

Aus der
Klinik für Herzchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

Etablierung von dreidimensionalen Zellkulturmodellen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Lotte Anna Görtz

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Hug Aubin

Zweitgutachter: Prof. Jörg Distler

*Diese Arbeit ist für einen besonders wertvollen Menschen in meinem Leben.
Für meine Oma Dinie.*

Teile dieser Arbeit wurden als Vortrag im Rahmen der 52. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie präsentiert:

„3D spheroid model for the investigation of the inflammatory role of smooth muscle cells in cardiovascular diseases”, L. A. Görtz, U. Resch, L. M. Schmidt, M. Saynisch, S. Müller, J.-W. Lackmann, M. Cappallo, M. Hayungs, R. Batool, S. Bayraktar, V. Schmidt, M. Krueger, A. Lichtenberg, E. Weber, H. Aubin.

Abstract veröffentlicht in: The Thoracic and Cardiovascular Surgeon 71.S 01 (2023): DGTHG-V34

1 Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind weltweit die häufigste Todesursache und fordern demnach die Entwicklung neuer Forschungsmodelle zur Untersuchung krankheitsrelevanter Prozesse. Da Krankheitsprozesse *in vivo* im dreidimensionalen Raum ablaufen, gewinnen dreidimensionalen Gewebe- und Organstrukturen (Sphäroide/Organoide) als realitätsnahe Modelle für die Forschung zunehmend an Bedeutung. Das Herz konnte bereits als Kardiodium aus humanen pluripotenten Stammzellen generiert werden. Ziel dieser Arbeit ist zunächst eine Literaturrecherche bezüglich bereits etablierter Protokolle zur Kardiodium-Generierung, ein tabellarischer Vergleich der dazu genutzten Methoden und Materialien und anschließend die Generierung von Kardiodien aus mesenchymalen Stammzellen aus viszeralem Rattenfettgewebe. Eine Generierung dieser Kardioide, basierend auf dem Protokoll von Hofbauer et al. [1], war erfolglos, sodass Anpassungen des Protokolls vorgesehen sind, um es in Zukunft auch auf humane mesenchymale Stammzellen übertragen zu können. Dies könnte personalisierte Medizin ermöglichen, etwa Kardioide aus Zellen herzkranker Patienten zu gewinnen und diese auf Entstehung sowie Therapien von Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu untersuchen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Generierung von Sphäroiden aus Glattmuskelzellen, da Glattmuskelzellen bei Entzündungsprozessen ihren Phänotypen verändern und so die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen beeinflussen können. Da die entsprechenden Pathomechanismen noch nicht vollständig aufgedeckt sind, sollen diese Glattmuskelzell-Sphäroide als zukünftiges Forschungsmodell dienen. Es ist gelungen, Glattmuskelzell-Sphäroide zu generieren und diese mittels Mikroskopie-Analysen und einer *Proteomics*-Analyse mit der 2D-Zellkultur zu vergleichen. Es zeigte sich eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung je nach Zellkulturmodell. Proteine der extrazellulären Matrix wiesen im 3D-Modell beispielsweise eine signifikant höhere Proteinabundanz auf, was der *in vivo*-Situation ähnelt. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der Zellkulturmodelle im Hinblick auf deren Proteinzusammensetzung nach Stimulation mit einem inflammatorischen Reiz. In Zukunft müssen weiterführende Experimente durchgeführt werden, um zu analysieren, ob das 3D-Modell die *in vivo*-Situation adäquater widerspiegelt als das 2D-Modell.

2 Summary

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide and therefore require the development of new research models for investigating disease-related processes. Since disease processes occur in vivo in three-dimensional space, three-dimensional tissue and organ structures (spheroids/organoids) are becoming increasingly important as realistic models for research. The heart has already been generated as a cardioid from human pluripotent stem cells. The aim of this work is first to conduct a literature search on established protocols for cardioid generation, to compare the methods and materials used in a table, and then to generate cardioids from mesenchymal stem cells from visceral rat adipose tissue. Generation of these cardioids based on the protocol of Hofbauer et al. [1] was unsuccessful, so adjustments to the protocol are planned in order to be able to transfer it to human mesenchymal stem cells in the future. This could enable personalised medicine, for example, obtaining cardioids from cells of patients with heart disease and examining them for the development and treatment of cardiovascular diseases.

Another goal of this work is to generate spheroids from smooth muscle cells, as smooth muscle cells change their phenotype during inflammatory processes and can thus influence the development of cardiovascular diseases. Since the corresponding pathomechanisms have not yet been fully elucidated, these smooth muscle cell spheroids are to serve as a future research model. We succeeded in generating smooth muscle cell spheroids and comparing them with 2D cell culture using microscopy analyses and proteomics analysis. The results showed a different protein composition depending on the cell culture model. For example, extracellular matrix proteins showed significantly higher protein abundance in the 3D model, which is similar to the in vivo situation. In addition, the cell culture models were compared in terms of their protein composition after stimulation with an inflammatory stimulus. Further experiments will need to be conducted in the future to analyse whether the 3D model reflects the in vivo situation more adequately than the 2D model.

3 Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AmpB	Amphotericin B
ASCs	<i>adipose-derived stem cells</i>
BMP4	<i>bone morphogenic protein 4</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL2	<i>CC-chemokine ligand 2</i>
CD11b	Integrin alpha M
CD68	Macrosialin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
E8	Essential 8 Medium
ECM	extrazelluläre Matrix
EVTs	<i>Engineered Vascular Smooth Muscle Cell Tissue</i>
F4/80	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>
F12	Nährstoffmischung F-12
FC	<i>Fold change</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGF2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
g	Gramm

GMZ	Glattmuskelzellen
HCFs	<i>Human cardiac fibroblasts</i>
HCMECs	<i>Human cardiac microvascular endothelial cells</i>
HDFBs	<i>Human dermal fibroblasts</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
hiPSCs	<i>Human induced pluripotent stem cells</i>
hiPSC-CMs	<i>Human induced pluripotent stem cell- derived cardiomyocytes</i>
hiPSC-ECs	<i>Human induced pluripotent stem cell- derived endothelial cells</i>
HPCFs	<i>Human primary cardiac fibroblasts</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL-1 β	Interleukin-1-beta
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
iPSC-CMs	<i>induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes</i>
IWP2	<i>Inhibitor of Wnt Production-2</i>
IWP4	<i>Inhibitor of Wnt Production-4</i>
<i>LFQ-intensity</i>	<i>Label-free quantification-intensity</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	<i>Laser-Scanning-Mikroskop</i>

mESCs	<i>mouse embryonic stem cells</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ml	Milliliter
n	Anzahl
ng	Nanogramm
PI3K/AKT	Phosphoinositid-3-Kinase/Protein Kinase B
P/S	Penicillin/Streptomycin
Rcf	<i>relative centrifugal force</i>
Rocki	ROCK Inhibitor Y-27632
ROCKs	<i>Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinases</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
SVF	stromale vaskuläre Fraktion
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TLR4	<i>Toll-like</i> Rezeptor 4
U	<i>Unit</i>
ULA	<i>Ultra low attachment</i>
VEGF-A	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
Vs	<i>versus</i>
Wnt	<i>Wingless/int1</i>
Wnt-C59	<i>Porcn Inhibitor II</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zellkulturmodelle in der biomedizinischen Forschung	1
1.2	Zweidimensionale Zellkultur	1
1.3	Dreidimensionale Zellkultur	2
1.4	Gerüstbasierte und gerüstfreie dreidimensionale Zellkulturmodelle	3
1.4.1	Gerüstbasierte dreidimensionale Zellkulturmodelle	3
1.4.2	Gerüstfreie dreidimensionale Zellkulturmodelle	4
1.5	Proteine und Signalwege	4
1.6	Herzgewebe in 3D	7
1.7	Klinische Relevanz kardialer Organoide	7
1.8	Modulation von Signalwegen zur kardialen Organoid-Generierung	8
1.9	Vaskuläre Glattmuskelzellen – Ursprung und Funktion	9
1.10	Phänotyp-Wechsel von vaskulären Glattmuskelzellen	10
1.11	Makrophagen-ähnliche Glattmuskelzellen	10
1.12	Klinische Relevanz des Phänotyp-Wechsels von Glattmuskelzellen zu Makrophagen-ähnlichen Glattmuskelzellen	11
2	Ziele der Arbeit	12
3	Material	13
3.1	Versuchstiere	13
3.2	Verbrauchsmaterialien (Tabelle 1)	13
3.3	Reagenzien, Lösungen und Antikörper (Tabelle 2)	14
3.4	Geräte (Tabelle 3)	15
4	Methoden	15
4.1	Literaturrecherche	15
4.2	Matrix zum Vergleich von Methoden zur Generierung von Herzgewebe	16
4.3	Isolation der stromalen vaskulären Fraktion aus viszeralem Rattenfettgewebe	16
4.4	3D-Kultivierung der ASCs der stromalen vaskulären Fraktion	16
4.5	Differenzierung von ASCs-Zellaggregaten zu Kardioiden	17
4.6	Isolation von Glattmuskelzellen aus einer Rattenaorta	17
4.7	2D- und 3D-Zellkultur von Glattmuskelzellen	18
4.8	Stimulation von Glattmuskelzellen mit LPS	18
4.9	Immunfluoreszenz-Färbung von Glattmuskelzellen	19
4.10	Kultivierung und Stimulation von Glattmuskelzellen für die <i>Proteomics</i> -Analyse	19

4.11	Statistische Analyse	20
5	Ergebnisse	20
5.1	Modelle zur Generierung von Herzgewebe	20
5.2	Vergleich von gerüstfreien, kardialen Organoid-Modellen	23
5.3	Besseres Wachstum der Zellen der stromalen vaskulären Fraktion bei 0,05% BSA.....	29
5.4	Versuch der Generierung von kardialen Organoiden	30
5.5	Lichtmikroskopie-Aufnahmen von unstimulierten und mit LPS stimulierten Glattmuskelzellen in 2D- und 3D-Kultur	31
5.6	Kein Nachweis von F4/80 in der 2D-Glattmuskelzellkultur	32
5.7	Nachweis von F4/80 in Glattmuskelzell-Sphäroiden	33
5.8	Klassische Glattmuskelzell-Marker in 2D- und 3D-Kultur	34
5.9	Hauptkomponentenanalyse.....	35
5.10	Veränderungen der Proteinabundanz zwischen unstimulierten und mit LPS stimulierten Glattmuskelzellen.....	37
5.11	Signifikante Unterschiede in der Proteinzusammensetzung in 2D und 3D	39
5.12	Höhere Proteinabundanz von Aktininen, Myosinen und Integrinen in der 2D-Zellkultur	42
5.13	Niedrigere Proteinabundanz von ECM-assoziierten Proteinen in der 2D- Zellkultur	43
5.14	Proteine mit ähnlicher Proteinabundanz in der 2D- und 3D-Zellkultur ...	45
6	Diskussion	47
6.1	Vergleich von Modellen zur Generierung von kardialen Organoiden und der entsprechenden Modulation von Signalwegen	47
6.2	Erste Versuche der Generierung von kardialen Organoiden aus ASCs der SVF von viszeralem Rattenfettgewebe	49
6.3	Sphäroide aus Glattmuskelzellen	52
6.4	Phänotyp-Wechsel der Glattmuskelzellen nach inflammatorischer Stimulation.....	55
6.5	Limitationen dieser Arbeit.....	57
7	Schlussfolgerung	58
8	Literaturverzeichnis	60
9	Tabellenverzeichnis.....	65
10	Abbildungsverzeichnis	65

1 Einleitung

1.1 Zellkulturmodelle in der biomedizinischen Forschung

Zellkulturmodelle sind seit Jahrzehnten ein unverzichtbares Instrument in der biomedizinischen Forschung. Sie ermöglichen die gezielte Untersuchung von sowohl physiologischen als auch pathophysiologischen zellulären Prozessen unter kontrollierten Bedingungen. Traditionell werden Zellen in zweidimensionalen Zellkulturen kultiviert, jedoch gewinnen dreidimensionale Zellkulturmodelle zunehmend an Bedeutung, da diese die natürliche Zellumgebung *in vivo* besser widerspiegeln und folglich zu realitätsnäheren Ergebnissen führen können. Auch in der kardiovaskulären Forschung werden Zellkulturmodelle zunehmend genutzt, um Pathomechanismen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen auf zellulärer Ebene zu analysieren und neue diagnostische und therapeutische Ansätze zu entwickeln. Die in dieser Arbeit thematisierten Kardioide zählen zu den dreidimensionalen Zellkulturmodellen, die das Herz als Organ für Forschungszwecke widerspiegeln sollen.

1.2 Zweidimensionale Zellkultur

Die Kultivierung von Zellen in zweidimensionaler Zellkultur ist eine seit Jahrzehnten angewendete Methode, um Zellen unter kontrollierten Bedingungen wachsen zu lassen und sie anschließend für Forschungszwecke zu nutzen. Die Zellen werden hierbei auf einer planaren Oberfläche kultiviert, nehmen eine flache und längliche Form an und wachsen in einer einzigen Schicht [2, 3].

Ein Vorteil der 2D-Zellkultur besteht darin, dass durch das einschichtige Wachsen in einer planaren Ebene die Nährstoffe und Wachstumsfaktoren aus dem Nährmedium gleichmäßig auf alle Zellen verteilt werden [2, 3] und die meisten Zellen sich dementsprechend im gleichen Entwicklungsstadium befinden [2]. Zusätzlich ist diese Methode preislich günstig [2, 3].

Nachteilig ist jedoch, dass die Zell-Zell-Kontakte die *in vivo*-Situation weniger genau repräsentieren [2, 3], die Zellproliferationsrate unnatürlich schnell ist [2, 3] und es Abweichungen in der Gen- und Proteinexpression im Vergleich zu *in vivo*-

Modellen gibt [2]. Aufgrund der unnatürlichen Umgebung reagieren die Zellen zudem anders auf mechanische Reize als Zellen *in vivo* [2].

Insgesamt ist es der 2D-Zellkultur nicht möglich, die komplexe *in vivo*-Physiologie nachzuahmen [3].

1.3 Dreidimensionale Zellkultur

Die Kultivierung von Zellen in einer dreidimensionalen Zellkultur ist eine immer populärer werdende Methode in den Forschungslaboren. Hier entsprechen Zellform und Zellwachstum den natürlichen Bedingungen [2, 3]. Die Zellen ordnen sich zu 3D-Aggregaten, den sogenannten Sphäroiden, an. Wenn ein Sphäroid mehrere für ein Organ spezifische Zelltypen in typischer räumlicher Anordnung enthält und bestimmte organotypische Funktionen ausführen kann, wird dieses als Organoid bezeichnet [2, 4, 5].

Vorteile der 3D-Zellkultur bestehen darin, dass die regelrechten Zell-Zell-Kontakte eine gute intrazelluläre Kommunikation ermöglichen, die Zellen gut differenziert sind und die Proliferationsrate der Situation *in vivo* entspricht [2, 3]. Die Gen- und Proteinexpression ist ähnlich der von *in vivo*-Modellen und die Zellen reagieren akkurat auf mechanische Reize [2].

Nachteilig ist in der 3D-Zellkultur jedoch, dass die Nährstoffe und Wachstumsfaktoren aus dem Kultivierungsmedium ungleichmäßig auf die Zellen verteilt werden [3], sodass die Zellen im Inneren des Sphäroids oft inaktiv sind [2] und die Zellproliferation in der Peripherie der 3D-Struktur höher ist [6]. Nährstoffe, Sauerstoff und Wachstumsfaktoren erreichen die Zellen im Inneren des Sphäroids durch Diffusion, weshalb diese Substanzen den Kern des Sphäroids, je größer dieser ist, schwer erreichen, da die Sphäroid-Größe den Diffusionsgradienten beeinflusst [7]. Um größere Sphäroide generieren zu können, müssten diese 3D-Systeme über eine Vaskularisierung verfügen, um auch die Zellen im Inneren des Sphäroids ausreichend mit Sauerstoff sowie Nährstoffen zu versorgen. Diese Vaskularisierung würde die Entwicklung der Zellen im Kern des Sphäroids zu gewebeähnlichen Strukturen fördern und ihr Überleben sichern, sodass sie, wie die Zellen in der Peripherie der 3D-Struktur, funktionsfähig sind [8, 9].

Ein weiterer Nachteil sind die hohen Kosten der 3D-Zellkultur [2, 3].

Insgesamt hat die Organoid-Technologie ein großes Potenzial für die Modellierung von Krankheiten. Aufgrund der Einschränkungen dieser 3D-Modelle, ist es jedoch derzeit am besten, eine Kombination von 2D- und 3D-Zellkulturmodellen in Verbindung mit humanisierten Tiermodellen zu nutzen, um die molekularen Mechanismen hinter humanen Erkrankungen umfassend und zuverlässig zu verstehen [8].

1.4 Gerüstbasierte und gerüstfreie dreidimensionale Zellkulturmodelle

Bei den dreidimensionalen Zellkulturmodellen wird zwischen gerüstbasierten (*scaffold-based*) und gerüstfreien (*scaffold-free*) Modellen unterschieden. Im Gegensatz zu den gerüstfreien Zellkulturmodellen besitzen die gerüstbasierten Zellkulturmodelle zwischen den einzelnen Zellen eine Nachahmung der sogenannten extrazellulären Matrix (ECM). Die ECM sowie Vor- und Nachteile werden im Folgenden erläutert. In dieser Arbeit wurde der Fokus für die Generierung von dreidimensionalen Zellkulturmodelle in Form von Kardioiden und Glattmuskelzell-Sphäroiden auf die gerüstfreien Zellkulturmodelle gelegt.

1.4.1 Gerüstbasierte dreidimensionale Zellkulturmodelle

Bei den gerüstbasierten Modellen sollen Gewebe generiert werden, die durch Unterstützung eines natürlichen oder synthetischen Gerüsts die natürliche feste extrazelluläre Matrix nachahmen [10].

Als ECM wird in Geweben und Organen die nicht-zelluläre Komponente bezeichnet, die das physische Gerüst für Zellen bildet und die Morphogenese, Differenzierung sowie Homöostase von Geweben durch biochemische und biomechanische Signale fördert [11].

Zur Nachahmung der ECM können beispielsweise synthetische oder natürliche Hydrogele verwendet werden. Letztere werden meist aus natürlichen Polymeren wie Fibrinogen, Hyaluronsäure, Kollagen, Matrigel, Gelatine, Chitosan und Aginat hergestellt [2]. Häufig werden zelladhärente Hydrogele zur Bildung der Gerüste verwendet, die ähnliche Funktionen wie die native ECM besitzen [10, 11].

Vorteilhaft an dieser gerüstbasierten Methode ist, dass das Zellüberleben und die Differenzierung der Zellen verbessert wird [10, 12].

Herausforderungen sind jedoch, dass Hydrogele die Nährstoffdiffusion einschränken können, zu einer allgemeinen Heterogenität bei der Gewebezüchtung führen können [10, 13] oder zytotoxisch für die 3D-Zellkultur sind [10, 14].

1.4.2 Gerüstfreie dreidimensionale Zellkulturmodelle

Bei den gerüstfreien Modellen soll Gewebe ohne unterstützendes Gerüstmaterial geschaffen werden. Hierzu werden beispielsweise die Technik des hängenden Tropfens, magnetische Levitation, Bioreaktoren mit Rührwerk oder auch *Ultra-low-attachement* (ULA-)Platten genutzt, um Sphäroide zu generieren. Alle Techniken zwingen die Zellen zu einer Aggregation und führen zur Bildung von Zellaggregaten in Form von Sphäroiden [10].

Der Vorteil dieser gerüstfreien Methoden besteht darin, dass hunderte bis tausende selbstorganisierte Sphäroide innerhalb von 24 Stunden generiert werden können, die das Potenzial haben, Gewebeeigenschaften zu imitieren [10].

Der Nachteil dieser gerüstfreien Modelle besteht jedoch darin, dass einige Zelltypen ohne das Vorhandensein eines Gerüsts, das die ECM imitiert, nicht überlebensfähig sind [10].

In dieser Arbeit wurde die Nutzung von ULA-Platten zur Sphäroid-beziehungsweise Organoid-Generierung gewählt, da diese Technik leicht in der Handhabung ist, geringe Kosten verursacht und eine gute Reproduzierbarkeit aufweist.

1.5 Proteine und Signalwege

Zellen und Gewebe besitzen Strukturproteine, die ihnen Stabilität aber auch Elastizität verleihen sowie Membranproteine, die eine Interaktion der Zellen miteinander und mit der, die Zellen umgebenen, extrazellulären Matrix ermöglichen. Im Folgenden werden einige dieser Proteine kurz in ihrer Funktion

erläutert, da im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden soll, ob bei diesen Proteinen ein Unterschied bezüglich der Proteinabundanz zwischen einer Glattmuskelzell-Kultur im zweidimensionalen und dreidimensionalen Zellkulturmodell besteht.

Aktinine, Myosine, Integrine und Kollagene sind Proteine, die in verschiedenen Geweben und Zellen vorkommen.

Zellen benötigen ihr Aktin-Zytoskelett unter anderem für die Zellteilung, Adhäsion und Migration [15]. Aktinine zählen zu den Aktin-Vernetzungsproteinen und fungieren als Stabilisatoren für das Zellgerüst [15]. Vor allem die Isoformen Aktinin-Alpha-1 und Aktinin-Alpha-4 sind wichtig für die Zytokinese und Zellmotilität [15].

Myosine sind unter anderem ein wichtiger Bestandteil von Muskelzellen und ermöglichen deren Kontraktion [16, 17]. Sogenannte Nicht-Muskel-Myosine haben einen Einfluss auf die Zytokinese, Zellmigration, Zelladhäsion, Aufrechterhaltung der Zellform und die Signaltransduktion [18]. Die schweren Ketten dieser Nicht-Muskel-Myosine werden von den Proteinen Myosin-9, Myosin-10 und Myosin-14 gebildet [18].

Integrine sind Proteine, die in der Zellmembran präsent sind und eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und dem Zellüberleben spielen [19]. Sie erkennen Änderungen in der Zellumgebung und können diese an andere Zellen übertragen [19]. Zu diesen Integrinen zählen beispielsweise Integrin-Alpha-1, Integrin-Alpha-V, Integrin-Beta-1 und Integrin-Beta-6 [19].

Kollagene sind Proteine, die für die strukturelle Integrität von Zellen in Geweben sorgen [20]. Kollagene zählen, wie auch Fibronectin, Thrombospondin 4 und Vitronectin, zu Zellen der ECM [20-23]. Diese Proteine beeinflussen als Bestandteile der ECM die mechanische Belastbarkeit, Festigkeit und Elastizität von Zellen und Geweben sowie die Zellkommunikation und Zellsignalgebung [24].

Neben weiteren Proteinen sind die oben genannten Proteine Komponenten von bestimmten Signalwegen beziehungsweise spezialisierten Strukturen, die sich

auf die Zellmorphologie, Zell-Zell- und Zell-ECM-Interaktionen beziehen. Im Folgenden werden vier dieser Signalwege und spezialisierten Strukturen, die für die Signalweiterleitung wichtig sind, erläutert, da diese ebenfalls im Hinblick auf Unterschiede zwischen der 2D-Glattnuskelzell-Kultur und 3D-Glattnuskelzell-Kultur untersucht werden sollen.

Fokale Adhäsionen (*Focal Adhesions*) sind spezialisierte Strukturen von Zellen, die wichtig für die Zelladhäsion und Zellmigration sind, da Zellen sich über fokale Adhäsionen an die ECM binden können, um so mit anderen Zellen zu interagieren [25]. Fokale Adhäsionen haben einen Einfluss auf die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und das Überleben von Zellen [25]. Proteine, die an den fokalen Adhäsionen beteiligt sind, sind beispielsweise Aktinine, Integrine und Proteine der ECM [26].

Die Regulation des Aktin-Zytoskeletts (*Regulation of actin cytoskeleton*) ist ein essenzieller Prozess für die Zellformgebung, Zellmigration und Zellteilung [18]. Die Zellformgebung und Zellbewegung wird durch die Kontraktion von Aktinfilamenten, die durch Myosine aktiviert werden, beeinflusst [18]. Proteine, die an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sind, sind beispielsweise Aktinine, Integrine, Myosine und Nicht-Muskel-Myosine [15, 18, 24].

ECM-Rezeptor-Interaktionen (*ECM-receptor-interactions*) bezeichnen Interaktionen zwischen Proteinen der ECM und Oberflächenrezeptoren von Zellen [27]. Zellen benötigen derartige Interaktionen für die Zelladhäsion, Migration, Differenzierung und das Zellüberleben [27]. Hierbei sind Integrine wichtige Oberflächenrezeptoren von Zellen, die mit ECM-Proteinen wie Kollagen, Fibronectin und Laminin interagieren können [24].

Tight Junctions sind Verknüpfungsstellen zwischen Zellen, die eine Barrierefunktion besitzen und den Durchtritt von Molekülen und Ionen zwischen Zellen regulieren [28, 29]. Zu den Proteinen, die *Tight Junctions* ausbilden, zählen beispielsweise Claudine und Occludine aber auch Aktinine, Integrine und Nicht-Muskel-Myosine [28, 29].

1.6 Herzgewebe in 3D

Mittlerweile besteht die Möglichkeit, menschliche Organe als Organoide aus pluripotenten Stammzellen zu rekonstruieren, um die zelluläre Mikroumgebung und die *in vivo*-Physiologie des Gewebes nachzuahmen [30]. Neben Organoiden des Gehirns, der Lunge, der Leber und vielen weiteren, ist es bereits gelungen, das Herz als Organoid zu rekonstruieren [30]. Diese Rekonstruktion des Herzens als Organoid erfolgte meist unter Verwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs). Das Herz kann in der Zellkultur auch in Form eines Sphäroids oder Herzpflasters rekonstruiert werden. Eine weitere Methode, das Herz als 3D-Konstrukt zu generieren, ist die Verwendung eines 3D-Druckers. Da der Fokus dieser Arbeit auf der Generierung von Kardioden unter gerüstfreien Bedingungen liegt, werden verschiedene, bereits etablierte Modelle zur Generierung kardialer Organoide unter gerüstfreien Bedingungen anhand verwendeter Materialien, beschriebener Methoden und Merkmale der resultierenden Organoide tabellarisch miteinander verglichen.

In dieser Arbeit soll das Herz als Organoid unter Verwendung von, aus viszeralem Rattenfettgewebe gewonnenen mesenchymalen Stammzellen, rekonstruiert werden. Diese Stammzellen befinden sich in der stromalen vaskulären Fraktion (SVF) des viszeralen Fettgewebes, die neben den Stammzellen noch weitere Zelltypen wie beispielsweise Endothelzellen, Makrophagen, Lymphozyten, Glattmuskelzellen, Perizyten und Prä-Adipozyten enthält [31, 32]. Hierzu wird das Protokoll der Gruppe Hofbauer et al. [1] auf die aus Fettgewebe gewonnenen mesenchymalen Stammzellen, *adipose-derived stem cells* (ASCs), angewendet. Hofbauer et al. [1] generierte mithilfe von 96-ULA-Platten kardiale Organoide aus hiPSCs, die Kardiomyozyten und Fibroblasten-ähnliche Zellen enthielten sowie bei Verwendung von VEGF-A auch Endothelzellen aufwiesen. Zusätzlich wiesen diese kardialen Organoide kammerartige Strukturen auf und besaßen die Fähigkeit zu kontrahieren [1].

1.7 Klinische Relevanz kardialer Organoide

Die Möglichkeit, Organoide aus Zellen von Patienten zu generieren, ist ein großer Vorteil für die personalisierte Medizin, da durch hiPSCs-abgeleitete Organoide

eine Behandlung an das jeweilige Genom des jeweiligen Patienten angepasst werden kann [30]. Diese Organoide können zusätzlich als Modell für die Krebsforschung dienen, genetische Störungen, neurodegenerative und neuropsychiatrische Störungen sowie infektiöse Krankheiten modellieren und Anwendung in der Regenerationsmedizin finden [30]. Die Generierung von Organoid-Biobanken kann in Zukunft genutzt werden, um das Ansprechen von Medikamenten auf genetische Variationen zu verstehen, Behandlungen dementsprechend anzupassen und zu verbessern [30]. Die Kardioide können in Zukunft als Modelle zur Untersuchung der molekularen Pathologien von angeborenen Herzerkrankungen des Menschen, zur Untersuchung der Pathophysiologie von Herzinfarkten und anderen Herzerkrankungen genutzt werden sowie in der Medikamentenforschung Anwendung finden [33-35]. Demzufolge sind Kardioid-Modelle ein großer Gewinn, da Herz-Kreislauf-Erkrankungen der Hauptgrund für Mortalität in Industrieländern sind und angeborene Herzerkrankungen die häufigsten angeborenen Fehlbildungen des Menschen darstellen [35].

1.8 Modulation von Signalwegen zur kardialen Organoid-Generierung

Für die Generierung von kardialen Organoiden ist die Modulation verschiedener Signalwege, die während der Kardiogenese ablaufen und der Einsatz bestimmter Reagenzien notwendig. Die einzelnen Protokolle zur Generierung kardialer Organoide, die in dieser Arbeit anhand verwendeter Materialien, beschriebener Methoden und Merkmalen der resultierenden Organoide miteinander verglichen werden, greifen unter Verwendung verschiedener Substanzen während der Kultivierung der Zellen in diese Signalwege ein. Im Folgenden werden die Signalwege näher erläutert, die in den einzelnen Protokollen zur Generierung der Kardioide aktiv mittels entsprechender Substanzen manipuliert werden.

Die Modulation des Wnt-Signalweges ist von essenzieller Bedeutung, da die Behandlung von humanen Stammzellen mit Aktivatoren des Wnt-Weges die Spezifikation des Mesoderms unterstützt und eine spätere Behandlung der humanen Stammzellen mit Inhibitoren des Wnt-Signalweges die Differenzierung der Zellen zu Kardiomyozyten fördert [36]. Als Aktivator des Wnt-Weges dient

beispielsweise CHIR99021 und als Inhibitor fungieren Substanzen wie Wnt-C59 oder IWP2.

Der PI3K/AKT-Signalweg beeinflusst den Isoformen-Wechsel des Proteins Titin in Kardiomyozyten, wodurch die Steifigkeit des Herzmuskels moduliert wird [37]. In diesem Signalweg fungiert Insulin als Aktivator und die synthetische Verbindung LY294002 als Inhibitor [37].

Auch BMP4 und FGF tragen entscheidend zur Kardiogenese bei, da BMP4 unter anderem die Expression von sarkomerem α -Aktinin, Titin und sarkomerem Myosin induziert und in Interaktion mit FGF die terminale Differenzierung des Herzens reguliert [38].

Activin A unterstützt die Kardiogenese hinsichtlich der Differenzierung der humanen embryonalen Stammzellen in das Endoderm [39]. In Kombination mit BMP4 wird diese Differenzierung sogar verstärkt [39].

Zusätzlich wird angenommen, dass Retinsäure einen Einfluss auf die atriale und ventrikuläre Spezifikation des sich entwickelnden Herzens nimmt [40].

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A (VEGF-A) fördert die Proliferation und Migration von Endothelzellen [41].

Des Weiteren wird in den meisten Protokollen zur Generierung von kardialen Organoiden aus kultivierten Stammzellen der ROCK Inhibitor Y-27632 (Rocki) genutzt, um *Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinases* (ROCKs) zu hemmen, die durch Veränderungen des Zytoskeletts von Zellen die Zelladhäsion und Zellmigration fördern [42]. Durch die Hemmung dieser ROCKs werden die Stammzellen in Kultur geschützt [42]. ROCK-Inhibitoren fördern das Überleben von humanen pluripotenten Stammzellen durch Verstärkung und Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Adhäsion sowie durch Aufrechterhaltung der Pluripotenz und Reduktion der zellulären Apoptose in Suspensionskulturen [43].

1.9 Vaskuläre Glattmuskelzellen – Ursprung und Funktion

Vaskuläre Glattmuskelzellen werden in dieser Arbeit näher betrachtet, da diese ebenfalls zur Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie beispielsweise der Atherosklerose, beitragen. Die Pathomechanismen dahinter sind jedoch noch

nicht vollständig geklärt. Im Allgemeinen sind vaskuläre Glattmuskelzellen ein wichtiger Bestandteil der Wände von Blutgefäßen [44-46]. Sie regulieren durch Kontraktion den Gefäßtonus, den Blutfluss sowie den Blutdruck [45, 47]. Vaskuläre Glattmuskelzellen exprimieren typische Marker für das Zytoskelett und kontraktile Proteine, die notwendig für ihre Funktion sind [44, 48]. Zu diesen Markern zählen beispielsweise Aktinin-Alpha-2, Myosin-11, Calponin-1, Calponin-2, Transgelin und Caldesmon [44-49]. Diese vaskulären Glattmuskelzellen werden auch als kontraktile Glattmuskelzellen bezeichnet [44, 45]. Myosin-11 gilt als der spezifischste Marker für Glattmuskelzelllinien und deren Differenzierung [48]. Unter pathologischen Bedingungen können diese kontraktilen Glattmuskelzellen ihren Phänotyp hin zu einem synthetischen Phänotyp verändern [44, 45].

1.10 Phänotyp-Wechsel von vaskulären Glattmuskelzellen

Ein Phänotyp-Wechsel von kontraktilen Glattmuskelzellen zu synthetischen Glattmuskelzellen wird beispielsweise durch einen Gefäßumbau nach endothelialer Dysfunktion, Gefäßschädigung [44] oder auch durch Angioplastie oder eine Bypass-Operation [45] verursacht. Dieser Phänotyp-Wechsel steht in Assoziation mit einer verringerten Genexpression von Glattmuskelzell-selektiven Markern und einer gesteigerten Proliferation und Migration der Glattmuskelzellen [44, 45, 47, 49]. Durch den Phänotyp-Wechsel können die Glattmuskelzellen Merkmale entwickeln, die beispielsweise an Fibroblasten, Osteoblasten oder auch Makrophagen-ähnliche Zellen erinnern [46, 50].

1.11 Makrophagen-ähnliche Glattmuskelzellen

Makrophagen-ähnliche Glattmuskelzellen treiben die Entstehung der Atherosklerose voran. Da die Atherosklerose eine relevante Herz-Kreislauf-Erkrankung ist, ist es wichtig die Pathomechanismen zu verstehen, durch welche die Makrophagen-ähnlichen Glattmuskelzellen den Krankheitsprozess fördern. Im Allgemeinen sind Makrophagen-ähnliche Glattmuskelzellen eine Unterform des synthetischen Phänotyps und nehmen Einfluss auf die vaskuläre Gewebshomöostase [46]. Sie interagieren als nicht-professionelle Phagozyten

und können zu einem chronisch-inflammatorischen Zustand in den Gefäßwänden führen, was wiederum die Migration von immunkompetenten Zellen und eine starke Zytokin-Produktion verursacht [46, 51].

Makrophagen-ähnliche Glattmuskelzellen weisen, neben den oben genannten Glattmuskelzell-Markern, zusätzlich einige spezifische Makrophagen-Marker wie CD68, CD11b und F4/80 auf [46] und konnten in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden [52]. Sie sind an chronisch-inflammatorischen Prozessen beteiligt, produzieren Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL2 und treiben den pathologischen Prozess der Atherosklerose voran [46, 53].

1.12 Klinische Relevanz des Phänotyp-Wechsels von Glattmuskelzellen zu Makrophagen-ähnlichen Glattmuskelzellen

In der Klinik ist die De-Differenzierung von kontraktile zu synthetischen Glattmuskelzellen, zu denen auch die Makrophagen-ähnlichen Glattmuskelzellen gehören, von Bedeutung, da diese eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose spielen [54]. Wie genau die Glattmuskelzellen die Pathophysiologie der Atherosklerose beeinflussen, ist aktuell noch nicht geklärt, allerdings beeinflussen die veränderten Zellen die Entwicklung, Progression und Stabilität von atherosklerotischen Plaques [47, 54]. Zudem wurde durch humangenetische Studien gezeigt, dass bestimmte funktionsregulierende Glattmuskelzell-Marker auch für die koronare Herzkrankheit verantwortlich sind [54, 55]. Die in dieser Arbeit thematisierten Glattmuskelzell-Sphäroide könnten gegebenenfalls zukünftig als dreidimensionales Zellkulturmodell zur Forschung bezüglich der Pathomechanismen und möglichen therapeutischen Ansätzen dienen.

2 Ziele der Arbeit

Das übergeordnete Ziel bezogen auf die Ergebnisse dieser Arbeit, ist die Generierung von dreidimensionalen Zellkulturmodellen zur Forschung an Herz-Kreislauf-Erkrankungen, da Herz-Kreislauf-Erkrankungen die führende Todesursache weltweit sind. Das Ziel dieser Arbeit besteht darin Kardioiden und Glattmuskelzell-Sphäroide zu generieren und zu charakterisieren, um diese als zukünftige Forschungsmodelle nutzen zu können. Konkrete Zielsetzungen sind die Folgenden:

1. Literaturrecherche bezüglich bereits etablierter Modelle zur Generierung von Herzgewebe
2. Vergleich der Protokolle zur Generierung von gerüstfreien, kardialen Organoid-Modellen anhand verwendeter Materialien, beschriebener Methoden und Merkmalen der resultierenden Organoiden
3. Generierung von Kardioiden aus ASCs der stromalen vaskulären Fraktion von viszeralem Rattenfettgewebe
4. Generierung von Glattmuskelzell-Sphäroiden aus Glattmuskelzellen einer Rattenaorta
5. Mikroskopischer Vergleich der 2D- und 3D-Glattmuskelzellkultur, auch nach Stimulation mit einem proinflammatorischen Stimulus und anschließender Färbung im Hinblick auf einen Phänotyp-Wechsel
6. Analyse und Vergleich der Proteinzusammensetzung der 2D- und 3D-Glattmuskelzellkultur
7. Vergleich der Proteinzusammensetzung der 2D- und 3D-Glattmuskelzellkultur nach inflammatorischer Stimulation

3 Material

3.1 Versuchstiere

Die Tötung der Versuchstiere und Organentnahme wurde nach erhaltener Zustimmung zum berechtigten Töten von Tieren (ohne Vorbehandlung) zu wissenschaftlichen Zwecken nach §4 Absatz 3 des Tierschutzgesetzes durch die Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Aktenzeichen: O89/12) durch entsprechende, dazu berechnigte, Mitarbeiter des Labors durchgeführt. Als Versuchstiere wurden ein bis sechs Monate alte männliche Wistar-Ratten genutzt.

3.2 Verbrauchsmaterialien (Tabelle 1)

Verbrauchsmaterial	Hersteller
2 ml Reaktionsgefäße (<i>Safe-Lock-Tubes</i>)	Eppendorf
15 ml Falcons	Greiner
50 ml Falcons	Greiner
10 cm Platte	Greiner
6-well-Platte (<i>Cellstar, Cellculture Plate sterile, with lid</i>)	Greiner bio-one
24-well-Platte (<i>Cellstar, Cellculture Plate sterile, with lid</i>)	Greiner bio-one
48-well-Platte (<i>Cellstar, Cellculture Plate sterile, with lid</i>)	Greiner bio-one
96-well-Platte (<i>96U Bottom Plate</i>)	Thermo Fisher Scientific
Cover Slips (24 x 60 mm)	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH
Cover Slips (12 mm Durchmesser)	Epredia
Eindeckmedium (<i>CV Ultra Mounting medium</i>)	Leica
Einwegskalpell (<i>Safeshield Scalpel</i>)	Feather
Handschuhe (<i>Dermagrip, Nitrile Examination Gloves</i>)	WRP Dermagrip
Objektträger (Menzel-Gläser, Superfrost Ultra Plus)	Thermo Scientific
Pasteurpipetten aus Glas	Brand
Pipettenspitzen	Tip One

Serologische Pipetten (<i>Cellstar</i>)	Greiner bio-one
Vakuum Filter (<i>Stericup Quick Release</i>)	Millipore
Zellschaber	Sarstedt
Zellsieb (<i>EasyStrainer</i> , 100µm)	Greiner

3.3 Reagenzien, Lösungen und Antikörper (Tabelle 2)

Substanz	Hersteller
Activin A	Stemcell Technologies
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth
Amphotericin B	Gibco
BMP4	Stemcell Technologies
CellAdhere Dilution Buffer	Stemcell Technologies
CHIR99021	Stemcell Technologies
DAPI	Roth
Destilliertes Wasser (DEMI-Wasser)	Fisher
DMEM (1X + GlutaMAX-I)	Gibco
DPBS	Gibco
Essential 8 Medium	Gibco
Ethanol (70%) zur Desinfektion	Technisolv, VWR Chemicals
F4/80	Invitrogen
FGF2	Stemcell Technologies
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma Life Science
Formaldehyd (4%)	Thermo Scientific
Gelatine	Sigma Life Science
Insulin	Sigma Aldrich
IWP2	Stemcell Technologies
Liberase	Roche
LPS	Sigma Aldrich
LY294002	Stemcell Technologies
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Retinsäure	Stemcell Technologies
TGFβ	R&D Systems
Trypan Blue Solution (0,4%)	VWR Life Science
Trypsin-EDTA	Gibco
Vitronektin XF	Stemcell Technologies
Y-27632	Stemcell Technologies

3.4 Geräte (Tabelle 3)

Gerät	Hersteller
Autoklav	Systec VX-95
Brutschrank (37°C, 5% CO ₂ , <i>Hera Cell 240i</i>)	Thermo Scientific
Fluoreszenzmikroskop (DM 2000 LED)	Leica
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Ewald
Kühlschrank 4°C	Revco Technologies
<i>Laser-Scanning</i> -Mikroskop (LSM 700)	Carl Zeiss
Lichtmikroskop	Leica
Pinzetten	Carl Roth
Pipettierhilfe (accu-jet S)	Brand
Waage (PT120)	Sartorius
Wasserbad	GFL
Sterile Werkbank (<i>Hera Safe KS</i>)	Thermo Scientific
Zählkammer (Neubauer)	Marienfeld
Zentrifuge (5804 R)	Eppendorf

4 Methoden

4.1 Literaturrecherche

Zur Auffindung relevanter Protokolle zur Generierung von kardialen Organoiden wurde mithilfe der Datenbank *PubMed* eine systematische Literaturrecherche durchgeführt. Dabei wurden alle aufgefundenen verfügbaren Veröffentlichungen bis in das Jahr 2023 berücksichtigt, um den aktuellen Forschungsstand bezüglich Kardioden bestmöglich abzubilden. Für die Suche wurden Schlagwörter wie beispielsweise „Kardiod“ oder Organoid“ einzeln oder auch in Kombination mit weiteren thematisch passenden Suchbegriffen verwendet, um einen möglichst großen Überblick über die aktuell relevanten Protokolle zu erhalten. Ebenfalls wurden die Referenzen der identifizierten Protokolle überprüft, um weitere relevante Protokolle zu identifizieren. Die Ergebnisse der Literaturrecherche wurden anschließend hinsichtlich ihrer Relevanz für diese Arbeit geprüft. Für den tabellarischen Vergleich der bereits etablierten Protokolle wurden die Protokolle ausgewählt, die Kardioide unter gerüstfreien Bedingungen generieren.

4.2 Matrix zum Vergleich von Methoden zur Generierung von Herzgewebe

Für den Vergleich von Methoden zur Generierung von Herzgewebe wurden die Modelle aus den Ergebnissen der Literaturrecherche ausgewählt, die Herzgewebe in Form von kardialen Organoiden unter gerüstfreien Bedingungen rekonstruieren. Als gerüstfrei wurden die Modelle definiert, die zur Generierung der Sphäroide und Organoiden kein Gerüst verwenden, unabhängig davon, wie die Zellen vorher in der 2D-Kultur behandelt worden sind.

4.3 Isolation der stromalen vaskulären Fraktion aus viszeralem Rattenfettgewebe

Einer ein bis sechs Monate alten männlichen Wistar Ratte wurde nach Euthanasie das viszerale Fettgewebe entnommen, in eiskaltem DPBS gespült, gewogen und unter einer sterilen Werkbank mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert. Das Fettgewebe wurde mit DPBS + 1% P/S + 1% AmpB (1 g viszerale Fettgewebe zu 1 ml DPBS) + Liberase (1 g viszerale Fettgewebe mit 50 µl Liberase (7,5 U/ml)) gemischt und für 40 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein 100 µm Zellsieb gefiltert, im Verhältnis 1:1 mit DMEM + 10% FCS + 1% P/S + 1% AmpB aufgefüllt und fünf Minuten bei 65 rcf zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Fett und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mit Wachstumsmedium Cardio (E8 Medium + 0,05% BSA + 3 ng/ml FGF2 + 1,8 ng/ml TGFβ) resuspendiert. 1 ml der Einzelzellsuspension wurde pro *Well* auf eine mit Vitronectin XF beschichtete 12-*well*-Platte gegeben und in einem 37°C CO₂-Inkubator inkubiert. Der erste Mediumwechsel erfolgte vier Stunden nach Isolation und anschließend alle zwei bis drei Tage bis zum Aussetzen der Zellen der SVF in die 3D-Kultur.

4.4 3D-Kultivierung der ASCs der stromalen vaskulären Fraktion

Zur Aussetzung der ASCs der stromalen vaskulären Fraktion wurde die 12-*well*-Platte mit DPBS gespült und anschließend mit 0,3 ml Trypsin für drei Minuten bei 37°C behandelt. Das Trypsin wurde mit DMEM + 10% FCS deaktiviert und die Zellen mit einem Zellkratzer mechanisch von der Platte gelöst. Danach wurden

die Zellen für fünf Minuten bei 65 rcf zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand bis zum Pellet abgesaugt und mit initialem Medium (E8 + 0,1% Y-27632) eine Einzelzellsuspension hergestellt. 150 µl dieser Einzelzellsuspension wurden pro Vertiefung einer 96-ULA-Platte ausgesetzt und für 24 Stunden im CO₂-Inkubator kultiviert.

4.5 Differenzierung von ASCs-Zellaggregaten zu Kardioiden

Nach 24 Stunden Kultivierung im initialen Medium (E8 + 0,1% Y-27632) erfolgte die Induktion der Zellaggregate zur Generierung von Kardioiden. Hierzu wurden die Zellaggregate in den einzelnen Vertiefungen der 96-ULA-Platte mit DPBS gewaschen und für 36 bis 40 Stunden im Induktionsmedium Cardio (DMEM/F12 + 30 ng/ml FGF2 + 5 µM LY294002 + 50 ng/ml Activin A + 10 ng/ml BMP4 + 5,3 µM CHIR99021 + 1 µg/ml Insulin) kultiviert. Nach 36 bis 40 Stunden wurden die Zellaggregate erneut mit DPBS gespült und für vier Tage im Differenzierungsmedium Cardio (DMEM/F12 + 8 ng/ml FGF2 + 10 ng/ml BMP4 + 4µM IWP2 + 0,5 µM Retinsäure + 10 µg/ml Insulin) kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Anschließend wurden die Zellaggregate mit DPBS gewaschen und für zwei Tage im Spezifizierungsmedium Cardio (DMEM/F12 + 8 ng/ml FGF2 + 10 ng/ml BMP4 + 10 µg/ml Insulin) kultiviert. Danach wurden die Zellaggregate mit DPBS gespült und im Erhaltungsmedium Cardio (DMEM/F12 + 10 µg/ml Insulin) kultiviert. Alle zwei Tage wurde die Hälfte des Erhaltungsmediums gewechselt.

4.6 Isolation von Glattmuskelzellen aus einer Rattenaorta

Einer Wistar Ratte wurde die Aorta entnommen und diese in DPBS gewaschen. Die Aorta wurde aus dem umgebenen Fettgewebe freigelegt und mit einem Skalpell in 1-2 mm dicke Ringe geschnitten. Die *Wells* einer 6-well-Platte wurden mit 0,5-1 ml DMEM + 10% FCS + 1% P/S + 1% AmpB benetzt und vier bis sechs Ringe pro *Well* im Medium aufgestellt. Die Aortenringe wurden im CO₂-Inkubator kultiviert, bis die Glattmuskelzellen aus den Aortenringen ausgeschwommen und auf der Platte anwachsen waren. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurden die *Wells* mit DPBS gespült und

die Zellen zur Ernte mit 0,5 ml Trypsin für fünf Minuten bei 37°C behandelt. Das Trypsin wurde mit DMEM + 10% FCS deaktiviert. Die Zellen wurden anschließend auf eine 10 cm Platte überführt und kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage.

4.7 2D- und 3D-Zellkultur von Glattmuskelzellen

Die Glattmuskelzellen einer 70-80% konfluenten 10 cm Platte wurden in eine 96-ULA-Platte für die 3D-Zellkultur und auf eine *24-well*-Platte auf *Cover Slips* für die 2D-Zellkultur ausgesetzt. Die *Cover Slips* wurden vor der Verwendung in der *24-well*-Platte für 15 Minuten mit 500 µl Gelatine beschichtet, die Gelatine anschließend abgesaugt und die Platte für weitere zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Ernte der Glattmuskelzellen wurde die 10 cm Platte mit DPBS gespült und mit Trypsin behandelt. Die Glattmuskelzellen wurden für fünf Minuten bei 150 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zum Zellpellet abgesaugt und das Pellet in DPBS resuspendiert. Die Zellen wurden erneut für fünf Minuten bei 150 rcf zentrifugiert, der Überstand bis zum Pellet abgesaugt und mit DMEM eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen in der Einzelzellsuspension wurden mit Hilfe einer Neubauerzählkammer gezählt und anschließend 40.000 Zellen pro Vertiefung der 96-ULA-Platte beziehungsweise pro *Well* der *24-well*-Platte ausgesetzt (Tag 0). Die Zellen wurden bis zur Stimulation mit LPS an Tag drei im CO₂-Inkubator kultiviert.

4.8 Stimulation von Glattmuskelzellen mit LPS

Die in 2D und 3D ausgesetzten Glattmuskelzellen wurden an Tag drei mit LPS stimuliert. Hierzu wurde eine LPS-DMEM-Stimulationslösung mit einer Arbeitskonzentration von 100 ng/ml hergestellt. Je 500 µl der Stimulationslösung wurde auf die *Wells* der *24-well*-Platte und je 200 µl der Stimulationslösung in die Vertiefungen der 96-ULA-Platte gegeben. Die Zellen wurden für eine Stunde im CO₂-Inkubator gelagert. Die Glattmuskelzellen wurden anschließend mit DPBS gewaschen und in Kultivierungsmedium im CO₂-Inkubator kultiviert.

4.9 Immunfluoreszenz-Färbung von Glattmuskelzellen

Zur Färbung der Glattmuskelzellen wurde eine DAPI-DMEM-Lösung mit einer Arbeitskonzentration von 0,2 µg/ml verwendet. Dieser Färbelösung wurde F4/80 im Verhältnis 1:1000 hinzugefügt. Anschließend wurden 500 µl der Färbelösung auf die zu färbenden *Wells* der 24-well-Platte und 150 µl in die zu färbenden Vertiefungen der 96-ULA-Platte gegeben. Die Glattmuskelzellen wurden für 24 Stunden mit der Färbelösung im CO₂-Inkubator kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen drei Mal mit DPBS gewaschen. Die Glattmuskelzell-Sphäroide wurden in einem Tropfen DMEM auf einem *Cover Slip* mit dem *Laser-Scanning-Mikroskop* (LSM) mikroskopiert. Die Zellen der 2D-Kultur wurden auf den *Cover Slips* in der 24-well-Platte mit Formaldehyd fixiert, auf Objektträgern eingebettet und anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert.

4.10 Kultivierung und Stimulation von Glattmuskelzellen für die *Proteomics*-Analyse

Die Glattmuskelzellen einer circa 50% konfluenten 10 cm Platte wurden geerntet und in 2D- sowie 3D-Kultur ausgesetzt. Für die 3D-Kultur wurden 30.000 Zellen pro Vertiefung einer 96-ULA-Platte ausgesät und für die 2D-Kultur 90.000 Zellen pro *Well* einer 48-well-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wurde die eine Hälfte der Zellen in 2D- und 3D-Kultur für eine Stunde mit DMEM + 10% FCS + 100 ng/ml LPS stimuliert. Die andere Hälfte wurde für eine Stunde nur mit DMEM + 10% FCS behandelt. Die Sphäroide wurden nach der Stimulation in Eppendorf-*Tubes* überführt (drei Sphäroide pro Eppendorf-*Tube*). Die Sphäroide wurden für zehn Sekunden *short spin* zentrifugiert, der Überstand abgenommen, mit DPBS gewaschen und bei -80°C für die *Proteomics*-Analyse eingefroren. Die Zellen der 2D-Kultur wurden nach der Stimulation mit DPBS gewaschen und mit Trypsin aus den *Wells* geerntet. Die Zellen aus einem *Well* wurden in je ein Eppendorf-*Tube* überführt, *short spin* zentrifugiert, die Pellets mit DPBS gewaschen und bei -80°C für die *Proteomics*-Analyse eingefroren.

Für die *Proteomics*-Analyse wurden die Zellen in 200 µl 4%-igem SDS in DPBS resuspendiert und anschließend im Bioruptor mit zehn Mal 30 Zyklen lysiert. Danach wurden die Zellen auf 95°C erhitzt, homogenisiert und zentrifugiert. 20

µg wurden nach dem SP3-Verdauungsprotokoll [56] für die *Proteomics*-Analyse prozessiert. Die Aufarbeitung der eingefrorenen Proben und die anschließende Analyse wurde von Mitarbeitern des Institutes für Genetik des CECAD Research Centers und der *Proteomics Facility* des CECAD Research Centers in Köln durchgeführt.

Die Messungen der Proteom-Proben und die Datenverarbeitung wurden, wie in *Phosphoproteomics of developing heart identifies PERM1 – An outer mitochondrial membrane protein* by S. Aravamudha et al. [57] beschrieben, von Mitarbeitern des Institutes für Genetik des CECAD Research Centers und der *Proteomics Facility* des CECAD Research Centers in Köln durchgeführt.

4.11 Statistische Analyse

Die in dieser Arbeit beschriebene *Proteomics*-Analyse wurde mit drei technischen und drei biologischen Replikaten durchgeführt. Zur Auswertung des Datensatzes der *Proteomics*-Analyse wurden die gemessenen *Label-free quantification*-Intensitäten (LFQ-Intensitäten) mit einem *homemade python script* unter Mithilfe von Dr. rer. nat. Samet Bayraktar ausgewertet. Die gemessenen LFQ-Intensitäten wurden log2-transformiert. Zur Signifikanzanalyse wurde ein t-Test der unabhängigen Proben mit gleicher Varianz und die *Fold Change* (FC) durchgeführt.

Proteine mit FC-Werten von < -1 oder > 1 ($p\text{-value} = 0,05$) wurden als signifikant vermindert beziehungsweise vermehrt hinsichtlich ihrer Proteinabundanz definiert.

5 Ergebnisse

5.1 Modelle zur Generierung von Herzgewebe

Mittlerweile sind viele Modelle zur Generierung von Herzgewebe im dreidimensionalen Raum etabliert. Die folgende Tabelle listet verschiedene Protokolle, mit denen das Herz in der Zellkultur als Sphäroid oder Organoid unter gerüstbasierten oder gerüstfreien Bedingungen bereits generiert wurde (Tabelle 4).

Autor und Jahr	Titel	Gerüstbasiert	Gerüstfrei	Sphäroid	Organoid
Andersen, 2018 [58]	Precardiac organoids form two heart fields via Bmp/Wnt signaling		X	X	
Branco, 2022 [59]	Human multilineage pro-epicardium/foregut organoids support the development of an epicardium/myocardium organoid		X		X
Buono, 2020 [60]	Human Cardiac Organoids for Modeling Genetic Cardiomyopathy		X		X
Feng, 2022 [61]	Computational profiling of hiPSC-derived heart organoids reveals chamber defects associated with NKX2-5 deficiency		X		X
Drakhils, 2021 [62]	Human heart-forming organoids recapitulate early heart and foregut development	X			X
Forsythe, 2018 [63]	Environmental Toxin Screening Using Human-Derived 3D bioengineered Liver and Cardiac Organoids		X		X
Hoang, 2018 [64]	Generation of spatial-patterned early-developing cardiac organoids using human pluripotent stem cells	X			X
Hoang, 2021 [65]	Engineering Spatial-Organized Cardiac Organoids for Developmental Toxicity Testing	X			X
Hofbauer, 2021 [1]	Cardioids reveal self-organizing principles of human cardiogenesis		X		X
Kitsuka, 2019 [66]	2-CI-C.OXT-A stimulates contraction through the suppression of phosphodiesterase activity in human induced pluripotent stem cell-derived cardiac organoids		X		X
LaBarge, 2019 [67]	Maturation of three-dimensional, hiPSC-derived cardiomyocyte spheroids utilizing cyclic, uniaxial stretch and electrical stimulation		X	X	
Lee, 2020 [68]	In vitro generation of functional murine heart organoids via FGF4 and extracellular matrix	X			X
Lee, 2022 [69]	Generation of human iPSCs derived heart organoids structurally and functionally similar to heart	X			X
Lewis-Israeli, 2021a [70]	Generating Self-Assembling Human Heart Organoids Derived from Pluripotent Stem Cells		X		X
Lewis-Israeli, 2021b [33]	Self-assembling Human Heart Organoids for the Modeling of Cardiac Development and Congenital Heart Disease		X		X

Autor und Jahr	Titel	Gerüstbasiert	Gerüstfrei	Sphäroid	Organoid
Meier, 2023 [71]	Epicardioid single-cell genomics uncover principles of human epicardium biology in heart development and disease	X			X
Mills, 2017 [72]	Functional screening in human cardiac organoids reveals a metabolic mechanism for cardiomyocyte cell cycle arrest	X			X
Mills, 2019 [73]	Drug Screening in Human PSC-Cardiac Organoids Identifies Pro-proliferative Compounds Acting via the Mevalonate Pathway	X			X
Min, 2020 [74]	Biphasic electrical pulse by a micropillar electrode array enhances maturation and drug response of reprogrammed cardiac spheroids		X	X	
Olmsted, 2022 [75]	A combined human gastruloid model of cardiogenesis and neurogenesis		X		X
Polonchuk, 2017 [76]	Cardiac spheroids as promising in vitro models to study the human heart microenvironment		X	X	
Richards, 2017 [77]	Inspiration from heart development: Biomimetic development of functional human cardiac organoids	X			X
Richards, 2020 [78]	Human Cardiac Organoids for the Modelling of Myocardial Infarction and Drug Cardiotoxicity	X			X
Rossi, 2021 [79]	Capturing Cardiogenesis in Gastruloids		X		X
Silva, 2021 [80]	Co-emergence of cardiac and gut tissues promotes cardiomyocyte maturation within human iPSC-derived organoids	X			X
Varzideh, 2019 [81]	Human Cardiomyocytes Undergo Enhanced Maturation in Embryonic Stem Cell-Derived Organoid Transplants	X			X
Voges, 2017 [82]	Development of a Human Cardiac Organoid Injury Model Reveals Innate Regenerative Potential	X			X

Tabelle 4: Modelle zur Generierung kardialer Sphäroide und Organoid

Die Tabelle listet Modelle zur Generierung kardialer Sphäroide und Organoid unter gerüstbasierten oder gerüstfreien Bedingungen. Als gerüstfrei wurden die Modelle definiert, die zur Generierung der Sphäroide und Organoid kein Gerüst verwenden, unabhängig davon, wie die Zellen vorher in der 2D-Kultur behandelt worden sind.

5.2 Vergleich von gerüstfreien, kardialen Organoid-Modellen

Die Literaturrecherche ergab neun Protokolle zur Generierung von kardialen Organoid-Modellen unter gerüstfreien Bedingungen. Der Vergleich dieser neun Protokolle erfolgte anhand der Beschreibung über verwendete Materialien und Methoden sowie der Merkmale der resultierenden Organoide. Genauer wurde verglichen, welche Ausgangszellen in den einzelnen Protokollen verwendet wurden, welche Signalwege aktiviert und inhibiert wurden und welche *Readouts* zur Charakterisierung der Kardioide genutzt wurden (Tabelle 5). Die im Folgenden beschriebenen Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den neun Protokollen zur Generierung der gerüstfreien, kardialen Organoid-Modelle sind in Tabelle fünf aufgeführt.

Die Protokolle von Branco et al. [59], Buono et al. [60], Feng et al. [61], Forsythe et al. [63], Hofbauer et al. [1], Kitsuka et al. [66], und Lewis-Israeli et al. [33, 70] beschreiben alle Methoden zur Generierung von kardialen Organoiden unter gerüstfreien Bedingungen. Mittels der Protokolle von Olmsted et al. [75] und Rossi et al. [79] können Gastruloide mit kardialer Komponente unter gerüstfreien Bedingungen generiert werden, die im Folgenden auch mit den Modellen zur Generierung kardialer Organoide verglichen wurden, da es sich bei Gastruloiden um embryonale Organoide handelt.

Es zeigte sich, dass die meisten Protokolle hiPSCs nutzten, um die kardialen Organoide zu generieren. Im Protokoll von Rossi et al. [79] wurden mESCs verwendet. Lediglich Buono et al. [60], Forsythe et al. [63] und Kitsuka et al. [66] nutzten bereits differenzierte herztypische Zelllinien, um die kardialen Organoide zu generieren, sodass diesen Ausgangszellen, anders als bei den anderen Protokollen, keine spezifischen Reagenzien zur Differenzierung zu herzspezifischen Zelltypen hinzugefügt werden mussten. In den Protokollen von Branco et al. [59], Hofbauer et al. [1], Lewis-Israeli et al. [33, 70] und Olmsted et al. [75] wurden die verwendeten Stammzellen mit Rocki behandelt, um sie vor einer vorzeitigen Zelladhäsion und Zellmigration zu schützen.

Alle Protokolle führten zu einer erfolgreichen Generierung von kardialen Organoiden beziehungsweise Gastruloiden, in denen verschiedene herztypische Zelltypen, wie beispielsweise Kardiomyozyten, Endothelzellen oder Fibroblasten,

nachgewiesen werden konnten. Neben den herztypischen Zellen besaßen fast alle kardialen Organoide beziehungsweise Gastruloide Hohlräume in ihrer Struktur und verfügten über die Fähigkeit zur Kontraktion, weshalb bei den generierten 3D-Konstrukten auch von Organoiden gesprochen werden kann. Diese, für ein kardiales Organoid typischen Eigenschaften, wurden mittels verschiedener *Readouts* wie Immunfluoreszenz-Färbungen, Durchflusszytometrie oder Kontraktionsanalyse nachgewiesen.

Um die hiPSCs beziehungsweise mESC's zu herztypischen Zellen zu differenzieren, wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten für unterschiedlich lange Zeit mit verschiedenen Reagenzien behandelt, die jedoch nicht in allen Protokollen identisch waren. Ausgenommen hiervon sind im Folgenden die Protokolle von Bueno et al. [60], Forsythe et al. [63] und Kitsuka et al. [66], da den Ausgangszellen hier keine Reagenzien mehr zugefügt wurden.

Es zeigte sich, dass alle Protokolle die Modulierung des Wnt-Signalweges zur Generierung der kardialen Organoide nutzten. In allen Protokollen wurde dieser mit Hilfe der Reagenz CHIR99021 aktiviert. Hier zeigte sich jedoch ein Unterschied zwischen den einzelnen Protokollen, da Olmsted et al. [75] und Rossi et al. [79] den Wnt-Signalweg zwar, wie die anderen Protokolle, mit CHIR99021 aktivierten, jedoch im weiteren Verlauf des Protokolls nicht wieder inhibierten. Branco et al. [59], Feng et al. [61], Hofbauer et al. [1] und Lewis-Israeli et al. [33, 70] inhibierten den Wnt-Signalweg im weiteren Verlauf durch Reagenzien wie IWP2, IWP4 oder Wnt-C59.

Neben dem Wnt-Signalweg wurde der PI3K/AKT-Signalweg in den Protokollen von Hofbauer et al. [1] und Lewis-Israeli et al. [33, 70] moduliert. Hierzu nutzten diese Insulin als Reagenz, um den Signalweg zu aktivieren. Im Protokoll nach Hofbauer et al. [1] wurde dieser im weiteren Verlauf durch LY294002 wieder inhibiert. In den Protokollen nach Lewis-Israeli et al. [33, 70] erfolgte keine Inhibierung dieses PI3K/AKT-Weges. Branco et al. [59], Feng et al. [61], Olmsted et al. [75] und Rossi et al. [79] modellierten den PI3K-AKT-Signalweg in ihren Protokollen nicht.

Es zeigte sich, dass alle Protokolle BMP4 oder FGF2 oder auch beide Reagenzien zur Generierung der kardialen Organoide nutzten.

Hofbauer et al. [1] und Lewis-Israeli et al. [33, 70] verwendeten in ihren Protokollen zusätzlich Activin A.

Des Weiteren setzten, bis auf Lewis-Israeli et al. [33, 70], Olmsted et al. [75] und Rossi et al. [79], alle anderen Retinsäure als Reagenz in ihren Differenzierungsprotokollen ein.

Hofbauer et al. [1], Olmsted et al. [75] und Rossi et al. [79] fügten in ihren Differenzierungsprotokollen als Zusatz VEGF hinzu.

Im Gegensatz zu den Protokollen zur Generierung kardialer Organoide nutzen Olmsted et al. [75] und Rossi et al. [79] zur Generierung der Gastruloide mit kardialer Komponente noch einige weitere Reagenzien wie HGF, IGF-1, Ascorbinsäure und L-Ascorbinsäure-Phosphat.

Insgesamt zeigte sich, dass alle Protokolle die Differenzierung der Stammzellen zu herztypischen Zelllinien über die Modulation bestimmter Signalwege erreichen. Um diese Differenzierung zu erreichen, wurden die Signalwege mit zum Teil identischen, aber auch unterschiedlichen Reagenzien moduliert. Dies führte dazu, dass mit allen Protokollen kardiale Organoide generiert werden konnten, die die Organoid-typischen Eigenschaften besaßen, aber zum Teil unterschiedliche Zelltypen in den Organoiden enthalten waren.

In dieser Arbeit wurde aufgrund der oben genannten Modulationen der Signalwege und der Nutzung bestimmter Reagenzien mit den entsprechenden Auswirkungen auf die Kardiogenese das Protokoll von Hofbauer et al. [1] ausgewählt, um den Versuch zu starten, kardiale Organoide aus ASCs, aus viszeralem Rattenfettgewebe, zu generieren.

Autor	Ausgangszellen	Zellen im Organoid	Aktivierte/Inhibierte Signalwege mit Reagenzien	Readouts	Merkmale des Organoides
Branco [59]	hiPSCs	Kardiomyozyten (cTNT+/ISL1+/NKX2-5+), Endothelzellen (CD31+), epikardiale/Mesothelium-ähnliche Zellen (WT1+/LHX2-), Septum Transversum-ähnliche Zellen (WT1-/LHX2+)	Aktivierung: Wnt-Weg (CHIR99021) Inhibierung: Wnt-Weg (IWP-4) Weitere: Rocki, BMP4, Retinsäure	Immunfluoreszenz-Färbungen, Transmissions-elektronen-Mikroskopie, Durchflusszytometrie, transiente Kalziumanalyse, PCR, Transkriptom-Analyse	Kontraktion, herzspezifische Zelltypen, Hohlräume im Organoid
Buono [60]	hiPSC-CMs, HCMECs, HCFs	CMs (TNNT2+), HCMECs (VeCADH+), HCFs (VIM+)	Keine Reagenzien	Immunfluoreszenz-Färbungen, Messung der Kalziumaktivität	Kontraktion, herzspezifische Zelltypen
Feng [61]	hiPSCs	Kardiomyozyten (cTNT+/TNNT2+/TTN+/ACTN2+), Endothelzellen (CDH5+/NFATC1+/PECAM1+/FLVAP+), Fibroblasten (COL1A1+/POSTN+), epikardiale Zellen (WT1+/TNNT3+)	Aktivierung: Wnt-Weg (CHIR99021) Inhibierung: Wnt-Weg (C59) Weitere: Retinsäure	Immunfluoreszenz-Färbungen, Durchflusszytometrie, transiente Kalzium-Analyse	Kontraktion, herzspezifische Zelltypen, Hohlräume im Organoid
Forsythe [63]	iPSC-CMs, HPCFs	iPSC-CMs, HPCFs	Keine Reagenzien	<i>Live/Dead</i> -Färbung, ATP-Aktivitäts-Analyse, Herzschlag-Analyse	Kontraktion, herzspezifische Zelltypen
Hofbauer [1]	hiPSCs	Kardiomyozyten (TNNT2+/ACTN2+/TNNT1+/MYL7+/TTN+/NPPA+/ATP2A2+), Fibroblasten-ähnliche Zellen (COL1A1+/COL3A1+/VIM+), Zellen des ersten Herzfeldes (HAND1+/TBX5+/NKX2-5+/TBX1-), [Endothelzellen	Aktivierung: 1. Wnt-Weg (CHIR99021), 2. PI3K/AKT-Weg (Insulin) Inhibierung: 1. Wnt-Weg (IWP2), 2. PI3K/AKT-Weg (LY294002)	Immunfluoreszenz-Färbungen, Kryosektionierung, Elektronen-Mikroskopie, Messung von Kontraktionsmerkmalen, Durchflusszytometrie,	Kontraktion, herzspezifische Zelltypen, Hohlräume im Organoid

		(CDH5+/PECAM1+/VIM+/NPR3+/ETV2+/TAL1+/LMO2+)]	Weitere: Rocki, FGF2, BMP4, Activin A, Retinsäure, [VEGF-A]	RNA-Analyse, <i>Proteomics</i> -Analyse	
Kitsuka [66]	hiPSC-CMs, hiPSC-ECs, HDFBs	Kardiomyozyten (Troponin T), Endothelzellen (CD31+), HDFBs (CD90+)	Keine Reagenzien	Immunfluoreszenz-Färbungen, histologische Analyse, Immunhistochemie, Kontraktionsanalyse	Kontraktion, herzspezifische Zelltypen
Lewis-Israeli (a/b) [33, 70]	hiPSCs	Kardiomyozyten (TNNT2+/MYL2+/MYL7+), epikardiale Zellen (WT1+/TJP1+/TCF21+), endokardiale Zellen (NFATC1+/TEK+/TIE1+), kardiale Fibroblasten (VIM+/DLK1+/DDR2+/THY1+), Endothelzellen (PECAM1+/ESAM+), Zellen des ersten (HAND1+/NKX2-5+/EOMES+/PDGFRA+) und zweiten (HAND2+/MEF2C+/ISL1+/TBX18+) Herzfeldes	Aktivierung: 1. Wnt-Weg (CHIR99021), 2. PI3K/AKT-Weg (Insulin) Inhibierung: Wnt-Weg (Wnt-C59) Weitere: Rocki, BMP4, Activin A	Immunfluoreszenz-Färbungen, transiente Kalzium-Analyse,	Kontraktion, herzspezifische Zelltypen, Hohlräume im Organoid
Olmsted [75]	hiPSCs	Kardiomyozyten (cTnT+/TNNT2+/TNNT1+/MYL7+), kardiale Zellen (TNNT2+/LHX9+), kardiale Fibroblasten (LHX2+/LHX9+/WT1+), epikardiale Zellen (WT1+/TCF21+/TPJ1+/LHX2+/LHX9+/TBX18+/PLAC9+), epitheliale Zellen (PAX2+/PAX8+), Endothelzellen (CDH2+/CDH5+), Zellen des ersten (TBX5+/NKX2-5+/HAND1+) und zweiten (HAND2+/MEF2C+/ISL1+/TBX18+)	Aktivierung: Wnt-Weg (CHIR99021) Weitere: Rocki, FGF2, HGF, IGF-1, VEGF, Ascorbinsäure	Immunfluoreszenz-Färbungen, Einzelzell-Sequenzierung, Kalzium-Kontraktions-Analyse	neurokardiales Gastruloid, Kontraktion, herzspezifische Zelltypen, Hohlräume im Organoid

		Herzfeldes, Glattmuskelzellen (CNN1+/TAGLN+), vordere Vorderdarmzellen (FOXA2+/NKX2-1+/SHH+/EPCAM+), neurale Zellen (FABP7+/STMN2+), splanchnische Mesodermzellen (FOXF1+/PDGFRA+/TWIST1+/PRRX2+), einige weitere Zellen			
Rossi [79]	mESCs	Kardiomyozyten (cTnT+), Endothelzellen (CD31+/KDR+/CDH5+/CD34+/NOTCH4+/DII4+/CAV1+), Epithelzellen (ECad+), kardiovaskuläre Vorläuferzellen (Flk1+), Zellen des ersten (TBX5+/HCN4+/NKX2-5+/HAND1+) und zweiten (TBX1+/SIX1+/SIX2+) Herzfeldes, einige weitere Zellen	Aktivierung: Wnt-Weg (CHIR99021) Weitere: FGF2, VEGF, L-Ascorbinsäure-Phosphat	Immunfluoreszenz-Färbungen, konfokale Mikroskopie, Einzelzell-Sequenzierung, PCR, RNAscope, Durchflusszytometrie, FACS, Kalzium-Analyse	Gastruloid, Kontraktion, herzspezifische Zelltypen, Hohlräume im Organoid

Tabelle 5: Vergleich der kardialen, gerüstfreien Organoid-Modelle

Die Tabelle vergleicht die unterschiedlichen gerüstfreien Modelle zur Generierung von kardialen Organoiden hinsichtlich der Zellen, die zur Organoid-Generierung genutzt wurden, der Zellen, die nach Generierung im Organoid vorhanden waren, sowie die zur Generierung aktivierten und inhibierten Signalwege mit den entsprechenden Reagenzien, der *Readouts* und der einzelnen Merkmale, die die kardialen Organoiden bzw. Gastruloide aufwiesen.

5.3 Besseres Wachstum der Zellen der stromalen vaskulären Fraktion bei 0,05% BSA

Ziel dieser Arbeit war es, kardiale Organoide aus den ASCs der stromalen vaskulären Fraktion von viszeralem Rattenfettgewebe zu generieren. Bei der Kultivierung dieser Zellen in 2D-Kultur, im vorgegebenen Wachstumsmedium Cardio, zeigte sich zu Beginn ein sehr langsames Wachstum von wenigen Zellen. Es wurde versucht, das Wachstum der Zellen durch Anpassung der Konzentrationen der unterschiedlichen Komponenten, die dem Wachstumsmedium Cardio zugesetzt werden sollten, zu verbessern. Durch eine Veränderung der Konzentration von BSA konnte ein besseres Wachstum der Zellen der stromalen vaskulären Fraktion und der darin enthaltenden ASCs in der 2D-Kultur erreicht werden (Abb. 1). Hierzu wurde die BSA-Konzentration von 0,5% auf 0,05% herabgesetzt. Am ersten Tag nach Isolation der SVF aus dem viszeralem Rattenfettgewebe waren in der 2D-Kultur noch keine quantitativen Veränderungen hinsichtlich der Zellzahl zwischen der Kultur mit 0,05% BSA im Medium und der Kultur mit 0,5% BSA im Medium sichtbar. Im Verlauf des vierten Tages waren jedoch quantitativ mehr Zellen in der 2D-Kultur mit 0,05% BSA im Medium gewachsen (n=3). Dementsprechend wurde die BSA-Konzentration angepasst und abweichend vom ursprünglichen Protokoll nur noch ein Wachstumsmedium Cardio mit 0,05% BSA im Medium zur Kultivierung der ASCs aus der SVF für weitere Versuchsansätze verwendet.

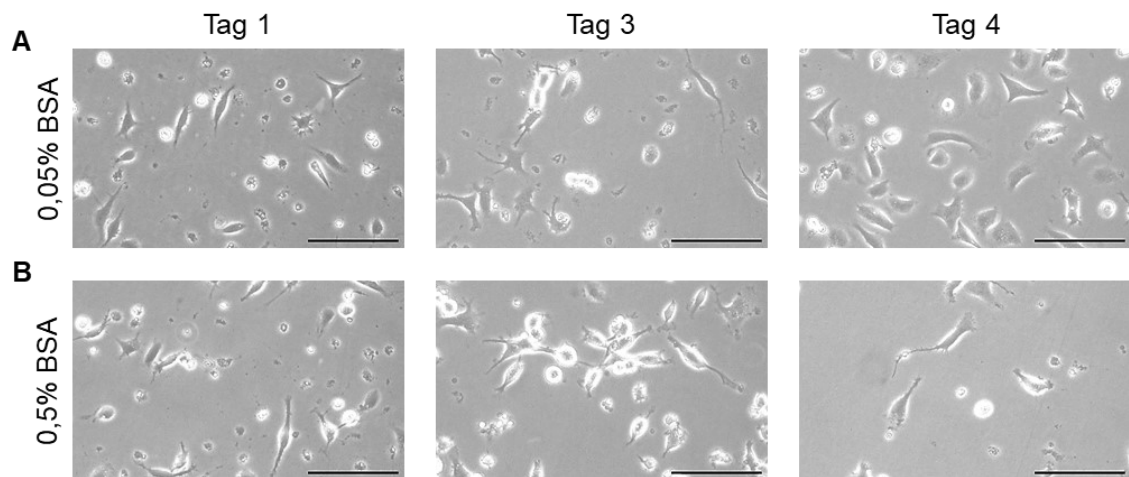


Abbildung 1: Besseres Wachstum der Zellen der stromalen vaskulären Fraktion bei 0,05% BSA

Die Lichtmikroskopie-Aufnahmen zeigen die Zellen der stromalen vaskulären Fraktion in 2D-Kultur an unterschiedlichen Tagen, die aus viszeralem Fettgewebe einer männlichen Wistar-Ratte gewonnen und in Wachstumsmedium Cardio ausgesät wurden. Reihe A erhielt das Wachstumsmedium Cardio mit 0,05% BSA und Reihe B das Wachstumsmedium Cardio mit 0,5% BSA. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich ein quantitativ stärkeres Wachstum der Zellen im Wachstumsmedium mit 0,05% BSA. Vergrößerung: x40. Maßstab: 100µm.

5.4 Versuch der Generierung von kardialen Organoiden

Im nächsten Schritt wurde versucht, die zuvor in 2D-Kultur kultivierten ASCs der SVF in die 3D-Kultur zu überführen, um aus diesen Zellen kardiale Organoide zu generieren. Die Zellen wurden hierzu für zehn Tage in 2D-Kultur gehalten (Abb. 2A). An Tag eins wuchsen mehr Zellen in 2D-Kultur, die im zeitlichen Verlauf bis zur Aussetzung an Tag zehn quantitativ abnahmen. Diese wenigen Zellen wurden in die 3D-Kultur überführt und das Differenzierungsprotokoll zur Generierung der kardialen Organoide auf diese angewendet (Abb. 2B). An Tag eins nach Überführung in die 3D-Kultur zeigte sich, dass sich Aggregate geformt hatten. Diese Zellaggregate veränderten sich im zeitlichen Verlauf unter Anwendung der verschiedenen Kultivierungsmedien des Differenzierungs-protokolls morphologisch jedoch nicht. Es bildeten sich keine rundlichen, dichten Zellaggregate, die weder eine kammerartige Morphologie noch eine Kontraktion aufwiesen.

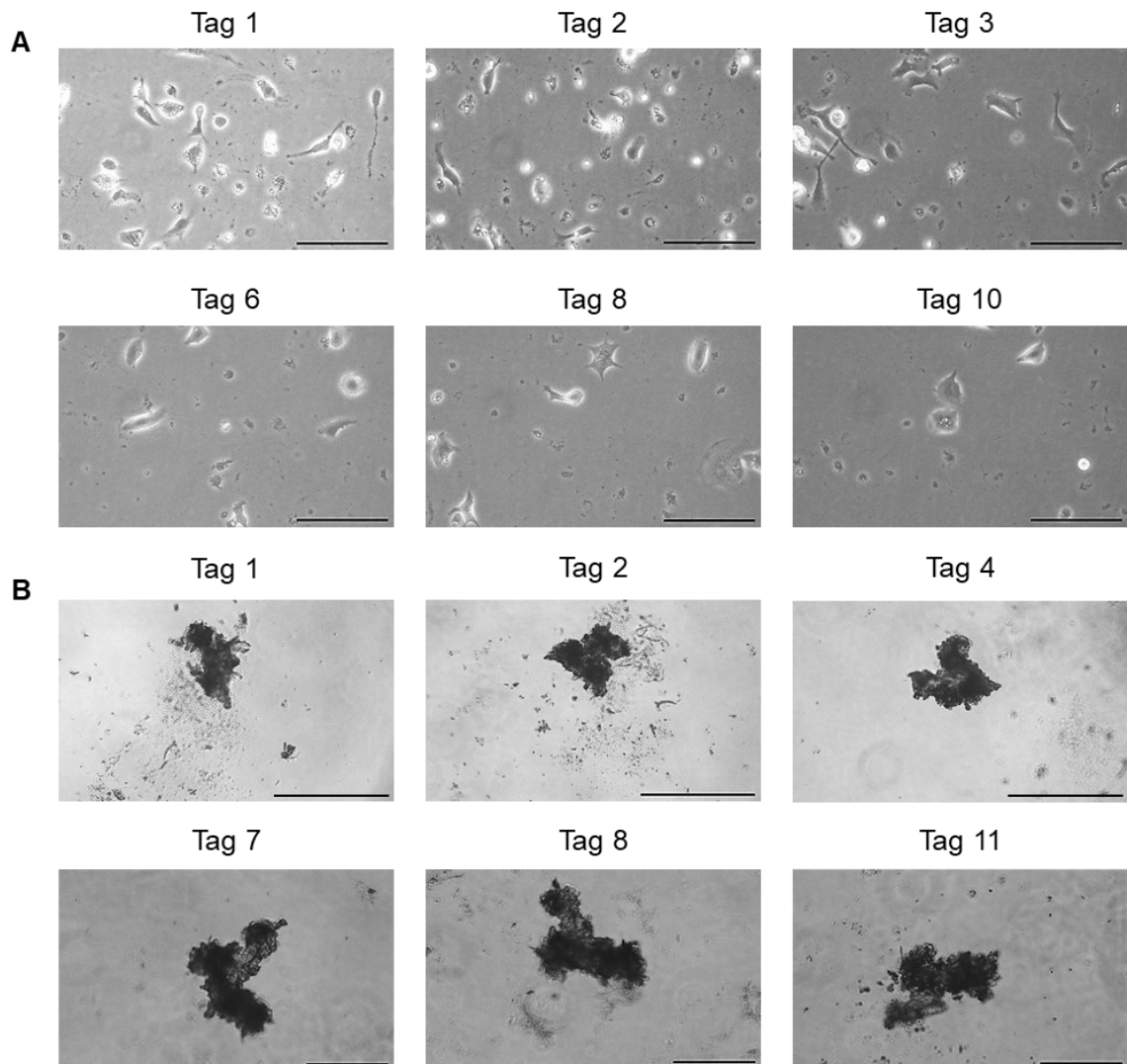


Abbildung 2: Anwendung des Kardioid-Differenzierungsprotokolls auf die ASCs der stromalen vaskulären Fraktion

Die Lichtmikroskopie-Aufnahmen zeigen den Versuch zur Generierung von Kardioiden aus den ASCs der stromalen vaskulären Fraktion. Die Zellen der stromalen vaskulären Fraktion wurden für zehn Tage in 2D-Kultur gehalten, wobei sich eine quantitative Reduzierung der Zellzahl zeigte (A). An Tag zehn wurden die Zellen in die 3D-Kultur überführt und das Kardioid-Differenzierungsprotokoll auf diese angewendet. Nach Tag eins in 3D-Kultur zeigte sich eine Aggregation der Zellen, jedoch bildeten diese im zeitlichen Verlauf keine rundlichen Sphäroide aus (B). Vergrößerungen: x40 in 2D, x10 in 3D. Maßstab: 100µm in 2D, 500µm in 3D.

5.5 Lichtmikroskopie-Aufnahmen von unstimulierten und mit LPS stimulierten Glattmuskelzellen in 2D- und 3D-Kultur

Diese Arbeit ging der Frage nach, ob es möglich ist, Glattmuskelzellen neben der 2D-Kultur auch in 3D-Kultur als Glattmuskelzell-Sphäroide zu kultivieren. Es zeigte sich, dass die Glattmuskelzellen erfolgreich als Sphäroide kultiviert werden konnten (Abb. 3A). Die Glattmuskelzellen aggregierten in 3D-Kultur zu dichten,

rundlichen Sphäroiden, wohingegen die Glattmuskelzellen in 2D in einer planaren Ebene wuchsen. Weder die Glattmuskelzellen in 2D- noch die in 3D-Kultur zeigten im zeitlichen Verlauf lichtmikroskopisch eine Änderung hinsichtlich ihrer Morphologie und konnten für anschließende Experimente über drei Tage in Kultur gehalten werden. Nachfolgend sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Glattmuskelzellen durch eine Stimulation mit einem inflammatorischen Reiz ihren Phänotyp verändern. Nach drei Tagen wurden beide Kulturen mit LPS, als inflammatorischer Stimulus, behandelt. Auch nach der Stimulation zeigten sich in der 2D- und 3D-Kultur lichtmikroskopisch, im Vergleich zu der jeweiligen unstimulierten Kultur, keine morphologischen Veränderungen (Abb. 3B). Die Lichtmikroskopie-Aufnahmen zeigen, dass es erfolgreich gelungen ist, neben der 2D-Kultur, Glattmuskelzell-Sphäroide zu generieren, die über mehrere Tage im dreidimensionalen Modell kultiviert werden konnten.

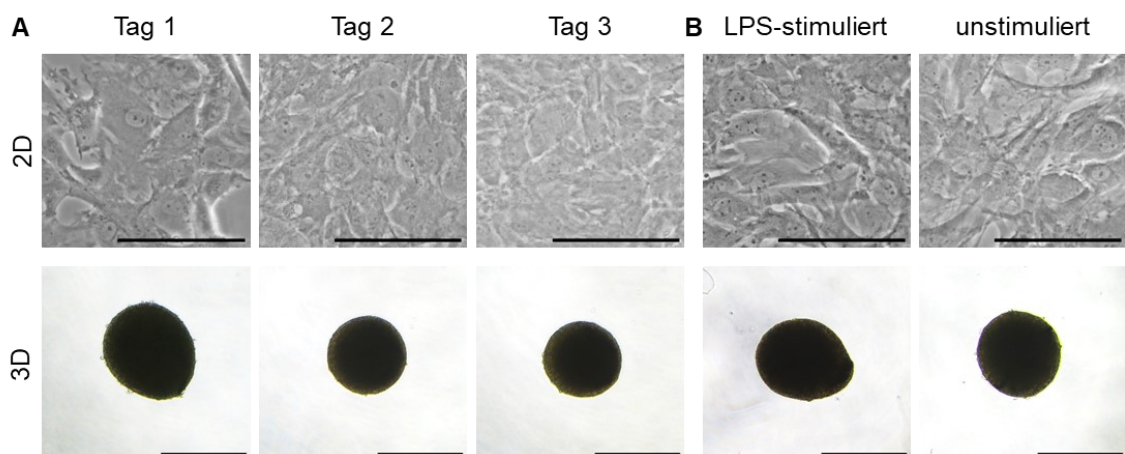


Abbildung 3: Glattmuskelzellen in 2D- und 3D-Kultur

Die Lichtmikroskopie-Aufnahmen zeigen Glattmuskelzellen in 2D- und 3D-Kultur. Neben der Kultivierung in 2D, ist es gelungen, rundliche Sphäroide zu generieren, die im zeitlichen Verlauf ihre Form beibehielten (A). Nach drei Tagen wurden die Zellen in 2D- und 3D-Kultur mit LPS stimuliert. Es zeigte sich, dass die 2D-Kultur sich dadurch morphologisch nicht veränderten und auch die Sphäroide nach Stimulation in ihrem dreidimensionalen Zellverband blieben (B). Vergrößerungen: x40 in 2D, x5 in 3D. Maßstab: 100µm in 2D, 500 in 3Dµm.

5.6 Kein Nachweis von F4/80 in der 2D-Glattmuskelzellkultur

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Glattmuskelzellen in 2D-Kultur durch Stimulation mit LPS für eine Stunde, als inflammatorischer Stimulus, ihren Phänotyp hin zu Makrophagen-ähnlichen Glattmuskelzellen ändern. Dazu wurden Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der 2D-Kultur nach der Stimulation mit LPS und anschließender Färbung der Zellen mit DAPI (blau) sowie F4/80-

Antikörper (grün) erstellt (Abb. 4). Die Zellkerne der Glattmuskelzellen zeigten sich durch die DAPI-Färbung sowohl in der mit LPS stimulierten Kultur als auch in der unstimulierten Kultur in blau. Das Glykoprotein F4/80, spezifisch für Makrophagen, sollte mit dem F4/80-Antikörper in grün dargestellt werden. Weder in der mit LPS stimulierten noch in der unstimulierten Kultur konnte ein grünes Signal zum Nachweis von F4/80 nachgewiesen werden.

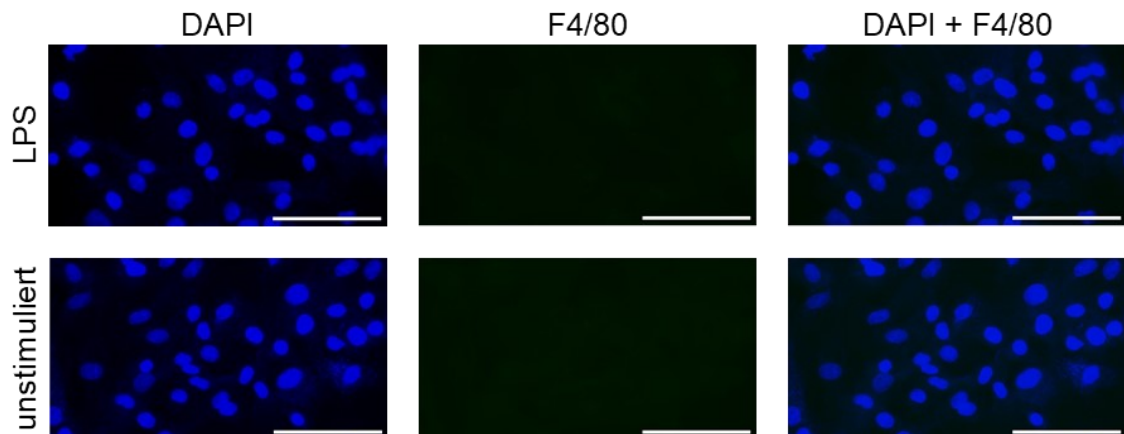


Abbildung 4: Kein F4/80-Signal nach LPS-Stimulation in der 2D-Kultur

Die Glattmuskelzellen der 2D-Kultur wurden nach LPS-Stimulation mit DAPI (blau) und F4/80 (grün) gefärbt. In den Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen zeigte sich weder in der mit LPS stimulierten noch in der unstimulierten Kultur ein Signal für F4/80. Vergrößerung: x40. Maßstab 100µm.

5.7 Nachweis von F4/80 in Glattmuskelzell-Sphäroiden

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Glattmuskelzellen in 3D-Kultur durch Stimulation mit LPS für eine Stunde, als inflammatorischer Stimulus, ihren Phänotyp hin zu Makrophagen-ähnlichen Glattmuskelzellen ändern. Hierzu wurden *Laser-Scanning*-Mikroskopie-Aufnahmen der Glattmuskelzell-Sphäroide nach Stimulation mit LPS und anschließender Färbung mit DAPI (blau) und dem F4/80-Antikörper (grün) erstellt (Abb. 5). Die Zellkerne der Glattmuskelzell-Sphäroide zeigten sich durch die DAPI-Färbung sowohl in der mit LPS stimulierten Kultur als auch in der unstimulierten Kultur in blau. Das Glykoprotein F4/80, spezifisch für Makrophagen, sollte mit dem F4/80-Antikörper in grün dargestellt werden. Das mit LPS stimulierte Sphäroid zeigte, anders als das unstimulierte Sphäroid, ein grünes Signal zum Nachweis von F4/80. Dieses Bild zeigte sich auch bei Wiederholungsversuchen (n=7).

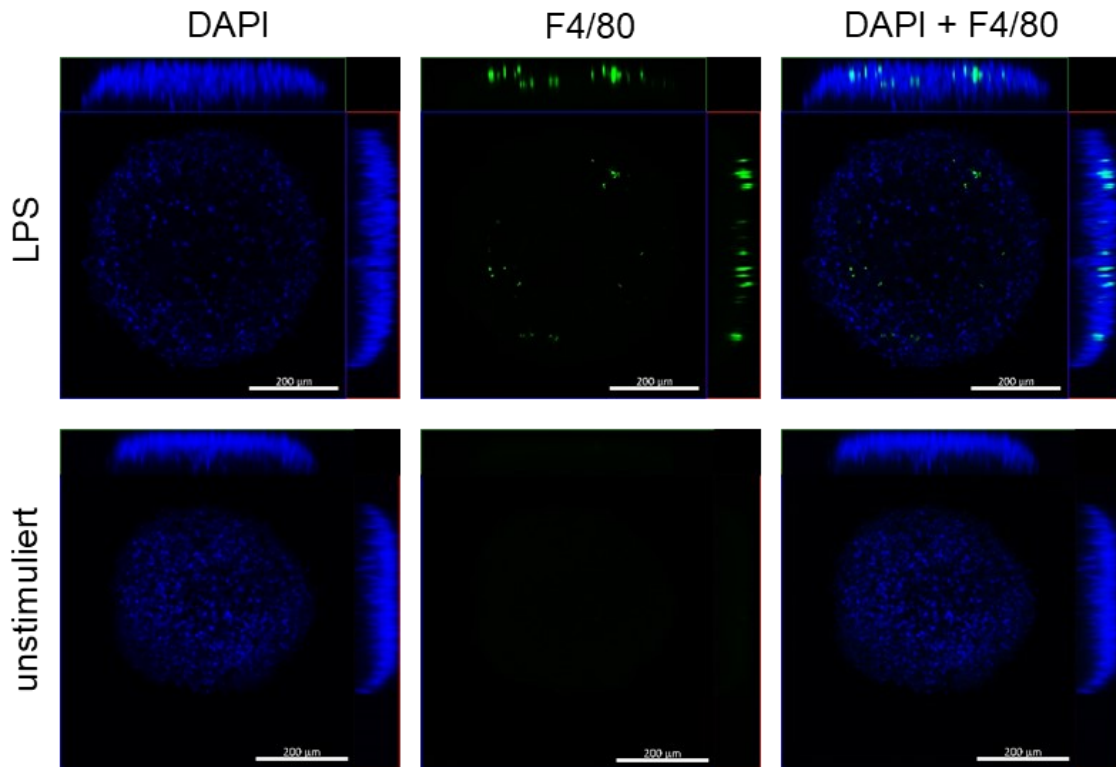


Abbildung 5: F4/80-Signal nach LPS-Stimulation in der 3D-Kultur

Die Glattmuskelzellen der 3D-Kultur wurden nach LPS-Stimulation mit DAPI (blau) und F4/80 (grün) gefärbt. In den *Laser-Scanning*-Mikroskopie-Aufnahmen zeigte sich in der mit LPS stimulierten Kultur ein F4/80-Signal, das in der unstimulierten Kultur nicht nachgewiesen werden konnte. Vergrößerung: x10. Maßstab 200µm.

5.8 Klassische Glattmuskelzell-Marker in 2D- und 3D-Kultur

Mithilfe einer *Proteomics*-Analyse sollte untersucht werden, ob Unterschiede bezüglich spezifischer Marker für Glattmuskelzellen zwischen der 2D- und 3D-Kultur nachweisbar waren. Abbildung sechs zeigt fünf Boxplots mit spezifischen Markern für Glattmuskelzellen, die sowohl in der 2D- als auch in der 3D-Kultur gemessen werden konnten. Hierbei handelte es sich um die Glattmuskelzell-Marker Aktin-Alpha-2; Aktin-Gamma-2, Caldesmon, Calponin-2, Myosin-11 und Transgelin. Diese sind mit der jeweilig gemessenen Intensität in logarithmischer Auftragung in den Boxplots in Abbildung sechs dargestellt. Die Proteine Caldesmon (FC = 0,301948; *p-value* = 0,055535), Calponin-2 (FC = -0,79167; *p-value* = 0,012302) und Transgelin (FC = 0,922626; *p-value* = 0,111275) zeigten in der 2D-Kultur hinsichtlich der Proteinabundanz keine signifikante Veränderung im Vergleich zur 3D-Kultur. Die Proteine Aktin-Alpha-2; Aktin-Gamma-2 (FC = 1,021446; *p-value* = 0,010762) und Myosin-11 (FC = 1,066885; *p-value* =

0,013382) waren ebenfalls in beiden Kulturen nachzuweisen, allerdings wiesen sie in der 2D-Kultur eine signifikant höhere Proteinabundanz im Vergleich zur 3D-Kultur mit einer Verdopplung auf.

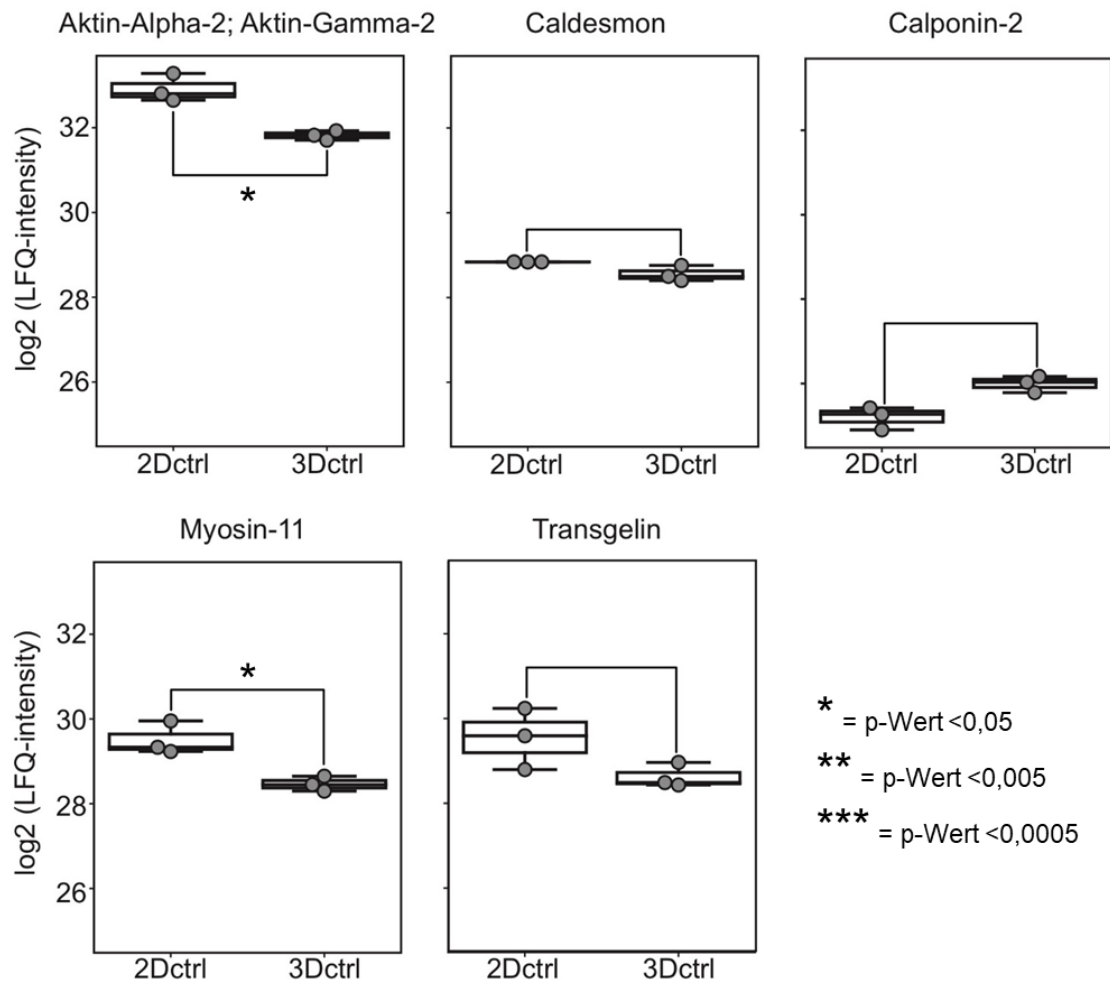


Abbildung 6: Nachweis von Glattmuskelzell-Markern in 2D- und 3D-Kultur

Mittels *Proteomics*-Analyse wurden die 2D- und 3D-Zellkultur hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung untersucht. Die Boxplots zeigen die gemessenen Proteinintensitäten spezifischer Glattmuskelzell-Marker in logarithmischer Auftragung, die sowohl in der 2D- als auch 3D-Kultur nachgewiesen werden konnten. Die *Proteomics*-Analyse wurde mit drei technischen und drei biologischen Replikaten durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied zwischen 2D und 3D lag vor, wenn der *p-value* < 0,05 und die *Fold change* < -1 oder > 1 war. Grafik in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Samet Bayraktar erstellt.

5.9 Hauptkomponentenanalyse

Im nächsten Schritt sollte mittels *Proteomics*-Analyse untersucht werden, ob es bezüglich der Proteinzusammensetzung Unterschiede zwischen der unstimulierten 2D- und 3D-Kultur sowie zwischen den unstimulierten Kulturen und den entsprechenden mit LPS stimulierten Kultur gab. Hierzu wurde der Datensatz an gemessenen Proteinen der vier unterschiedlichen Kultivierungs-

bedingungen (2D unstimuliert; 2D LPS-stimuliert; 3D unstimuliert; 3D LPS-stimuliert) mittels Hauptkomponentenanalyse auf bestehende Muster untersucht. Durch diese Hauptkomponentenanalyse konnte die Dimensionalität des Datensatzes auf zwei Hauptkomponenten reduziert werden und in einem linearen Koordinatensystem dargestellt werden, um den Datensatz an gemessenen Proteinen zu visualisieren und Cluster zu bilden. Abbildung sieben zeigt dieses lineare Koordinatensystem, in dem 40% der Information des Datensatzes auf der x-Achse und 20% der Information des Datensatzes auf der y-Achse dargestellt wurde, sodass insgesamt 60% der Informationen durch diese Hauptkomponentenanalyse visualisiert wurde. Es zeigte sich, dass sich die Proteinzusammensetzung in der 2D-Kultur (blau und gelb) deutlich von der in der 3D-Kultur (grün und rot) unterschied. Allerdings lagen die Werte der jeweiligen unstimulierten Kulturen nahe bei denen der entsprechenden mit LPS stimulierten Kulturen. Es zeigte sich somit kein deutlicher Unterschied in der Proteinzusammensetzung zwischen den jeweiligen unstimulierten Kulturen in 2D und 3D und den entsprechenden mit LPS stimulierten Kulturen.

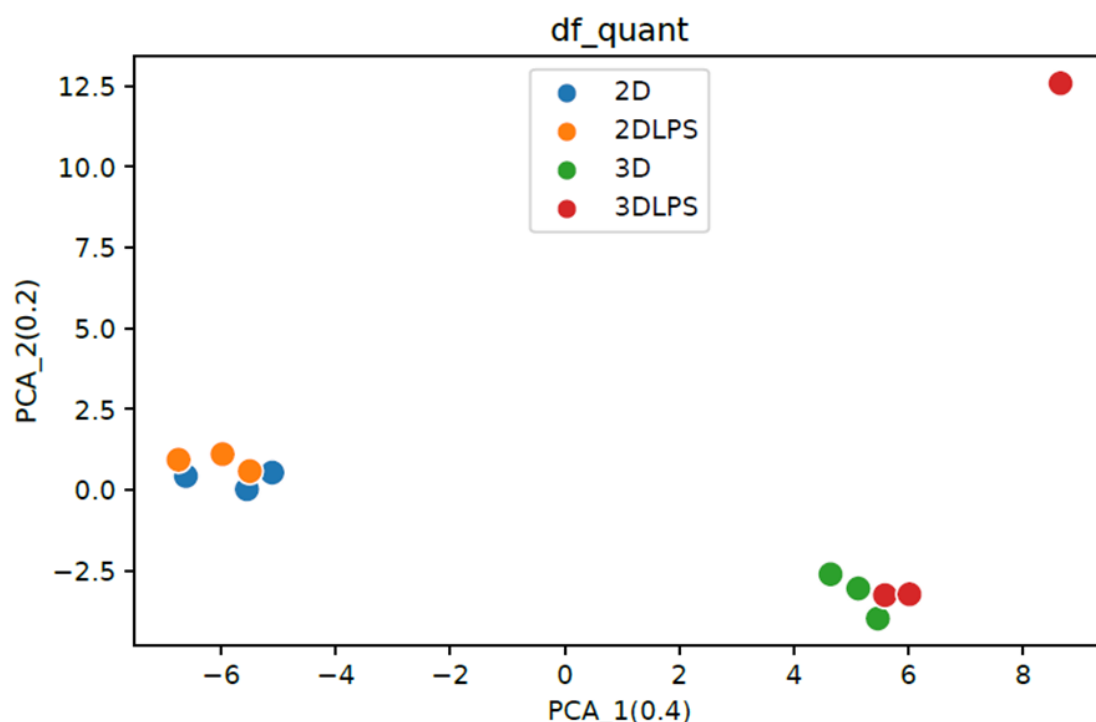


Abbildung 7: Unterschiedliche Proteinzusammensetzung der Glattmuskelzell-Kultur in 2D und 3D

Durch die Hauptkomponentenanalyse wurden alle Informationen des Datensatzes der *Proteomics*-Analyse über die vier unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen in einer zweidimensionalen Darstellungsweise zusammengeführt. Hierbei befinden sich 40% der

Informationen auf der x-Achse und 20% der Informationen auf der Y-Achse, sodass insgesamt 60% der Informationen in dieser Darstellung abgebildet wurden. Es zeigte sich, dass sich die Proteinzusammensetzung je nach Kultivierungsmethode voneinander unterschied, da die Werte der 2D-Kultur (blau und gelb) von den Werten der 3D-Kultur (grün und rot) deutlich abzugrenzen waren. Zwischen den jeweils unstimulierten und den entsprechenden mit LPS stimulierten Kulturen zeigten sich keine großen Unterschiede, da die Messwerte hier nah beieinander lagen (blau und gelb sowie grün und rot). Grafik in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Samet Bayraktar erstellt.

5.10 Veränderungen der Proteinabundanz zwischen unstimulierten und mit LPS stimulierten Glattmuskelzellen

Im Folgenden sollte mit Hilfe der *Proteomics*-Analyse untersucht werden, welche Proteine nach Stimulation mit LPS in beiden Zellkulturmodellen signifikante Unterschiede hinsichtlich ihrer Proteinabundanz im Vergleich zur unstimulierten Kultur aufwiesen. Es zeigte sich zunächst, dass in der 2D-Kultur nach Stimulation mit LPS vier Proteine (Abb. 8A) und in der 3D-Kultur acht Proteine (Abb. 8B) in ihrer Proteinabundanz im Vergleich zu den entsprechenden unstimulierten Kulturen signifikant verändert waren. Die vier veränderten Proteine im zweidimensionalen Modell waren in der unstimulierten 2D-Kultur im Vergleich zur mit LPS stimulierten 2D-Kultur in ihrer Proteinabundanz signifikant vermindert. Hierbei handelte es sich um die Proteine *Carbonyl reductase 1* (FC = -1,26924; *p-value* = 0,003577), *C1q and TNF related 3* (FC = -1,1371; *p-value* = 0,006748), *Sacsin* (FC = -1,12817; *p-value* = 0,00177) und *Vitronectin* (FC = -1,03115; *p-value* = 0,001006), die mit ihrer jeweiligen Funktion (übernommen von der bioinformatischen Datenbank UniProt) in Abbildung 8C gelistet sind. In der unstimulierten 3D-Kultur waren im Vergleich zur mit LPS stimulierten 3D-Kultur fünf Proteine in ihrer Proteinabundanz signifikant vermindert und drei Proteine signifikant erhöht. Hierbei handelte es sich um die Proteine *60S acidic ribosomal protein P2* (FC = -2,63316; *p-value* = 0,001056), *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta* (FC = -1,71019; *p-value* = 0,003993), *Obg-like ATPase 1* (FC = -1,27345; *p-value* = 0,001874), *Nucleolar transcription factor 1* (FC = -1,10067; *p-value* = 0,007444), *Probable glutathione peroxidase 8* (FC = -1,01677; *p-value* = 0,005199), *Integrin alpha-V* (FC = 1,463884; *p-value* = 0,001427), *Septin-8* (FC = 1,239993; *p-value* = 0,005793) und *Aldoketo reductase family 1 member B7 and B10* (FC = 1,039762; *p-value* = 0,000499), die ebenfalls mit ihrer Funktion (übernommen von der bioinformatischen Datenbank UniProt) in Abbildung 8D gelistet sind. Diese Proteine wurden im

weiteren Verlauf nicht weiter analysiert, da der Fokus mehr auf die Proteine gelegt werden sollte, die im Vergleich zwischen der 2D-Kultur und 3D-Kultur unter unstimulierten Bedingungen eine signifikante Veränderung hinsichtlich ihrer Proteinabundanz aufwiesen.

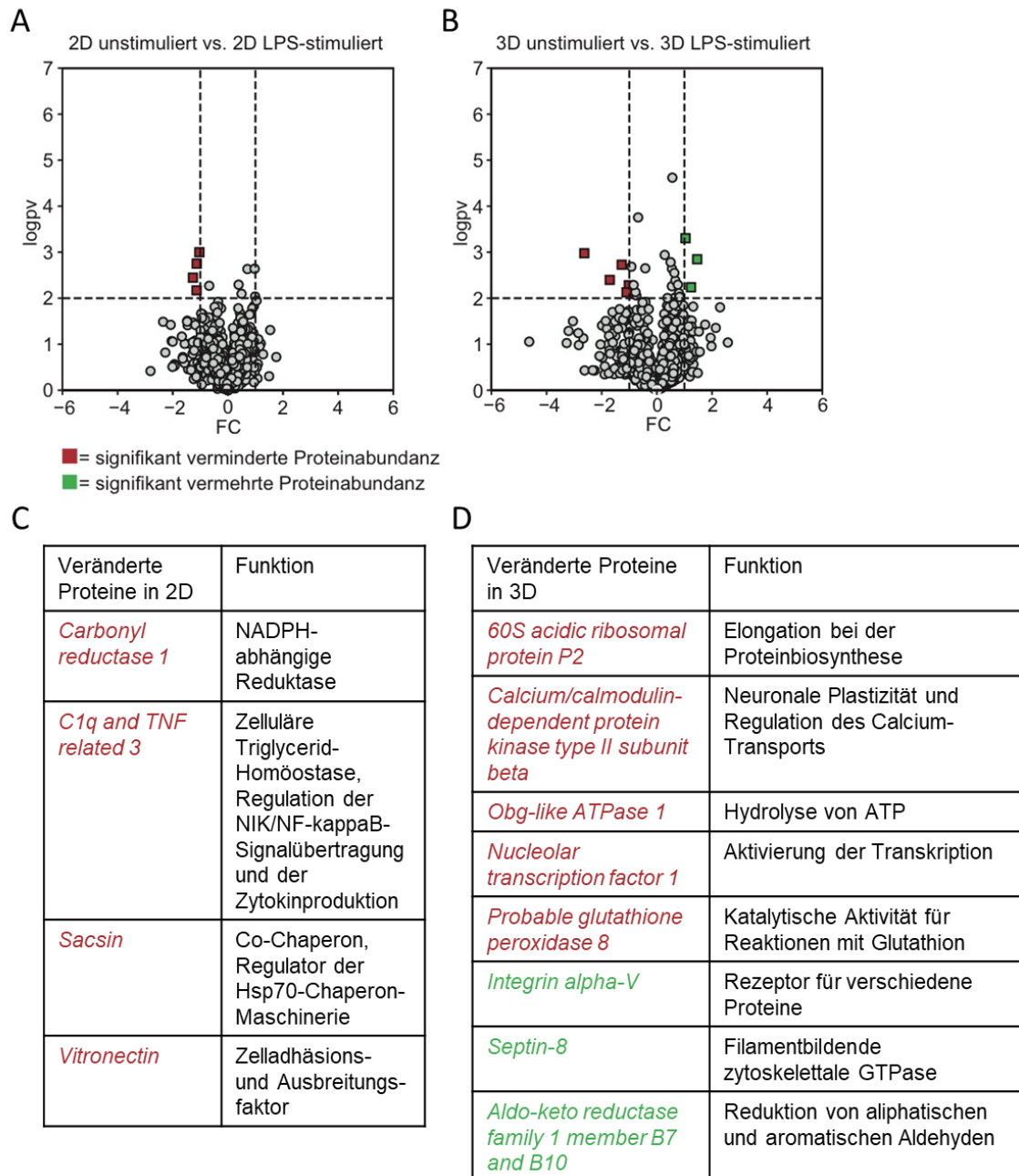


Abbildung 8: Veränderte Proteinzusammensetzung nach LPS-Stimulation

Nach Stimulation der Glattmuskelzellen mit LPS zeigte sich in der *Proteomics*-Analyse, dass die Proteinzusammensetzung sowohl in 2D als auch 3D verändert war. In der 2D-Kultur waren nach LPS-Stimulation vier Proteine (A) und in der 3D-Kultur acht Proteine (B) signifikant in ihrer Proteinabundanz verändert. Die signifikant veränderten Proteine sind mit ihrer jeweiligen Funktion (übernommen von der bioinformatischen Datenbank UniProt) in den beiden Tabellen für die 2D- und 3D-Kultur gelistet (C, D). Die rot markierten Proteine lagen in der unstimulierten Kultur im Vergleich zur mit LPS stimulierten Kultur signifikant vermindert und die grün markierten

Proteine signifikant vermehrt vor. Ein signifikanter Unterschied lag vor, wenn der *p-value* < 0,05 und die *Fold change* < -1 oder > 1 war. Grafik in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Samet Bayraktar erstellt.

5.11 Signifikante Unterschiede in der Proteinzusammensetzung in 2D und 3D

Im nächsten Schritt sollten die Proteine identifiziert und analysiert werden, die sich je nach Kultivierungsmethode in 2D oder 3D signifikant unterschieden. Generell konnten mittels *Proteomics*-Analyse insgesamt unter Betrachtung aller vier Kultivierungsbedingungen (2D unstimuliert; 2D LPS-stimuliert; 3D unstimuliert; 3D LPS-stimuliert) 1525 Proteine gemessen werden (Abb. 9A). Bezüglich der beiden unstimulierten Kulturen in 2D und 3D zeigte sich, dass insgesamt 1375 identisch waren, die 2D-Kultur 105 und die 3D-Kultur 32 einzigartige Proteine aufwies (Abb. 9B). Die 1375 Proteine, die sowohl in der 2D- als auch in der 3D-Kultur gemessen werden konnten, sollten nun auf eine signifikante Veränderung der Proteinabundanz analysiert werden. Hierbei stellte sich heraus, dass 54 Proteine eine signifikant höhere Proteinabundanz in der 2D-Kultur und 71 Proteine eine signifikant höhere Proteinabundanz in der 3D-Kultur aufwies (Abb. 9C). Dementsprechend sollte der Frage nachgegangen werden, um welche Proteine es sich hierbei handelte und welchen Signalwegen beziehungsweise spezialisierten Strukturen diese signifikant veränderten Proteine zuzuordnen werden konnten. Hierzu wurden zunächst die signifikant veränderten Proteine aus dem Datensatz der *Proteomics*-Analyse ermittelt und eine *Pathway*-Analyse mit Hilfe des Programms KEGG 2019 durchgeführt. Die entsprechenden Signalwege und spezialisierten Strukturen, welche den signifikant veränderten Proteinen zugeordnet werden konnten, sind mit der entsprechenden Trefferzahl (*hits*) an zugehörigen Proteinen in Abbildung 9D dargestellt. Von diesen sollten nun die Signalwege beziehungsweise spezialisierten Strukturen *Focal adhesion*, *Regulation of actin cytoskeleton*, *ECM-receptor interaction* und *Tight junction* hinsichtlich der Trefferproteine genauer analysiert werden, da diese sich vor allem auf die Interaktion der Zellen untereinander und mit der ECM beziehen. Es sollte untersucht werden, welche Unterschiede diese, je nach Kultivierungsmodell, aufwies. Die spezialisierte Struktur *Focal adhesion* wies mit 13 zugeordneten Proteinen die meisten Treffer

auf. Dem Signalweg *Regulation of actin cytoskeleton* konnten elf Proteine, dem Signalweg *ECM-receptor interaction* sieben Proteine und der spezialisierten Struktur *Tight Junction* acht Proteine zugeordnet werden. Die jeweiligen Proteine sind in Abbildung 9E gelistet, wobei die grün markierten Proteine in 2D und die rot markierten Proteine in 3D eine signifikant höhere Proteinabundanz aufwiesen. Betrachtete man die Treffer-Proteine genauer, fiel auf, dass einige dieser Proteine allen vier Signalwegen beziehungsweise spezialisierten Strukturen zugeordnet werden konnten und mehrere Proteine aus einer Proteingruppe eine signifikant veränderte Proteinabundanz aufwiesen. Bei diesen Proteingruppen handelte es sich um Aktinine, Myosine, Integrine und Proteine der ECM. Diese Proteingruppen werden im folgenden Abschnitt näher betrachtet, um zu untersuchen, um welchen Faktor die Proteine in ihrer Proteinabundanz signifikant vermehrt oder vermindert vorlagen.

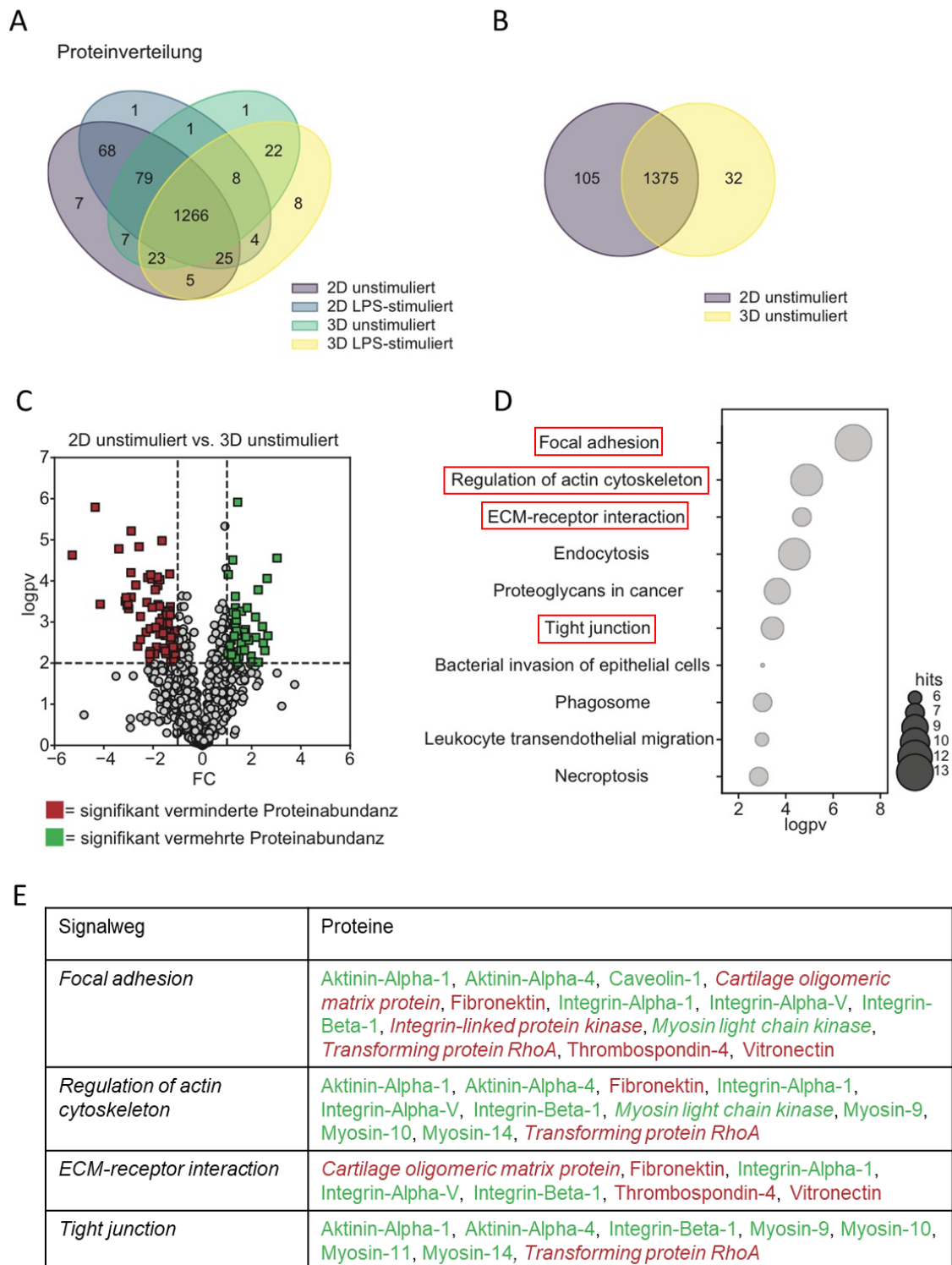


Abbildung 9: Signifikante Unterschiede in der Proteinzusammensetzung in 2D und 3D

Mittels *Proteomics*-Analyse konnten insgesamt 1525 Proteine gemessen werden (A). In den unstimulierten 2D- und 3D-Zellkulturen waren 1375 Proteine identisch (B). Von diesen hatten 54 Proteine eine signifikant höhere Proteinabundanz in der 2D-Zellkultur und 71 Proteine eine signifikant höhere Proteinabundanz in der 3D-Zellkultur (C). Diese Proteine konnten verschiedenen Signalwegen beziehungsweise spezialisierten Strukturen zugeordnet werden, die mithilfe der Datenbank *Kyoto encyclopedia of Genes and Genomes* ermittelt wurden (D). In der Tabelle sind die Trefferproteine, zugehörig zu den Signalwegen *Focal adhesion*, *Regulation of actin cytoskeleton*, *ECM-receptor interaction* und *Tight junction*, dargestellt. Die grün markierten

Proteine wiesen in der 2D-Kultur eine höhere und die rot markierten Proteine eine niedrigere Proteinabundanz im Vergleich zur 3D-Kultur auf (E). Grafik in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Samet Bayraktar erstellt.

5.12 Höhere Proteinabundanz von Aktininen, Myosinen und Integrinen in der 2D-Zellkultur

Bezüglich der vorher identifizierten Proteingruppen zeigte sich, dass die Aktinine, Integrine und Myosine in der 2D-Kultur im Vergleich zur 3D-Kultur signifikant vermehrt gemessen werden konnten. Diese sind mit der jeweilig gemessenen Intensität in logarithmischer Auftragung in den Boxplots in Abbildung zehn dargestellt. Bei den gemessenen Aktininen handelte es sich um Aktinin-Alpha-4 (FC = 1,239757; *p-value* = 4,45E-0,5) und Aktinin-Alpha-1 (FC = 1,340351; *p-value* = 0,00032). Aktinin-Alpha-4 wies in der 2D-Kultur eine 2,36-fach und Aktinin-Alpha-1 eine 2,53-fach erhöhte Proteinabundanz auf. Bei den gemessenen Integrinen handelte es sich um Integrin-Alpha-1 (FC = 2,162177; *p-value* = 0,019165), Integrin-Alpha-V (FC = 1,615798; *p-value* = 0,019385), Integrin-Beta-1 (FC = 1,318634; *p-value* = 0,009717) und Integrin-Beta-6 (FC = 0,95333; *p-value* = 0,015994). Integrin-Alpha-1 war in der 2D-Kultur 4,47-fach, Integrin-Alpha-V 3,06-fach und Integrin-Beta-1 2,49-fach mehr als in der 3D-Kultur gemessen worden. Bei Integrin-Beta-6 wurde im Vergleich zur 3D-Kultur in der 2D-Kultur eine 1,93-fach höhere Proteinabundanz gemessen, allerdings war diese Messung im Vergleich zu den anderen Integrinen knapp unterhalb der Grenze zur Signifikanz, da Integrin-Beta-6 mit einer FC von 0,95333 den festgesetzten Grenzwert von > 1 für eine Signifikanz unterschritt. Bei den gemessenen Myosinen handelte es sich um Myosin-9 (FC = 1,693869; *p-value* = 0,019646), Myosin-10 (FC = 1,717204; *p-value* = 0,024637), Myosin-11 (FC = 1,066885; *p-value* = 0,013382) und Myosin-14 (FC = 1,474429; *p-value* = 0,019133), wobei Myosin-9 in der 2D-Kultur im Vergleich zur 3D-Kultur eine um das 3,23-fach, Myosin-10 um das 3,28-fach, Myosin-11 um das 2,09-fach und Myosin-14 um das 2,77-fach erhöhte Proteinabundanz aufwiesen.

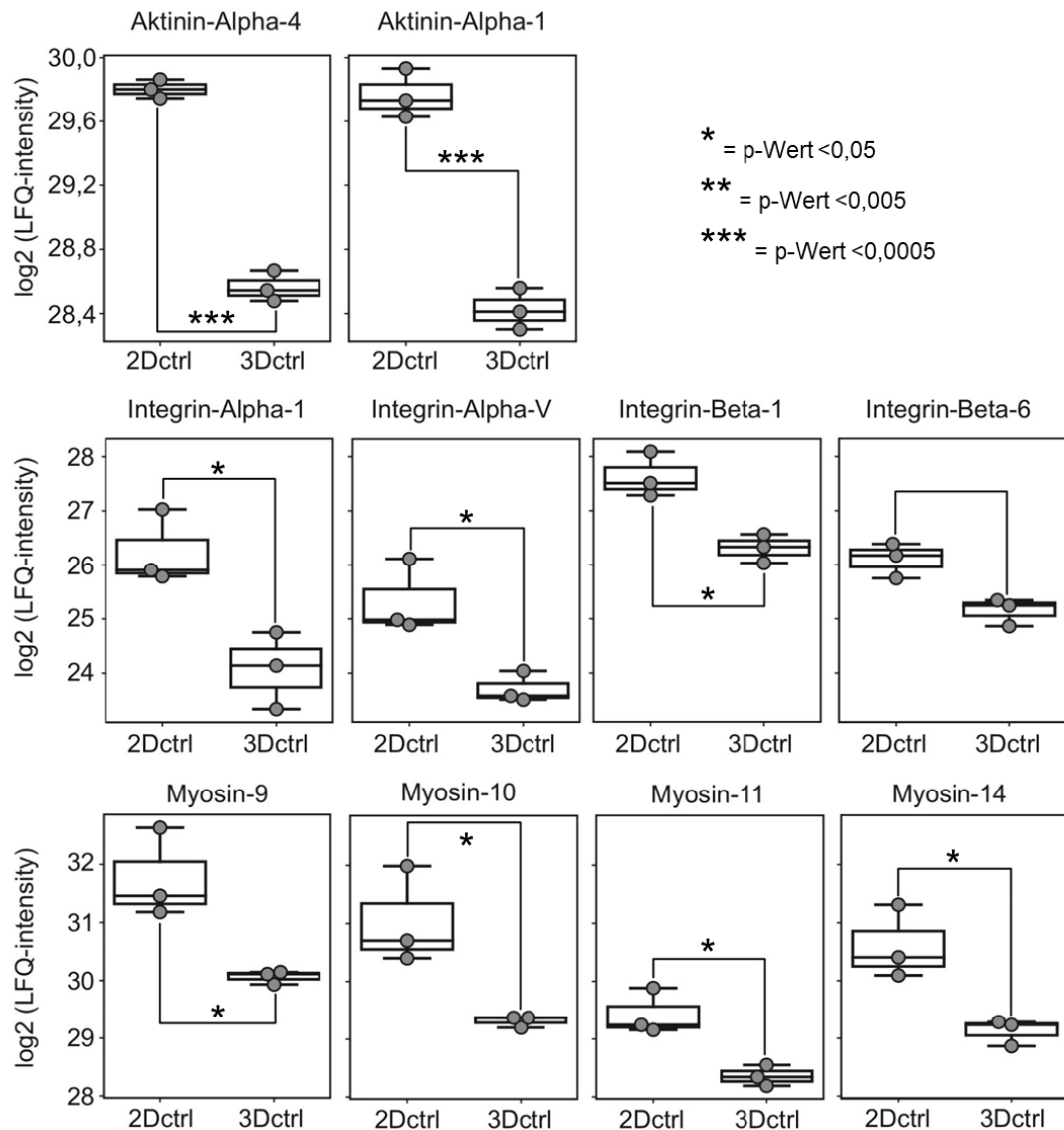


Abbildung 10: Boxplots von Proteinen mit höherer Proteinabundanz in der 2D-Kultur

Mittels *Proteomics*-Analyse wurden die 2D- und 3D-Zellkultur hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung untersucht. Die Boxplots zeigen die gemessenen Proteinintensitäten von ausgewählten Proteinen in logarithmischer Auftragung, die eine höhere Proteinabundanz in der 2D-Zellkultur aufwiesen. Hierbei handelte es sich um verschiedene Aktinine, Integrine und Myosine. Die *Proteomics*-Analyse wurde mit drei technischen und drei biologischen Replikaten durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied zwischen 2D und 3D lag vor, wenn der *p-value* < 0,05 und die *Fold change* < -1 oder > 1 war. Lediglich Integrin-Beta-6 war mit einem *p-value* < 0,05 und einer *Fold change* von 0,95 nicht signifikant erhöht. Grafik in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Samet Bayraktar erstellt.

5.13 Niedrigere Proteinabundanz von ECM-assoziierten Proteinen in der 2D-Zellkultur

Bezüglich der vorher identifizierten Proteingruppen zeigte sich, dass Proteine, die Komponenten der ECM sind, eine niedrigere Proteinabundanz in der 2D-

Kultur im Vergleich zur 3D-Kultur aufwiesen. Diese sind mit der jeweilig gemessenen Intensität in logarithmischer Auftragung in den Boxplots in Abbildung 11 dargestellt. Hier konnten die Proteine Fibronectin (FC = -1,80017; *p-value* = 0,004445), Thrombospondin-4 (FC = -1,7527; *p-value* = 0,028243) und Vitronectin (FC = -0,98375; *p-value* = 0,026166) identifiziert werden. Bei Fibronectin konnte eine 0,28-fach, bei Thrombospondin-4 eine 0,29-fach und bei Vitronectin eine 0,5-fach erhöhte Proteinabundanz im Vergleich zur 3D-Kultur gemessen werden. Im Gegensatz zu Fibronectin und Thrombospondin-4 lag bei Vitronectin in der 3D-Kultur jedoch keine signifikant erhöhte Proteinabundanz im Vergleich zur 2D-Kultur vor, da Vitronectin mit einer FC von -0,98375 den festgesetzten Grenzwert von < -1 für eine Signifikant nicht erfüllte.

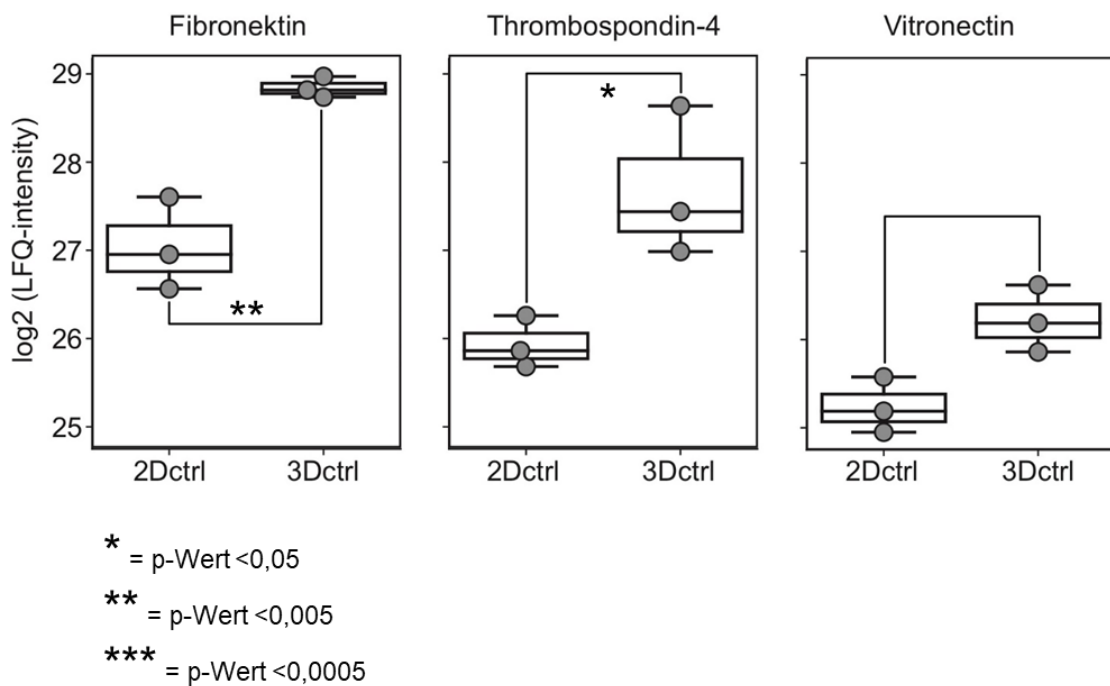


Abbildung 11: Boxplots von Proteinen mit niedrigerer Proteinabundanz in der 2D-Kultur

Mittels *Proteomics*-Analyse wurden die 2D- und 3D-Zellkultur hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung untersucht. Die Boxplots zeigen die gemessenen Proteinintensitäten von Proteinen der ECM in logarithmischer Auftragung, die eine niedrigere Proteinabundanz in der 2D-Zellkultur aufwiesen. Hierbei handelte es sich um die Proteine Fibronectin, Thrombospondin-4 und Vitronectin. Die *Proteomics*-Analyse wurde mit drei technischen und drei biologischen Replikaten durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied zwischen 2D und 3D lag vor, wenn der *p-value* < 0,05 und die *Fold change* < -1 oder > 1 war. Lediglich Vitronectin wies mit einem *p-value* < 0,05 und einer *Fold change* von -0,98 keine signifikant niedrigere Proteinabundanz in der 2D-Kultur auf. Grafik in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Samet Bayraktar erstellt.

5.14 Proteine mit ähnlicher Proteinabundanz in der 2D- und 3D-Zellkultur

Unabhängig von den zuvor identifizierten Proteingruppen zeigte sich zusätzlich, dass in beiden Kulturmodellen viele verschiedene Kollagene nachzuweisen waren. Diese sind mit der jeweilig gemessenen Intensität in logarithmischer Auftragung in den Boxplots in Abbildung zwölf dargestellt. Die Kollagene zeigten jedoch keine signifikante Veränderung hinsichtlich ihrer Proteinabundanz im Vergleich zwischen der 2D- und 3D-Kultur. Die Kollagene, die gemessen werden konnten sind Alpha-1-Typ-I-Kollagen (FC = 0,013103; *p-value* = 0,972003), Alpha-2-Typ-I-Kollagen (FC = 0,009752; *p-value* = 0,978916), Alpha-1-Typ-II-Kollagen (FC = -0,68583; *p-value* = 0,043475), Alpha-1-Typ-III-Kollagen (FC = 0,036875; *p-value* = 0,878167), Alpha-1-Typ-V-Kollagen (FC = 0,577309; *p-value* = 0,217397), Alpha-2-Typ-V-Kollagen (FC = 0,504731; *p-value* = 0,014165), Alpha-1-Typ-VI-Kollagen (FC = -0,59516; *p-value* = 0,180629), Alpha-2-Typ-VI-Kollagen (FC = 0,213616; *p-value* = 0,710357) und Alpha-1-Typ-VIII-Kollagen (FC = -0,01422; *p-value* = 0,989014).

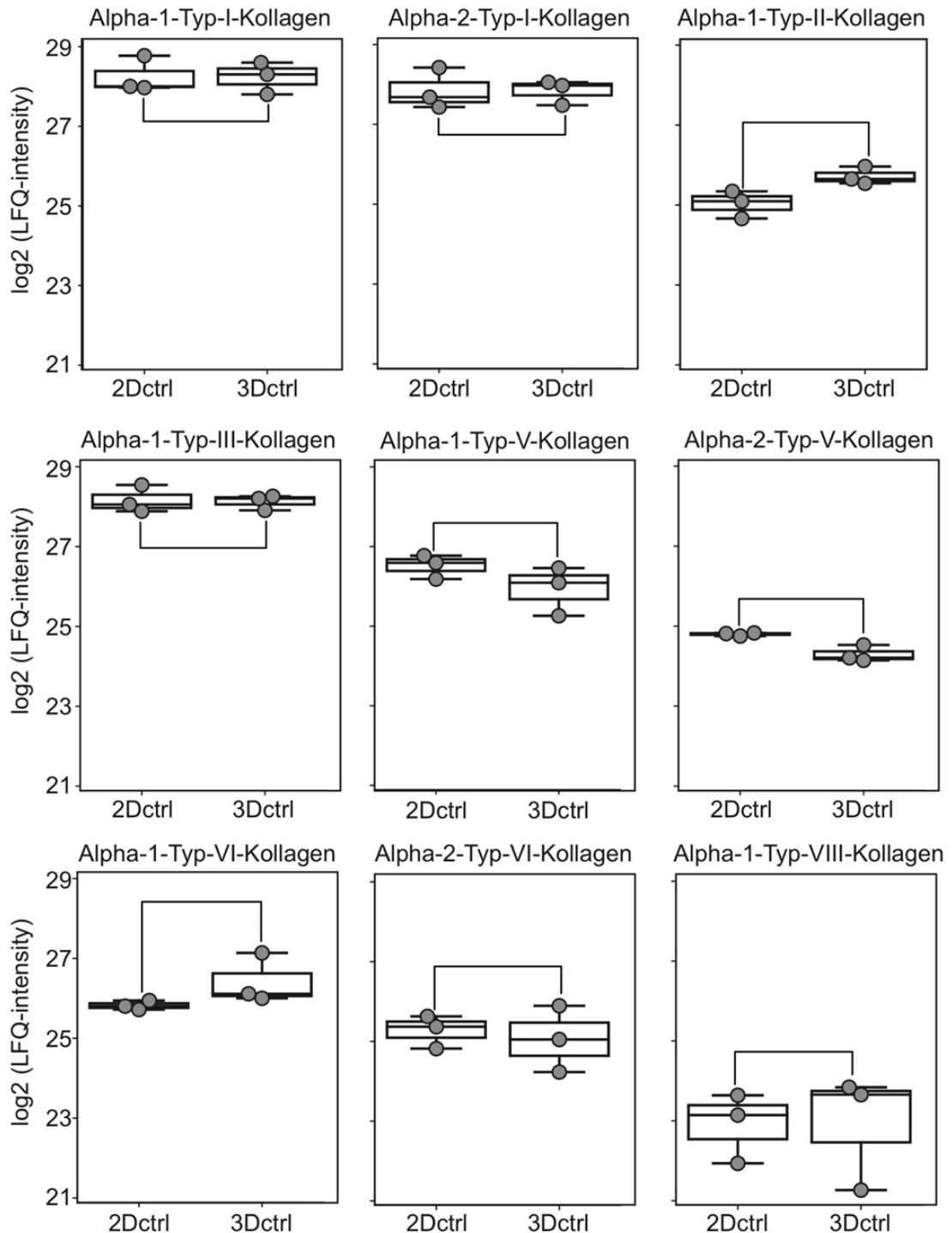


Abbildung 12: Kein Unterschied der Proteinabundanz in 2D und 3D bei Kollagenen

Mittels *Proteomics*-Analyse wurden die 2D- und 3D-Zellkultur hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung untersucht. Die Boxplots zeigen die gemessenen Proteinintensitäten von verschiedenen Kollagenen in logarithmischer Auftragung, die im Vergleich zwischen der 2D- und 3D-Zellkultur keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Proteinabundanz aufwiesen. Die *Proteomics*-Analyse wurde mit drei technischen und drei biologischen Replikaten durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied zwischen 2D und 3D lag vor, wenn der *p-value* < 0,05 und die *Fold change* < -1 oder > 1 war. Grafik in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Samet Bayraktar erstellt.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden erste Schritte unternommen, ein Protokoll zur Generierung von kardialen Organoiden aus ASCs aus viszeralem Rattenfettgewebe zu etablieren, in Anlehnung an ein bereits etabliertes Protokoll zur Generierung von kardialen Organoiden aus humanen pluripotenten Stammzellen. Außerdem bestand das Ziel dieser Arbeit darin, Sphäroide aus Glattmuskelzellen zu generieren, die mit einer 2D-Zellkultur aus Glattmuskelzellen hinsichtlich der Proteinzusammensetzung verglichen werden sollten. Nach Behandlung mit LPS, als inflammatorischer Stimulus, sollten die beiden Zellkulturen bezüglich eines Phänotyp-Wechsels der Glattmuskelzellen untersucht werden und auch hier hinsichtlich der Proteinzusammensetzung verglichen werden.

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit sind folgende:

- Misserfolg bei der Generierung von kardialen Organoiden aus ASCs aus viszeralem Rattenfettgewebe
- Erfolgreiche Generierung von Sphäroiden aus Glattmuskelzellen
- Phänotyp-Wechsel der Glattmuskelzellen nach Stimulation mit LPS in der 3D-Kultur, jedoch nicht in der 2D-Kultur
- Unterschiede in der Proteinzusammensetzung zwischen der unstimulierten 2D-Kultur und der unstimulierten 3D-Kultur, sowie zwischen den jeweiligen unstimulierten Kulturen und der entsprechenden mit LPS stimulierten Kultur

6.1 Vergleich von Modellen zur Generierung von kardialen Organoiden und der entsprechenden Modulation von Signalwegen

In dieser Arbeit wurden multiple Methoden zur Generierung von kardialen Sphäroiden beziehungsweise Organoiden unter gerüstbasierten oder gerüstfreien Bedingungen gelistet, wodurch deutlich wird, dass dreidimensionale Zellkulturmodelle einen immer höheren Stellenwert in der Forschung erlangen. Es ist bereits mehrfach gelungen, kardiale Organoide zu generieren. Der Fokus

dieser Arbeit lag auf den Modellen zur Generierung kardialer Organoide unter gerüstfreien Bedingungen. Durch den Vergleich der unterschiedlichen, bereits etablierten, Protokolle (Tabelle 5) fiel auf, dass alle in grundlegende Signalwege der Kardiogenese, wie den Wnt-Signalweg oder den PI3K-AKT-Signalweg, eingriffen, um die Differenzierung von humanen pluripotenten Stammzellen zu herzspezifischen kardialen Zellen zu fördern. Jedoch zeigten sich Unterschiede bezogen auf die Aktivierung und Inhibierung dieser Signalwege und der Nutzung weiterer Reagenzien, um die Kardiogenese zu modellieren. In dieser Arbeit wurde das Protokoll nach Hofbauer et al. [1] ausgewählt, um die kardialen Organoide aus ASCs, aus viszeralem Rattenfettgewebe, zu generieren. Nachfolgend werden Gründe aufgeführt, warum für diese Arbeit das Protokoll von Hofbauer et al. [1] anstelle der anderen Vergleichsprotokolle (Tabelle 5) ausgewählt wurde. Ein Grund, warum das Protokoll nach Hofbauer et al. [1] ausgewählt wurde, ist, dass das Protokoll ein in der Handhabung einfaches und kostengünstiges Modell darstellte und die Verwendung der entsprechenden Reagenzien und Modulation der Signalwege im Protokoll von Hofbauer et al. [1] einen zielführenden Effekt bezüglich der Kardiogenese und Generierung von kardialen Organoiden zeigte. Ein weiterer, zu nennender Grund ist, dass Hofbauer et al. [1] im Gegensatz zu den Protokollen von Bueno et al. [60], Forsythe et al. [63] und Kitsuka et al. [66] hiPSCs nutzte, um die kardialen Organoide zu generieren, und keine bereits differenzierten herztypischen Zellen. Dies war eine wichtige Voraussetzung für diese Arbeit, da hier mesenchymale Stammzellen aus viszeralem Rattenfettgewebe verwendet wurden und keine bereits differenzierten herztypischen Zellen. Die Protokolle von Hofbauer et al. [1] und Lewis-Israeli et al. [33, 70] wiesen im Vergleich viele Parallelen auf. Beide griffen zur Generierung der kardiale Organoide im Gegensatz zu den anderen bereits genannten Protokollen (Tabelle 5) in den PI3K-AKT-Signalweg ein, der ebenfalls eine Rolle während der Kardiogenese spielt. Sie imitierten den Prozess der Kardiogenese dementsprechend adäquater, sodass diese beiden Protokolle die interessanteren Ansätze in Bezug auf die Ziele dieser Arbeit boten. Letztlich wurde in dieser Arbeit das Protokoll von Hofbauer et al. [1] gewählt, um es auf die mesenchymalen Stammzellen anzuwenden, da es, im Vergleich zu den Protokollen von Lewis-Israeli et al. [33, 70], zusätzlich weitere Reagenzien, wie beispielsweise Retinsäure und VEGF-A verwendete, um den Prozess der

Kardiogenese zu modulieren und beispielsweise mittels VEGF-A die Differenzierung von Endothelzellen zu fördern. Denn Hofbauer et al. [1] generierte vorerst nur kardiale Organoiden mit enthaltenden Kardiomyozyten und Fibroblasten-ähnlichen Zellen und erst durch die Zugabe von VEGF-A konnten auch Endothelzellen im Kardioid nachgewiesen werden. Dies sprach ebenfalls dafür, das Protokoll von Hofbauer et al. [1] für die Ziele dieser Arbeit auszuwählen, da es die Möglichkeit bot zuerst zu versuchen überhaupt Kardiomyozyten aus den mesenchymalen Stammzellen des viszeralen Rattenfettgewebes zu differenzieren. Bei Erfolg hätte dieses Protokoll dann auf die Generierung kardialer Organoiden mit zusätzlich enthaltenden Endothelzellen ausgeweitet werden können.

6.2 Erste Versuche der Generierung von kardialen Organoiden aus ASCs der SVF von viszeralem Rattenfettgewebe

Der Versuch, kardiale Organoiden mithilfe des Protokolls von Hofbauer et al. [1] aus ASCs, aus viszeralem Rattenfettgewebe, zu generieren, stellte eine Herausforderung dar. Es gestaltete sich schwer die ASCs aus der stromalen vaskulären Fraktion des viszeralen Rattenfettgewebes in 2D-Kultur zu isolieren und kultivieren. Das im Protokoll beschriebene Medium zur Kultivierung der Stammzellen in der 2D-Kultur vor der Aussetzung in die 3D-Kultur wurde mit 0,5% BSA angesetzt, jedoch zeigte sich in dieser Arbeit ein besseres Wachstum der Zellen in der 2D-Kultur durch eine Änderung der BSA-Konzentration auf 0,05%, sodass diese Anpassung für weitere Versuche abweichend vom Protokoll von Hofbauer et al. [1] fortgeführt wurde. Dementsprechend muss diskutiert werden, ob die BSA-Konzentration ein Grund für die sich als herausfordernd erwiesene Isolation und Kultivierung der ASCs der SVF in der 2D-Kultur ist. Einerseits wird bovines Serumalbumin häufig in der Zellkultur verwendet, da es das Wachstum und die Vermehrung von Zellen unterstützt. Andererseits ist bekannt, dass die Konzentration an BSA in einer Lösung die Viskosität beeinflusst [83]. Da die Zellen in dieser Arbeit, bei einer um das 10-fach erhöhten BSA-Konzentration, ein quantitativ vermindertes Wachstum zeigten, steht zur Diskussion, ob die 0,5%-ige BSA-Konzentration die Viskosität des Kultivierungsmediums so verändert hat, dass diese das Wachstum der Zellen negativ beeinflusst hat. Des

Weiteren zeigte Kikuchi et al. [84] in einer Arbeit im Hinblick auf die Generierung von Zell-Sphäroiden und Zellaggregaten, dass bovines Serumalbumin in Kombination mit Dextransulfat im Kultivierungsmedium die Adhäsion von Zellen an Oberflächen wirksam unterdrückt. Kikuchi et al. [84] nutzte dies, um Sphäroide generieren zu können, ohne eine Vorbeschichtungen von Zellkulturplatten durchführen zu müssen. Mithilfe der Zugabe von BSA und Dextransulfat konnten so nicht-adhärenzte Zellkulturen generiert werden [84]. Im Hinblick auf diese Arbeit könnte somit diskutiert werden, ob hier eine BSA-Konzentration von 0,5% ohne Kombination mit Dextransulfat ausgereicht hat, um die Zelladhäsion in der 2D-Kultur wirksam zu unterdrücken, sodass die Zellen der SVF sich nur schwer in 2D-Kultur kultivieren ließen. Dies würde die Beobachtung stützen, dass die Zellen bei einer, um das 10-fach, niedrigeren BSA-Konzentration ein besseres Wachstum zeigten, da bei einer BSA-Konzentration von 0,05% die Unterdrückung der Zelladhäsion vermutlich nicht so stark ausgeprägt war wie in der Kultur mit einer BSA-Konzentration von 0,5%. Als weiterer Grund dafür, dass die ASCs sich in der 2D-Kultur nur schwierig kultivieren ließen, kann zur Diskussion gestellt werden, dass es sich bei ASCs zwar, wie auch bei den hiPSCs, um eine Art von Stammzellen handelt, diese sich jedoch hinsichtlich ihrer Eigenschaften von den hiPSCs unterscheiden. Da hiPSCs, anders als ASCs, durch Reprogrammierung von adulten Körperzellen gewonnen werden, besitzen sie die Fähigkeit, ähnlich wie embryonale Stammzellen, in multiple Zelltypen zu differenzieren [85]. Die ASCs hingegen zählen zu den mesenchymalen Stammzellen, einer Art adulter Stammzellen, die sich nur zu bestimmten Zelltypen differenzieren lassen [85]. Einerseits könnte dies ein Grund dafür sein, dass das Protokoll von Hofbauer et al. [1] nicht exakt auf die ASCs anwendbar war. Andererseits wurde jedoch schon gezeigt, dass die Möglichkeit besteht, Kardiomyozyten aus, aus Fettgewebe stammenden, mesenchymalen Stammzellen zu generieren [86].

Die Zellen erreichten in der 2D-Kultur auch nach zehn Tagen noch keine Konfluenz von 70-80%. Durch die spezifischen Reagenzien, die dem Kultivierungsmedium zugefügt wurden, sollten sich die ASCs nach Ablauf der zehn Tage von den anderen, in der SVF enthaltenden, Zelltypen separiert haben, sodass in der 2D-Kultur nur noch ASCs vorhanden sein sollten.

Dementsprechend wurde der Versuch gestartet, die wenigen isolierten ASCs in die 3D-Kultur zu überführen. Aus den wenigen ausgesetzten Zellen formten sich bereits am ersten Tag Zellaggregate, die mit den speziellen Kultivierungsmedien aus dem Differenzierungsprotokoll von Hofbauer et al. [1] weiter behandelt wurden. Im Verlauf nahmen diese Zellaggregate nicht die typisch rundliche Organoid-Form an. Das Differenzierungsprotokoll zur Generierung kardialer Organoiden ohne enthaltende Endothelzellen wurde vollständig auf diese Zellaggregate angewendet, jedoch war ein Nachweis Organoid-typischer Eigenschaften, wie dem Vorhandensein herzspezifischer Zellen, einer hohlraumartigen Struktur und einer Kontraktion der Zellaggregate, nicht möglich. Mögliche Gründe dafür könnten sein, dass eine zu geringe Zellzahl ausgesetzt wurde, die ASCs nicht optimal aus der SVF separiert werden konnten und die Zellen folglich nicht adäquat auf die speziellen Reagenzien in den Kultivierungsmedien reagieren konnten. Dementsprechend folgte keine weitere Differenzierung der Zellen und keine adäquate Interaktion der Zellen untereinander, die essenziell für die Bildung der rundlichen Sphäroide beziehungsweise Organoiden gewesen wären.

Schlussendlich gelang es nicht, kardiale Organoiden zu generieren.

Zukünftig soll der Versuch gestartet werden, die SVF nach der Isolation aus dem viszeralen Rattenfettgewebe direkt im dreidimensionalen Modell, ohne vorherige Kultivierung in der 2D-Kultur, auszusetzen und die ASCs durch Zugabe entsprechender Kultivierungsmedien mit enthaltenden Reagenzien unmittelbar in der 3D-Kultur zu separieren und anschließend zu kardialen Organoiden zu differenzieren. So könnte die, sich als problematisch erwiesene, Isolation der ASCs in 2D-Kultur umgangen werden. Des Weiteren werden gegebenenfalls noch andere Anpassungen hinsichtlich der Konzentrationen der unterschiedlichen Reagenzien im Differenzierungsprotokoll vorgenommen werden müssen, um das Protokoll von Hofbauer et al. [1] auf die ASCs des viszeralen Rattenfettgewebes zu übertragen. Denn wie bereits genannt, handelt es sich bei hiPSCs und ASCs zwar jeweils um eine Art von Stammzellen, diese unterscheiden sich aber dennoch hinsichtlich ihrer Eigenschaften.

Bei erfolgreicher Etablierung dieses Protokolls könnte in Zukunft durch Zugabe von VEGF-A der Versuch gestartet werden, diese kardialen Organoiden auch mit enthaltenden Endothelzellen zu generieren.

Eine erfolgreiche Etablierung eines Protokolls zur Generierung von kardialen Organoiden aus ASCs von viszeralem Rattenfettgewebe wäre der nächste Schritt in Richtung personalisierte Medizin, da mit diesem Protokoll anschließend versucht werden könnte, individualisierte Kardioide aus humanem viszeralem Fettgewebe von bestimmten Patientengruppen zu generieren. Dies könnte die Forschung an verschiedenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder angeborenen Fehlbildungen des Herzens weiterbringen und die Forschung an individuellen, auf bestimmte Patientengruppen angepassten, Therapieoptionen unterstützen. Diese Forschung ist essenziell, da Herz-Kreislauf-Erkrankungen die führende Todesursache weltweit darstellen und angeborene Herzfehler die häufigsten Fehlbildungen des Menschen sind [35].

6.3 Sphäroide aus Glattmuskelzellen

Die in dieser Arbeit angewendete Methode zur Generierung von Glattmuskelzellen als Sphäroide zeigte Erfolg. Durch Aussetzung der Glattmuskelzellen in eine 96-ULA-Platte formten sich bereits nach dem ersten Tag rundliche Zellaggregate, die bis zum Tag der Stimulation mit LPS ihre rundliche Form behielten und somit für weitere Experimente mit Glattmuskelzellen als Sphäroide genutzt werden konnten.

Mittels *Proteomics*-Analyse konnten in diesen Glattmuskelzell-Sphäroiden fünf spezifische Glattmuskelzell-Marker nachgewiesen werden, von denen die beiden Marker Aktin-Alpha-2; Aktin-Gamma-2 und Myosin-11 im Vergleich zur 2D-Kultur in der 3D-Kultur eine niedrigere Proteinabundanz aufwiesen. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in der Arbeit von Reed et al. [87] wider, denen es ebenfalls gelungen ist, Glattmuskelzellen in einem dreidimensionalen System als sogenanntes *Engineered Vascular Smooth Muscle Cell Tissue* (EVTs) zu generieren. Auch hier wurden *Proteomics*-Analysen durchgeführt und es zeigte sich, dass der spezifische Glattmuskelzell-Marker Aktin-Alpha-2 in seiner Abundanz nach längerer Zeit in Kultur abnahm [87]. Diese beiden Ergebnisse

unterstreichen, dass die Expression des Kontraktionsmarker Aktin-Alpha-2 durch die Kultivierungsmethode beeinflusst wird und die gesamte Proteinzusammensetzung von Glattmuskelzellen sich durch die Kultivierung in 3D vermutlich verändert.

Beim Vergleich der beiden unstimulierten Glattmuskelzellkulturen in 2D und 3D zeigte sich, dass die Kultivierungsmethode einen deutlichen Einfluss auf die Proteinzusammensetzung nahm. In der 2D-Kultur konnten im Vergleich zur 3D-Kultur 54 Proteine in ihrer Proteinabundanz signifikant vermehrt und 71 Proteine signifikant vermindert gemessen werden.

Zu diesen signifikant veränderten Proteinen zählten Proteine, die bei der Zellformgebung, Zell-Zell-Interaktion, Zell-ECM-Interaktion sowie Zellteilung von Bedeutung sind. Proteine, wie Aktinine und Myosine, die das Zellgerüst stärken und die Zellteilung, Zellmigration und Zelladhäsion fördern, sowie Integrine, die Zellproliferation und Zellsignalweiterleitung unterstützen, waren in der 2D-Kultur in ihrer Proteinabundanz im Vergleich zur 3D-Kultur vermehrt vorhanden. Dies lässt vermuten, dass die genannten Funktionen, die diese Proteine besitzen, in der 2D-Kultur stärker ausgebildet sind als in der 3D-Kultur. Somit wären auch die Signalwege und spezialisierten Strukturen, mit denen diese Proteine assoziiert werden, wie die fokalen Adhäsionen, die Regulation des Aktin-Zytoskeletts, die ECM-Rezeptor-Interaktion durch Integrine und *Tight Junctions* in der 2D-Kultur ausgeprägter als in der 3D-Kultur. Jedoch muss bei dieser Vermutung bedacht werden, dass Zellen im zweidimensionalen Raum nicht unter physiologischen Bedingungen wachsen [2, 3], sodass diskutiert werden muss, ob die vermehrte Proteinabundanz der genannten Proteine in 2D dadurch zustande kam, dass sich die Zellen in diesem Kultivierungssystem unnatürlich schnell teilen, wie es üblich für zweidimensionale Zellkultursysteme ist [2, 3]. Somit könnte es sich gegebenenfalls um eine Überexpression der entsprechenden Proteine gehandelt haben. Unter Annahme dieser Aussage, wäre dann die dreidimensionale Zellkultur, die Kultur, die die Situation *in vivo* besser imitiert, da die Proteine hier durch eine adäquat schnelle Zellteilung vermutlich nicht überexprimiert werden [2, 3].

Ferner waren Proteine der ECM in der 3D-Kultur im Vergleich zur 2D-Kultur in ihrer Proteinabundanz signifikant erhöht, was unterstreicht, dass die 3D-Kultur die physiologische Situation besser imitiert, da diese das Potenzial besitzt, eigenständig Proteine der ECM zu bilden und eine ECM aufzubauen [2, 3]. Aufgrund der vermehrt gemessenen Proteinabundanz der ECM-Proteine Fibronektin, Thrombospondin-4 und Vitronectin könnte diskutiert werden, ob die Interaktionen von Zellen mit der, die Zellen umgebenden, ECM in der 3D-Kultur im Vergleich zur 2D-Kultur stärker ausgeprägt sind. Auch dieses Ergebnis weist Parallelen zur Arbeit von Reed et al. [87] auf, da diese mittels *Proteomics*-Analyse der ETVs ECM-Proteine, vor allem der Kollagen- und Proteoglykan-Familie und ECM-Proteinrezeptoren, nachweisen konnten. Multiple Kollagene wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls in den Glattmuskelzell-Sphäroiden nachgewiesen, jedoch zeigten diese keine signifikante Änderung ihrer Proteinabundanz im Vergleich zur 2D-Kultur, sodass angenommen werden kann, dass die Kultivierungsmethode in 2D oder 3D die Kollagenzusammensetzung in Glattmuskelzellen nicht wesentlich verändert.

Die genannten Vermutungen müssen in Zukunft durch weitere Analysen bestärkt oder entkräftigt werden, um die Schlussfolgerung, dass es sich bei der vermehrt gemessenen Proteinabundanz in 2D um eine Überexpression der Proteine handelt, zu bestätigen beziehungsweise zu entkräftigen. Genauso muss durch weitere Experimente geprüft werden, ob die 3D-Kultur aus Glattmuskelzellen tatsächlich das Potenzial besitzt, eigenständig eine ECM aufzubauen und die Situation *in vivo* somit adäquater imitiert als die 2D-Kultur aus Glattmuskelzellen.

Die erfolgreiche Generierung der Sphäroide aus Glattmuskelzellen ist ein Gewinn für die Zukunft, da bekannt ist, dass 3D-Zellkulturen die Situation *in vivo* besser imitieren als 2D-Zellkulturen [2, 3]. Mittels weiterer Forschung unter Verwendung der Glattmuskel-Sphäroide könnte in Zukunft der Frage nachgegangen werden, welche Pathomechanismen für die De-Differenzierung der kontraktile Glattmuskelzellen zu synthetischen Glattmuskelzellen und dem Entstehen von Erkrankungen, wie der Atherosklerose, verantwortlich sind. In Zukunft könnte so gegebenenfalls die Frage beantwortet werden, wie die synthetischen Glattmuskelzellen die Entwicklung, Progression und Stabilität von atherosklerotischen Plaques beeinflussen. Die Beantwortung dieser Frage

könnte dann im weiteren Verlauf die Entwicklung von Therapieoptionen im Hinblick auf Patienten mit Atherosklerose vorantreiben. Dies wäre ein großer Gewinn, da Atherosklerose zu den Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählt, die die weltweit führende Todesursache darstellen.

6.4 Phänotyp-Wechsel der Glattmuskelzellen nach inflammatorischer Stimulation

Es zeigte sich, dass die Glattmuskelzellen sowohl in der 2D- als auch 3D-Zellkultur durch die Stimulation mit LPS morphologisch keine Veränderungen aufwiesen. Mithilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie wurden die Glattmuskelzellen der 2D-Kultur hinsichtlich eines Phänotyp-Wechsels hin zu Makrophagen-ähnlichen Glattmuskelzellen untersucht. Einerseits zeigte sich kein spezifisches Signal für den angefärbten Makrophagen-Marker F4/80, sodass davon auszugehen ist, dass in der 2D-Kultur kein Phänotyp-Wechsel stattgefunden hat. Andererseits wiesen die stimulierten Sphäroide der 3D-Kultur in der *Laser-Scanning*-Mikroskopie Bereiche mit einem positiven Signal für F4/80 auf, was vermuten lässt, dass in der 3D-Kultur ein Phänotyp-Wechsel nach Stimulation mit LPS stattgefunden hat. In Studien mit vaskulären Glattmuskelzellen in 2D-Kultur, wurde bereits nachgewiesen, dass LPS, als inflammatorischer Stimulus, den *Toll-like* Rezeptor 4 (TLR4) stimuliert, der verschiedene Signalwege aktiviert, die die Zellproliferation verstärken [88]. Des Weiteren ist bekannt, dass Signalübertragungen über diesen TLR4 einen proinflammatorischen Phänotyp in vaskulären Glattmuskelzellen fördern [89]. Im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit könnte somit diskutiert werden, ob die Zellen in 3D-Kultur, durch die Stimulation mit LPS, verstärkt TLR4 exprimieren, was zu einem Phänotyp-Wechsel führen würde, und diese LPS-getriggerte TLR4-Expression in der 2D-Kultur nur in geringerem Maße nachzuweisen wäre. Diese Annahme könnte, bei Bestätigung, der Grund dafür sein, dass in der 3D-Kultur, anders als in der 2D-Kultur, F4/80-Signale nachzuweisen waren, da die Glattmuskelzellen in der 3D-Kultur gegebenenfalls über eine stärkere Expression von TLR4 und die darauffolgenden TLR4-Signalübertragungen schneller in einen proinflammatorischen Phänotyp übergehen konnten. Demzufolge sollte in weiteren Experimenten geprüft werden, ob TLR4 in den beiden Zellkulturmodellen nach

Stimulation mit LPS nachgewiesen werden kann. Falls TLR4 in der 2D- und 3D-Kultur tatsächlich nachgewiesen werden könnte, sollte zukünftig auch untersucht werden, ob die Expression von TLR4 zunimmt, wenn die Zellen in 2D und 3D nach Stimulation mit LPS für längere Zeit in Kultur behalten werden. Gegebenenfalls benötigen die Zellen in 2D eine längere Zeit nach Stimulation in Kultur, um in einen proinflammatorischen Phänotyp überzugehen, da sie die *in vivo*-Situation weniger adäquat imitieren als die 3D-Kultur, sodass nach längerer Zeit in Kultur gegebenenfalls auch hier F4/80-Signale nachgewiesen werden könnten. Zusätzlich sollte durch weitere Methoden, wie beispielsweise der Durchflusszytometrie oder PCR-Analyse, bestätigt werden, dass in der 3D-Kultur nach Stimulation mit LPS Makrophagen-ähnliche Glattmuskelzellen, die F4/80 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, nachgewiesen werden können.

Durch die Stimulation der Glattmuskelzellen mit LPS und anschließender *Proteomics*-Analyse konnte gezeigt werden, dass sich die jeweiligen stimulierten Zellkulturen in 2D und 3D in ihrer Proteinzusammensetzung von den jeweiligen unstimulierten Kulturen unterschieden. Es zeigten sich jedoch nur geringe Veränderungen in der Proteinzusammensetzung von wenigen, in ihrer Proteinabundanz signifikant veränderten, Proteinen. Um größere Unterschiede in der Proteinzusammensetzung zwischen den unstimulierten und mit LPS stimulierten Kulturen zu erreichen, hätten die Zellen nach der einstündigen Stimulation mit LPS vermutlich nicht sofort für die Mikroskopie- und *Proteomics*-Analysen aus der Kultur genommen und eingefroren werden müssen, sondern für eine längere Zeit in Kultur gehalten werden sollen. Diese längere Zeit in Kultur hätte den Zellen gegebenenfalls die Möglichkeit gegeben ihre Proteinzusammensetzung durch eine LPS-getriggerte Veränderung der Proteinexpression zu verändern.

Demzufolge sollte in Zukunft untersucht werden, wie sich die Zellen verhalten, wenn man die Zellen nach der einstündigen Stimulation mit LPS für beispielsweise 24, 48 oder 72 Stunden weiter in Kultur belässt und erst anschließend färbt beziehungsweise die *Proteomics*-Analyse durchführt. Denn es wäre interessant zu untersuchen, ob sich das Expressionsmuster der Zellen durch diese verlängerte Zeit in Kultur tatsächlich weiter verändert.

6.5 Limitationen dieser Arbeit

Die Limitationen dieser Arbeit ergeben sich aus mehreren methodischen und biologischen Herausforderungen, die im Hinblick auf die Aussagekraft und Übertragbarkeit der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Im Allgemeinen werden die Ergebnisse dieser Arbeit bereits durch die anfänglich erfolgte Literaturrecherche limitiert, da diese durch die alleinige Nutzung der Datenbank *PubMed* begrenzt wurde und so gegebenenfalls relevante Protokolle aus anderen Datenbanken ausgeschlossen wurden. Zusätzlich wurden nur Veröffentlichungen bis in das Jahr 2023 berücksichtigt, sodass der aktuelle Forschungsstand nicht abgebildet wird. Auch die Verwendung von Schlagwörtern und deren Kombination kann zu Abdecklücken führen. Demnach wäre es besser gewesen eine exakte Suchstrategie zu nutzen, klare Ein- und Ausschlusskriterien für alle Treffer-Protokolle festzulegen, die Qualität und Transparenz der Protokolle zu bewerten, weitere Datenbanken miteinzubeziehen und regelmäßige Aktualisierungen für den aktuellen Forschungsstand vorzunehmen.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass das verwendete Protokoll zur Generierung von Kardioiden auf bestimmte Ursprungszellen limitiert ist, da es nicht erfolgreich auf mesenchymale Stammzellen viszeralen Fettgewebe einer Ratte übertragen werden konnte. Das Protokoll muss für andere Zelltypen optimiert werden, wenn aus diesen anderen Zelltypen funktionelle Kardioiden mit Kontraktionsfähigkeit und Hohlräumen generiert werden sollen. Auch die Übertragbarkeit des Protokolls auf humane Zellen ist bislang nicht untersucht worden, was die Relevanz der Ergebnisse im Hinblick auf personalisierte Medizin einschränkt.

Des Weiteren zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich der Proteinzusammensetzung zwischen der 2D- und 3D-Glattmuskelzellkultur, besonders bei Struktur- und Matrixproteinen. Diese unterschiedliche Ausgangslage der Proteine limitieren die direkte Vergleichbarkeit der Modelle im Hinblick auf weitere Experimente. Zudem fehlen für die Glattmuskelzell-Sphäroide Daten zur Langzeitstabilität oder zum Reifungsgrad, was Aussagen über die Funktionalität dieses dreidimensionalen Zellkulturmodells einschränken.

Die Beobachtung, dass der Immunzellmarker F4/80 nach Stimulation mit LPS in der 3D-Zellkultur aber nicht in der 2D-Zellkultur nachzuweisen war, lässt offen,

ob Unterschiede in der Zellantwort vorliegen oder die Nachweismethode ein limitierender Faktor ist. Letztendlich kann auch mit einer *Proteomics*-Analyse nicht jeder Zelltyp oder jede Funktion dargestellt werden, da diese Ergebnisse durch die Auswahl an Replikaten und Analyseparametern eingeschränkt werden.

7 Schlussfolgerung

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass zur Generierung von kardialen Organoiden bestimmte Signalwege der Kardiogenese moduliert werden müssen, um 3D-Konstrukte zu erhalten, die die typischen kardialen Zelltypen enthalten, eine hohlraumartige Struktur aufweisen und die Fähigkeit zur Kontraktion besitzen. Es wurde gezeigt, dass das Protokoll von Hofbauer et al. [1] nicht auf ASCs aus viszeralem Rattenfettgewebe anwendbar ist und in Zukunft angepasst werden müsste, um erfolgreich kardiale Organoide aus den ASCs des viszeralen Rattenfettgewebes zu generieren. Des Weiteren gelang es, Glattmuskelzellen, neben der Kultivierung im zweidimensionalen Raum, auch im dreidimensionalen Raum zu kultivieren. Es zeigte sich, dass das Zellkulturmodell einen Einfluss auf die Proteinzusammensetzung der jeweiligen Kultur hat. Vor allem Proteine, die für grundlegende Eigenschaften, wie die Formhaltung der Zellen, die Zellteilung, die Zell-Zell-Interaktion und die Verknüpfung der Zellen mit der ECM, wichtig sind, wiesen Differenzen bezüglich ihrer Proteinabundanz je nach Zellkulturmodell auf. Auch das Potenzial von Glattmuskelzellen ihren Phänotyp, als Reaktion auf einen inflammatorischen Stimulus zu ändern, konnte, wenn auch nur in der 3D-Kultur, gezeigt werden.

Insgesamt unterstreicht diese Arbeit, dass die Zellkultur im dreidimensionalen Raum in Zukunft immer mehr an Bedeutung gewinnen wird, um die *in vivo*-Situation von Zellen adäquater zu imitieren. Mit dem zukünftigen Ziel, Kardioiden auch aus humanem viszeralem Fettgewebe zu generieren, könnte bei Erfolg die Forschung bezüglich personalisierter Medizin weiter vorangetrieben werden. Diese humanen Kardioiden könnten als Ansatz für die Forschung an individuellen Therapieoptionen für bestimmte Patientengruppen genutzt werden. Die Glattmuskelzell-Sphäroide sind in Zukunft als dreidimensionales Modell gewinnbringend, da mit diesen weiter am Pathomechanismus hinter dem

Phänotyp-Wechsel der Glattmuskelzellen im Rahmen einer Entzündungsreaktion geforscht werden könnte. Mit den Glattmuskelzell-Sphäroiden könnte der Pathomechanismus hinter der Entstehung von bestimmten Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie der Atherosklerose, weiter untersucht werden.

Da Herz-Kreislauf-Erkrankungen weiterhin die führende Todesursache weltweit darstellen, sind diese beiden 3D-Modelle gute Ansätze für die zukünftige medizinische Forschung auch im Hinblick auf personalisierte Medizin.

8 Literaturverzeichnis

1. Hofbauer, P., et al., *Cardioids reveal self-organizing principles of human cardiogenesis*. Cell, 2021. **184**(12): p. 3299-3317 e22.
2. Jensen, C. and Y. Teng, *Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?* Front Mol Biosci, 2020. **7**: p. 33.
3. Habanjar, O., et al., *3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(22).
4. Lancaster, M.A. and J.A. Knoblich, *Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies*. Science, 2014. **345**(6194): p. 1247125.
5. Taylor, J., et al., *Generation of immune cell containing adipose organoids for in vitro analysis of immune metabolism*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 21104.
6. Kapalczynska, M., et al., *2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures*. Arch Med Sci, 2018. **14**(4): p. 910-919.
7. Ryu, N.E., S.H. Lee, and H. Park, *Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells*. Cells, 2019. **8**(12).
8. Ho, B.X., N.M.Q. Pek, and B.S. Soh, *Disease Modeling Using 3D Organoids Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(4).
9. Yin, X., et al., *Engineering Stem Cell Organoids*. Cell Stem Cell, 2016. **18**(1): p. 25-38.
10. Valdoz, J.C., et al., *The ECM: To Scaffold, or Not to Scaffold, That Is the Question*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(23).
11. Frantz, C., K.M. Stewart, and V.M. Weaver, *The extracellular matrix at a glance*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 24): p. 4195-200.
12. Nii, T. and Y. Katayama, *Biomaterial-Assisted Regenerative Medicine*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(16).
13. Hughes, C.S., L.M. Postovit, and G.A. Lajoie, *Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture*. Proteomics, 2010. **10**(9): p. 1886-90.
14. Caliari, S.R. and J.A. Burdick, *A practical guide to hydrogels for cell culture*. Nat Methods, 2016. **13**(5): p. 405-14.
15. Rajan, S., D.S. Kudryashov, and E. Reisler, *Actin Bundles Dynamics and Architecture*. Biomolecules, 2023. **13**(3).
16. Foth, B.J., M.C. Goedecke, and D. Soldati, *New insights into myosin evolution and classification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3681-6.
17. Odrionitz, F. and M. Kollmar, *Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species*. Genome Biol, 2007. **8**(9): p. R196.
18. Pecci, A., et al., *MYH9: Structure, functions and role of non-muscle myosin IIA in human disease*. Gene, 2018. **664**: p. 152-167.
19. Takada, Y., X. Ye, and S. Simon, *The integrins*. Genome Biol, 2007. **8**(5): p. 215.
20. Gordon, M.K. and R.A. Hahn, *Collagens*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(1): p. 247-57.

21. Dalton, C.J. and C.A. Lemmon, *Fibronectin: Molecular Structure, Fibrillar Structure and Mechanochemical Signaling*. Cells, 2021. **10**(9).
22. Stenina-Adognravi, O. and E.F. Plow, *Thrombospondin-4 in tissue remodeling*. Matrix Biol, 2019. **75-76**: p. 300-313.
23. Ruzha, Y., et al., *Role of Vitronectin and Its Receptors in Neuronal Function and Neurodegenerative Diseases*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(20).
24. Dzobo, K. and C. Dandara, *The Extracellular Matrix: Its Composition, Function, Remodeling, and Role in Tumorigenesis*. Biomimetics (Basel), 2023. **8**(2).
25. Murphy, K.N. and A.J. Brinkworth, *Manipulation of Focal Adhesion Signaling by Pathogenic Microbes*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(3).
26. Revach, O.Y., I. Grosheva, and B. Geiger, *Biomechanical regulation of focal adhesion and invadopodia formation*. J Cell Sci, 2020. **133**(20).
27. Nersisyan, S., et al., *ECM-Receptor Regulatory Network and Its Prognostic Role in Colorectal Cancer*. Front Genet, 2021. **12**: p. 782699.
28. Angulo-Urarte, A., T. van der Wal, and S. Huveneers, *Cell-cell junctions as sensors and transducers of mechanical forces*. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2020. **1862**(9): p. 183316.
29. Hartsock, A. and W.J. Nelson, *Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 660-9.
30. Shankaran, A., et al., *Advances in development and application of human organoids*. 3 Biotech, 2021. **11**(6): p. 257.
31. Bora, P. and A.S. Majumdar, *Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation*. Stem Cell Res Ther, 2017. **8**(1): p. 145.
32. Minteer, D., K.G. Marra, and J.P. Rubin, *Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2013. **129**: p. 59-71.
33. Lewis-Israeli, Y.R., et al., *Self-assembling human heart organoids for the modeling of cardiac development and congenital heart disease*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 5142.
34. Miyamoto, M., et al., *Heart organoids and tissue models for modeling development and disease*. Semin Cell Dev Biol, 2021. **118**: p. 119-128.
35. Lewis-Israeli, Y.R., A.H. Wasserman, and A. Aguirre, *Heart Organoids and Engineered Heart Tissues: Novel Tools for Modeling Human Cardiac Biology and Disease*. Biomolecules, 2021. **11**(9).
36. Ozhan, G. and G. Weidinger, *Wnt/beta-catenin signaling in heart regeneration*. Cell Regen, 2015. **4**(1): p. 3.
37. Kruger, M., et al., *Insulin signaling regulates cardiac titin properties in heart development and diabetic cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(5): p. 910-6.
38. Nakajima, Y., et al., *Heart development before beating*. Anat Sci Int, 2009. **84**(3): p. 67-76.
39. Teo, A.K., et al., *Activin and BMP4 synergistically promote formation of definitive endoderm in human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2012. **30**(4): p. 631-42.
40. Asson-Batres, M.A., C. Rochette-Egly, and SpringerLink, *The Biochemistry of Retinoid Signaling III : Vitamin A and Retinoic Acid in*

- Embryonic Development*. 1st 2020. ed. Subcellular Biochemistry 95. 2020, Cham: Springer International Publishing : Imprint: Springer.
41. Yamazaki, Y. and T. Morita, *Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors*. Mol Divers, 2006. **10**(4): p. 515-27.
 42. Zhao, M., et al., *Y-27632 preconditioning enhances transplantation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in myocardial infarction mice*. Cardiovasc Res, 2019. **115**(2): p. 343-356.
 43. Matsumoto, T., M.H. Kim, and M. Kino-Oka, *Effect of Rho-Associated Kinase Inhibitor on Growth Behaviors of Human Induced Pluripotent Stem Cells in Suspension Culture*. Bioengineering (Basel), 2022. **9**(11).
 44. Wang, G., et al., *Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells*. J Physiol, 2015. **593**(14): p. 3013-30.
 45. Shi, J., et al., *Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2020. **319**(3): p. H613-H631.
 46. Sorokin, V., et al., *Role of Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity and Interactions in Vessel Wall Inflammation*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 599415.
 47. Gomez, D. and G.K. Owens, *Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis*. Cardiovasc Res, 2012. **95**(2): p. 156-64.
 48. Chakraborty, R., et al., *Promoters to Study Vascular Smooth Muscle*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019. **39**(4): p. 603-612.
 49. Rensen, S.S., P.A. Doevendans, and G.J. van Eys, *Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity*. Neth Heart J, 2007. **15**(3): p. 100-8.
 50. Liu, M. and D. Gomez, *Smooth Muscle Cell Phenotypic Diversity*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019. **39**(9): p. 1715-1723.
 51. Bennett, M.R., S. Sinha, and G.K. Owens, *Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis*. Circ Res, 2016. **118**(4): p. 692-702.
 52. Feil, S., et al., *Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis*. Circ Res, 2014. **115**(7): p. 662-7.
 53. Orr, A.W., et al., *Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis*. J Vasc Res, 2010. **47**(2): p. 168-80.
 54. Pan, H., et al., *Single-Cell Genomics Reveals a Novel Cell State During Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Potential Therapeutic Targets for Atherosclerosis in Mouse and Human*. Circulation, 2020. **142**(21): p. 2060-2075.
 55. Wong, D., A.W. Turner, and C.L. Miller, *Genetic Insights Into Smooth Muscle Cell Contributions to Coronary Artery Disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019. **39**(6): p. 1006-1017.
 56. Hughes, C.S., et al., *Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments*. Nat Protoc, 2019. **14**(1): p. 68-85.
 57. Aravamudhan, S., et al., *Phosphoproteomics of the developing heart identifies PERM1 - An outer mitochondrial membrane protein*. J Mol Cell Cardiol, 2021. **154**: p. 41-59.
 58. Andersen, P., et al., *Precardiac organoids form two heart fields via Bmp/Wnt signaling*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 3140.

59. Branco, M.A., et al., *Human multilineage pro-epicardium/foregut organoids support the development of an epicardium/myocardium organoid*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 6981.
60. Filippo Buono, M., et al., *Human Cardiac Organoids for Modeling Genetic Cardiomyopathy*. Cells, 2020. **9**(7).
61. Feng, W., et al., *Computational profiling of hiPSC-derived heart organoids reveals chamber defects associated with NKX2-5 deficiency*. Commun Biol, 2022. **5**(1): p. 399.
62. Drakhlis, L., et al., *Human heart-forming organoids recapitulate early heart and foregut development*. Nat Biotechnol, 2021. **39**(6): p. 737-746.
63. Forsythe, S.D., et al., *Environmental Toxin Screening Using Human-Derived 3D Bioengineered Liver and Cardiac Organoids*. Front Public Health, 2018. **6**: p. 103.
64. Hoang, P., et al., *Generation of spatial-patterned early-developing cardiac organoids using human pluripotent stem cells*. Nat Protoc, 2018. **13**(4): p. 723-737.
65. Hoang, P., et al., *Engineering spatial-organized cardiac organoids for developmental toxicity testing*. Stem Cell Reports, 2021. **16**(5): p. 1228-1244.
66. Kitsuka, T., et al., *2-Cl-C.OXT-A stimulates contraction through the suppression of phosphodiesterase activity in human induced pluripotent stem cell-derived cardiac organoids*. PLoS One, 2019. **14**(7): p. e0213114.
67. LaBarge, W., et al., *Maturation of three-dimensional, hiPSC-derived cardiomyocyte spheroids utilizing cyclic, uniaxial stretch and electrical stimulation*. PLoS One, 2019. **14**(7): p. e0219442.
68. Lee, J., et al., *In vitro generation of functional murine heart organoids via FGF4 and extracellular matrix*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 4283.
69. Lee, S.G., et al., *Generation of human iPSCs derived heart organoids structurally and functionally similar to heart*. Biomaterials, 2022. **290**: p. 121860.
70. Lewis-Israeli, Y.R., et al., *Generating Self-Assembling Human Heart Organoids Derived from Pluripotent Stem Cells*. J Vis Exp, 2021(175).
71. Meier, A.B., et al., *Epicardioid single-cell genomics uncovers principles of human epicardium biology in heart development and disease*. Nat Biotechnol, 2023.
72. Mills, R.J., et al., *Functional screening in human cardiac organoids reveals a metabolic mechanism for cardiomyocyte cell cycle arrest*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(40): p. E8372-E8381.
73. Mills, R.J., et al., *Drug Screening in Human PSC-Cardiac Organoids Identifies Pro-proliferative Compounds Acting via the Mevalonate Pathway*. Cell Stem Cell, 2019. **24**(6): p. 895-907 e6.
74. Min, S., et al., *Biphasic Electrical Pulse by a Micropillar Electrode Array Enhances Maturation and Drug Response of Reprogrammed Cardiac Spheroids*. Nano Lett, 2020. **20**(10): p. 6947-6956.
75. Olmsted, Z.T. and J.L. Paluh, *A combined human gastruloid model of cardiogenesis and neurogenesis*. iScience, 2022. **25**(6): p. 104486.
76. Polonchuk, L., et al., *Cardiac spheroids as promising in vitro models to study the human heart microenvironment*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 7005.

77. Richards, D.J., et al., *Inspiration from heart development: Biomimetic development of functional human cardiac organoids*. Biomaterials, 2017. **142**: p. 112-123.
78. Richards, D.J., et al., *Human cardiac organoids for the modelling of myocardial infarction and drug cardiotoxicity*. Nat Biomed Eng, 2020. **4**(4): p. 446-462.
79. Rossi, G., et al., *Capturing Cardiogenesis in Gastruloids*. Cell Stem Cell, 2021. **28**(2): p. 230-240 e6.
80. Silva, A.C., et al., *Co-emergence of cardiac and gut tissues promotes cardiomyocyte maturation within human iPSC-derived organoids*. Cell Stem Cell, 2021. **28**(12): p. 2137-2152 e6.
81. Varzideh, F., et al., *Human cardiomyocytes undergo enhanced maturation in embryonic stem cell-derived organoid transplants*. Biomaterials, 2019. **192**: p. 537-550.
82. Voges, H.K., et al., *Development of a human cardiac organoid injury model reveals innate regenerative potential*. Development, 2017. **144**(6): p. 1118-1127.
83. Yadav, S., S.J. Shire, and D.S. Kalonia, *Viscosity analysis of high concentration bovine serum albumin aqueous solutions*. Pharm Res, 2011. **28**(8): p. 1973-83.
84. Kikuchi, T., K. Matsuura, and T. Shimizu, *Non-coating method for non-adherent cell culture using high molecular weight dextran sulfate and bovine serum albumin*. J Biosci Bioeng, 2021. **132**(5): p. 537-542.
85. Zhang, L., et al., *Stem cell therapy in liver regeneration: Focus on mesenchymal stem cells and induced pluripotent stem cells*. Pharmacol Ther, 2022. **232**: p. 108004.
86. Liu, G.B., et al., *Ghrelin promotes cardiomyocyte differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by DDX17-mediated regulation of the SFRP4/Wnt/beta-catenin axis*. Mol Med Rep, 2023. **28**(3).
87. Reed, E., et al., *Extracellular Matrix Profiling and Disease Modelling in Engineered Vascular Smooth Muscle Cell Tissues*. Matrix Biol Plus, 2022. **16**: p. 100122.
88. Jiang, D., Y. Yang, and D. Li, *Lipopolysaccharide induced vascular smooth muscle cells proliferation: A new potential therapeutic target for proliferative vascular diseases*. Cell Prolif, 2017. **50**(2).
89. Yang, X., et al., *Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells: role of efficient Toll-like receptor 4 signaling*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(3): p. H1069-76.

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien.....	Seite 13
Tabelle 2: Reagenzien, Lösungen und Antikörper.....	Seite 14
Tabelle 3: Geräte.....	Seite 15
Tabelle 4: Modelle zur Generierung kardialer Sphäroide und Organoide.....	Seite 21
Tabelle 5: Vergleich der kardialen, gerüstfreien Organoid-Modelle.....	Seite 26

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Besseres Wachstum der Zellen der stromalen vaskulären Fraktion bei 0,05% BSA.....	Seite 30
Abbildung 2: Anwendung des Kardioid-Differenzierungsprotokolls auf die ASCs der stromalen vaskulären Fraktion.....	Seite 31
Abbildung 3: Glattmuskelzellen in 2D- und 3D-Kultur.....	Seite 32
Abbildung 4: Kein F4/80-Signal nach LPS-Stimulation in der 2D-Kultur....	Seite 33
Abbildung 5: F4/80-Signal nach LPS-Stimulation in der 3D-Kultur.....	Seite 34
Abbildung 6: Nachweis von Glattmuskelzell-Markern in 2D- und 3D-Kultur.....	Seite 35
Abbildung 7: Unterschiedliche Proteinzusammensetzung der Glattmuskelzell- Kultur in 2D und 3D.....	Seite 36
Abbildung 8: Veränderte Proteinzusammensetzung nach LPS-Stimulation.....	Seite 38
Abbildung 9: Signifikante Unterschiede in der Proteinzusammensetzung in 2D und 3D.....	Seite 41
Abbildung 10: Boxplots von Proteinen mit höherer Proteinabundanz in der 2D- Kultur.....	Seite 43

Abbildung 11: Boxplots von Proteinen mit niedrigerer Proteinabundanz in der 2D-Kultur.....	Seite 44
Abbildung 12: Kein Unterschied der Proteinabundanz in 2D und 3D bei Kollagenen.....	Seite 46

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hug Aubin, meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Elvira Weber und dem Direktor der Klinik für kardiovaskuläre Chirurgie Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg bedanken, die es mir überhaupt ermöglicht haben, an diesem Projekt mitzuarbeiten und diese Dissertation zu schreiben. Besonders Frau Dr. rer. nat. Elvira Weber hat mir mit ihrem reichhaltigen Wissen, ihren kreativen Ideen und guten Ratschlägen während meiner Zeit im CURE 3D Labor der experimentellen Herzchirurgie stets zur Seite gestanden und mich unterstützt. Sie hatte und hat immer noch ein offenes Ohr für mich und auch für die anderen Labormitarbeiter. Sie hat an mich geglaubt und mich immerzu dazu ermutigt, weiterzumachen und nicht aufzugeben, auch wenn ein Experiment nicht auf Anhieb funktioniert hat. Ein großes Dankeschön dafür Elvira.

Ebenfalls danke ich dem ganzen Team unseres CURE 3D Labors für die guten Ratschläge, Ideen und die schöne gemeinsame Zeit im Labor. Ein besonderer Dank gilt meinen Laborkollegen Miral Hayungs, Pandora Jashnieh und Philipp Münch, die mich während meiner Zeit im Labor begleitet haben und mit denen ich Freud und Leid teilen konnte.

Außerdem danke ich dem Team des Institutes für Genetik des CECAD Research Centers in Köln und der *Proteomics Facility* des CECAD Research Centers in Köln für die Unterstützung bei der *Proteomics*-Analyse.

Des Weiteren gilt ein großer Dank Dr. rer. nat. Samet Bayraktar, der mir bei der Auswertung der Daten zur Seite stand und immer für Fragen offen war.

Als Letztes danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die während meines gesamten Studiums und auch während meiner Zeit im Labor immer für mich da waren und mich auf meinem Lebensweg begleiten. Danke, dass es Euch gibt.