

Ein Zell-Atlas des kranken Herzens

Einzelzelltechniken ermöglichen neue Einsichten auf Zellebene

von
Wesley Abplanalp
und Stefanie Dimmeler

Herz und Gefäße bilden ein hochkomplexes Organsystem, in dem unterschiedlichste Zellen korrekt zusammenarbeiten müssen, um alle Organe mit Blut zu versorgen. In den vergangenen Jahrzehnten hat die Herzbiologie ganze Gewebe oder Zellisolate in den Blick genommen. Doch jetzt erlauben neue Technologien, die Vielfalt der Zelltypen und ihre individuelle Antwort auf Signale bis auf die Ebene von Proteinen und Genen zu verfolgen. Forscher hoffen, kranken Herzen dadurch besser bei der Regeneration helfen zu können.

Allein die Endothelzellen, die alle Blutgefäße auskleiden, haben bei einem ausgewachsenen Menschen die Fläche eines Fußballplatzes. Die Endothelzellen arbeiten zusammen mit den Gefäßmuskelzellen, die das Gefäß stabilisieren und den Druck regulieren. Für die Kontraktion des Herzens sind wiederum die Herzmuskelzellen verantwortlich. Diese und andere spezialisierte Zelltypen sind notwendig, um in einem dynamischen Zusammenspiel die Organfunktion aufrechtzuerhalten.

Die bisher verwendeten Verfahren, mit denen man die Vielseitigkeit der Zellen und deren Regulation untersucht hat – insbesondere bei Erkrankungen oder im alten Herzen – haben jedoch eine begrenzte Auflösung, so dass biologisch relevante Informationen möglicherweise verloren gehen. Die Vielfalt der Zelltypen und deren individuelle Antwort auf Signale können damit nicht abgeschätzt werden.

Neu entwickelte Verfahren zur Analyse einzelner Zellen gewähren nun Einblicke in die tatsächliche Vielfalt der Zellen des Herz-Kreislauf-Systems. Im Gegensatz zur bisherigen Betrachtung mit Mikroskopie und Durchflusszytometrie erlauben es diese Verfahren, gleichzeitig eine Vielzahl an aktiven Genen oder Proteinen in einzelnen Zellen zu analysieren (siehe Kasten »Einzelzelltechnologien«, Seite 59). Um all diese Daten sinnvoll zusammenzuführen und interpretieren zu können, werden dann Ansätze aus der künstlichen Intelligenz genutzt. Mithilfe von Maschinenlernverfahren können Wissenschaftler Signaturen entdecken und Zellen mit ähnlichen Eigenschaften klassifizieren. In Herzgewebe können z.B. Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Herzmuskelzellen, aber auch noch andere Zelltypen unterschieden und quantitativ nach ihren Eigenschaften/Expressionsmustern erfasst werden (Abb. 1, Seite 58).

Wie reagieren einzelne Zellen auf Risikofaktoren?

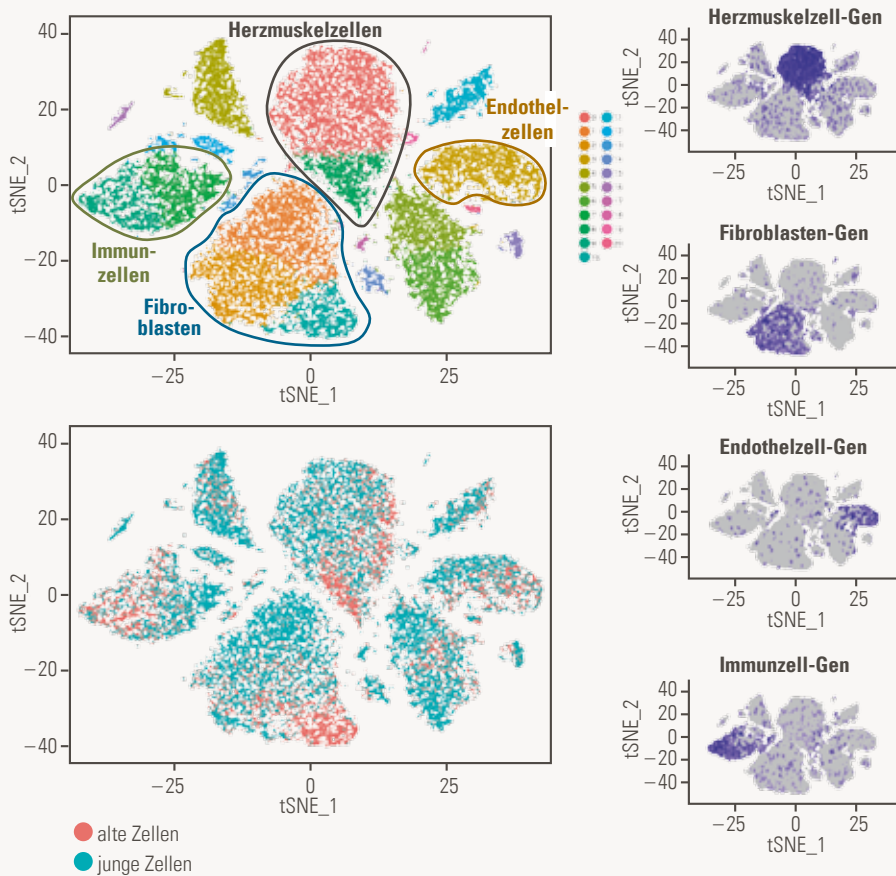
Diese Methoden können wir in Krankheitsmodellen anwenden, um erstmals zu untersuchen, wie einzelne Zellen auf Risikofaktoren oder Erkrankungen reagieren. Wir möchten z. B. wissen, ob sich alle Zellen gleichzeitig verändern, oder ob es möglicherweise nur einzelne Zellen oder Zellgruppen sind, die dann Nachbarzellen durch fehlerhafte Kontakte schädigen. Von besonderer Bedeutung ist, dass diese Technologie auch auf kleine menschliche Gewebestücke, wie Biopsien, angewendet werden kann, so dass wir damit erstmals einen Atlas des kranken Herzens oder Gefäßsystems anfertigen können. Hierfür müssen wir jedoch zunächst umfangreiche Daten sammeln.

Bei Mäusen ist man schon weiter: Ein Zell-Atlas der gesunden Maus wurde kürzlich vom »Tabula Muris«-Konsortium veröffentlicht: Dieser umfasst 100 000 Zellen von 20 Organen und Geweben. Zur Erstellung des menschlichen Zell-Atlas wurde im Oktober 2016 in London das Konsortium »Human Cell Atlas« gegründet. Bedenkt man, dass ein erwachsener Mensch aus 100 Billionen Zellen besteht, ist noch viel Arbeit notwendig, um diese Heterogenität abzubilden. Bei manchen Zellarten, die in hoher Zahl vorkommen, reicht bereits eine kleine Stichprobe, aber um seltene Zellen (wie z.B. Stammzellen) oder auch komplexe Veränderungen bei Erkrankungen feststellen zu

AUF DEN PUNKT GEBRACHT

- Mit modernen Einzelzelltechnologien kann man eine Vielzahl an aktiven Genen oder Proteinen in einzelnen Zellen analysieren.
- Zurzeit sammeln Forscher Daten aus krankem Herz- und Gefäßgewebe, um herauszufinden, ob und wie einzelne Zellgruppen sich verändern. Erste Erkenntnisse gibt es zur Narbenbildung nach Herzinfarkt, Atherosklerose sowie der Entwicklung, Erneuerung und Alterung von Herzzellen.
- Um die großen Datenmengen auszuwerten, bedarf es spezieller Techniken des maschinellen Lernens.

1 Analyse der Genexpression einzelner Zellen im alten und jungen Mäuseherz



A Die RNA jeder einzelnen Zelle aus alten und jungen Herzen wird mit Einzelzelltechnologien entschlüsselt und alle Zellen werden bioinformatisch verglichen. Mithilfe eines maschinellen Lernverfahrens können die Zellen zweidimensional visualisiert werden. Zellen mit sehr ähnlichen RNAs erscheinen in dieser Analyse sehr nahe beieinander und bilden ein Cluster. Aufgrund von bekannten typischen Genen können die Zellen dann einzelnen Zelltypen zugeordnet werden (siehe Beispiele in B).

B Hier gezeigt sind Herzmuskelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen. Die einzelnen Zellpopulationen enthalten aber auch Untergruppen (wie z. B. das rote und das grüne Cluster in der Herzmuskelzellpopulation in Bild A).

C Aufteilung der Zellen des alten (rot) und jungen Herzens (türkis). Die Verschiebung weist darauf hin, dass sich im alternden Herzen einzelne Zellpopulationen verändern. Durch Nachweis der RNAs, die sich in den neuen Zellpopulationen befinden, können neue Signaturen oder Signalwege entdeckt werden.

Daten: Julian Wagner und David John in Kollaboration mit Sascha Sauer, Berlin.

können, müssen sehr viele Zellen analysiert werden. Daher hat die Chan Zuckerberg Initiative von Facebook-Gründer Mark Zuckerberg und seiner Frau, der Kinderärztin Priscilla Chan, das Projekt im Juni 2019 zusätzlich mit 68 Millionen Dollar gefördert.

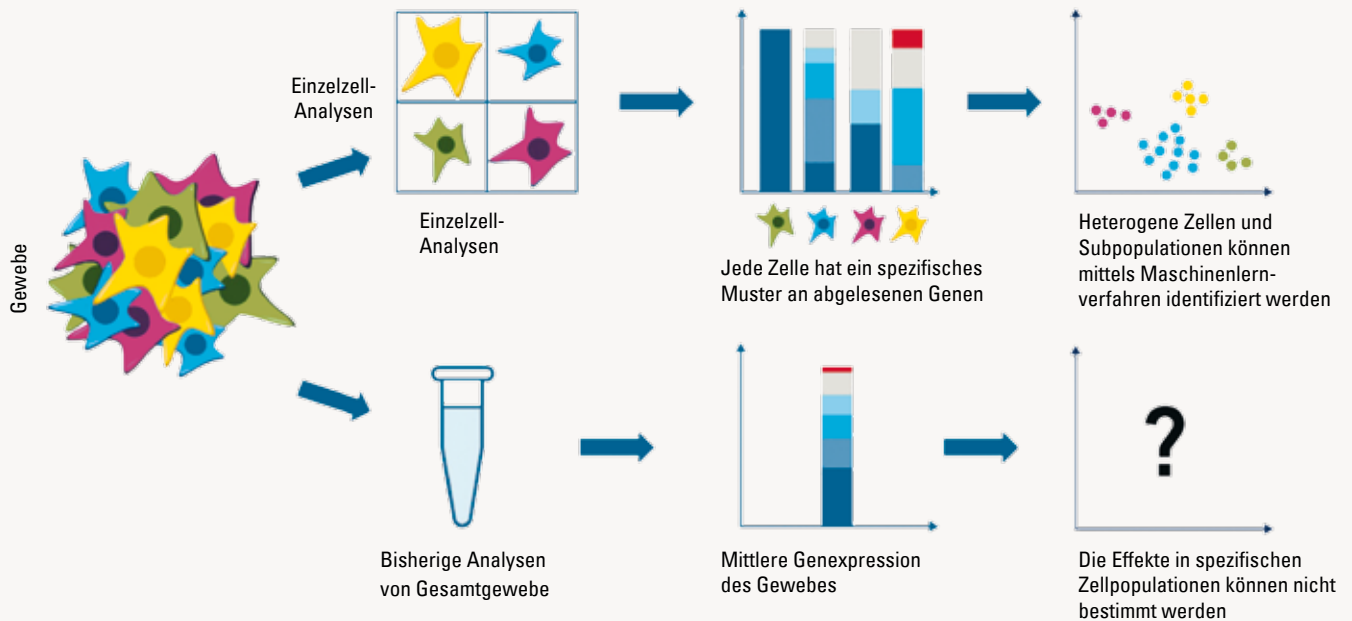
Gestörte zelluläre Kommunikation nach Herzinfarkt

Unsere Arbeitsgruppe arbeitet zusammen mit Prof. Andreas Zeiher, Kardiologie, und Prof. Thomas Walther, Herzchirurgie, mit Unterstützung der Dr. Robert Schwiete Stiftung an der Aufklärung der Einzelzellbiologie im kranken und alten Herzen des Menschen. Insbesondere versuchen wir, anhand von menschlichem Blut und kleinen Gewebestückchen, die bei Herzoperationen anfallen, zu verstehen, wie sich die einzelnen Zelltypen bei Patienten mit Herzkrankheiten verändern. Zentral ist dabei die Frage, wie der Herzinfarkt und die dann folgende Narbenbildung die Zusammensetzung und die Kommunikation der Zellen im Herzen verändern.

Insbesondere hoffen wir herauszufinden, wie sich die wichtigen Gefäß- und Herzmuskelzellen des Menschen auf der Ebene einzelner Zellen verändern. Gibt es möglicherweise seltene, bisher unbekannt Populationen von Stamm- oder Vorläuferzellen, die man auf Einzelzebene entdecken kann? Wie verändern sich die Entzündungszellen im Blut bei Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen und welche Veränderungen bewirken sie nach Einwanderung ins Herz?

Während die menschlichen Proben zuerst noch gesammelt werden müssen, haben wir anhand erster Untersuchungen an Mäusen bereits Einblicke gewonnen, wie das Alter deren Herz beeinflusst. Wir konnten zeigen, dass im Alter eine Veränderung der einzelnen Zellpopulationen zu beobachten ist (Abb. 1). Nachfolgende bioinformatische Analysen zeigten zudem eine Veränderung der Gene, die für die Kommunikation der Zellen untereinander verantwortlich sind. Wir konnten im alten Herzen eine Kommunikationsstörung nachweisen. Im jungen Herzen unterstützen sich die Zellen

2A Einzelzelltechnologien

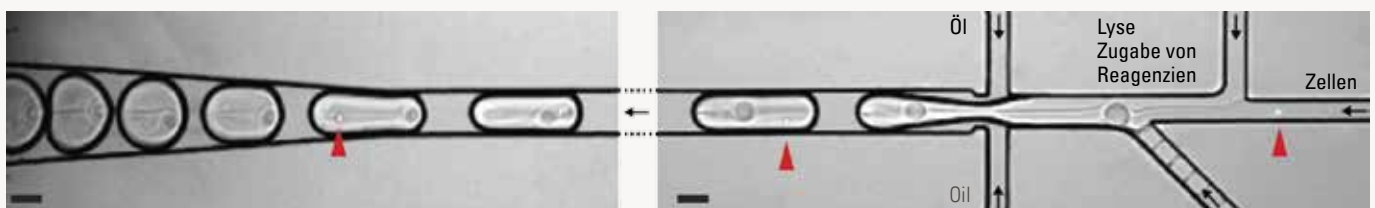


A Vergleich der Einzelzelltechnologie (oben) mit der Analyse eines Gewebeverbandes (unten). Mit Einzelzelltechnologien lassen sich die Signaturen einzelner Zellen auf verschiedenen molekularen Ebenen aufklären. So sind Aussagen zur Regulation möglich, die durch Analyse des Gewebever-

bands insgesamt verloren gehen. Bisher erfolgreich sind die Analyse der DNA und RNA sowie erste Ansätze zur Aufklärung der epigenetischen Kontrolle und der Proteine. Technologisch am weitesten fortgeschritten und bisher am weitesten verbreitet ist die **Einzelzell-RNA-Analyse**. Diese

hat sich in jüngster Zeit als leistungsstarkes Instrument zur Kartierung der zellulären Heterogenität in erkrankten und gesunden Geweben herausgestellt. Hierbei sind Hochdurchsatzmethoden erforderlich, um die Vielfalt von Zellen einzufangen.

2B Tröpfchen-Mikrofluidik-Technik



Hydrogel-Beads mit Barcodes



B Die **Tröpfchen-Mikrofluidik-Technik** gehört zu den vielversprechendsten Kandidaten, wenn es darum geht, Tausende von Einzelzellen durch vollständige Transkriptomanalyse zu erfassen und zu verarbeiten. Dabei wird zuerst jede Zelle einer Zellsuspension in Nanolitertröpfchen mit

Hydrogelkügelchen eingekapselt. Jedes Tröpfchen trägt spezifische Barcode-DNA-Primer, die an die RNAs der Zelle binden. Die Zelle wird dann lysiert, so dass alle enthaltenen RNAs durch eine reverse Transkriptionsreaktion in DNAs übersetzt werden können, d. h., jede DNA einer Zelle enthält dann

einen »Barcode«. Durch Sequenzierungsverfahren werden dann die DNAs analysiert. Die »Barcodes« ermöglichen es, jede RNA ihrer Ursprungszelle zuzuordnen. Aktuell können ungefähr 1000 bis 2000 Gene pro Zelle auf diese Weise analysiert werden.

gegenseitig: Zellen des Bindegewebes, die zwischen den Herzmuskel- und Gefäß-bildenden Zellen lokalisiert sind, sogenannte Fibroblasten, schütten Botenstoffe aus, die die Gefäßzellen positiv beeinflussen. Im Alter werden andere Botenstoffe durch die Fibroblasten gebildet, die negative Wirkungen auf die Gefäßzellen haben und damit zu einer eingeschränkten Durchblutung des alten Herzens führen könnten.

Atherosklerose: Neue Zielstrukturen für Medikamente in Sicht

Erste Untersuchungen mit Proben von experimentellen Gefäßerkrankungsmodellen haben ebenfalls interessante Ergebnisse hervorgebracht: Prof. Nina Wettschureck, Mitglied des »Cardio-Pulmonary Institute« und Forscherin am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim, konnte zeigen, dass chronische Gefäßentzündungen zu einer speziellen Aktivierung von glatten Muskelzellen der Hauptschlagader führen, was wiederum zur krankhaften Veränderung der Gefäße beiträgt. Die kranken Zellen unterscheiden sich von den gesunden Zellen durch die Expression spezieller Gene, z.B. verschiedener G-Proteingekoppelter Rezeptoren. Da diese Art von Rezeptoren sehr gut durch pharmakologische Substanzen reguliert werden können, wird nun getestet, ob eine ausschließliche Behandlung der kranken Zellen die Entzündung des Gefäßsystems und möglicherweise die Atherosklerose aufhalten kann.

● You can read an English translation of this article online at: www.aktuelles.uni-frankfurt.de/forschung-frankfurt-englisch

Andere Forscher am »Cardio-Pulmonary Institute« versuchen, diese neue Einzelzell-Technologie zur Entdeckung von seltenen Zellen, wie Stamm- und Vorläuferzellen zu nutzen. Prof. Thomas Braun vom Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim charakterisierte umfassend Maus-Herzvorläuferzellen in der embryonalen Entwicklung. Zusätzlich zur Analyse der Genexpression hat seine Gruppe ein Verfahren entwickelt, mit dem sie die epigenetische Kontrolle in einzelnen Zellen aufklären konnte. Auf diese Weise konnte er verschiedene, bisher unbekannte Herz-Subpopulationen nachweisen. Die Rekonstruktion der Entwicklungstrajektorien zeigt zudem, wie multipotente Stammzellen sich in verschiedene Entwicklungszweige unterteilen, bevor durch spezielle Gene dann die Entwicklung direkt zu Herzmuskelzellen führt. Indem die Arbeitsgruppe von Braun diese epigenetischen Prozesse aufklärt, hofft sie, die Bildung von Herzmuskelzellen besser zu verstehen und damit möglicherweise auch neue Ansätze für die Regeneration des Herzens zu finden.

Gleichzeitig erfolgt die Weiterentwicklung der Technologie, so dass mehr Gene pro Zelle analysiert und auch Proteine besser nachgewiesen werden können. Wir hoffen, dass diese neuen Technologien dazu beitragen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen besser zu verstehen und darauf aufbauend auch neue therapeutische oder diagnostische Verfahren entwickeln zu können. ●



Die Autoren

Prof. Dr. Stefanie Dimmeler, Jahrgang 1967, ist Sprecherin des Exzellenzclusters Cardio-Pulmonary Institute, das die Goethe-Universität mit der Universität Gießen und dem Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim teilt. Die studierte Biologin leitet das Institut für kardiovaskuläre Regeneration an der Goethe-Universität. Ihre Forschungsschwerpunkte sind die Aufklärung von Mechanismen der Gefäß- und Herz-Reparatur.

dimmeler@em.uni-frankfurt.de

Dr. Wesley Abplanalp, Jahrgang 1981, ist ein amerikanischer Physiologe und arbeitet seit Februar 2017 am Institut für kardiovaskuläre Regeneration. Er leitet die Einzelzellanalyse-Plattform des Instituts.

abplanalp@em.uni-frankfurt.de