierungsprotokolls. Eine komplette Differenzierung der hiPSC zu Herzzellen bedarf etwa einen Zeitaufwand von 2 Monaten. Anschließend erfolgen die eigentlichen Messungen und Stimulationsexperimente. Dabei muss beachtet werden, dass bis zum Wechsel aufs kardiale Medium, also etwa der erste Monat, kein Antibiotikum verwendet wird. Bei bakterieller Kontamination muss die gesamte Arbeit verworfen werden. Man kann aufgrund der Reinheit von über 90% Kardiomyozyten davon ausgehen, dass die nachfolgend beschriebenen Effekte zuverlässig durch die hiPSC abgeleiteten Herzzellen zustande kommen. Rojas et al. erreichten sogar eine Reinheit von über 99% bei murinen iPSC abgeleiteten Herzzellen und zeigten dabei zusätzlich eine erfolgreiche intramyokardiale Transplantation dieser Zellen mit Verbesserung der linksventrikulären Funktion (Rojas et al. 2017). Rojas et al. optimierten das Differenzierungsprotokoll u.a. durch eine genetische Veränderung ihrer murinen iPSC abgeleiteten Herzzellen, um diese hochreine Kultur zu erreichen.

Da die weiteren Zielstellungen dieses Projekts vor allem die Forschung mit physiologischen Stimuli und deren pathomechanistischen Einflüsse auf hiPSC war, wurde von genetischen Modifikationen abgesehen. Die erste Zielstellung des Projekts, ob die Kardiomyogenese der hiPSC gelingt, konnte mit verschiedenen Methoden erfolgreich gezeigt werden und bildete die Grundlage für nachfolgende Experimente.

## Diskussion

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob adrenerge und angiotensinerge Rezeptoren auf den hiPSC abgeleiteten Herzzellen exprimiert sind, welche für nachfolgend geplante Stimulationsuntersuchungen notwendig waren. Die adrenergen und angiotensinerger Rezeptoren konnten in Expressionsanalysen in Abbildung 8 identifiziert werden. Der Angiotensin II Rezeptor Typ 1 konnte zusätzlich auf Proteinebene (Abbildung 12) nachgewiesen und mittels Immunfluoreszenz visualisiert werden (Abbildung 15). Zahlreiche andere Studien konnten an hiPSC abgeleiteten Herzzellen die Einflüsse von adrenerger bzw. angiotensinerger Stimulation untersuchen (Tanaka et al. 2014, Wu et al. 2015, Gao et al. 2020). Wu et al. konnten die Expression adrenerger Rezeptoren ab den Differenzierungstag 12 zeigen (Wu et al. 2015). Gao et al. konnten die Expression des ATII-R1 ab den Differenzierungstag 9 nachweisen (Gao et al. 2020). Interessanterweise konnten Sie jedoch nur eine minimale ATII-R2 Expression in den hiPSC abgeleiteten Herzzellen finden (Gao et al. 2020). Dieses Resultat steht im Gegensatz zu den ermittelten Ergebnissen aus Abbildung 7, in der ein signifikanter Anstieg der ATII-R2 Expression nachgewiesen wurde. Die Differenz ist womöglich durch abweichende Primersequenzen oder über die abweichende Methodik zu erklären. Sedan et al. konnten an humanen embryonal-abgeleiteten Herzzellen über Immunfluoreszenz den ATII-R1 nachweisen (Sedan et al. 2008). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit der Immunfluoreszenz-Untersuchung aus Abbildung 15. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit und der kongruenten Resultate der zitierten Literatur, kann mit hoher Sicherheit angenommen werden, dass adrenerge und angiotensinerge Rezeptoren auf den hiPSC vorhanden sind. Die zweite Zielstellung, der Rezeptornachweis, konnte somit belegt werden und bildete ebenfalls die Grundlage für nachfolgend geplante Stimulationsuntersuchungen.

Grundsätzlich kann die Verwendung von hiPSC in 4 Hauptbereiche eingeteilt werden (Liu et al. 2020). Dazu zählt der Gewebersatz in Form der regenerativen Medizin, die Forschung am Krankheitsmodell, pharmakologische Testungen und letztlich das Nachvollziehen von embryonalen Prozessen des Menschen (Liu et al. 2020). Schätzungen zufolge werden jährlich weltweit zwischen 28 bis 100 Millionen Tiere für medizinische Forschung und Laborexperimente genutzt (Taylor et al. 2008). Die Zahlen sind sehr ungenau, da nur wenige Länder Tiernutzungsstatistiken veröffentlichen (Taylor et al. 2008). Trotz zahlreicher Gesetze und Richtlinien, u.a. der 3-R-Regel: Reduction - Reduktion, Refinement - Schmerzreduktion, Replacement - Ersatz, bleibt der Tierversuch ein kontroverses Thema (Taylor et al. 2008).

Dahingehend stellen die hiPSC eine wertvolle Alternative zu Tierversuchen dar, da sie die Umstände im Menschen mit hoher Zuverlässigkeit simulieren (de Lazaro et al. 2014).

An den in diesem Projekt erzeugten hiPSC abgeleiteten Herzzellen sollten embryonale Prozesse mit Bezug zum Hippo-Signalweg nachvollzogen werden. Zusätzlich sollten die Kardiomyozyten durch Stimulationsuntersuchungen charakterisiert und darüber hinaus Hinweise über das Herzremodeling als Krankheitsmodell gewonnen werden. Dieses Projekt deckte somit 3 der 4 Hauptbereiche der beschriebenen hiPSC Verwendung ab. Lediglich der Gewerbersatz im Bereich der regenerativen Medizin konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht untersucht werden. Rojas et al. zeigten mit der erfolgreichen intramyokardialen Transplantation der Zellen, dass der Gewebeersatz durch iPSC auch möglich ist und mit einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion einhergehen kann (Rojas et al. 2017).

### **6.2 Erkenntnisse über den Hippo-Signalweg**

Anlass zur Untersuchung des Hippo-Signalwegs gab der Aspekt, dass dieser Signalweg mit Proliferationsprozessen in Verbindung gebracht wird (Harvey et al. 2003) und die Erkenntnis, dass reifes Herzgewebe ein begrenztes Regenerationspotential zeigt und daher der Untergang von Herzmuskelgewebe z.B. durch einen Herzinfarkt langfristig zur Herzinsuffizienz führt (Lip et al. 2000, Mia und Singh 2019, Chen et al. 2019). Der Hippo-Signalweg könnte sowohl an der Pathogenese der Herzinsuffizienz involviert sein als auch einen möglichen Behandlungsansatz darstellen. Lin et al. untersuchten die herzspezifische Aktivierung von YAP nach Myokardinfarkt und zeigten damit ein signifikant verbessertes Überleben der Mäuse (Lin et al. 2014). Andererseits zeigen Prognosen, dass die Zahl der Herzinsuffizienzfälle und die damit verbundene Belastung des Gesundheitssystems bis 2030 enorm ansteigen (Heidenreich et al. 2013). Diese Ergebnisse sind beeindruckend und rechtfertigen die weitere Forschung an der Herzinsuffizienz und dessen mögliche Verhinderung durch Beeinflussung des Hippo-Signalwegs.

Der Hippo-Signalweg wird in der Literatur in Beziehung zur Kardiomyogenese und der Entwicklung von Herzerkrankungen gebracht (Mia und Singh 2019). In den Abbildungen 7 und 11 wurden Komponenten des Hippo-Signalwegs während der Kardiomyogenese untersucht. Hier zeigte sich das gesteigerte Proliferationspotential

## Diskussion

in den Herzvorläuferzellen mit einem signifikanten Anstieg zahlreicher Hippo-Komponenten während der ersten Differenzierungsphase. Mit der Herzzellentstehung fielen diese Komponenten wieder signifikant ab. Dieser Verlauf zeigte das wieder abnehmende Proliferationspotential. Die Ergebnisse stimmen mit den Beschreibungen von Mia und Singh überein (Mia und Singh 2019).

In dieser Arbeit wurde ebenfalls die Expression von Hippo-assoziierten Genen CCN1 und CCN2 untersucht. Die Transkription dieser Gene erfolgt durch den YAP-TEAD Komplex (Mia und Singh 2019). In Phasen der Zelldifferenzierung erschienen CCN1 und CCN2 herunterreguliert, in Phasen der Proliferation und Zellteilung hingegen hochreguliert. Ramos und Camargo beschrieben den YAP-TEAD Komplex als proliferativ und stammzellerhaltend. Stammzellerhaltend erklärt die Abschaltung in Phasen der Differenzierung, ersichtlich durch die Herunterregulation von CCN1 und CCN2 und proliferativ wird durch die Expressionssteigerung von CCN1 und CCN2 gezeigt (Ramos und Camargo 2012). Die Zielstellung, wie sich die Hippo-Komponenten während der Kardiomyogenese der hiPSC verhalten, konnte somit erläutert werden. Zusammenfassend zeigte sich ein steigendes Proliferationspotential in den Herzvorläuferzellen und dessen Abnahme mit der Herzzellentstehung.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob der Hippo-Signalweg einen möglichen Behandlungsansatz im Remodelingprozess der Herzinsuffizienz sein kann. Lin et al. zeigten ein signifikant verbessertes Überleben von Mäusen nach Myokardinfarkt durch herzspezifische Aktivierung von YAP (Lin et al. 2014). Xin et al. beschrieben eine verbesserte Regeneration nach Herzinfarkt durch Überaktivierung von YAP im Mausmodell (Xin et al. 2013). Hou et al. zeigten, dass YAP bei Herzinsuffizienz im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht ist (Hou et al. 2017). Es stellt sich aus der Kombination dieser Erkenntnisse heraus, dass die Aktivierung des Hippo-Signalwegs nach einem Akutereignis positive Wirkungen ausübt und das Überleben verbessern kann. Eine chronische Hippo-Aktivierung kann jedoch durch überschießende Proliferation negative Folgen wie z.B. die Ausbildung einer Herzinsuffizienz haben. Die Ergebnisse aus der angiotensinergen Stimulation zeigten eine direkte Aktivierung des Hippo-Signalwegs und geben Anlass, dass der Hippo-Signalweg an der Pathogenese der Herzinsuffizienz beteiligt sind.

Aus diesem Standpunkt lässt sich diskutieren, dass der Hippo-Signalweg einen Behandlungsansatz im Remodelingprozess darstellt. Auf der anderen Seite gilt zu

beachten, dass der Hippo-Signalweg durch Aktivierung von Proliferationsprozessen mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht wird und die eingeleiteten Transkriptionsprogramme teilweise noch unklar sind (Ramos und Camargo 2012). Zusammenfassend lässt sich aus diesem Projekt sagen, dass der Hippo-Signalweg eine interessante Zielstruktur auf der Suche nach Therapien der Herzinsuffizienz darstellt (Lin et al. 2014).

Im Kampf gegen die zunehmende kardiovaskuläre Krankheitslast könnte der Hippo-Signalweg und dessen Modulierung eine entscheidende Rolle gewinnen (Heidenreich et al. 2013). Das Ziel des Projekts war die Klärung der Frage, ob der Hippo-Signalweg ein möglicher Behandlungsansatz im Remodelingprozess sein kann. Dies kann aufgrund der erhobenen Ergebnisse nicht abschließend beantwortet werden. Die zitierte Literatur zeigte bereits hoffnungsvolle Ansätze, letztlich sind weitere Forschungen notwendig, um die Mechanismen der Tumorgenese genauer zu verstehen und um dies klar von den positiven Wirkungen abgrenzen zu können.

### **6.3 Effekte adrenerger Substanzen**

Nachdem die adrenergen Rezeptoren in den Ergebnissen aus Abbildung 8 nachgewiesen wurden, stellte sich die Frage, ob die hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten auf externe adrenerge Stimuli reagieren. Es wurde bereits beschrieben, dass die adrenerge Stimulation die Herzfrequenz (Chronotropie) erhöht und es zur Steigerung der Kontraktionskraft (Inotropie) kommt (Triposkiadis et al. 2009). Die Ergebnisse, welche den Abbildungen 16 und 17 zugrunde liegen, zeigten, dass die hiPSC abgeleiteten Herzzellen positiv chronotrop auf Adrenalin und negativ chronotrop auf den Antagonisten Propranolol reagieren. Dies lässt sich mit den in-vivo zu erwartenden Effekten vereinbaren. Sowohl nach 3 Stunden als auch nach 24 Stunden, konnte eine signifikante Steigerung der Herzfrequenz von in Ruhe ca. 65 Kontraktionen/min auf über 160 Kontraktionen/min unter Adrenalineinfluss gezeigt werden. Propranolol löste den gegenteiligen Effekt aus, indem es die Herzfrequenz auf unter 45 Kontraktionen/min reduzierte. Interessanterweise zeigte sich die Variabilität der Kontraktionsfrequenz unter adrenergen Stimuli nur bei adulten hiPSC Herzzellen am Differenzierungstag 28, nicht jedoch bei jungen Herzzellen am Tag 9.

Dieses Ergebnis deckt sich mit der Aussage, die mithilfe von Abbildung 8 getroffen wurde. Hieraus konnte die fehlende Expression des  $\beta$ 1-AR am Differenzierungstag 9 abgeleitet werden. Auf den jungen hiPSC Herzzellen fehlt der  $\beta$ 1-Adrenorezeptor,

## Diskussion

welcher für die chronotropen Effekte der adrenergen Stimuli verantwortlich ist. Unsere Arbeitsgruppe beschrieb bereits ausführlich den Reifungsprozess während der Kardiomyogenese der hiPSC. Die fehlende Herzfrequenzvariabilität bei jungen Kardiomyozyten und das Ansprechen adulte Kardiomyozyten auf adrenerge Stimuli, deckt sich mit den bereits publizierten Erkenntnissen (Bekhte et al. 2020).

Yokoo et al. untersuchten u.a. ebenfalls Adrenalin und Propranolol an hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten (Yokoo et al. 2009). Die von Yokoo et al. beschriebenen, positiv chronotropen Effekte von Adrenalin stimmen mit den Ergebnissen aus den Abbildungen 16 und 17 überein. Yokoo et al. konnten ebenfalls eine abfallende Herzfrequenz unter Propranolol ermitteln, dabei aber keine statistische Signifikanz zeigen (Yokoo et al. 2009). Die Resultate in diesem Projekt aus den Abbildungen 16 und 17 zeigten einen signifikanten Abfall der Herzfrequenz unter der Behandlung mit Propranolol. Die Vorbehandlung mit dem Betablocker verhinderte zusätzlich effektiv den Anstieg der Herzfrequenz unter Adrenalin. Die Therapie mit Betablockern hat bereits in zahlreichen Studien bewiesen hat, dass sie negative chronotrope Effekte auslöst (Yamakawa et al. 1996). Des Weiteren konnten Yokoo et al. mit anderen negativ chronotrop wirkenden Medikamenten ebenfalls signifikante Herzfrequenzabfälle nachweisen (Yokoo et al. 2009). Die Resultate dieses Projekts lassen sich somit mit der zitierten Literatur vereinbaren.

Abbildung 18 zeigte einen signifikanten Anstieg der Expression des  $\beta$ 1-Adrenorezeptors am Tag 28 nach Adrenalingabe, welche interessanterweise durch die Vorbehandlung mit Propranolol verhindert werden konnte. Es zeigte sich hierbei der direkte Einfluss eines externen adrenergen Stimulus auf die hiPSC Herzzellen und die direkte Verbindung durch eine intrazelluläre Signalkaskade mit Expressionssteigerung. Rajagopal und Shenoy beschreiben eine Herunterregulierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren bei wiederholter oder kontinuierlicher Stimulation (Rajagopal und Shenoy 2018). Vermutlich ist die Stimulation über 48 Stunden, welche in diesem Projekt durchgeführt wurde, ein zu kurzfristiger Reiz für die beschriebene Herunterregulierung, weshalb es hierbei wohl zu differenten Ergebnissen kam.

In den Abbildungen 20 und 21 konnte die Beeinflussung der  $Ca^{2+}$ -Oszillation durch adrenerge Stimulation untersucht werden. Die Kalziumverfügbarkeit beeinflusst u.a. die Kontraktionsfrequenz als auch die Kontraktionsstärke (Triposkiadis et al. 2009),

## Diskussion

somit kann aus der Kalziumoszillation die Chronotropie und Inotropie abgeleitet werden. Adrenalin und Dobutamin zeigten in den Abbildungen 20 und 21 positiv chronotrope und inotrope Effekte, während Propranolol und Atenolol einen negativen Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation entfalteten. Dobutamin schaffte es im Gegensatz zu Adrenalin den Antagonisten zu verdrängen und die Kalziumoszillation wiederherzustellen. Die mögliche Erklärung ist, dass Dobutamin eine selektive  $\beta_1$ -Adrenorezeptor Wirkung zeigt (Williams und Bishop 1981), während Adrenalin agonistisch sowohl an  $\alpha$ - als auch an  $\beta$ -Adrenorezeptoren wirkt (Triposkiadis et al. 2009).

Zusammenfassend zeigen die erhobenen Daten und die zitierte Literatur, dass sich die hiPSC Herzzellen in-vitro wie humane Herzzellen in-vivo verhalten. Die Zielstellung dieser Arbeit, ob hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten in-vitro auf externe adrenerge Stimuli reagieren, wie man es bei Herzzellen in-vivo erwartet, konnte mit diesen Ergebnissen erfolgreich gezeigt und beantwortet werden.

Eine weitere Zielstellung dieses Projekts war es, die Beeinflussung des Hippo-Signalwegs durch adrenerge Substanzen zu untersuchen. Die Beeinflussung des Hippo-Signalwegs durch Adrenalin wurden von Yu et al. beschrieben (Yu et al. 2012). Im zugrundeliegenden Experiment zur Abbildung 19 wurde diese Beeinflussung ebenfalls untersucht. Es zeigte sich tendenziell ein Anstieg der Expression aller ausgewählten Hippo-Komponenten durch die Stimulation mit Adrenalin. Der Transkriptionsfaktor TEAD bildete dabei eine Ausnahme und zeigte eine niedrigere Expression. Während diese Arbeit die Expressionslevel der Hippo-Komponenten untersuchte, zeigte Yu et al. den Zusammenhang zwischen Adrenalin und gesteigerter YAP-Phosphorylierung auf Proteinebene. Des Weiteren nutzten Yu et al. eine andere Zelllinie (Yu et al. 2012). Die Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen sind nicht ausreichend, um einen direkten Einfluss zu zeigen. Auf die Untersuchung der Proteinlevel wurde aufgrund von anderen Experimenten verzichtet. In diesem Projekt konnte kein statistisch sicherer Zusammenhang zwischen der Beeinflussung des Hippo-Signalwegs mit adrenergen Stimuli abgeleitet werden, so dass diese Fragestellung in weiteren Untersuchungen beantwortet werden sollte.

#### **6.4 Effekte angiotensinerger Substanzen**

Neben der Behandlung mit adrenergen Substanzen sollten auch angiotensinerge Stimuli an hiPSC abgeleiteten Herzzellen untersucht werden. In Abbildung 8 konnte gezeigt werden, dass die beiden ATII-Rezeptoren auf den Kardiomyozyten exprimiert werden. Abbildung 12 zeigte übereinstimmende Resultate für den ATII-R1 auf Proteinebene. Hier zeigte sich ein stetiger Anstieg des Proteinlevels mit Fortschreiten der Kardiomyogenese. Mithilfe der Immunfluoreszenz konnte der ATII-R1 in Abbildung 15 visualisiert werden.

Nachdem der Rezeptornachweis erfolgte, stellte sich die Frage, ob die hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten auf externe angiotensinerge Stimuli reagieren. Diese Frage konnte mithilfe der Ergebnisse aus den Abbildungen 24 und 25 beantwortet werden. Abbildung 24 zeigte eine signifikante und dosisabhängige Zunahme der Expression des ATII-R1 nach Angiotensin II Stimulation. Abbildung 25 zeigte eine signifikante Abnahme der Expression nach Behandlung mit Losartan, somit den gegenteiligen Effekt zur Stimulation mit Angiotensin II. Losartan zeigte dabei keinen Effekt auf die Expression des ATII-R2 und regulierte spezifisch nur die ATII-R1 Expression. Siegl et al. beschrieben ebenfalls die agonistische Wirkung von Angiotensin II und stellten Losartan als hoch-selektiven ATII-R1 Blocker heraus (Siegl et al. 1995). Die Resultate, die den Abbildungen 24 und 25 zugrunde liegen, zeigten ebenfalls die komplementären Wirkungen von Angiotensin II und Losartan. Die Zielstellung dieser Arbeit, ob hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten auch auf externe angiotensinerge Stimuli reagieren, konnte mit diesen Ergebnissen gezeigt werden.

Nachdem der Hippo-Signalweg während der Kardiomyogenese charakterisiert wurde, sollte dessen Beeinflussung durch angiotensinerge Substanzen als weitere Zielstellung des Projekts untersucht werden. Abbildung 23 zeigte, dass die 48-stündige Angiotensin II Behandlung die Expression ausgewählter Hippo-Komponenten erhöht. Der ATII-R1 Antagonist Losartan reduzierte diese Expression hingegen signifikant. Interessanterweise zeigten sich die Ergebnisse analog zu den Resultaten aus der adrenergen Stimulation, nur bei adulten hiPSC abgeleiteten Herzzellen am Differenzierungstag 28. Abbildung 22 zeigte den gleichen Versuch an jungen Kardiomyozyten am Differenzierungstag 9. Dabei wurden keine signifikanten Effekte durch die Stimulation mit Angiotensin II auf ausgewählte Hippo-Komponenten ermittelt.

## Diskussion

Dieses Ergebnis stimmt mit der Aussage, die mithilfe von Abbildung 8 getroffen wurde, überein. Hieraus konnte die niedrige Expression der Angiotensin II Rezeptoren am Differenzierungstag 9 abgeleitet werden, welche für das fehlende Ansprechen auf angiotensinerge Stimuli verantwortlich sein kann. Vermutlich ist die Rezeptordichte am Tag 9 nicht ausreichend, dass die Stimulation mit Angiotensin II einen relevanten Einfluss auf die Herzzellen und die untersuchten Hippo-Komponenten ausübt.

Die Angiotensin II Behandlung führte ebenfalls zu einer tendenziell ansteigenden Expression des Hippo-assoziierten Gens CCN2. Aus den Ergebnissen, welche in Abbildung 23 dargestellt sind, ließ sich somit eine direkte Verbindung von Ang II über den ATII-R1 zum Hippo-Signalweg ableiten. Diese Aussage konnte durch das Ergebnis in Abbildung 26 noch einmal bekräftigt werden. Es zeigte sich, dass die Stimulation mit Angiotensin II über 48h eine signifikante Reduktion des pYAP Proteinlevels verursacht. Da sich das Gesamt-YAP Proteinlevel zwischen Kontrolle und Stimulation nicht wesentlich unterschied, kam es folglich zur Verschiebung von pYAP zu vermehrt unpYAP. Wennmann et al. beschrieben ebenfalls die Verschiebung von pYAP zu unpYAP. Des Weiteren konnten sie die nukleäre Translokation von YAP, welche durch Angiotensin II Behandlung ausgelöst wurde, zeigen (Wennmann et al. 2014). In Abbildung 29 konnte die Angiotensin II vermittelte YAP Translokation, ebenfalls gezeigt werden. Nach 20-minütiger Behandlung mit 10  $\mu$ M Angiotensin II zeigte sich eine nukleäre Signalsteigerung des Transkriptionsfaktors YAP.

Die Zusammenschau der Ergebnisse und die zitierte Literatur beweist den direkten Zusammenhang von Angiotensin II mit dem Hippo-Signalweg. Angiotensin II aktiviert dabei den Signalweg, indem das Phosphorylierungslevel von YAP abnimmt. Anschließend kommt es zum vermehrten YAP-Shutteling in den Nukleus und zur gesteigerten Gentranskription Hippo-assoziiierter Gene. Die Beeinflussung des Hippo-Signalwegs durch angiotensinerge Stimuli konnte somit in diesem Projekt gezeigt werden.

Abadir et al. konnten mitochondriale Angiotensin II Rezeptoren nachweisen und zeigten zusätzlich deren Beeinflussung durch Angiotensin II und Losartan (Abadir et al. 2011). Aus dieser Erkenntnis und der Möglichkeit, die Mitochondrienfunktion im Labor messen zu können, wurde die Zielstellung formuliert, den Einfluss angiotensinergischer Stimuli auf die Mitochondrienfunktion der Herzzellen zu untersuchen. Anlass für diese Untersuchung gab ebenfalls die Vermutung, dass Angiotensin II die

## Diskussion

Mitochondrienfunktion negativ beeinflussen könnte, da Stoffwechselveränderungen eine Eigenschaft der Herzinsuffizienz sind und sich diese u.a. in einer Abnahme der ATP-Konzentration um bis zu 30% manifestieren (Chen et al. 2019). Die Immunfluoreszenz-Untersuchung in Abbildung 15 ließ vermuten, dass der Angiotensin II Rezeptor Typ 1 intrazellulär vorhanden ist. Neben den Zellkernen könnten die Mitochondrien den ATII-R1 in ihrer Mitochondrienmembran exprimieren. Abadir et al. beschrieben ein funktionelles mitochondriales RAAS und wiesen dieses mithilfe der Immunelektronenmikroskopie nach, indem sie Ang II in murinen kardialen Mitochondrien in Umgebung der mitochondrialen ATII-R2 identifizierten (Abadir et al. 2011).

In der Zusammenschau aus den Abbildungen 30, 31 und 32 konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II die Mitochondrienfunktion der hiPSC Kardiomyozyten beeinflusst. Das Ergebnis, welches Abbildung 30 zugrunde liegt, schloss aus, dass das Lösungsmittel oder andere zufällig vorhandene Substanzen für Veränderungen der mitochondrialen Funktionen auslösend waren. Die Abbildungen 31 und 32 zeigten, dass Angiotensin II den basalen Sauerstoffverbrauch, die Stressreservekapazität, den Protonleak und die ATP Produktion der Mitochondrien signifikant beeinflussen konnte. Des Weiteren ging aus Abbildung 31 hervor, dass eine Konzentrationsabhängigkeit des Angiotensin II Einflusses auf die Mitochondrienfunktion bestand. Eine niedrige Konzentration steigerte den Energiestoffwechsel signifikant, während eine hohe Konzentration interessanterweise den gegenteiligen Effekt auslöste. Dieses Ergebnis erschien zunächst kontrovers. Eine mögliche Erklärung hierfür lieferten Bosnyak et al. (Bosnyak et al. 2011). Sie zeigten, dass Angiotensin II eine höhere Affinität für den ATII-R2 besitzt als zum ATII-R1. In niedrigen Konzentrationen agiert Ang II wohl über das ATII-R2 Signal und erst in höheren Konzentrationen rekrutiert sich der ATII-R1 Effekt (Bosnyak et al. 2011). Übertragen auf die Ergebnisse aus Abbildung 31 bedeutet diese Erkenntnis, dass das ATII-R2 Signal für die günstigen Effekte und das ATII-R1 Signal für die negative Beeinflussung der Mitochondrienfunktion ursächlich sind.

Diese These kann durch die Ergebnisse aus der Abbildung 32 bestärkt werden. Hier zeigte sich, dass Ang II in Kombination mit Losartan, einem ATII-R1 Blocker, für die signifikante Steigerung des Energiestoffwechsels verantwortlich war. Man kann daraus ableiten, dass selektiv der ATII-R2 als auslösender Rezeptor für die positiven Effekte zu identifizieren ist. Losartan blockierte effektiv und selektiv den ATII-R1 und Angiotensin II konnte in diesem Fall spezifische ATII-R2 Effekte auslösen. Abadir et

## Diskussion

al. konnten ebenfalls zeigen, dass die Aktivierung mitochondrialer Angiotensin II Rezeptoren, die mitochondriale Atmung modulieren kann. Diese Erkenntnisse stimmen mit den Resultaten dieser Arbeit überein. Des Weiteren präsentierten Abadir et al. Hinweise auf eine altersbedingte Veränderung der mitochondrialen Angiotensin II Rezeptorverteilung. Junge Mäuse wiesen ein erhöhtes Verhältnis aus ATII R2 zu ATII R1 auf, während bei älteren Mäusen relativ der ATII-R1 überwog. Interessanterweise konnte die dauerhafte Behandlung mit Losartan dieses Verhältnis umkehren und die Rezeptordichte des ATII-R2 bei adulten Mäusen signifikant erhöhen (Abadir et al. 2011). Sowohl Abadir et al. als auch die Ergebnisse aus den Abbildungen 31 und 32 legen die These nahe, dass ein Verlust von ATII-R2 Rezeptoren und damit ein Überwiegen der ATII-R1 Rezeptoren, ein Aspekt der mitochondrialen Dysfunktion ist, welcher bei kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet wird. Faria-Costa et al. zeigten ebenfalls die günstigen Effekte des ATII-R2 und die ungünstigen Wirkungen des ATII-R1 auf (Faria-Costa et al. 2014). Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse dieses Projekts.

Die Zielstellung dieser Arbeit, den Einfluss von angiotensinergen Stimuli auf die Mitochondrienfunktion zu untersuchen, konnte somit beantwortet werden. In weiteren Untersuchungen sollte die These, dass es unter chronischen Angiotensin II Einfluss zu einer Rezeptorumverteilung vom ATII-R2 zum ATII-R1 kommt, verifiziert werden.

Aktuell ist der Mechanismus, wie Angiotensin II nach intrazellulär gelangt und diese lokalen Effekte auslöst, noch nicht genau bekannt. Ein Erklärungsansatz ist die Internalisierung von Angiotensin II über den Substrat-Rezeptorkomplex über die Zellmembran. Nach intrazellulärer Ablösung von Angiotensin II kommt es zur Interaktion von Ang II mit den mitochondrialen Angiotensin II Rezeptoren. Laut van Kesteren gibt es keine Hinweise das Herzzellen die Angiotensin II Vorstufe Angiotensinogen selbst produzieren (van Kesteren et al. 1999). Daraus lässt sich schließen, dass Angiotensin II von extrazellulär über den ATII-Rezeptor internalisiert wird und dann intrazelluläre Wirkungen entfaltet (van Kats et al. 1997). Diese Ergebnisse zeigen den engen Zusammenhang zwischen den im Blut zirkulierenden Angiotensin II, dessen intrazelluläre Aufnahme und die Interaktion mit Zellorganellen wie z.B. den Mitochondrien. Es bedarf jedoch weiteren Untersuchungen zum molekularen Verständnis des kardialen RAAS. Die mitochondriale Dysfunktion ist ein bedeutender Aspekt in der Pathogenese der Herzinsuffizienz (Zhou und Tian 2018), welche u.a. durch langfristige Angiotensin II Exposition begünstigt wird (Yusuf et al.

2000, Paradis et al. 2000). Die Herzinsuffizienz stellt heutzutage eine der häufigsten Todesursachen des Menschen dar (NCHS 2016, Deutsche Herzstiftung 2016) und sollte deshalb weiter intensiv erforscht werden.

### **6.5 In-vivo Mausexperiment**

Um die Relevanz des Hippo-Signalwegs in einem lebenden Organismus zu charakterisieren, wurde der zentrale Transkriptionsfaktor YAP mittels Immunhistochemiemikroskopie in verschiedenen Geweben der Maus untersucht. Der Nachweis von YAP in Leber- und Milzgewebe zeigte zum einen das Funktionieren des verwendeten Protokolls und zum anderen diente es als Positivkontrolle für sich proliferierendes Gewebe (Delhaye et al. 1996). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der in-vitro an hiPSC abgeleiteten Herzzellen untersuchte Hippo-Signalweg auch in einem lebenden Organismus im Mausmodell nachweisbar ist. Die Ergebnisse aus Abbildung 33 bestätigen diese Aussagen. Der zentrale Transkriptionsfaktor YAP konnte in seiner aktiven, unphosphorylierten Form im Zellkern von murinen Leber- und Milzgewebe dargestellt werden.

Zeitgleich zu dieser Promotionsarbeit wurde in der Arbeitsgruppe ein experimentelles CerS2-Überexpression-Mausmodell etabliert. Dieses Modell konnte genutzt werden, um den Einfluss von Ceramiden auf die Regulation des Hippo-Signalwegs zu untersuchen. Da bereits in hiPSC abgeleiteten Herzzellen nachgewiesen wurde, dass kardiale Risikofaktoren den Hippo-Signalweg aktivieren, stellte sich die Frage, ob das in-vivo nachvollzogen werden kann. Erhöhte Serumceramide sind ein dosisabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen und erhöhen das Risiko auf unerwünschte kardiale Ereignisse wie z.B. einem Myokardinfarkt, einem Schlaganfall oder den Tod (Vasile et al. 2021).

Die Ergebnisse aus Abbildung 34 zeigten, dass die aktive, unphosphorylierte Form tendenziell häufiger im Nukleus zu finden war, als die inaktive Form. Es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen Wildtyp-Maus und Überexpression-Maus gefunden werden. Dieses Ergebnis lässt sich mit der Methodik erklären. Die CerS2 Überexpression ist an eine doxycyclinhaltige Ernährung gekoppelt, welche über 4 Wochen gegeben wurde. Erste Daten von Jasmine Wu zeigten, dass erst nach 2 Wochen Fütterung erhöhte Ceramidspiegel nachweisbar sind. Vermutlich sind die sich ergebenden 2 Wochen Exposition mit erhöhten Ceramiden, ein zu kurzer Zeitraum für signifikante Unterschiede.

### 6.6 Statistische Auswertung

In diesem Projekt wurden mindestens 3 und oftmals 4 bis 8 Zellkulturpassagen untersucht. Für die statistische Auswertung ist die Strichprobengröße demzufolge vergleichsweise klein. Zu Beginn der statistischen Auswertung wurde an den erhobenen Daten der Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung und der Brown-Forsythe Test auf Varianzgleichheit mithilfe des Programms SigmaPlot durchgeführt. Vor allem bei der Annahme der Normalverteilung wurde bedacht, dass es sich um eine kleine Stichprobe handelt. S. S. Shapiro und M. B. Wilk zeigten, dass ihr eingeführter Test für kleine Stichproben ( $n < 20$ ) effektiv auf Normalität testet (Shapiro und Wilk 1965). Unter dieser Annahme wurden normalverteilte Daten mithilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben statistisch überprüft und in den Ergebnissen dargestellt.

Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wäre als Alternative zum t-Test möglich gewesen, da hier die Daten nicht normalverteilt sein müssen (Wilcoxon 1946, Mann und Whitney 1947). Letztlich wurden die Daten aber nach den Empfehlungen von SigmaPlot und in Rücksprache mit einem Statistiker der Universität Jena statistisch ausgewertet und entsprechend mit Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzniveau dargestellt. Die Kultivierung und Differenzierung der hiPSC erforderte einen enormen zeitlichen Aufwand von insgesamt etwa 2 Monaten pro Passage. Für weitergehende Projekte ist es trotz des erheblichen zeitlichen Mehraufwands hilfreich, die Stichprobengröße zu erhöhen, um die statistische Sicherheit weiter anzuheben und die Aussagekraft noch weiter zu erhöhen.

### 6.7 Limitationen der Arbeit

Dieses Projekt war zunächst angelegt, um die Wirksamkeit physiologischer Stimuli zu untersuchen und nachzuweisen. Das Thema Remodeling und Entstehung einer Herzinsuffizienz ist ein chronisch-progredienter Vorgang. Die Arbeitsgruppe arbeitet erst einige Jahre an hiPSC. Es ist noch nichts über die maximal erreichbare Lebenszeit dieser Zellen bekannt. Die meisten Vorversuche endeten um den Tag 28 der Herzzelldifferenzierung. Aufgrund dieser Erfahrungen wurden die Zellen in diesem Projekt meist über 48 Stunden mit den Substanzen stimuliert. Der Stimulationsbeginn wurde aufgrund des Ergebnisses der Rezeptorexpression auf den 28. Differenzierungstag festgelegt. Da eine Herzinsuffizienz über wesentlich längere Zeit entsteht, bieten sich längere Untersuchungs- und Stimulationszeiträume an. Dafür wäre es notwendig, die Lebensdauer der hiPSC in Vorversuchen zu ermitteln. Die

## Diskussion

Expressionsanalysen und die Ergebnisse der Mitochondrienfunktion geben Anhalt, an diesem Thema weitere Folgeexperimente zu realisieren. Die These über die mitochondriale Dysfunktion auf Grundlage des Verlusts ATII-R2 Rezeptoren zu Gunsten verstärkter ATII-R1 Signaltransduktion, wäre ein interessanter Ansatz einer längerfristigen Angiotensin II Stimulation.

Weitere Limitationen gab es beim Nachweis der adrenergen Rezeptoren. Im Projekt erfolgte der Expressionsnachweis der Adrenorezeptoren und die adrenerge Stimulation mittels Herzfrequenzanalyse. Der Rezeptornachweis auf Proteinebene wurde aufgrund von fehlenden zusätzlichen Informationsgewinn nicht durchgeführt.

Des Weiteren gingen aufgrund einer Geräteumstellung im Labor einige Primärdaten aus Westernblots verloren. Einige Proteinexperimente konnten somit nicht vollständig ausgewertet werden und es fehlen bei einzelnen erfolgten Auswertungen die dazugehörigen Aufnahmen.

### 7 Schlussfolgerungen

In diesem Projekt konnte eine hochreine hiPSC Herzzellkultur erzeugt werden. Diese Herzzellen wurden aus Fibroblasten über die Induktion von Stammzellen erzeugt und durch Expressions-, Proteinanalysen und Immunfluoreszenzmessungen phänotypisch charakterisiert. Die Ergebnisse zeigten eine erfolgreiche Differenzierung der hiPSC zur Herzzelle. Darüber hinaus konnten Antworten auf adrenerge Stimuli abgeleitet werden. Beispielsweise konnte die Herzfrequenz durch Adrenalin gesteigert und durch Propranolol gesenkt werden. Interessanterweise gelang dies nur bei adulten Herzzellen und nicht in den jungen Herzzellen. Weiterhin konnte der Kalziumfluss in der Herzzelle abgeleitet und beeinflusst werden. Beta-Agonisten verstärkten und Betablocker reduzierten das Kalziumsignal in den Zellen. Dobutamin durchbrach die Wirkung von Atenolol und stellte den  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluss im Sinne einer Reanimation wieder her. Adrenalin konnte Propranolol hingegen nicht verdrängen. Des Weiteren wurden angiotensinerge Stimuli angewendet und deren Effekte auf die hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten untersucht. Es zeigten sich Expressionsveränderungen auf den Angiotensin II Rezeptor Typ 1 und auf ausgewählte Hippo-Komponenten. Diese Ergebnisse stimmen mit den erhobenen Proteinanalysen überein. Zusätzlich konnte eine YAP-Translokation in den Zellkern unter dem Einfluss von Angiotensin II beobachtet werden. Es konnte jedoch nicht genau identifiziert werden, ob dies über den ATII-R1 oder den ATII-R2 ausgelöst wird. Andere Studien konnten jedoch in ähnlichen Experimenten den ATII-R1 als Auslöser für die Translokation identifizieren.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II die Mitochondrienfunktion beeinflusst. Es wurde u.a. ein positiver Einfluss auf die ATP Produktion ermittelt und dafür der ATII-R2 als ursächliches Signal ermittelt. Der ATII-R1 zeigte entgegengesetzte negative Auswirkungen, weshalb die These aufgestellt wurde, dass ein Verlust von ATII-R2 und damit ein Überwiegen der ATII-R1, ein Aspekt der mitochondrialen Dysfunktion sein kann, welche bei kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet wird. Schlussfolgernd lässt sich aus dem Projekt sagen, dass Angiotensin II den Hippo-Signalweg direkt beeinflusst. Dieser Proliferationssignalweg spielt eine Rolle in der Kardiomyogenese und könnte am pathologischen Remodeling und an der Pathogenese der Herzinsuffizienz beteiligt sein. Es lässt sich ableiten, dass Angiotensin II, über den ATII-R1, die Hippo-Target-Expression hochreguliert und diese Komponenten vermutlich am pathologischen Umbau beteiligt sind. Losartan schützt die Zellen effektiv vor der Expressionssteigerung der Hippo-Komponenten, was diese

## Schlussfolgerungen

These bekräftigt. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht weiterhin die Erkenntnis hervor, dass eine akute angiotensinerge Stimulation über den ATII-R2 positive Effekte auf die metabolische Funktion der Zellen ausübt. Weiterhin lässt sich vermuten, dass der Hippo-Signalweg über das ATII-R1 Signal aktiviert wird und vermutlich durch chronische Aktivierung an der Pathogenese des Remodelings beteiligt ist.

Mithilfe der hiPSC Zellen können Risikofaktoren der modernen Gesellschaft, wie hier im Projekt beispielsweise mit Angiotensin II gezeigt, simuliert werden und daraus pathophysiologische Überlegungen zur Krankheitsentstehung hergeleitet werden. In weiteren Forschungen könnten Therapien wie z.B. Gen-Knockouts oder spezifische Hippo Aktivatoren bzw. Inhibitoren getestet werden. Die Möglichkeiten, welche hiPSC abgeleitete Herzzellen bieten, sind aber noch viel weitreichender. In Studien an Mäusen konnten die hiPSC Herzzellen erfolgreiche intramyokardiale transplantiert werden und zu einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion führen. Des Weiteren konnten Ansätze eines Remodelingmodells an hiPSC abgeleiteten Kardiomyozyten generiert und durch Behandlung mit trophischen Reizen, eine Herzhypertrophie mit Kontraktionsstörungen erzeugt werden.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die Effekte von physiologisch relevanten Stimuli an hiPSC abgeleiteten Herzzellen zu untersuchen. Die Ergebnisse stimmen in vielen Punkten mit publizierten Erkenntnissen überein und lassen einen Vergleich mit klinisch erhobenen in-vivo Daten zu. Die hiPSC Kardiomyozyten eignen sich hervorragend zur Forschung an verschiedenen kardiologischen und pharmakologischen Fragestellungen und könnten die Transplantationsmedizin revolutionieren. Dabei bietet die hiPSC-Methode zahlreiche Vorteile gegenüber anderen Stammzellforschungsmethoden. Schlussfolgernd kann man aus den Ergebnissen ableiten, dass die hiPSC abgeleiteten Herzzellen ein einzigartiges in-vitro Modell darstellen, welches für das Verständnis der kardialen Physiologie und der Stoffwechselfunktionen genutzt werden kann. Es können Pharmaka an diesen Zellen als Alternative zu Tierversuchen getestet werden und dabei mögliche Therapiestrategien abgeleitet werden. Weiterhin bietet sich an, die Langzeitwirkung von adrenergen und angiotensinergen Substanzen zu untersuchen, um ein Herzinsuffizienzmodell zu generieren. Dabei sollten die hiPSC abgeleiteten Herzzellen über längere Zeiträume mit bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren behandelt werden und strukturelle, funktionelle oder metabolische Parameter untersucht werden.

### III Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abadir PM, Foster DB, Crow M, Cooke CA, Rucker JJ, Jain A, Smith BJ, Burks TN, Cohn RD, Fedarko NS, Carey RM, O'Rourke B, Walston JD. 2011. Identification and characterization of a functional mitochondrial angiotensin system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (36):14849-14854.
- Agilent Technologies. 2019. Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit User Guide Kit 103015-100 Page 6, Figures 1 and 2 Wilmington, USA:
- Bekhite MM, Gonzalez Delgado A, Menz F, Kretzschmar T, Wu JMF, Bekfani T, Nietzsche S, Wartenberg M, Westermann M, Greber B, Schulze PC. 2020. Longitudinal metabolic profiling of cardiomyocytes derived from human-induced pluripotent stem cells. *Basic Res Cardiol*, 115 (4):37.
- Bers DM. 2008. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol*, 70:23-49.
- Bio-Rad Laboratories Inc. 2000. Rapid assembly casting system for slab gels; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA:
- Bosnyak S, Jones ES, Christopoulos A, Aguilar MI, Thomas WG, Widdop RE. 2011. Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. *Clin Sci (Lond)*, 121 (7):297-303.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- Burnette WN. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112 (2):195-203.
- Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380 (6569):64-66.
- Cannon W. 1915. Bodily changes in Pain, Hunger, Fear and Rage. D Appleton and Company, Seite 211.
- Chen L, Song J, Hu S. 2019. Metabolic remodeling of substrate utilization during heart failure progression. *Heart Fail Rev*, 24 (1):143-154.
- Chen YJ, Li LJ, Tang WL, Song JY, Qiu R, Li Q, Xue H, Wright JM. 2018. First-line drugs inhibiting the renin angiotensin system versus other first-line antihypertensive drug classes for hypertension. *Cochrane Database Syst Rev*, 11:CD008170.
- Christoffels VM, Habets PE, Franco D, Campione M, de Jong F, Lamers WH, Bao ZZ, Palmer S, Biben C, Harvey RP, Moorman AF. 2000. Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol*, 223 (2):266-278.
- de Lazaro I, Yilmazer A, Kostarelou K. 2014. Induced pluripotent stem (iPS) cells: a new source for cell-based therapeutics? *J Control Release*, 185:37-44.
- Delhaye M, Louis H, Degraef C, Le Moine O, Deviere J, Gulbis B, Jacobovitz D, Adler M, Galand P. 1996. Relationship between hepatocyte proliferative activity and liver functional reserve in human cirrhosis. *Hepatology*, 23 (5):1003-1011.
- Deutsche Herzstiftung. 2016. 28. Deutscher Herzbericht.
- Divakaruni AS, Paradise A, Ferrick DA, Murphy AN, Jastroch M. 2014. Analysis and Interpretation of Microplate-Based Oxygen Consumption and pH Data. *Methods in Enzymology*, 547.
- Dostal DE, Baker KM. 1999. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res*, 85 (7):643-650.
- Faria-Costa G, Leite-Moreira A, Henriques-Coelho T. 2014. Cardiovascular effects of the angiotensin type 2 receptor. *Rev Port Cardiol*, 33 (7-8):439-449.
- Frangogiannis NG. 2015. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol*, 5 (4):1841-1875.

## Literatur- und Quellenverzeichnis

- Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. 2009. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 85 (8):348-362.
- Gao Q, Wang P, Wu Z, Qiu H, Lin B, Chen J, Cen J, Zhuang J. 2020. Angiotensin II induces apoptosis in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Preprint.
- Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I. 2000. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium*, 27 (2):97-106.
- Goldblatt MW, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. 1933. Studies on Experimental Hypertension. *The Journal of Experimental Medicine*, 59:347-379.
- Goss CM. 1942. The physiology of the embryonic mammalian heart before circulation. *American Journal of Physiology*.
- Harvey KF, Pflieger CM, Hariharan IK. 2003. The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell*, 114 (4):457-467.
- Heidenreich PA, Albert NM, Allen LA, Bluemke DA, Butler J, Fonarow GC, Ikonomidis JS, Khavjou O, Konstam MA, Maddox TM, Nichol G, Pham M, Pina IL, Trogdon JG, American Heart Association Advocacy Coordinating C, Council on Arteriosclerosis T, Vascular B, Council on Cardiovascular R, Intervention, Council on Clinical C, Council on E, Prevention, Stroke C. 2013. Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circ Heart Fail*, 6 (3):606-619.
- Herrmann G, Descherd GM. 1939. The chemical nature of heart failure. *Annals of Internal Medicine*, 12 (8):1233-1244.
- Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. 1993. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol*, 22 (4 Suppl A):6A-13A.
- Hou N, Wen Y, Yuan X, Xu H, Wang X, Li F, Ye B. 2017. Activation of Yap1/Taz signaling in ischemic heart disease and dilated cardiomyopathy. *Exp Mol Pathol*, 103 (3):267-275.
- Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. 2010. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*, 10 (9):1886-1890.
- Huxley AF, Niedergerke R. 1954. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature*, 173 (4412):971-973.
- Huxley H, Hanson J. 1954. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*, 173 (4412):973-976.
- Jiang YF, Chen M, Zhang NN, Yang HJ, Rui Q, Zhou YF. 2018. In vitro and in vivo differentiation of induced pluripotent stem cells generated from urine-derived cells into cardiomyocytes. *Biol Open*, 7 (1).
- Johnson M. 2012. Loading Controls for Western Blots. *Methods* 2012;2:114, Synatom Research, Princeton, New Jersey, USA, (Labome, The world of laboratories).
- Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silberagl S. 2010. *Physiologie*. Stuttgart / New York: Georg Thieme Verlag; 6. Auflage Seite 127.
- Koo JH, Guan KL. 2018. Interplay between YAP/TAZ and Metabolism. *Cell Metab*, 28 (2):196-206.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259):680-685.
- Liebau S, Stockmann M, Illing A, Seufferlein T, Kleger A. 2014. [Induced pluripotent stem cells. A new resource in modern medicine]. *Internist (Berl)*, 55 (4):460-469.
- Lin Z, von Gise A, Zhou P, Gu F, Ma Q, Jiang J, Yau AL, Buck JN, Gouin KA, van Gorp PR, Zhou B, Chen J, Seidman JG, Wang DZ, Pu WT. 2014. Cardiac-specific YAP activation improves cardiac function and survival in an experimental murine MI model. *Circ Res*, 115 (3):354-363.
- Lip GY, Gibbs CR, Beevers DG. 2000. ABC of heart failure: aetiology. *BMJ*, 320 (7227):104-107.
- Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. 2020. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Rep*, 16 (1):3-32.

## Literatur- und Quellenverzeichnis

- Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM. 2011. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol*, 51 (3):288-298.
- Lymn RW, Taylor EW. 1971. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry*, 10 (25):4617-4624.
- Macherey-Nagel. 2015. RNA Isolation User Manual NucleoSpin® RNA / RNA Midi MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland:
- Mann HB, Whitney DR. 1947. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Annals of Mathematical Statistics*, 18:50-60.
- McCorry LK. 2007. Physiology of the autonomic nervous system. *Am J Pharm Educ*, 71 (4):78.
- Menz F, Bekhite MM, Kretzschmar T, Wu JMF, Franz M, Schulze PC. 2020. Characterization of the Hippo pathway during cardiomyogenesis and effects of angiotensin II stimulation in cardiomyocytes derived from human iPS cells; 86. Jahrestagung in Mannheim: Clinical Research in Cardiology.
- Menz F, Bekhite MM, Hübner S, Haxhikadrija P, Kretzschmar T, Wu JMF, Franz M, Schulze PC. 2021. The responsiveness of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation; 87. Jahrestagung in Mannheim: Clinical Research in Cardiology.
- Mia MM, Singh MK. 2019. The Hippo Signaling Pathway in Cardiac Development and Diseases. *Front Cell Dev Biol*, 7:211.
- NCHS. 2016. Health, United States, 2015. In: Statistics NCoH, Hrsg. Health, United States, 2015: With Special Feature on Racial and Ethnic Health Disparities. Hyattsville (MD).
- Neri Seneri GG, Boddi M, Coppo M, Chechi T, Zarone N, Moira M, Poggesi L, Margheri M, Simonetti I. 1996. Evidence for the existence of a functional cardiac renin-angiotensin system in humans. *Circulation*, 94 (8):1886-1893.
- Neubauer S. 2007. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med*, 356 (11):1140-1151.
- Omboni S, Volpe M. 2019. Angiotensin Receptor Blockers Versus Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors for the Treatment of Arterial Hypertension and the Role of Olmesartan. *Adv Ther*, 36 (2):278-297.
- Panina Y, Germond A, Masui S, Watanabe TM. 2018. Validation of Common Housekeeping Genes as Reference for qPCR Gene Expression Analysis During iPS Reprogramming Process. *Sci Rep*, 8 (1):8716.
- Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. 2000. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (2):931-936.
- Pasumarthi KB, Field LJ. 2002. Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circ Res*, 90 (10):1044-1054.
- Peischarde S, Piccini I, Strutz-Seebohm N, Greber B, Seebohm G. 2017. From iPSC towards cardiac tissue-a road under construction. *Pflugers Arch*, 469 (10):1233-1243.
- Rajagopal S, Shenoy SK. 2018. GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cell Signal*, 41:9-16.
- Ramos A, Camargo FD. 2012. The Hippo signaling pathway and stem cell biology. *Trends Cell Biol*, 22 (7):339-346.
- Rojas SV, Kensah G, Rotaermel A, Baraki H, Kutschka I, Zweigerdt R, Martin U, Haverich A, Gruh I, Martens A. 2017. Transplantation of purified iPSC-derived cardiomyocytes in myocardial infarction. *PLoS One*, 12 (5):e0173222.
- Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. 2010. Physiologie des Menschen. Springer Medizin Verlag, 31. Auflage, Seiten 100-101, 103 524-525, 527.
- Sedan O, Dolnikov K, Zeevi-Levin N, Leibovich N, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Binah O. 2008. 1,4,5-Inositol trisphosphate-operated intracellular Ca(2+) stores and angiotensin-II/endothelin-1 signaling pathway are functional in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells*, 26 (12):3130-3138.
- Shapiro SS, Wilk MB. 1965. An analysis of variance test normality (complete samples). *Biometrika*, 52 (591).

## Literatur- und Quellenverzeichnis

- Siegl PK, Kivlighn SD, Broten TP. 1995. Pharmacology of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, in animal models of hypertension. *J Hypertens Suppl*, 13 (1):S15-21.
- Singh V, Mendirichaga R, Savani GT, Rodriguez A, Blumer V, Elmariah S, Inglessis-Azuaje I, Palacios I. 2018. Comparison of Utilization Trends, Indications, and Complications of Endomyocardial Biopsy in Native Versus Donor Hearts (from the Nationwide Inpatient Sample 2002 to 2014). *Am J Cardiol*, 121 (3):356-363.
- Singh VK, Kumar N, Kalsan M, Saini A, Chandra R. 2015. Mechanism of Induction: Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). *J Stem Cells*, 10 (1):43-62.
- Stennard FA, Costa MW, Elliott DA, Rankin S, Haast SJ, Lai D, McDonald LP, Niederreither K, Dolle P, Bruneau BG, Zorn AM, Harvey RP. 2003. Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart. *Dev Biol*, 262 (2):206-224.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126 (4):663-676.
- Tanaka A, Yuasa S, Mearini G, Egashira T, Seki T, Kodaira M, Kusumoto D, Kuroda Y, Okata S, Suzuki T, Inohara T, Arimura T, Makino S, Kimura K, Kimura A, Furukawa T, Carrier L, Node K, Fukuda K. 2014. Endothelin-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc*, 3 (6):e001263.
- Taylor K, Gordon N, Langley G, Higgins W. 2008. Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005. *Altern Lab Anim*, 36 (3):327-342.
- Thermo Fisher Scientific. 2013. RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit Waltham, Massachusetts, USA:
- Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J. 2009. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J Am Coll Cardiol*, 54 (19):1747-1762.
- van Kats JP, de Lannoy LM, Jan Danser AH, van Meegen JR, Verdouw PD, Schalekamp MA. 1997. Angiotensin II type 1 (AT1) receptor-mediated accumulation of angiotensin II in tissues and its intracellular half-life in vivo. *Hypertension*, 30 (1 Pt 1):42-49.
- van Kesteren CA, Saris JJ, Dekkers DH, Lamers JM, Saxena PR, Schalekamp MA, Danser AH. 1999. Cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts do not synthesize renin or angiotensinogen: evidence for stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy independent of angiotensin II. *Cardiovasc Res*, 43 (1):148-156.
- Vasile VC, Meeusen JW, Medina Inojosa JR, Donato LJ, Scott CG, Hyun MS, Vinciguerra M, Rodeheffer RR, Lopez-Jimenez F, Jaffe AS. 2021. Ceramide Scores Predict Cardiovascular Risk in the Community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 41 (4):1558-1569.
- Virchow R. 1858. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. 16. Vorlesung, gehalten 1858 im pathologischen Institute zu Berlin. aus zwanzig Vorlesungen mit 144 Holzschnitten. . Berlin: Verlag von August Hirschwald.
- Wang DH, Yao A, Zhao H, DiPette DJ. 1997. Distinct mechanisms of modulation of angiotensin II type I receptor gene expression in heart and aorta. *Hypertension*, 29 (5):1104-1108.
- Wang J, Gareri C, Rockman HA. 2018. G-Protein-Coupled Receptors in Heart Disease. *Circ Res*, 123 (6):716-735.
- Wennmann DO, Vollenbrocker B, Eckart AK, Bonse J, Erdmann F, Wolters DA, Schenk LK, Schulze U, Kremerskothen J, Weide T, Pavenstadt H. 2014. The Hippo pathway is controlled by Angiotensin II signaling and its reactivation induces apoptosis in podocytes. *Cell Death Dis*, 5:e1519.
- Wilcoxon F. 1946. Individual comparisons of grouped data by ranking methods. *J Econ Entomol*, 39:269.
- Williams RS, Bishop T. 1981. Selectivity of dobutamine for adrenergic receptor subtypes: in vitro analysis by radioligand binding. *J Clin Invest*, 67 (6):1703-1711.

## Literatur- und Quellenverzeichnis

- Wu H, Lee J, Vincent LG, Wang Q, Gu M, Lan F, Churko JM, Sallam KI, Matsa E, Sharma A, Gold JD, Engler AJ, Xiang YK, Bers DM, Wu JC. 2015. Epigenetic Regulation of Phosphodiesterases 2A and 3A Underlies Compromised beta-Adrenergic Signaling in an iPSC Model of Dilated Cardiomyopathy. *Cell Stem Cell*, 17 (1):89-100.
- Xin M, Kim Y, Sutherland LB, Murakami M, Qi X, McAnally J, Porrello ER, Mahmoud AI, Tan W, Shelton JM, Richardson JA, Sadek HA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2013. Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (34):13839-13844.
- Yamakawa H, Takeuchi M, Takaoka H, Hata K, Mori M, Yokoyama M. 1996. Negative chronotropic effect of beta-blockade therapy reduces myocardial oxygen expenditure for nonmechanical work. *Circulation*, 94 (3):340-345.
- Yokoo N, Baba S, Kaichi S, Niwa A, Mima T, Doi H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T. 2009. The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 387 (3):482-488.
- Yu FX, Zhao B, Panupinthu N, Jewell JL, Lian I, Wang LH, Zhao J, Yuan H, Tumaneng K, Li H, Fu XD, Mills GB, Guan KL. 2012. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell*, 150 (4):780-791.
- Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. 2000. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med*, 342 (3):145-153.
- Zhang M, D'Aniello C, Verkerk AO, Wrobel E, Frank S, Ward-van Oostwaard D, Piccini I, Freund C, Rao J, Seeböhm G, Atsma DE, Schulze-Bahr E, Mummery CL, Greber B, Bellin M. 2014. Recessive cardiac phenotypes in induced pluripotent stem cell models of Jervell and Lange-Nielsen syndrome: disease mechanisms and pharmacological rescue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111 (50):E5383-5392.
- Zhao B, Li L, Lei Q, Guan KL. 2010. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev*, 24 (9):862-874.
- Zhou B, Tian R. 2018. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *J Clin Invest*, 128 (9):3716-3726.
- Zilles K, Tillmann BN. 2010. *Anatomie*. Heidelberg Seite 68: Springer Medizin Verlag.

## **IV Anhang**

### **Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Mohamed Bekhite**

Die Experimente, welche den Abbildungen 13, 20 und 21 zugrunde liegen, wurden gemeinsam mit Herrn Dr. Mohamed Bekhite durchgeführt. Die hiPSC wurden dabei von mir kultiviert, zu Herzzellen differenziert und für die Messung vorbereitet. Die anschließenden Messungen mit adrenerger Stimulation erfolgten gemeinsam. Die Auswertung, welche in den Abbildungen 20 und 21 dargestellt ist, erfolgte ausschließlich durch Herrn Dr. M. Bekhite. Die Daten wurden anschließend gemeinsam im Journal: „Basic Research in Cardiology“ publiziert (Bekhite et al. 2020).

Herrn Dr. Mohamed Bekhite stimmte zu, dass ich die Daten seiner Auswertung in der Promotion verwenden darf. Ich habe einen Hinweis an den angegebenen Stellen hinzugefügt, um zu kennzeichnen, dass ich diese Teilergebnisse nicht allein erhoben habe.

### **Zusammenarbeit mit Frau Jasmine Wu**

Die Experimente, welche den Abbildungen 33 und 34 zugrunde liegen, wurden gemeinsam mit Frau Jasmine Wu durchgeführt. Die Mäuse wurden von Frau Wu gefüttert und aufgezogen. Weiterhin führte sie die Isolation von Leber-, Milz- und Herzgewebe durch. Die anschließende Aufbereitung wurde gemeinsam durchgeführt. Die Messung und Auswertung erfolgte von mir.

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1: Verwendete Primer.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabelle 2: Verwendete Antikörper für die Proteinanalytik.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabelle 3: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie.....</b>	<b>34</b>
<b>Tabelle 4: Verwendete Laser für die Immunfluoreszenzmikroskopie.....</b>	<b>34</b>
<b>Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemiemikroskopie.....</b>	<b>36</b>

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1: Aufbau des quergestreiften Muskels.....</b>	<b>9</b>
<b>Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Renin-Angiotensin-Systems.....</b>	<b>13</b>
<b>Abbildung 3: Schematischer Ablauf des Mito-Stresstests.....</b>	<b>18</b>
<b>Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Hippo-Signalwegs.....</b>	<b>20</b>
<b>Abbildung 5: Schematische Darstellung der hiPSC Differenzierung.....</b>	<b>24</b>
<b>Abbildung 6: Expressionslevel verschiedener Differenzierungsgene während der Kardiomyogenese.....</b>	<b>37</b>
<b>Abbildung 7: Expressionslevel verschiedener Hippo-Gene während der Kardiomyogenese.....</b>	<b>38</b>
<b>Abbildung 8: Expressionslevel adrenerger und angiotensinerger Rezeptoren während der Kardiomyogenese.....</b>	<b>39</b>
<b>Abbildung 9: Embryonale Proteinlevel während der Kardiomyogenese.....</b>	<b>40</b>
<b>Abbildung 10: Kardiale Proteinlevel während der Kardiomyogenese.....</b>	<b>41</b>
<b>Abbildung 11: Hippo-Proteinlevel während der Kardiomyogenese.....</b>	<b>42</b>
<b>Abbildung 12: ATII-R1-Proteinlevel während der Kardiomyogenese.....</b>	<b>43</b>
<b>Abbildung 13: Immunfluoreszenz verschiedener embryonaler Strukturen.....</b>	<b>44</b>
<b>Abbildung 14: Immunfluoreszenz verschiedener kardialer Strukturen.....</b>	<b>45</b>
<b>Abbildung 15: Immunfluoreszenz des Angiotensin II Rezeptor Typ 1.....</b>	<b>46</b>
<b>Abbildung 16: Herzfrequenzanalyse unter 3h adrenerger Stimulation.....</b>	<b>47</b>
<b>Abbildung 17: Herzfrequenzanalyse unter 24h adrenerger Stimulation.....</b>	<b>48</b>
<b>Abbildung 18: Expressionslevel adrenerger Rezeptoren am Tag 28 nach adrenerger Stimulation.....</b>	<b>49</b>
<b>Abbildung 19: Expressionslevel ausgewählter Hippo-Targets am Tag 28 nach adrenerger Stimulation.....</b>	<b>50</b>
<b>Abbildung 20: Ca<sup>2+</sup>-Oszillation hiPSC Herzzellen am Tag 28 unter unselektiver adrenerger Stimulation.....</b>	<b>51</b>
<b>Abbildung 21: Ca<sup>2+</sup>-Oszillation hiPSC Herzzellen am Tag 28 unter selektiver adrenerger Stimulation.....</b>	<b>52</b>
<b>Abbildung 22: Expressionslevel ausgewählter Hippo-Gene nach angiotensinerger Stimulation am Tag 9.....</b>	<b>53</b>
<b>Abbildung 23: Expressionslevel ausgewählter Hippo-Gene nach angiotensinerger Stimulation am Tag 28.....</b>	<b>54</b>
<b>Abbildung 24: Expressionslevel des Angiotensin II Rezeptor Typ 1 nach 48h Angiotensin II Stimulation.....</b>	<b>55</b>
<b>Abbildung 25: Expressionslevel des Angiotensin II Rezeptor Typ 1 nach 48h Losartan Stimulation.....</b>	<b>56</b>

## Anhang

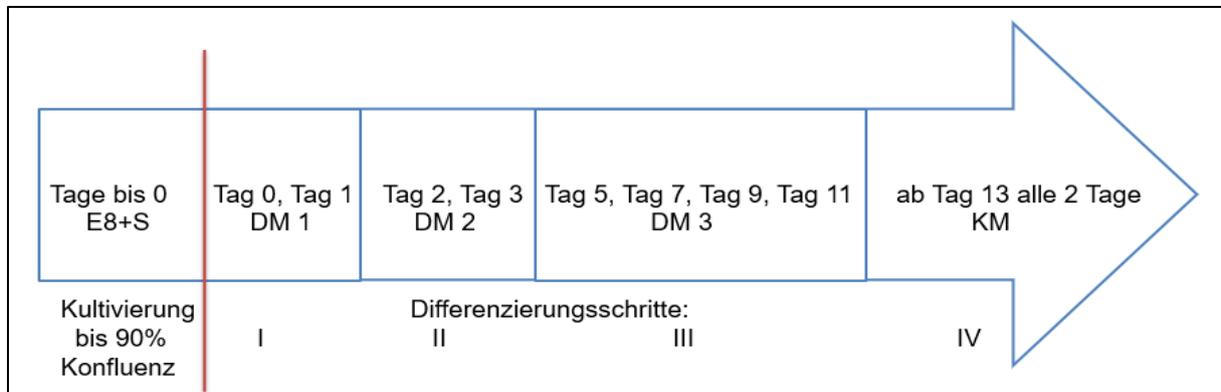
<b>Abbildung 26: pYAP / Total YAP-Proteinlevel nach 48h Angiotensin II Stimulation.....</b>	<b>57</b>
<b>Abbildung 27: TEAD-Proteinlevel nach 48h Angiotensin II Stimulation.....</b>	<b>58</b>
<b>Abbildung 28: ATII-R1-Proteinlevel nach 48h Angiotensin II Stimulation.....</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 29: Immunfluoreszenz der YAP Translokation nach 20min Angiotensin II Stimulation.....</b>	<b>60</b>
<b>Abbildung 30: Mitochondrienfunktion nach Lösungsmittel Stimulation.....</b>	<b>61</b>
<b>Abbildung 31: Mitochondrienfunktion nach verschiedenen Konzentrationen angiotensinerner Stimuli.....</b>	<b>62</b>
<b>Abbildung 32: Mitochondrienfunktion nach verschiedenen Kombinationen angiotensinerner Stimuli.....</b>	<b>63</b>
<b>Abbildung 33: Immunhistochemie von murinen Leber- und Milzgewebe.....</b>	<b>64</b>
<b>Abbildung 34: Immunhistochemie von murinen Herzgewebe.....</b>	<b>65</b>
<b>Abbildung 35: Schematische Darstellung der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit... </b>	<b>66</b>

## Anhang

### Materialien

Substanzen und Chemikalien zugehörig zum Punkt 4.1.2

### Differenzierungsprotokoll



### Differenzierungsmedien

Differenzierungsmedium	Substanzen
Differenzierungsmedium 1 (DM 1)	10 ml RPMI 4 µl BMP-4 2 µl Activin A 2 µl CHIR-99021 2 µl Y-27632 20 µl Acorbic Acid 100 µl B27 Minus Insulin
Differenzierungsmedium 2 (DM 2)	10 ml RPMI 3 µl BMP-4 40 µl Acorbic Acid 200 µl B27 Minus Insulin 2,5 µl IWP-2
Differenzierungsmedium 3 (DM 3)	10 ml RPMI 40 µl Acorbic Acid 200 µl B27 Supplement
Kardiales Medium (KM)	10 ml Knockout DMEM 300 µl Knockout Serum 100 µl L-Glutamin 50 µl Penicillin-Streptomycin

### Zusätze für die Differenzierungsmedien

Artikel	Hersteller	Katalognr.
Matrigel®	Corning, New York, USA	11543550
Essential 8 Supplement (S)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	A1517001
BMP-4	PeproTech, Rocky Hill, USA	120-05
CHIR-99021	Axon Medchem BV, Groningen, Niederlande	252917-06-9
Activin A	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada	78001
Y-27632	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada	72304
Acorbic Acid	Sigma Aldrich, St.Louis, USA	A92902
IWP-2	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, Kanada	sc-252928
B27 Minus Insulin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	A18956-01
B27 Supplement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	17504-044
L-Glutamin	Sigma Aldrich, St.Louis, USA	G8540
Penicillin-Streptomycin	Sigma Aldrich, St.Louis, USA	P4333

## Anhang

### Stimulanzen

Artikel	Hersteller	Katalognr.
Angiotensin II	Abcam, Cambridge, England	ab120183
Losartan	Cayman chemical, Ann Arbor, USA	10006594
PD123319	Cayman chemical, Ann Arbor, USA	16099
Adrenalin	Sigma Aldrich, St.Louis, USA	E4642
Dobutamin	Sigma Aldrich, St.Louis, USA	D0676
Propranolol	Sigma Aldrich, St.Louis, USA	P0884
Atenolol	Sigma Aldrich, St.Louis, USA	A7655

### RNA Analyse

Artikel	Hersteller	Katalognr.
β Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St.Louis, USA	M6250
70% Ethanol	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland (NucleoSpin® RNA Midi Kit)	740955.250
MDB		
DNase reaction mixture		
RA1		
RAW2		
RA3		
RNase-freies Wasser		
OligoPrimer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (cDNA Kit RevertAid First Strang Kit)	K1621
ReactionBuffer		
dNTP Mix		
RiboLock RNase-Inhibitor		
Reverse Transkriptase	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA	4309155
SYBR Green Master Mix		

### Proteinanalyse

Artikel	Hersteller	Katalognr.
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	8076
Proteaseinhibitor	BioVision, Milpitas, USA	K271
Phosphataseinhibitor	BioVision, Milpitas, USA	K273
Bradford Reagenz	Sigma Aldrich, St.Louis, USA	B6916
Acrylamid-Lösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	T802.1
10% SDS	BioRad, Hercules, USA	161-0416
TEMED	Sigma Aldrich, St.Louis, USA	T9281
10% APS	BioRad, Hercules, USA	161-0700
Biotinylierter Marker	Cell Signaling Technologies, Cambridge, England	7727S
Kaleidoskopmarker	BioRad, Hercules, USA	161-0375
Tween	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	9127.1
Chemilumineszenzkit	Merck Millipore, Burlington, USA	WBKLS0100
Stripping-Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	46430

### Immunfluoreszenz

Artikel	Hersteller	Katalognr.
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	KK44
Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	T161
Trypanblau	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA	T10282
DAPI - Höchst 33342	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA	H3570
Fluo-4-AM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	11504786
Tyrode Lösung	Sigma Aldrich, St.Louis, USA	T1788

### Immunhistochemie

Artikel	Hersteller	Katalognr.
Paraffin	Sigma Aldrich, St.Louis, USA	64742-51-4
Antigen-Retrieval Lösung	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA	15576276
WGA	AAT Bioquest, Sunnyvale, USA	25559
Mounting-Öl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	00-4958-02

## Anhang

### Puffer, Medien, Pulver und Lösungen

Artikel	Hersteller	Katalognr.
Dulbecco's Phosphate Buffer saline (PBS)	Sigma Aldrich, St.Louis, USA	D8537
Triton X-100 (T)	Sigma Aldrich, St.Louis, USA	X100
DMEM (1x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	41965-039
Essential 8 Basal Medium (E8)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	A1517001
RPMI Medium 1640 + L-Glutamine	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	11875-093
KnockOut™ DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	10829-018
KnockOut™ Serum Replacement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	A31815-02
ReLeSR™	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada	NC0729236
TrypLE™ Select Enzyme	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA	12563029
DMSO	Sigma Aldrich, St.Louis, USA	D2650
H2O	Sigma Aldrich, St.Louis, USA	W4502
RIPA	Sigma Aldrich, St.Louis, USA	20-188
SDS Laufpuffer	BioRad, Hercules, USA	161-0732
SDS Ladepuffer	BioRad, Hercules, USA	161-0747
1,5M Tris-HCL	BioRad, Hercules, USA	161-0798
0,5M Tris-HCL	BioRad, Hercules, USA	161-0799
Transferpuffer	BioRad, Hercules, USA	1610734
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	KK44
TBS	BioRad, Hercules, USA	1706435

### Verbrauchsmaterialien zugehörig zum Punkt 4.1.4

#### Zellkultur

Artikel	Hersteller	Katalognr.
Zellkulturflasche, 250ml, 75cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	658175
Zellkultur 12-Wellplatte	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	665180
Zellkultur 24-Wellplatte	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	662160
Zellkultur 96-Wellplatte	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	101085-004
Deckglas	MatTek, Ashland, USA	P24G
Zellschaber	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	541070
Pipette 5ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	606180
Pipette 10ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	607180
Pipette 25ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	760180

#### RNA Analyse

Artikel	Hersteller	Katalognr.
RNase-freie Tubes	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	AM12400
PCR tubes 0,2ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	0030124332
96 Well-Reaktionsplatte	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA	4346907
Abdeckfolie für 96 Wellplatte	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA	4311971
Pipettenspitze 10µl	Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland	S1111-3800
Pipettenspitze 200µl	Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland	S1111-0810
Pipettenspitze 1000µl	Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland	S11226-7810
Schreddersäule	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	740955.250
Isolationssäule		

#### Proteinanalyse

Artikel	Hersteller	Katalognr.
Eppendorftube	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	0030120086
96-Wellplatte	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	655101
Mini Protean Tetra Handcast System	BioRad, Hercules, USA	1658001FC
Blotting System Trans-Blot Cell	BioRad, Hercules, USA	1703825

## Anhang

Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, Chicago, USA	10600003
Filterpapier	Whatmann plc., Maidstone, England	3030917
Falcontube	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	0030122151
Einwegskalpell	Braun, Kronberg im Taunus, Deutschland	8508216

### Immunfluoreszenz / Immunhistochemie

Artikel	Hersteller	Katalognr.
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	11562203
Deckgläschen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	10513234

### Mitochondrienfunktionsmessung

Artikel	Hersteller	Katalognr.
Eppendorftube 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	0030120191
Auszählglas	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	C10228
Seahorse XFe96 Spheroid FluxPak	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	101085-004
Seahorse XF Cell Mito-Stresstest Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	103015-100

### Geräte und Software zugehörig zum Punkt 4.1.5

Gerätebezeichnung	Hersteller
Brutschrank (CO2 Incubator MCO-18AIC)	Sanyo, Osaka, Japan
Wasserbad	Grant Instruments, Cambridge, England
Kühlschrank Vitacool	Foron, Chemnitz, Deutschland
Kryofroster (Cryogenic freezer)	Arctiko, Esbjerg, Dänemark
Pipetboy	Integra Bioscience, Biebertal, Deutschland
Mehrkanalpipette	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lichtmikroskop (Axiovert25)	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Werkbank - Holten LaminAir	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NanoDrop2000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortex RS-VA 10	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
ThermoCycler (Mastercycler gradient)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (centrifuge 5415R)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (Coulter Allegra 21R)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Kühlzentrifuge Universal 30 RF	Hettich, Kirchlingern, Deutschland
qrtPCR (StepOnePlus RT PCR System)	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA
Zählgerät Countess II FL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ClarioStar	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Ultraschallgerät Sonoplus	BANDELIN electronic, Berlin, Deutschland
PowerSupply	BioRad, Hercules, USA
LAS4000	Quansys Bioscience Inc., Logan, USA
Seahorse Analyser XF96	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Konfokales Mikroskop LSM 510-Meta	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Konfokales Mikroskop LSM 900	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Analysenwaage AC 210 S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Mikrotom RM2125 RTS	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland

Software	Hersteller
Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
StepOne Software v2.3	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA
Wave 2.6	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
SigmaPlot 14.0	Systat Software Inc., San Jose, USA
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Albuquerque, USA
Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation, Albuquerque, USA
LSM Software Zen2012	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
MultiGauge	Fujifilm, Tokio, Japan

# Anhang

## Übersicht über alle ermittelten Daten

Herzfrequenz adrenerge Stimulation													
Herzfrequenz 3h Stimulation	Tag 9			Tag 28			24h Stimulation	Tag 9			Tag 28		
	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert		MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert
Kontrolle	69	9		72	7		Kontrolle	67	8		76	14	
Adrenalin 1µM	70	9	0,688	169	11	6,2E-13	Adrenalin 1µM	70	6	0,435	167	13	3,4E-10
Propranolol 1µM	69	8	0,877	43	5	8,2E-08	Propranolol 1µM	70	7	0,391	42	8	2,0E-05
Propranolol 1µM + Adrenalin 1µM	70	7	0,742	43	5	9,9E-08	Prop. 1µM + Adr. 1µM	70	10	0,547	44	5	1,9E-05

PCR Kardiomyogenese															
hiPSC Differenzierung	Oct3/4			Nanog			Brachyury			Gata4			MYH7		
	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert
Tag 0	1,00	0,31		1,00	0,09		0,00	0,00	0,001	0,00	0,00	0,072	0,00	0,00	0,040
Tag 2	0,68	0,17	0,275	0,39	0,11	3,7E-03	1,00	0,18		0,10	0,07	0,035	0,00	0,00	0,041
Tag 5	0,02	0,01	0,011	0,01	0,01	1,1E-04	0,00	0,00	0,001	1,00	0,40		0,00	0,00	0,041
Tag 9	0,07	0,04	0,014	0,05	0,06	2,5E-04	0,00	0,00	0,001	0,49	0,30	0,223	0,00	0,00	0,041
Tag 14	0,00	0,00	0,010	0,03	0,02	1,4E-04	0,00	0,00	0,001	0,48	0,21	0,182	0,14	0,10	0,066
Tag 28	0,00	0,00	0,010	0,01	0,00	1,1E-04	0,00	0,00	0,001	0,33	0,25	0,115	1,00	0,47	

hiPSC Differenzierung	NF2			MTS			LATS			YAP			TEAD		
	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert
Tag 0	1,00	0,15	0,037	1,00	0,24	0,072	1,00	0,31	0,095	1,00	0,09	6,6E-05	1,00	0,26	0,029
Tag 2	1,10	0,45	0,315	1,05	0,20	0,062	0,93	0,11	0,015	1,50	0,17	0,001	0,97	0,07	0,029
Tag 5	1,49	0,17		1,42	0,04		1,56	0,19		2,77	0,30		2,72	0,42	
Tag 9	1,03	0,39	0,201	0,90	0,36	0,111	1,84	0,04	0,107	2,57	1,01	0,755	1,59	0,60	0,038
Tag 14	1,02	0,30	0,130	0,63	0,08	2,4E-04	1,37	0,82	0,768	2,49	0,52	0,445	1,50	0,37	0,010
Tag 28	0,75	0,10	0,006	0,43	0,05	3,1E-05	0,44	0,18	0,004	1,46	0,43	0,005	0,78	0,10	0,029

hiPSC Differenzierung	CCN1			CCN2			hiPSC Diff.	α1-AR			α2-AR		
	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert		MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert
Tag 0	1,00	0,50		1,00	0,34		Tag 0	0,02	0,00		1,00	0,87	
Tag 2	0,04	0,02	0,029	0,06	0,01	0,003	Tag 9	1,00	0,38	0,029	0,98	0,46	0,976
Tag 5	0,46	0,22	0,138	0,54	0,28	0,122	Tag 14	1,02	0,58	0,025	1,23	0,59	0,716
Tag 9	0,21	0,10	0,036	0,14	0,04	0,005	Tag 28	0,73	0,40	0,053	0,78	0,43	0,701
Tag 14	0,46	0,33	0,170	0,38	0,29	0,053							
Tag 28	0,10	0,02	0,029	0,12	0,06	0,005							

hiPSC Differenzierung	β1-AR			β2-AR			AT II-R1			AT II-R2		
	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert
Tag 0	0,07	0,03	0,006	1,00	0,30		0,01	0,01		0,01	0,02	
Tag 9	0,04	0,02	0,005	0,65	0,36	0,240	0,02	0,01	0,009	0,05	0,05	0,052
Tag 14	0,11	0,05	0,008	0,67	0,51	0,377	0,17	0,12	0,010	1,00	0,69	0,091
Tag 28	1,00	0,68		1,08	0,44	0,806	1,00	0,58	0,024	0,57	0,32	0,016

PCR adrenerge Stimulation															
d28 48h Stimulation	NF2			MTS			LATS			YAP			TEAD		
	MW	±SD	P-Wert												
Kontrolle	1,00	0,12		1,00	0,19		1,00	0,44		1,00	0,30		1,00	0,69	
Adrenalin 1µM	1,27	0,40	0,401	1,24	0,48	0,550	1,24	0,75	0,722	1,23	0,31	0,489	0,85	0,47	0,819

d28 48h Stimulation	CCN1			CCN2		
	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert
Kontrolle	1,00	0,12		1,00	0,48	
Adrenalin 1µM	1,52	0,43	0,175	1,45	0,36	0,351

d28 48h Stimulation	α1-AR			β1-AR		
	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert
Kontrolle	1,00	0,39		1,00	0,24	
Adrenalin 1µM	0,70	0,10	0,245	2,76	0,24	0,002
Propranolol 1µM	1,18	0,18	0,488	1,28	0,27	0,336
Adrenalin 1µM+Propranolol 1µM	0,47	0,17	0,070	1,34	0,39	0,354

# Anhang

PCR angiotensinerge Stimulation																
<i>d9 48h Stimulation</i>	NF2			MTS			LATS			YAP			TEAD			
	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	
Kontrolle	1,00	0,51		1,00	0,45		1,00	0,38		1,00	0,27		1,00	0,39		
Angiotensin II 1µM	0,91	0,27	<b>0,787</b>	0,79	0,27	<b>0,520</b>	0,93	0,48	<b>0,873</b>	0,65	0,17	<b>0,105</b>	1,32	0,62	<b>0,568</b>	
Losartan 1µM	0,89	0,49	<b>0,802</b>	0,95	0,49	<b>0,901</b>	1,07	0,83	<b>0,925</b>	0,74	0,37	<b>0,367</b>	0,89	0,43	<b>0,801</b>	
<i>d28 48h Stimulation</i>	NF2			MTS			LATS			YAP			TEAD			
	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	
Kontrolle	1,00	0,37		1,00	0,16		1,00	0,16		1,00	0,08		1,00	0,09		
Angiotensin II 1µM	1,85	0,60	<b>0,082</b>	1,41	0,17	<b>0,069</b>	2,67	1,19	<b>0,052</b>	1,55	0,38	<b>0,121</b>	1,92	0,64	<b>0,049</b>	
Kontrolle	1,00	0,15		1,00	0,07		1,00	0,54		1,00	0,30		1,00	0,22		
Losartan 1µM	0,67	0,09	<b>0,016</b>	0,54	0,02	<b>7,93E-04</b>	0,39	0,09	<b>0,103</b>	0,46	0,13	<b>0,030</b>	0,31	0,03	<b>0,011</b>	
PD123319 1µM	0,87	0,30	<b>0,532</b>	0,80	0,17	<b>0,201</b>	0,74	0,28	<b>0,480</b>	0,93	0,53	<b>0,851</b>	0,55	0,24	<b>0,119</b>	
<i>d28 48h Stimulation</i>	AT II-R1									<i>d28 48h Stim.</i>			CCN2			
	MW	±SD	P-Wert							MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	
Kontrolle	1,00	0,24								Kontrolle	1,00	0,22				
Angiotensin II 1nM	3,86	1,38	<b>0,012</b>							Angiotensin II 1µM	1,46	0,47	<b>0,280</b>			
Angiotensin II 1µM	6,62	2,35	<b>0,006</b>							Kontrolle	1,00	0,16				
										Losartan 1µM	1,26	0,36	<b>0,412</b>			
										PD123319 1µM	1,04	0,34	<b>0,893</b>			
<i>d28 48h Stimulation</i>	AT II-R1			AT II-R2												
	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert										
Kontrolle	1,00	0,47		1,00	0,35											
Losartan 1nM	0,40	0,35	<b>0,045</b>	0,95	0,31	<b>0,807</b>										
Westernblot Kardiomyogenese																
<i>hiPSC Differenzierung</i>	SOX2			Nanog			HCN4			MCH						
	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert				
Tag 0	1,00	0,11		1,00	0,29		0,14	0,03	<b>0,017</b>	0,37	0,19	<b>0,021</b>				
Tag 2	0,25	0,09	<b>0,002</b>	1,10	0,64	<b>0,821</b>	0,26	0,13	<b>0,035</b>	0,44	0,15	<b>0,025</b>				
Tag 5	0,15	0,10	<b>0,001</b>	0,80	0,43	<b>0,542</b>	0,27	0,10	<b>0,033</b>	0,73	0,21	<b>0,466</b>				
Tag 9	0,21	0,21	<b>0,010</b>	0,70	0,34	<b>0,293</b>	0,72	0,25	<b>0,380</b>	1,00	0,31	<b>0,514</b>				
Tag 14	0,16	0,18	<b>0,005</b>	0,39	0,23	<b>0,069</b>	1,00	0,31		0,86	0,19					
Tag 28	0,04	0,02	<b>2,9E-04</b>	0,26	0,14	<b>0,058</b>	0,72	0,28	<b>0,400</b>	0,62	0,26	<b>0,258</b>				
<i>hiPSC Differenzierung</i>	pYAP / YAP			TEAD			ATII-R1									
	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert							
Tag 0	0,60	0,47	<b>0,261</b>	0,18	0,10	<b>0,030</b>	0,38	0,37	<b>0,131</b>							
Tag 2	0,16	0,05	<b>0,771</b>	0,33	0,03	<b>0,048</b>	0,37	0,18	<b>0,085</b>							
Tag 5	0,28	0,09		1,00	0,34		0,53	0,34	<b>0,214</b>							
Tag 9	0,33	0,11	<b>0,743</b>	0,50	0,27	<b>0,175</b>	0,67	0,16	<b>0,293</b>							
Tag 14	0,36	0,19	<b>0,593</b>	0,33	0,34	<b>0,118</b>	0,82	0,36	<b>0,610</b>							
Tag 28	1,00	0,75	<b>0,087</b>	0,13	0,05	<b>0,022</b>	1,00	0,49								
Westernblot angiotensinerge Stimulation																
<i>d28 48h Stimulation</i>	pYAP			Total YAP			TEAD			ATII-R1						
	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert				
Kontrolle	1,00	0,26		1,00	0,26		0,56	0,35		0,73	0,12					
Angiotensin II 1µM	0,53	0,16	<b>0,006</b>	0,79	0,34	<b>0,425</b>	1,00	0,47	<b>0,092</b>	1,00	0,33	<b>0,083</b>				
Mitochondrienfkt angiotensinerge Stimulation																
<i>Energiestoffwechsel</i>	Basal Respiration			Maximal Respiration			Proton Leak			ATP Production			Spare Respiratory Capacity			
	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	
ohne Lösungsmittel	43,9	12,3		61,7	14,2		4,4	2,0		39,5	10,3		17,8	2,7		
mit Lösungsmittel	44,3	5,6	<b>0,964</b>	61,5	9,5	<b>0,983</b>	4,7	0,8	<b>0,855</b>	39,6	4,8	<b>0,985</b>	17,2	4,3	<b>0,841</b>	
<i>Energiestoffwechsel</i>	Basal Respiration			Maximal Respiration			Proton Leak			ATP Production			Spare Respiratory Capacity			
	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	
Lösungsmittelkontrolle	44,3	5,6		61,5	9,5		4,7	0,8		39,6	4,8		17,2	4,3		
Angiotensin II 1 µM	58,8	3,9	<b>0,005</b>	100,8	10,1	<b>0,002</b>	5,8	1,8	<b>0,167</b>	52,9	4,0	<b>0,024</b>	42,0	9,9	<b>0,008</b>	
Angiotensin II 100 µM	28,4	6,9	<b>0,019</b>	41,2	15,0	<b>0,102</b>	3,6	1,6	<b>0,347</b>	24,9	5,5	<b>0,010</b>	12,8	11,7	<b>0,598</b>	
<i>Energiestoffwechsel</i>	Basal Respiration			Maximal Respiration			Proton Leak			ATP Production			Spare Respiratory Capacity			
	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	MW	±SD	P-Wert	
Lösungsmittelkontrolle	37,0	5,6		49,6	7,1		5,0	1,4		32,0	5,6		12,6	5,2		
Losartan + PD + Lösungsmittel	32,8	12,8	<b>0,563</b>	42,6	18,5	<b>0,499</b>	3,7	2,5	<b>0,389</b>	29,1	10,3	<b>0,636</b>	9,8	6,4	<b>0,521</b>	
Losartan + PD + Angiotensin II	44,9	12,7	<b>0,273</b>	50,3	15,8	<b>0,936</b>	5,3	2,8	<b>0,875</b>	39,6	10,0	<b>0,202</b>	5,4	5,0	<b>0,065</b>	
PD123319 + Angiotensin II	36,1	6,7	<b>0,827</b>	53,5	15,8	<b>0,649</b>	3,1	1,5	<b>0,082</b>	33,0	5,2	<b>0,787</b>	17,5	12,4	<b>0,474</b>	
Angiotensin II	73,3	15,4	<b>0,002</b>	117,8	36,2	<b>0,006</b>	11,3	4,3	<b>0,025</b>	62,0	12,7	<b>0,003</b>	44,5	26,2	<b>0,044</b>	
Losartan + Angiotensin II	56,2	12,5	<b>0,031</b>	85,1	23,2	<b>0,073</b>	5,7	2,2	<b>0,646</b>	50,5	10,8	<b>0,023</b>	29,0	10,8	<b>0,034</b>	

### Danksagung

Mir hat die Zeit im Labor sehr viel Spaß gemacht. Ich durfte mir selbst viele Gedanken machen und Experimente in Eigenregie planen. Dafür möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Christian Schulze, dem Arbeitsgruppenleiter und Mentor des Projekts, für die Unterstützung bedanken. Er unterstützte mich bei der Einreichung der Abstracts zum 86. und 87. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie und ermutigte mich einen Teil der Ergebnisse als Coautor im Journal „*Basic Research in Cardiology*“ zu publizieren.

An dieser Stelle möchte ich mich auch herzlich bei Herrn Dr. Mohamed Bekhite bedanken. Er gab mir die Möglichkeit, das faszinierende Thema zu bearbeiten und stand bei Fragestellungen aller Art und zu jeder Uhrzeit zur Verfügung. Ohne seine Vorarbeiten auf dem Thema der hiPSC derived cardiomyocytes wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen.

Meine Wertschätzung geht gleichermaßen an das Laborteam, vor allem an Beate Schulze, Martina Voigt, Jasmine Wu und Tom Kretschmar, welche zum zügigen Voranschreiten meiner Arbeit beitrugen und mich vor allem bei der methodischen Ausführung unterstützten.

Einen besonderen Dank möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Antje und Bernd Menz, aussprechen. Die beiden haben mich in allen Lebenslagen unterstützt und mir durch ihre aufopferungsvolle Art alle Möglichkeiten gegeben, die Schule, den Leistungssport, das Studium und die Promotion bestmöglich abzuschließen. Meine Brüder Robert und Benedikt konnte ich ebenfalls jederzeit um Hilfe bitten.

Letztlich möchte ich auch meiner Freundin Olivia Hoffmann danken. Trotz zahlreicher Nachtschichten im Labor wurde ich immer liebevoll unterstützt und zu jeder Zeit motiviert, durchzuhalten und weiterzumachen.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Herr Prof. Dr. med. Christian Schulze,

Herr Dr. Mohamed Bekhite,

Frau Jasmine Wu

Herr Tom Kretschmar

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 07.02.2023

**Ort, Datum**

**Unterschrift des Verfassers**