

## Abstract

The growth of life beyond the planet Earth is always the primary focus of space biologists. However, there is no success so far in reproduction related research under space. Hence, it's also very exciting that these type studies are very new and rare, where human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) exposed to SMG and various assays are performed, which answers many unsolved questions and open new window for the future space biology experiments and space expeditions.

The first main aim was to decipher the impact of different gravity conditions such as SMG and parabolic flight on the differentiation potential of mouse embryonic stem cells (mESCs). The total RNA of the mESCs after completion of the 31<sup>st</sup> parabola as well as the total RNA from mESCs which first were exposed to parabolic flight, and then differentiated for 12 days, and with each of their respective control were analysed using microarray technique. I performed a global transcriptomics study to identify the biological processes affected by the different gravity conditions. The findings demonstrated that biological processes involved in vascular development, kidney development, neuronal development and skeletal muscle development were highly enriched in mESCs exposed to parabolic flight-induced altered gravity conditions. In contrast, biological processes involved in apoptosis, heart contraction, cardiac muscle development and MAP/ERK pathway were highly suppressed. We witnessed the reduction in differential potency of mESCs towards cardiac cells post parabolic flight exposure. At the same time, we also recorded the changes in hiPSC-CMs beating rate both in presence and absence of cardio-active drugs like Isoprenaline, Bay-K8644 and Nifedipine under parabolic flight. The beating rate of hiPSC-CMs was increased during the parabolic flight as compared to ground control hiPSC-CMs. Treatment of hiPSC-CMs with Isoprenaline and Bay-K8644 showed similar increase in their beating rate with additive effects due to drug treatment. When hiPSC-CMs were treated with the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel (LTCC) blocker Nifedipine, there was no beating observed even after parabolic flight exposure. These findings suggest that the parabolic flight-induced increase in the beating activity of cardiomyocytes occurred via modulation of the LTCC opening activity, possibly because of stress dependent calcium induced calcium release.

The second main aim of my thesis was to investigate the effects of 2-D-clinostat induced simulated microgravity (SMG) on the hiPSC-CMs and to explore potential mechanisms affecting the function of the cardiomyocytes by SMG. For this aim, RNAseq transcriptomic and Stable Isotope Labelling with Amino Acids in Cell Culture (SILAC) proteomic experiments were performed after exposing of hiPSC-CMs to SMG for 48 hr. Analysis of the differential expressed genes and proteins showed that hiPSC-CMs exposed to SMG had significant deregulation in several key cellular pathways associated with calcium handling, mitochondria morphology, bioenergetics, cytoskeletal organization as well as with senescence and chromatin organization pathways. These transcriptomics and proteomics findings were validated further with specific functional assays and live cell imaging. It was demonstrated that SMG exposed hiPSC-CMs shows significant  $\text{Ca}^{2+}$  deregulation, mitochondria stress, structural deformities, and reduction in mitochondrial membrane potential. In addition, excessive intracellular reactive oxygen species (ROS) formation and reduction in ATP formation in SMG exposed hiPSC-CMs were also the striking observations made during my research. I also performed the  $\beta$ -galactosidase activity assays and found high  $\beta$ -galactosidase activity in SMG exposed hiPSC-CMs, which support the hypothesis that the SMG induced stress and excessive ROS causes deregulation of calcium homeostasis and suboptimal mitochondrial bioenergetics thereby resulting in senescence of hiPSC-CMs after SMG exposure. Transgenic hiPSC-CMs were also generated allowing live imaging of intracellular changes of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and live imaging of contraction of myofibrils to assess the cardiomyocytes functions under SMG conditions. Moreover, applying the Chromosome conformation capture iHi-C 2.0 technique it could be demonstrated that SMG induces changes of the chromosomal architecture in hiPSC-CMs that may contribute to the regulation of gene expressions thereby promoting the senescence processes in cardiomyocytes.

## Abstrakt

Das Streben nach Leben jenseits des Planeten Erde steht immer im Mittelpunkt des Interesses von Weltraumbiologen. Trotzdem gab es bisher keine großen Erfolge in der Reproduktionsforschung im All. Daher stellen diese Untersuchungen, in denen aus induziert-pluripotenten Stammzellen gewonnene humane Kardiomyozyten (hiPSC-CMs) simulierter Mikrogravitation (SMG) ausgesetzt waren und auf verschiedene Weisen analysiert wurden, ein Novum und eine Seltenheit dar. Sie beantworten viele ungelöste Fragen und öffnen zugleich eine Tür für zukünftige Forschungsarbeiten wie Weltraumbiologie-Experimente und Weltraumexpedition.

Das erste Hauptziel der vorliegenden Dissertation war es, die Auswirkungen unterschiedlicher Parabelfluginduzierten-Schwerkraftbedingungen auf das Differenzierungspotenzial von embryonaler Stammzellen der Maus (mESCs) zu untersuchen. Die Gesamt-RNA der mESCs nach Abschluss der 31 Parabel sowie jene von mESCs, die zunächst den Parabelfluginduzierten-Bedingungen ausgesetzt waren und dann für 12 Tage differenziert wurde und mit der jeweiligen Kontrolle mittels der Mikroarray-Technik analysiert wurde. Es wurde eine globale Transkriptom-Studie durchgeführt, um biologischen Prozesse zu identifizieren, die durch die unterschiedlichen Schwerkraftbedingungen beeinflusst werden. Die Ergebnisse demonstrierten, dass die biologischen Prozesse, die an der Entwicklung von Blutgefäßen, der Niere, der Neuronen und der Skelettmuskulatur beteiligt sind, in den mESCs, die veränderten Schwerkraftbedingungen ausgesetzt waren, signifikant verstärkt waren. Im Gegensatz dazu wurden die biologischen Prozesse, die an Apoptose, Herzkontraktion, Herzmuskelentwicklung und dem MAP/ERK-Signalweg beteiligt sind, stark unterdrückt. Es wurde auch beobachtet, dass die mESCs, die den Parabelflügen ausgesetzt waren und unter  $1g$  Bedingungen sich Richtung Kardiomyozyten differenzierten, ein signifikant vermindertes Potenzial zur Differenzierung in schlagende Kardiomyozyten zeigten. Des Weiteren wurden hiPSC-CMs in Gegenwart oder Abwesenheit von kardioaktiven Medikamenten wie Isoprenalin, Bay-K8644 und Nifedipin, parabelfluginduzierten veränderten Mikrogravitationsbedingungen ausgesetzt. Die Schlagrate von hiPSC-CMs war während des Parabelflugs im Vergleich zu hiPSC-CMs der Bodenkontrolle erhöht. Die Behandlung von hiPSC-CMs mit Isoprenalin

und Bay-K8644 zeigte eine ähnliche Erhöhung ihrer Schlagrate mit additiven Effekten. Bei der Behandlung von hiPSC-CMs mit dem mit dem L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (LTCC)-Blocker Nifedipin wurde während des Parabelflugs keine Schlagende-Aktivität in den hiPSC-CMs beobachtet. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die durch den Parabelflug induzierte Erhöhung der Schlagaktivität der Kardiomyozyten über eine Modulation der LTCC-Öffnungsaktivität erfolgte, möglicherweise aufgrund einer stressabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung.

Das zweite Hauptziel meiner Dissertation war es, die Auswirkungen der durch 2-D-Klinostat induzierten simulierten Mikrogravitation (SMG) auf die hiPSC-CMs zu untersuchen und mögliche Mechanismen zu erforschen, die die Funktion der Kardiomyozyten durch SMG beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden RNAseq Transkriptom-Experimente sowie durch die „stabile Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in Zellkultur“ (SILAC)-Methode quantitative Proteom-Untersuchungen durchgeführt, nachdem die hiPSC-CMs 48 Stunden lang einer SMG ausgesetzt waren. Die Analyse der differentiell exprimierten Genen zeigte, dass 48 Stunden SMG eine signifikante Deregulierung von mehreren zellulären Schlüsselwegen in hiPSC-CMs bewirkten. Diese Prozesse waren mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Handling, der Morphologie der Mitochondrien, der Bioenergetik, der Zytoskelett-Organisation sowie mit Seneszenz- und Chromatin-Organisationsprozessen assoziiert. Diese Transkriptom- und Proteom-Befunde wurden mit spezifischen funktionellen Methoden und Live-Cell-Imaging-Methoden weiter validiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine SMG-Exposition von hiPSC-CMs zu einer signifikanten  $\text{Ca}^{2+}$ -Deregulierung, zu Mitochondrien-Stress, zu strukturellen Abnormitäten und zu einer Reduktion des mitochondriale Membranpotentials führte. Darüber hinaus wurde eine übermäßige Bildung von intrazellulärer reaktiver Sauerstoffradikalen (ROS) und die Reduktion der ATP-Bildung in SMG-exponierten hiPSC-CMs während meiner Forschung beobachtet. Es wurden auch  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsuntersuchungen durchgeführt, die eine hohe  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in SMG-ausgesetzten hiPSC-CMs zeigten. Letztere Untersuchungen unterstützen die Hypothese, dass der SMG-induzierter Stress und die übermäßige ROS-Bildung eine Deregulierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und eine suboptimale mitochondriale Bioenergetik verursachen; Prozesse die zur Seneszenz der hiPSC-CMs nach SMG-Exposition führen. Es wurden auch

transgene hiPSC-CMs generiert, die eine Live-Bildgebung der intrazellulären Veränderungen des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  und eine Live-Bildgebung der Kontraktion der Myofibrillen ermöglichen, um die Funktion der Kardiomyozyten unter echten SMG-Bedingungen zu untersuchen. Darüber hinaus konnte durch Anwendung der sogenannten Chromosome Conformation Capture (iHi-C 2.0) -Methode demonstriert werden, dass SMG, Veränderungen der Chromosomen-Architektur in hiPSC-CMs bewirkt. Solche Veränderungen können die Genexpression beeinflussen und dadurch Seneszenzprozesse in den Kardiomyozyten fördern.