

Aus der I. Medizinischen Klinik (Institut für Kardiologie, Angiologie,  
Pneumologie, Hämostaseologie und internistische Intensivmedizin)  
der Medizinischen Fakultät Mannheim  
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Borggrefe)

# **Ionenkanaldysfunktionen von Kardiomyozyten eines Patienten mit Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 2I und dilatativer Kardiomyopathie**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der  
Medizinischen Fakultät Mannheim  
der Ruprecht-Karls-Universität  
zu  
Heidelberg

vorgelegt von  
Jan-Dierk Schünemann

aus  
Rotenburg (Wümme)  
2018

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd  
Referent: Prof. Dr. med. Ibrahim Akin

Gewidmet meinen Eltern

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	1
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Kardiomyopathien.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Grundlagen .....	2
1.1.2 Dilatative Kardiomyopathien .....	4
<b>1.2 Muskeldystrophie.....</b>	<b>6</b>
1.2.1 Grundlagen .....	6
1.2.2 Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 2I (LGMD2I).....	7
<b>1.3 Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs) .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Zielsetzung .....</b>	<b>11</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Ethik .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Patientenvorstellung.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3 HiPSC-Kardiomyozyten generieren.....</b>	<b>14</b>
<b>2.4 Kultursystem .....</b>	<b>14</b>
<b>2.5 Vereinzeln von Zellen .....</b>	<b>14</b>
<b>2.6 Quantifizieren von hiPSC-Kardiomyozyten .....</b>	<b>15</b>
2.6.1 Polymerase chain reaction (PCR).....	15
2.6.2 Immunfluoreszenz-Färbung .....	16
2.6.3 Live-Cell Imaging und Bildverarbeitung .....	16
<b>2.7 Calcium Fluoreszenz .....</b>	<b>17</b>
<b>2.8 Patch-Clamp .....</b>	<b>18</b>
2.8.1 Exkurs: Phasen eines Aktionspotentials .....	22
2.8.2 Auswertung .....	25
2.8.3 Statistische Analyse .....	26
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Charakterisierung patientenspezifischer hiPSC-Kardiomyozyten.....</b>	<b>27</b>

<b>3.2</b>	<b>Morphologie der Kardiomyozyten</b> .....	31
<b>3.3</b>	<b>Aktionspotentialänderungen</b> .....	32
<b>3.4</b>	<b>Veränderungen spezifischer Ionenströme</b> .....	33
3.4.1	I <sub>Na</sub> -Strom .....	33
3.4.2	L-Typ Calciumstrom .....	36
3.4.3	Kaliumstrom .....	39
<b>3.5</b>	<b>Veränderungen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration</b> .....	43
<b>3.6</b>	<b>Next-Generation Sequencing (NGS)</b> .....	44
<b>3.7</b>	<b>Gesunde Zelllinien D2 und D3</b> .....	45
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	48
<b>4.1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	48
<b>4.2</b>	<b>Diskussion der Methoden</b> .....	48
4.2.1	Humane induzierte pluripotente Stammzellen .....	48
<b>4.3</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b> .....	50
4.3.1	Zusammenhang einer FKRP-Mutation mit SCN5A-Dysfunktionen ..	50
4.3.2	Calciumhomöostase in DCM-Kardiomyozyten.....	51
4.3.3	Veränderungen der Kaliumkanäle.....	52
4.3.4	Atypische Aktionspotentiale .....	52
4.3.5	Herzinsuffizienz – elektrisches Remodelling.....	53
<b>4.4</b>	<b>Ausblick</b> .....	55
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	56
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	58
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	64
<b>8</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b> .....	65
8.1	Originalarbeiten und Poster .....	65
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	66
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	67

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP: Aktionspotential  
APA: Aktionspotentialamplitude  
APD50: Aktionspotentialdauer bei 50% Repolarisation  
APD90: Aktionspotentialdauer bei 90% Repolarisation  
CACNA1C: Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C  
DCM: Dilatative Kardiomyopathie  
DG: Dystroglykan  
EKG: Elektrokardiogramm  
ESC: embryonale Stammzelle  
FKRP: Fukutin-related Protein  
GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase  
Gm: Membranleitfähigkeit  
HCM: Hypertrophe Kardiomyopathie  
hiPSC: humane induzierte pluripotente Stammzelle  
 $I_{Ca-L}$ : L- Typ Calciumstrom („long lasting“)  
 $I_{Ca-T}$ : T- Typ Calciumstrom („tiny“)  
ICD: Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator  
 $I_{K1}$ : einwärts gleichrichtender Kaliumstrom  
 $I_{Kr}$ : „rapid“ (schneller) verzögerter Gleichrichter Kaliumstrom  
 $I_{Ks}$ : „slow“ (langsamer) verzögerter Gleichrichter Kaliumstrom  
 $I_{Na}$ : Natriumstrom  
IPS: induzierte pluripotente Stammzelle  
 $I_{to}$ : transienter Kaliumauswärtsstrom  
KCND3: Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member 3  
KCNH2: Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 2  
KCNQ1: Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1  
Late- $I_{Na}$ : später Natriumstrom  
LGMD2I: Limb Girdle Muscular Dystrophie 2I, Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 2I  
LV: Linker Ventrikel  
LV-EF: linksventrikuläre Ejektionsfraktion  
MD: Muskeldystrophie  
mRNA: messenger RNA  
MRT: Magnetresonanztomographie  
NGS: Next-Generation Sequencing  
PCR: Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion  
RNA: Ribonukleinsäure  
RP: Ruhepotential  
SCN5A: Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5  
SM: Skelettmuskulatur  
TNT: Troponin T  
Vmax: Depolarisationsgeschwindigkeit

# 1 EINLEITUNG

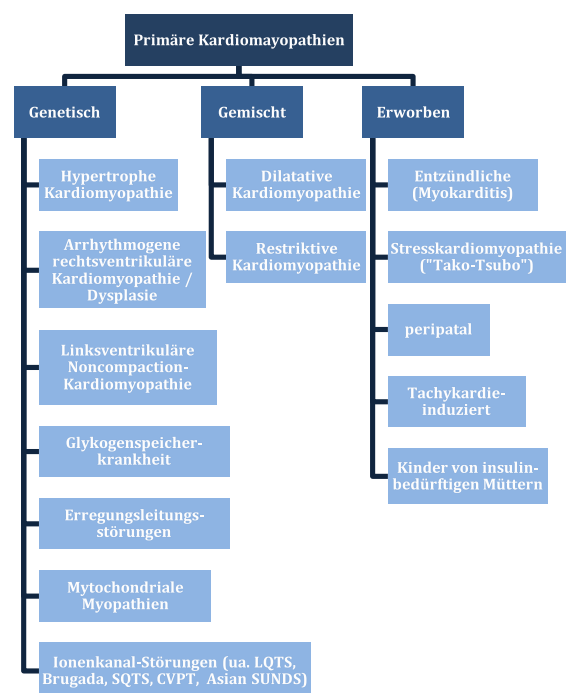
## 1.1 Kardiomyopathien

### 1.1.1 Grundlagen

Kardiomyopathien beschreiben Myokardstörungen, bei denen der Herzmuskel strukturell und funktionell verändert ist. Diese Störungen treten in Abwesenheit einer relevanten koronaren Herzerkrankung, arteriellen Hypertonie, Herzklappenerkrankung oder angeborenen Herzerkrankung auf (Elliott et al., 2008; Maron et al., 2006).

Man kann die Kardiomyopathien in eine primäre und sekundäre Gruppe aufteilen. Der Begriff primär wird dazu verwendet, um Krankheiten festzulegen, welche das Herz als einziges oder vorherrschendes Organ betreffen, und sekundär die Krankheiten, welche im Rahmen einer systemischen Störung zu einer Myokardstörung führen (Elliott et al., 2008).

Unterteilt werden die primären Kardiomyopathien in genetische (familiäre), gemischte (genetische & nicht-genetische) sowie erworbene Formen (siehe Abbildung 1).



**Abb. 1: Primäre Kardiomyopathien.**  
nach (Maron et al., 2006)

### Primäre Kardiomyopathien:

Man unterscheidet vier morphologisch unterschiedliche primäre Kardiomyopathien (Maron et al., 2006):

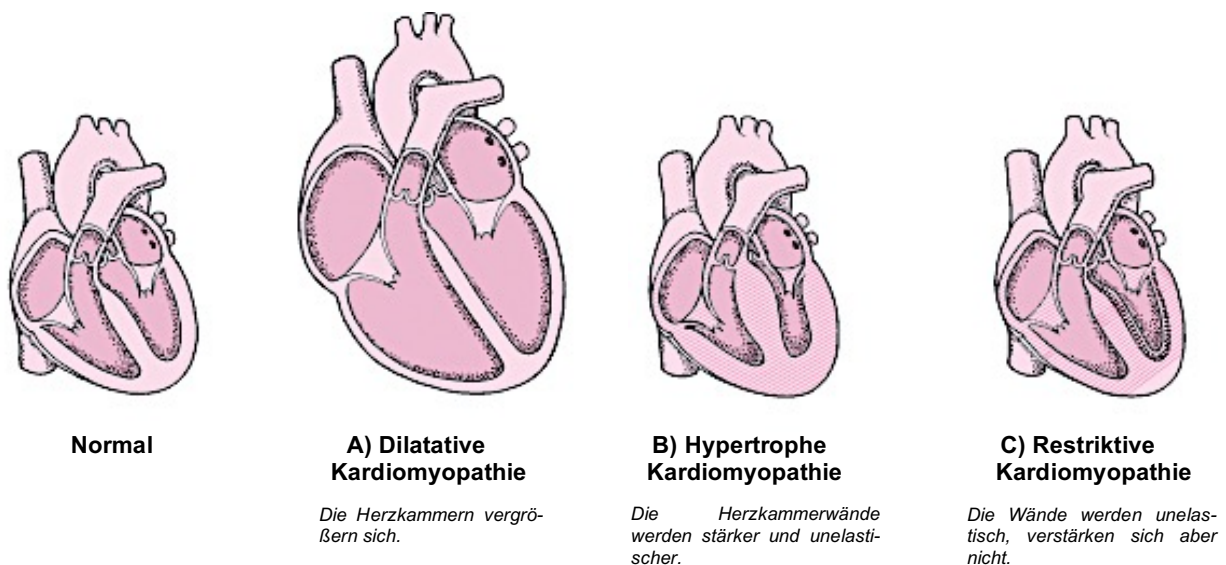
Bei der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) kommt es zu einer Hypertrophie des linken (evtl. auch rechten) Ventrikels, wobei es zu einer mitbestehenden Obstruktion der linksventrikulären Ausflussbahn kommen kann (s. Abb. 2 B).

Bei der restriktiven Kardiomyopathie vermindert sich die ventrikuläre Compliance während der Diastole bei gewöhnlich intakter systolischer Funktion. Dies führt zu ei-

ner Beeinträchtigung der ventrikulären Füllung bei normalem oder verringertem Volumen beider Ventrikel. Zusätzlich besteht eine beidseitige atriale Vergrößerung (s. Abb. 2 C).

Bei der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie / Dysplasie (ARVC/D) tritt ein rechtsventrikulärer Myozytenuntergang auf, an dessen Ort es zum Ersatz durch fettiges oder fibröses Gewebe kommt. Die Folge ist eine regionale oder globale Veränderung, was zu einer Ausdünnung und Dilatation der Ventrikelwand sowie zu einer Störung der Erregungsleitung führen kann.

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist durch eine links- oder biventrikuläre Dilatation mit einer systolischen Dysfunktion gekennzeichnet. Es ist keine Zunahme (Hypertrophie) der linksventrikulären (LV)-Wand vorhanden (Elliott et al., 2008; Maron et al., 2006; Mestroni et al., 1999a; Mestroni et al., 1999b; Pinto et al., 2016) (s. Abb.2 A). Sie stellt die häufigste Kardiomyopathie dar.



**Abb. 2: Morphologie der Kardiomyopathien.**  
(nach <http://www.msmanuals.com/de-de/heim>)

### Sekundäre Kardiomyopathien:

Inwieweit eine myokardiale Beteiligung bei sekundären Kardiomyopathien besteht, variiert zwischen den verschiedenen Erkrankungen beträchtlich. Eine eindeutige Zuteilung zwischen primären und sekundären Kardiomyopathien erscheint daher in manchen Fällen willkürlich, wenn eine Erkrankung zwar den sekundären Störungen zugeteilt wurde, aber überwiegend das Herz betrifft (Elliott et al., 2008; Maron et al., 2006).



Die Art und Weise, wie eine Erkrankung eine Kardiomyopathie verursacht, kann sehr vielfältig sein. U.a. kann sie durch toxische Stoffe wie Drogen oder Schwermetalle, durch Speichererkrankungen wie eine Hämochromatose oder autoimmune Prozesse wie z.B. in Form eines systemischen Lupus erythematoses entstehen. Auch durch komplexere Prozesse (z.B. neuromuskuläre Erkrankungen wie die muskuläre Dystrophie), die mit einer Veränderung von Proteinstrukturen verbunden sind und strukturell abnormale Ionenkanalabschnitte hervorrufen, können sie sich entwickeln (Maron et al., 2006).

### 1.1.2 Dilatative Kardiomyopathien

Es handelt sich bei einer DCM um eine Myokardstörung, welche durch das Vorhandensein von einer links- oder biventrikulären Dilatation verbunden mit einer eingeschränkten systolischen Funktion charakterisiert ist. Dabei ist zu betonen, dass diese Charakterisierung nur zutrifft, wenn abnormale Belastungszustände wie arterielle Hypertonie, Herzklappenerkrankungen oder auch koronare Herzerkrankungen nicht als Ursache zutreffend sein könnten (Pinto et al., 2016).

DCMs sind die häufigsten Kardiomyopathien mit einer schätzungsweisen Prävalenz von 1:2500. Sie manifestieren sich in einem breiten Altersspektrum mit einer Häufung im dritten und vierten Lebensjahrzehnt (Maron et al., 2006), wobei sie Männer 3mal häufiger betrifft und mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Jones et al., 2004; Mestroni et al., 1999b).

Die Erkrankung wird leider oft erst im Rahmen einer klinischen Dekompensation diagnostiziert (Maron et al., 2006). Eine hohe Sterblichkeitsrate von 15 bis 50 % innerhalb von 5 Jahren nach einer Diagnosestellung spiegelt dieses wider (Komajda et al., 1990). Aufgrund dessen ist eine DCM auch die häufigste Indikation für eine Herztransplantation (Japp et al., 2016; Mestroni et al., 1999a; Mestroni et al., 1999b).

Die Definition von DCM beschreibt die Erkrankung zwar sehr zutreffend, hat aber wichtige Einschränkungen. Eine DCM kann sowohl durch genetische als auch nicht-genetische Ursachen induziert werden und obwohl sie unterschiedliche Mechanismen und Ätiologien aufweisen, zeigen beide die gleichen phänotypischen Merkmale und enden in einer gemeinsamen morphologischen und funktionellen Endstrecke (Maron et al., 2006; Pinto et al., 2016). Diese Einschränkung wird insbesondere

durch genetische Erkrankungen verstärkt, welche eine verzögerte oder unvollständige Expression aufweisen (Pinto et al., 2016).

Insgesamt ist bei etwa der Hälfte aller Patienten die genaue Ätiologie und der pathogenetische Mechanismus unbekannt, was lange Zeit an einer Unterschätzung von genetischen Faktoren lag (Mestroni et al., 1999a).

Genetische Ursachen können in Form einer sporadischen de novo-Mutation entstehen, aber auch eine familiäre Genese beinhalten (Mestroni et al., 1994). Dabei wird die familiäre Häufigkeit immer noch unterschätzt, was seinen Hauptgrund in fehlenden klinischen als auch histopathologischen Unterschieden zu nicht-familiären Fällen hat (Mestroni et al., 1999a). Insgesamt werden 20-35 % der DCM-Fälle eine familiäre Genese zugeschrieben (Baig et al., 1998; Elliott et al., 2008; Grunig et al., 1998; Maron et al., 2006; Mestroni et al., 1999a; Michels et al., 1992; Pinto et al., 2016). Das Auftreten einer genetischen Übertragung zeigt die Existenz eines defekten Gens (oder von defekten Genen) (Mestroni et al., 1999b), allerdings hat die Analyse dieser Gene mehrere Schwierigkeiten. In der Regel sind die Familien mit betroffenen DCM-Angehörigen klein (Keeling et al., 1995), wodurch eine klassische Kopplungsanalyse zur Identifizierung eines Krankheitslokus und somit des betreffenden Gens nicht möglich ist (Mestroni et al., 1999a). Weiterhin kann einem DCM-Phänotyp keine spezifische Krankheit zugeordnet werden, da die Diagnose hauptsächlich durch morphologische und funktionelle Veränderungen gestellt wird (Mestroni et al., 1999a; Pinto et al., 2016). Auch die Penetranz ist sehr variabel. Bei einem autosomal-dominanten Erbgang wird sie mit 80 % angenommen (Mestroni et al., 1994).

Über molekulargenetische Verfahren wurden bisher über 50 Gene identifiziert, welche krankheitsrelevante Mutationen enthielten (Japp et al., 2016; Pinto et al., 2016; van Spaendonck-Zwarts et al., 2013). Dilatative Kardiomyopathien können über verschiedene Übertragungswege vererbt werden. Das vorherrschende Vererbungsmuster ist autosomal-dominant. Seltener treten die autosomal-rezessive, X-chromosomale und mitochondriale Vererbung auf (Grunig et al., 1998; Maron et al., 2006; McMinn and Ross, 1995; Pinto et al., 2016).

Autosomal-dominante DCMs werden durch Mutationen in Zytoskelett-, Sarkomerprotein/Z-Band-, Kernmembran- und Glanzstreifenprotein-Genen verursacht (Elliott et al., 2008). Unter diesen stechen vor allem das Kernhüllenprotein Lamin-A/C (LMNA)-

Gen und das kardiale Sarkomerprotein Titin (TTN)-Gen hervor (Millat et al., 2011). Es wird angenommen, dass Mutationen des Titin (TTN)-Gens für 25 % der familiären oder schweren DCM-Transplantationen verantwortlich sind und damit am häufigsten bei DCMs auftreten (Japp et al., 2016; Pinto et al., 2016).

LMNA-Mutationen sind hingegen mit den meisten Defekten des Erregungsleitungssystems assoziiert und führen oft zu Herzrhythmusstörungen (Maron et al., 2006; Millat et al., 2011). Aufgrund dessen sind Träger dieser Mutation sorgfältig zu screenen, was häufig (28%) einen Schrittmacher im Verlauf erfordert (van Berlo et al., 2005). In manchen Fällen kann eine Erregungsleitungsanomalie durch ihren Phänotyp spezifisch auf einen Gendefekt hindeuten. Die Entdeckung von genetischen Veränderungen bei ausgeprägten phänotypischen Merkmalen stellt in der Zukunft einen wichtigen Behandlungsansatz dar (Japp et al., 2016).

Alle Patienten sollten daher eine detaillierte Familienanamnese ( $\geq 3$  Generation) und ein Screening mittels Elektrokardiogramm (EKG) und Echokardiographie durchführen lassen (Japp et al., 2016). Eine familiäre Genese sollte auch dann schon vermutet werden, wenn innerhalb einer Familie ein vorzeitiger Herztod, Erkrankungen des Erregungsleitungssystems oder auch Skelettmyopathien stattfanden (Elliott et al., 2008). Für die Therapie einer DCM ist das LV-Remodelling in Abhängigkeit des Ausmaßes der LV-Dilatation und der kontraktilen Beeinträchtigung ein zentrales therapeutisches Thema. Sie stellen auch für unerwünschte Ereignisse und die Prognose wichtige Faktoren dar (Japp et al., 2016). DCM-Patienten leiden daher meistens unter einer Herzinsuffizienz. Beobachtet wurde, dass diese schwerwiegender bei Patienten mit vorherrschender Genmutation war als bei denen ohne identifizierte Mutation (van Spaendonck-Zwarts et al., 2013). Ebenfalls sind diese Patienten durch plötzlichen Herztod gefährdet, was eine ICD-Implantation erforderlich macht.

## **1.2 Muskeldystrophie**

### **1.2.1 Grundlagen**

Muskeldystrophien (MDs) sind durch eine fortschreitende Schwäche und Degeneration (Dystrophie) der Skelettmuskulatur gekennzeichnet, deren myogene Verteilung und Schwere je nach Form unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann (Brockington et al., 2001b; Emery, 2002). Verursacht werden sie durch mehr als 30 verschiedene Erbkrankheiten, welche in dominanter oder rezessiver Weise vererbt oder oftmals

auch durch de-novo-Mutationen (= sporadisch) verursacht werden können (Davies and Nowak, 2006).

Als Folge der myogenen Degeneration kommt es zu einer Gehunfähigkeit sowie Atem- und Essschwierigkeiten, wobei der Schädigungsort nicht primär die Skelettmuskulatur (SM) sein muss, sondern auch andere Organe (u.a. das Herz) betreffen kann (Davies and Nowak, 2006; Emery, 2002). In den meisten Krankheitsfällen führen respiratorisches oder kardiales Versagen zum vorzeitigen Tod (Sasaki et al., 1998).

### 1.2.2 Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 2I (LGMD2I)

Wie unter Muskeldystrophien beschrieben, handelt es sich bei den Gliedergürtelmuskeldystrophien um eine Schwäche und Degeneration der Skelettmuskulatur (Gaul et al., 2006; Jefferies et al., 2005; Sveen et al., 2008; Wahbi et al., 2008). Klinisch differenziert zeigt sich diese vor allem an einer Schwäche der Schulter- und Beckengürtelmuskulatur, welche proximal größer als distal ist. Zusätzlich zeigen sich eine Erhöhung der Serum-Kreatinin-Kinase, eine Hypertrophie der Waden und des Oberschenkels sowie eine normale Intelligenz (Brockington et al., 2001a; Gaul et al., 2006). Epidemiologisch unterscheidet sich diese Form signifikant von anderen MDs (Emery, 2002). Auf Grund geringer Prävalenz kann diese bei der Gliedergürtel-MD nur ungefähr auf 0,8/100.000 (bezogen auf die gesamte Bevölkerung) angenommen werden, wohingegen die Duchenne-MD bei weitem am häufigsten auftritt ( $\approx 30/100.000$ ) und auch die schwerwiegendste Form der MDs darstellt.

Untergliedert werden Gliedergürtel-MDs in LGMD1, welche autosomal-dominant vererbt wird, sowie LGMD2, deren Erbgang autosomal-rezessiv ist (Gaul et al., 2006). LGMD2 umfasst insgesamt 17 genetisch unterschiedliche Subtypen, LGMD2A-Q (Petri et al., 2015). Im Vergleich zur dominanten Variante (LGMD1) ist eine rezessive Erkrankung schwerer. Das Erkrankungsalter umfasst die Kindheit und reicht bis zur vierten Lebensdekade (Petri et al., 2015).

Patienten mit LGMD2I stellen einen Subtyp der LGMD2-Varianten dar, welcher durch eine FKRP-Mutation auf Chromosom 19q13.3 verursacht wird (Walter et al., 2004). Die häufigste Mutation bei Patienten europäischer Herkunft stellt dabei eine Punktmutation (826C>A) dar, welche zu einem Aminosäureaustausch führt (Leu276Ile) (Mercuri et al., 2003; Poppe et al., 2004). Der Schweregrad der Erkrankung kann bei einer homozygoten Mutation zu einem relativ milden Phänotyp mit

späterem Krankheitsbeginn führen, wohingegen eine heterozygote Mutation einen schwereren (Duchenne-ähnlichen) und früheren Phänotypen verursacht (Brockington et al., 2001b; Mercuri et al., 2003).

Das Überleben und die Lebensqualität ist dabei vor allem von einer frühen Erkennung und Behandlung von Komplikationen abhängig (Pope et al., 2004). Ein hohes Risiko besteht für Herz- und Atemversagen, wobei durch Fortschritte im Atemwegsmanagement Erkrankungen des Herzens eine zentrale Rolle eingenommen haben (Petri et al., 2015).

Der Grad einer Herzbeteiligung variiert dabei von subklinisch bis schwer im Bereich von 10 bis 50 % (Margeta et al., 2009; Mercuri et al., 2003; Pope et al., 2004; Walter et al., 2004). Inwieweit eine Beteiligung diagnostiziert wird, ist nicht nur vom diagnostischen Verfahren abhängig (Goldstandard ist derzeit in der Früherkennung ein kardiales MRT, siehe Gaul et al., 2006), sondern auch, ob es sich um eine homozygote oder heterozygote Mutation handelt. Eine Heterozygotie ist mit einer früheren und schwereren Beteiligung des Herzens assoziiert (Pope et al., 2004; Wahbi et al., 2008). Keine Korrelation tritt dahingegen zwischen einer möglichen Herzbeteiligung und reduzierter Skelettmuskelkraft auf (Margeta et al., 2009; Petri et al., 2015; Sveen et al., 2008), weswegen unabhängig von der Muskelkraft immer eine kardiologische Begutachtung erfolgen sollte (Wahbi et al., 2008). Das klinische Bild umfasst dabei u.a. Arrhythmien und DCMs als Zeichen der Herzinsuffizienz (Mercuri et al., 2003; Sveen et al., 2008; Walter et al., 2004). LGMD2I Patienten unterschieden sich von den übrigen LGMD-Subtypen hier durch eine hohe Prävalenz kardialer Beteiligung und eine signifikante Reduzierung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LV-EF), welche bei Werten unter 50 % mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist (Petri et al., 2015).

In der Diagnostik wird bevorzugt zur Früherkennung und auch im klinischen Verlauf das kardiale MRT eingesetzt, da es empfindlicher als eine Echokardiographie ist und eine interdisziplinäre Betrachtung stattfindet (Gaul et al., 2006; Wahbi et al., 2008).

Es gibt keine spezifische Therapie für LGMD2I-Patienten, da durch eine relativ niedrige Prävalenz und das Fehlen von geeigneten Modellen die Forschung erschwert wird. Bisweilen wird beim Auftreten von Kardiomyopathien und LV-Dysfunktionen eine zur Duchenne-Muskeldystrophie ähnliche medikamentöse Therapie eingeleitet. Dabei werden ACE-Hemmer insbesondere mit Betablockern eingesetzt, wodurch

eine Progression verzögert wird und sich dies positiv auf das Langzeitüberleben auswirkt (Jefferies et al., 2005; Petri et al., 2015; Poppe et al., 2004).

Dennoch ist wenig über die zugrunde liegenden kardialen Pathologien durch Mutationen bekannt, weswegen es gilt, diese weiter zu erforschen.

### **1.3 Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs)**

Für die Erforschung von Herzfunktionen, insbesondere kardialer Ionenkanalfunktionen, stellen humane induzierte pluripotente Stammzellen eine hoffnungsvolle Option dar. Die Idee besteht darin, dass es pluripotenten Stammzellen möglich ist, sich in die meisten adulten Zelltypen zu differenzieren, darunter auch in Kardiomyozyten. Die Möglichkeit, durch das Reprogrammieren adulter Fibroblasten Stammzellen entstehen zu lassen (Zwi et al., 2009), bietet eine enorme Vielfalt an Einsatzmöglichkeiten, welche pharmakologische Testungen, Zellersatztherapien als auch Grundlagenforschungen in vitro umfassen (Itzhaki et al., 2011; Kehat et al., 2002; Kehat et al., 2001; Zhang et al., 2009). Durch ihre pluripotente Natur stellen sie zudem eine potentiell unbegrenzte Replikationskapazität dar (Xu et al., 2002), sodass auch langfristige Remodelling-Phänomene begutachtet werden können. Durch Biopsien gewonnenes Herzgewebe hat hierbei seine Grenzen. Es ist nicht nur bei seltenen Erkrankungen schwer zu erhalten, sondern besitzt auch nur ein begrenztes Überleben in der Langzeitkultivierung (Sun et al., 2012).

In der Forschung von kardialen Erkrankungen können hiPSCs in verschiedene Arten von Kardiomyozyten differenziert werden (He et al., 2003). Die Zellen zeigen einen „ventrikulären“, „atrialen“ oder „nodalen“ Phänotypen, welcher durch unterschiedliche Expression von spezifischen Markern und Aktionspotentialen charakterisiert ist (He et al., 2003; Moretti et al., 2010). HiPSC-Kardiomyozyten weisen strukturelle, molekulare und funktionelle Eigenschaften auf, wie sie auch in nativen Herzzellen vorhanden sind, einschließlich einer Reaktion auf kardioaktive Arzneimittel (Xu et al., 2002; Zwi et al., 2009). Moretti et al. (2010) zeigten erfolgreich, dass Krankheitsmechanismen vom Long-QT-Syndrom mit diesen erforscht werden können.

Anderen heterologen Expressionssystemen wie *Xenopus* Oozyten, humanen embryonalen Nieren-Zellen und Chinese Hamster Ovary hingegen fehlen wichtige Bestand-

teile von makromolekularen Komplexen des kardialen Ionenkanals, die für die normalen elektrophysiologischen Eigenschaften notwendig sind.

Auch embryonale Mausstammzellen weisen signifikante Unterschiede auf, wie Variationen in stadiumspezifischen Antigenen (He et al., 2003). Ebenfalls bestehen wichtige Unterschiede in der Physiologie und Struktur, welche sich in veränderten elektrischen Eigenschaften, Herzentwicklungen und Ionenkanälen zeigen (Sun et al., 2012).

Folglich stellen hiPSCs eine wichtige Forschungsmöglichkeit dar, um zelluläre und physiologische Prozesse von menschlichen Zellen zu erklären.

## 1.4 Zielsetzung

Die Entwicklung einer DCM ist bei LGMD2I-Patienten einer der Risikofaktoren, welcher das Überleben und die Lebensqualität beeinflusst (Poppe et al., 2004). Dennoch ist wenig über die Mechanismen der zugrundeliegenden kardialen Pathologie durch eine FKRP-Mutation bekannt.

Unter Berücksichtigung der Hürde bei der Gewinnung humaner ventrikulärer Herzzellen wurden hiPSC-Kardiomyozyten von einem DCM-Patienten mit einer Mutation im FKPR-Gen verwendet, um den kardialen Phänotyp bei LGMD2I nachzuahmen. Verglichen wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Zellen mit Zellen von gesunden Probanden.

Grundlage hierfür musste das erfolgreiche Erzeugen einer Zelllinie von einem Patienten mit LGMD2I und DCM mit rezidivierenden ventrikulären Tachykardien sein, welche die phänotypischen Eigenschaften von DCMs für mechanische und therapeutische Studien abbilden kann. Daraus folgend sollte der Mechanismus aufgedeckt werden, welcher für wiederkehrende ventrikuläre Tachyarrhythmien bei diesem Patienten zugrunde liegt.

Der grundlegende Erkenntnisgewinn über diese Mechanismen könnte eine Weiterentwicklung pharmakologischer Therapien ermöglichen und so eine wichtige Rolle in der Behandlung einnehmen.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Ethik

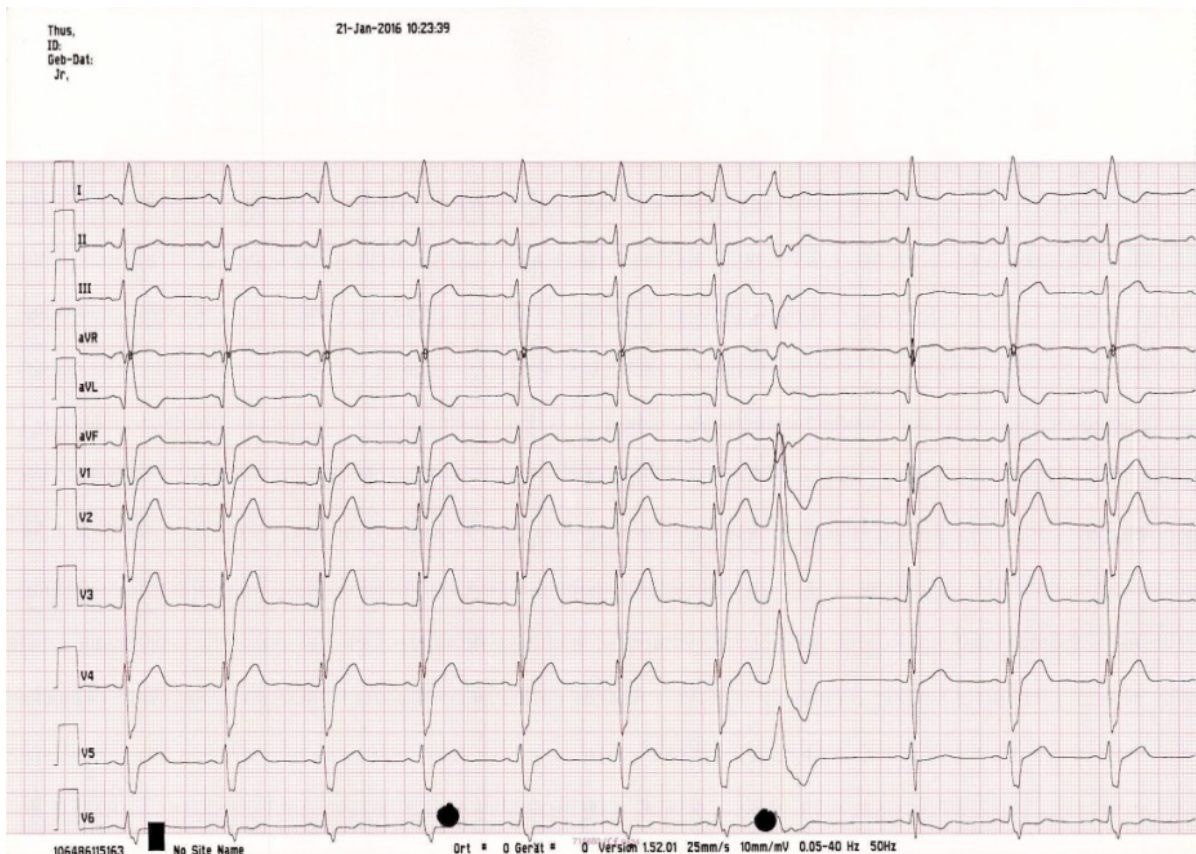
Hautbiopsien von drei gesunden Probanden und einem DCM-Patienten wurden mit schriftlicher Einverständniserklärung erhalten. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Mannheim, der Universität Heidelberg (Zulassungsnummer: 2009-350N-MA) und der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen (Zulassungsnummer: 10/9/15) genehmigt und gemäß den Vorgaben der Helsinki-Deklaration von 1975 in der revidierten Fassung von 1983 durchgeführt.

### 2.2 Patientenvorstellung

Der für diese Studie ausgewählte Patient war 51 Jahre alt, männlich und kaukasischer Abstammung. Er stellte sich mit einer Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 21 und DCM vor, welche durch klinische Symptome einer Herzinsuffizienz mit LV-Erweiterung und stark reduzierter LV-EF gekennzeichnet war. Die MD zeigte sich durch eine progressive proximale Muskelschwäche, wodurch er auf einen Rollstuhl angewiesen war. Der Grund für die Einweisung waren adäquate Schocks vom implantierbaren Kardioverter-Defibrillator (ICD), veranlasst durch wiederkehrende ventrikuläre Tachykardien.

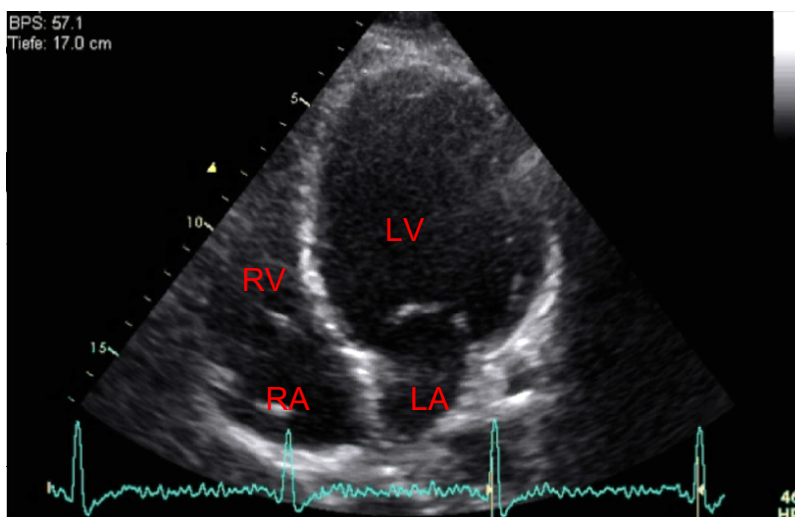
Die in der Vorgeschichte schon durchgeführte Genscreening-Analyse ergab, dass der Patient eine homozygote Punktmutation (826C>A) mit resultierendem Aminosäureaustausch (Ileu276Ile) trägt (Mercuri et al., 2003; Poppe et al., 2004) und daher als LGMD2I eingruppiert wird. In der Familienanamnese gab es keine bekannten DCMs oder Gliedergürtelmuskeldystrophien.

Im Zuge seines Klinikaufenthaltes wurde ein EKG aufgezeichnet (s. Abbildung 3). Seine DCM war schon vor einigen Jahren diagnostiziert worden und wurde durch eine Echokardiographie kontrolliert (s. Abbildung 4). Aufgrund einer stark reduzierten LV-EF von unter 30 %, assoziiert mit einer erhöhten Mortalität (Petri et al., 2015), war vor 7 Jahren ein Einkammer-ICD zur Primärprävention vom plötzlichen Herztod implantiert worden.



**Abb. 3: EKG des Patienten mit einer LGMD2I und DCM.**

Befund: Sinusrhythmus mit einzelner VES (ventrikulärer Extrasystole), Herzfrequenz: 60 Schläge pro Minute, Lagetyp: überdrehter Linkstyp, P-Welle normal, PQ-Zeit: <0,12 s, QRS-Komplex: 0,10 s, QT-Zeit frequenzkorrigiert (nach Bazett)  $\approx$  560 ms, fehlender R/S Umschlag, S-Persistenz bis V<sub>6</sub>, Linksanteriorer Hemiblock, T-Negativierung in I und aVL, ST-Strecken Deszendierend in I und aVL, allerdings bei bestehendem Schenkelblock ein charakteristischer Befund und darf nicht als Zeichen einer Ischämie gewertet werden;



**Abb. 4: Echokardiographie (4-Kammer-Blick).**

Es zeigte sich ein vergrößerter linker Ventrikel, eine Ausdünnung der LV-Wände sowie eine eingeschränkte systolische Funktion; die Ejektionsfraktion war stark reduziert (unter 30%); LV: linker Ventrikel, LA: linkes Atrium, RV: rechter Ventrikel, RA: rechtes Atrium;

### 2.3 hiPSC-Kardiomyozyten generieren

Durch Hautbiopsien waren dem erkrankten Patienten im Rahmen der Studie Hautzellen entnommen und zu Fibroblasten differenziert worden. Diese sowie die Zellen des ersten gesunden Probanden (D1) wurden unter Verwendung lentiviraler Partikel, die einen Transaktivator rtTA trugen, und einer induzierbaren polycistronischen Kasette mit den Reprogrammierungsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC zu menschlichen iPS-Zellen ausgebildet (Larribere et al., 2015; Maherali et al., 2008). Die Zellen des zweiten (D2) und dritten (D3) gesunden Probanden wurden hingegen in feederfreien Kulturen unter Verwendung eines integrationsfreien episomalen 4-in-1-CoMiP-Reprogrammierungsplasmiden (Addgene, # 63726) erzeugt. Es wurden bei beiden die gleichen Reprogrammierungsfaktoren verwendet wie bei den D1- und Patientenzellen, zusätzlich wurde allerdings noch eine kurze RNA in Haarnadel-Struktur gegen p53 zugegeben (Diecke et al., 2015).

Zur Generierung von hiPSC-Kardiomyozyten wurden gefrorene Aliquots (=Teilmenge einer Probe) von hiPSCs aufgetaut, ohne Feeder-Zellen kultiviert und mit Modifikatoren (Tiburcy et al., 2017) zu hiPSC-Kardiomyozyten ausdifferenziert. Nach einer Zeitspanne von 30 bis 60 Tagen in einem basischem Kulturmedium wurden sie aus 24-Well-Platten dissoziiert und auf Matrigel beschichtete Petrischalen übertragen.

### 2.4 Kultursystem

Für die Differenzierung der Stammzellen in Kardiomyozyten wurde das Protokoll aus Göttingen (Tiburcy et al., 2017) verwendet. Nachdem die Zellen 30 Tage alt und gut kontrahierbar waren, wurden sie für die verschiedenen Experimente verwendet.

Das zur Kultur verwendete Medium bestand aus 49 ml kardialem Medium (bestehend aus RPMI, 1% Na-Pyruvat, 1% Penicillin/Streptomycin), 2% B27 und 200  $\mu$ M ASC.

### 2.5 Vereinzeln von Zellen

#### Gesamtes Material:

12 ml Kulturmedium (12 ml kardiales Medium + 240  $\mu$ l B27 + 12  $\mu$ l ASC)

300  $\mu$ l Collagenase Typ I CLS1

1 ml PBS (w/o Ca Mg)

0,3 ml 0,05% Trypsin

0,3 ml RPMI + 10% FCS (270  $\mu$ l RPMI + 30  $\mu$ l FCS)

3,5 cm große Petrischalen

Für Patch-Clamp-Messungen wurden die Zellen auf 3,5 cm große Petrischalen einzelt, um eine Dichte von 2 bis  $4 \times 10^4$  Zellen pro Schale zu erzielen.

Dafür wurden sie mit 300  $\mu$ l (150 U) Collagenase Typ I CLS1 (Worthington, Deutschland) für 40 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur mit 250 x g für 2 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 1 ml PBS gewaschen. Es wurden 0,3 ml 0,05% Trypsin-EDTA (Life Technologies) zugegeben und für 4 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach einer Zugabe von 0,3 ml RPMI-Medium, das 10% FCS enthielt, wurden die Zellen bei 250 x g und bei Raumtemperatur für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und die Zellen mit 12 ml grundlegendem Kulturmedium resuspendiert. Die durchschnittliche Zellzahl pro Schale konnte nun in einer Neubauerkammer ermittelt werden.

## 2.6 Quantifizieren von hiPSC-Kardiomyozyten

### 2.6.1 Polymerase chain reaction (PCR)

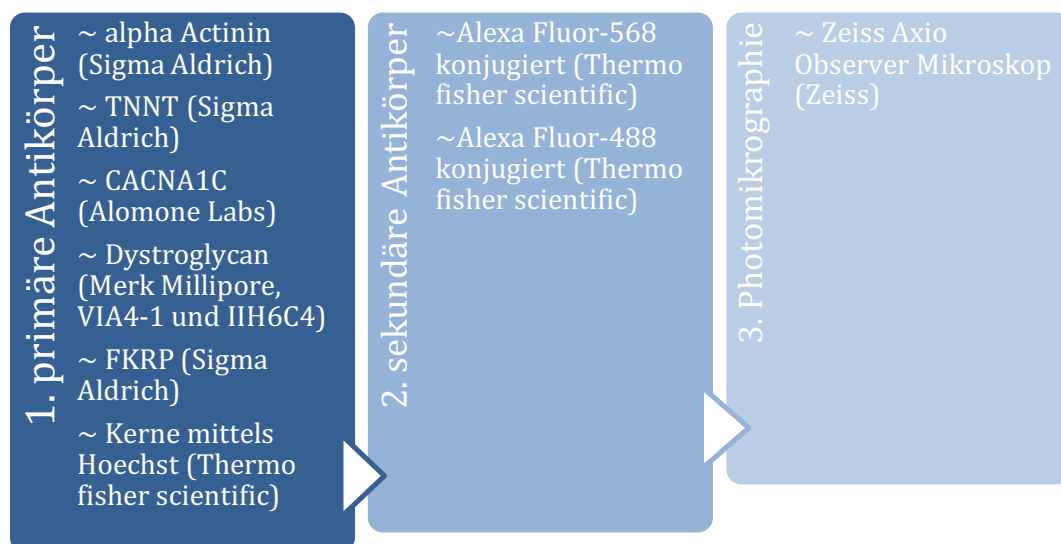
Durch die quantitative Bewertung der Steady-State-mRNA-Expression in hiPSC-Kardiomyozyten Kulturen konnte bestimmt werden, in welchem Ausmaß ein bestimmtes Gen exprimiert wird. So können Veränderungen in der Genexpression während der Zelldifferenzierung oder –entwicklung nachgewiesen werden (Schmittgen and Livak, 2008).

Unter Verwendung eines RNeasy-Mini-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland), einschließlich DNase-Behandlung, wurde die Gesamt-RNA erzeugt. In den Proben von behandelten und unbehandelten (Kontroll-) Zellen wurde die Expression der mRNA des interessierenden Gens relativ zum Housekeeping-Gen GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mit der sog.  $\Delta\Delta$ CT-Methode berechnet, basierend auf dem Zyklusschwellenwert (CT). Wobei der relative Expressionsfaktor durch  $= 2^{-\Delta(\Delta CT)}$ ,  $\Delta CT = CT_{\text{Gen von Interesse}} - CT_{\text{GAPDH}}$  und  $\Delta(\Delta CT) = \Delta CT_{\text{behandelt}} - \Delta CT_{\text{Kontrolle}}$  beschrieben ist (Schmittgen and Livak, 2008). Voraussetzung für die  $\Delta\Delta$ CT-Berechnungsmethode ist eine Verdopplung der DNA in jedem PCR-Zyklus. Es wurden bei jedem Experiment die cDNA von drei Zellkulturvertiefungen als biologische Replikate jeder Behandlung gemessen. Jede Zellkulturvertiefung wurde doppelt als technisches Replikat gemessen.

## 2.6.2 Immunfluoreszenz-Färbung

Immunfluoreszenz wurde verwendet, um an den kultivierten Zelllinien mittels Antikörpern die Verteilungen von Glykanen, Proteinen und anderen biologischen Molekülen zu untersuchen.

Dafür wurden hiPSC-Kardiomyozyten in mit Matrigel-beschichteten Lab-Tek-Kammern (BD Biosciences) mit je acht Vertiefungen geimpft. Sie wurden mit primären unmarkierten Antikörpern, welche an das jeweilige Antigen (Zielmolekül) binden, in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation mit Sekundärantikörpern, die Fluorophor trugen und durch Erkennung und Bindung vom primären Antikörper diesen nachwiesen (s. Abbildung 5). Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axio Observer Mikroskop (Zeiss) angefertigt.



**Abb. 5: Immunfluoreszenz mittels primärer und sekundärer Antikörper.**

Verwendung primärer und sekundärer Antikörper für den Nachweis von Glykanen, Proteinen und anderen biologischen Molekülen.

## 2.6.3 Live-Cell Imaging und Bildverarbeitung

Lebendzelleexperimente wurden in einer Tokai Hit-Inkubationskammer (Tokai Hit, Fujinomiya, Japan) bei 37 °C und mit 5% CO<sub>2</sub> durchgeführt. Die Zellen befanden sich dabei auf einem CSU-X1 Yokogawa-Rotationsscheiben-Konfokal (Yokogawa Electric Corporation, Tokio, Japan) und wurden mit Hilfe eines Nikon-Automatik Ti-Inversmikroskops mit 60x Plan Apo NA 1.4 Objektivs (Nikon, Tokio, Japan), sowie einer Hamamatsu C9100-02 EMCCD Kamera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) mit Volocity-Software (PerkinElmer) aufgenommen. Zur Analyse von Zellkon-

traktionen wurde die Zelllänge manuell unter Verwendung einer ImageJ-Software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) ermittelt.

## 2.7 Calcium Fluoreszenz

Die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) erfolgte durch eine Kombination von Patch-Clamp-Untersuchungen mit Live-Cell Imaging. Durch eine Anreicherung der Zellen mit dem fluoreszierenden  $Ca^{2+}$ -Indikator Fluo-3 AM über eine Pipette konnte die Fluoreszenz durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt werden, wobei Licht der Wellenlänge 520 nm emittiert wurde. Dabei können Veränderungen in  $[Ca^{2+}]_i$  durch folgende Formel beschrieben werden:

$$[Ca^{2+}]_i = k_d \frac{F}{F_{\max} - F}$$

wobei  $k_d$  = Dissoziationskonstante von Fluo-3 (400 nmol/L),  $F$  = Fluo-3 Fluoreszenz,  $F_{\max}$  =  $Ca^{2+}$  gesättigte Fluoreszenz, welche am Ende von jedem Experiment erhalten wird (Trafford et al., 1999);

Änderungen vom Membranstrom wurden dabei gleichzeitig mit der Fluoreszenz aufgenommen.

### Vorgang der Anreicherung mit dem $Ca^{2+}$ -Indikator Fluo-3 AM

Als erstes wurden 1,5 ml PSS in eine Petrischale zu hiPSC-Kardiomyozyten gegeben, wonach sie für 2 bis 4 Tage kultiviert wurden. Bei den darauffolgenden Schritten musste die Lichtempfindlichkeit des fluoreszierenden  $Ca^{2+}$ -Indikators Fluo-3 AM berücksichtigt werden. Es wurden 50 µg des membranpermeablen Acetoxymethylester-Derivats von Fluo-3 AM in 44 µl Pluronic F-127-Stammlösung (20% Gew./Vol. in DMSO) gelöst, um eine 1 mM Fluo-3 AM Stammlösung zu erhalten. Gelagert wurde sie bei -20 °C für maximal 1 Woche. Als nächstes wurden 15 ml der Fluo-3 AM Vorratslösung in 1,5 ml PSS gegeben, was zu einer Endkonzentration von 10 µM Fluo-3 AM führte, wobei man die Schale nur vorsichtig rühren durfte. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 10 Minuten in einer optisch undurchsichtigen Box inkubiert. Dies sollte den lichtempfindlichen Indikator schützen. Danach wurde das PSS behutsam abgesaugt, verworfen und die Zellen mit PSS 4- bis 5-mal gewaschen. Zuletzt wurden sie bei Raumtemperatur für circa 30 Minuten zur Entesterung mit PSS versetzt. Nach der Entesterung wurde die Fluoreszenz der Zellen unter Verwendung des Cairn Optoscan (Cairn Research, UK) Calcium-Bildgebungssystems gemessen.

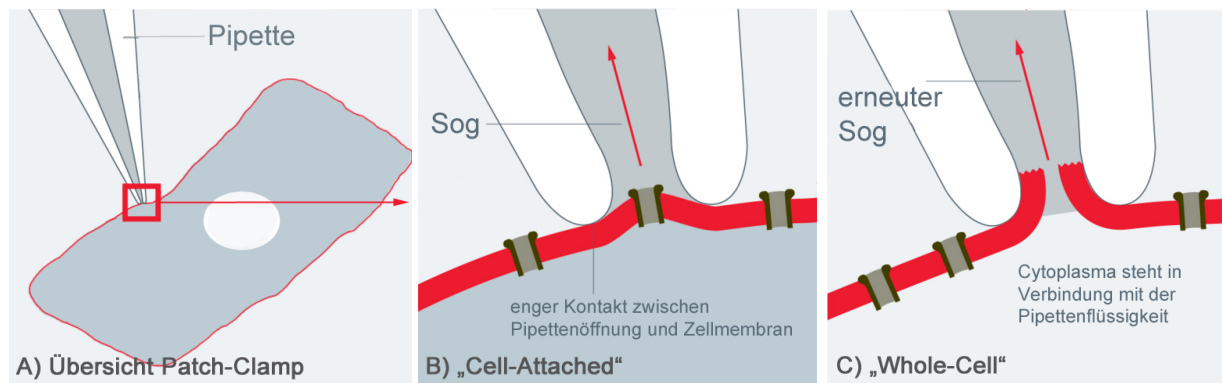
## 2.8 Patch-Clamp

Patch-Clamp ist eine Möglichkeit, durch physikalische Isolation von kleinen Membranabschnitten (sog. „patches“) Einkanalströme messen zu können. Dabei sind auf beiden Seiten der Zellmembran definierte Ionenkonzentrationen vorhanden (Hamill et al., 1981).

In den Patch-Clamp-Messungen wurde die „whole-cell“-Technik angewendet, wodurch eine elektrische Verbindung mit dem Zellinneren und Untersuchungen gesamter Ionenströme in kleinen Zellen ermöglicht wurde (Beech et al., 1991).

Verwendet wurden Patchelektroden, die aus Borosilicat Glaskapillaren (MTW 150F; world Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL) mittels DMZ-Universal Puller (Zeitz-Instrumente Vertriebs GmbH, Martinsried, Deutschland) gezogen wurden. Je nach gemessenem Ionenkanal wurden unterschiedliche vorgefilterte Pipettenfüllungen eingesetzt (siehe Tabelle 1). Der Pipettenwiderstand lag zwischen 1-2 M $\Omega$ . Alle Versuche wurden unter Raumtemperatur (22-25 °C) durchgeführt.

Zuerst mussten die Offset-Potentiale der Patchelektroden genullt werden. Danach wurde unter negativem Druck die Pipettenspitze an die Membran herangeführt und angesaugt, wodurch eine sogenannte „cell-attached“-Konfiguration erreicht wurde (s. Abbildung 6 B). Dabei entsteht der hohe Abdichtungswiderstand Giga-Seal zwischen Pipettenrand und Zellmembran, welcher sich im Giga-Ohm Bereich befindet (Sigworth and Neher, 1980) und eine starke Reduktion des Hintergrundrauschens auslöst, wodurch eine Messung im Pikoampere-Bereich ermöglicht wird. Anschließend wurde durch erneutes Anlegen eines Unterdruckes an der Pipettenspitze die Zellmembran aufgebrochen, wodurch die „whole-cell“-Konfiguration für Messungen entstand (s. Abbildung 6 C). Die Membrankapazität und der Serienwiderstand wurden kompensiert (60-80 %), die Diffusionspotentiale hingegen nicht. Während der Versuche setzte eine Badelektrode extrazellulär den Stromwert auf null.



**Abb. 6: Patch-Clamp Konfiguration.**

**A)** Übersicht Patch-Clamp an einem beispielhaften Kardiomyozyten.

**B)** „Cell-Attached“, die Zellmembran wird an der Pipettenspitze durch leichten Sog angesaugt, bleibt aber intakt.

**C)** „Whole-Cell“, die Zellmembran wird durch einen erneuten Sog aufgebrochen, wodurch eine elektrische Verbindung mit dem Zellinneren entsteht.

(nach <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique/>)

Die Pipettenflüssigkeit diffundiert über die Öffnung in die Zelle („innere Membran“), wodurch sich die Ionenkonzentration des Cytoplasmas mit der Lösung angleicht. So konnten nicht nur ein Membranstrom aufgezeichnet, sondern auch die Ioneninhalte von Zellen geändert werden (Hamill et al., 1981). Von außen war die Zelle („äußere Membran“) einer Badlösung ausgesetzt, welche sich je nach gemessenem Ionenkanal unterschied (siehe Tabelle 1). Durch Veränderungen ihrer Zusammensetzung konnte die Wirkung von Ionenkonzentrationsänderungen auf Ionenkanäle untersucht werden.

Die Signale wurden bei 10 kHz aufgenommen, mit dem Mikroelektrodenverstärker Axon 200B bei 2 kHz verstärkt, mit der Digidata 1440A Digitizer-Hardware digitalisiert sowie der Software pClamp 10.2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) gefiltert.

Die Aufnahmen wurden erst nach 3 bis 5 Minuten begonnen, nachdem der Strom einen steady-state erreicht hatte. Dies sollte einen systematischen Fehler verhindern, da Abfälle in der Anfangszeit der gemessenen Ströme die Ergebnisse verfälschen konnten. Daher wurden die zeitabhängigen Änderungen der Ströme sorgfältig beobachtet.



	Badlösung (in mmol/l)	Pipettenlösung (in mmol/l)
<b>Peak Natriumstrom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 NaCl</li> <li>• 110 CsCl</li> <li>• 1,8 CaCl<sub>2</sub></li> <li>• 1 MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 10 Hepes</li> <li>• 10 Glucose</li> <li>• 0,001 Nifedipin</li> <li>• pH 7,4 (CsOH)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 NaCl</li> <li>• 135 CsCl</li> <li>• 2 CaCl<sub>2</sub></li> <li>• 3 MgATP</li> <li>• 2 TEA-Cl</li> <li>• 5 EGTA</li> <li>• 10 HEPES (pH 7,2 CsOH).</li> </ul>
<b>Late Natriumstrom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 135 NaCl</li> <li>• 20 CsCl</li> <li>• 1,8 CaCl<sub>2</sub></li> <li>• 1 MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 10 Hepes</li> <li>• 10 Glucose</li> <li>• 0,001 Nifedipin</li> <li>• pH 7,4 (CsOH)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 NaCl</li> <li>• 135 CsCl</li> <li>• 2 CaCl<sub>2</sub></li> <li>• 3 MgATP</li> <li>• 2 TEA-Cl</li> <li>• 5 EGTA</li> <li>• 10 HEPES (pH 7,2 CsOH).</li> </ul>
<b>AP, I<sub>to</sub>, I<sub>Kr</sub> und I<sub>Ks</sub></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 130 NaCl</li> <li>• 5,9 KCl</li> <li>• 2,4 CaCl<sub>2</sub></li> <li>• 1,2 MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 11 Glucose</li> <li>• 10 HEPES</li> <li>• pH 7,4 (NaOH)</li> </ul> <p>Für I<sub>to</sub> Messungen wurde zusätzlich</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 µM Nifedipin</li> <li>• 10 µM TTX</li> <li>• 1 µM E-4031</li> </ul> <p>in die Badlösung gegeben, um I<sub>Ca-L</sub>, I<sub>Na</sub> und I<sub>Kr</sub> zu blockieren</p> <p>Für I<sub>Kr</sub>-Messungen wurde zusätzlich</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 µM Nifedipin</li> <li>• 10 µM Chromanol 293 B</li> <li>• 2 mM 4-AP</li> </ul> <p>in die Badlösung gegeben, um I<sub>Ca-L</sub>, I<sub>Ks</sub> und I<sub>to</sub> zu blockieren</p> <p>Für I<sub>Ks</sub>-Messungen wurde zusätzlich</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 µM Nifedipin</li> <li>• 2 mM 4-AP</li> <li>• 1 µM E-4031</li> </ul> <p>in die Badlösung gegeben, um I<sub>Ca-L</sub>, I<sub>to</sub> und I<sub>Kr</sub> zu blockieren</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 HEPES</li> <li>• 126 KCl</li> <li>• 6 NaCl</li> <li>• 1,2 MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 5 EGTA</li> <li>• 11 Glucose</li> <li>• 1 MgATP</li> <li>• pH 7,4 (KOH)</li> </ul>
<b>I<sub>Ca-L</sub></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 140 TEA-Cl</li> <li>• 5 CaCl<sub>2</sub></li> <li>• 1 MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 10 3R4S-Chromanol 293B</li> <li>• 10 HEPES</li> <li>• 0,01 TTX</li> <li>• 2 4-AP</li> <li>• pH 7,4 (CsOH)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 NaCl</li> <li>• 135 CsCl</li> <li>• CaCl<sub>2</sub></li> <li>• 3 MgATP</li> <li>• 2 TEA-Cl</li> <li>• 5 EGTA</li> <li>• 10 HEPES (pH 7,2 CsOH)</li> </ul>
<b>Calcium-Transient</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 130 NaCl</li> <li>• 5,9 KCl</li> <li>• 2,4 CaCl<sub>2</sub></li> <li>• 1,2 MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 11 Glucose</li> <li>• 10 HEPES</li> <li>• pH 7,4 (NaOH)</li> <li>• 5 4-AP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 HEPES</li> <li>• 126 KCl</li> <li>• 6 NaCl</li> <li>• 1,2 MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 5 EGTA</li> <li>• 11 Glucose</li> <li>• 1 MgATP</li> <li>• pH 7,4 (KOH)</li> </ul>

Tabelle 1: Patch-Clamp: Verwendete Badlösungen und Pipettenlösungen je nach gemessenem Ionenkanal.

Es wurden Standard-Patch-Clamp Aufnahmetechniken verwendet, um den Peak- und late- $I_{Na}$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{Ca-L}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ , Aktionspotential (AP) und Calcium-Transienten zu messen. Für die Messungen wurden Kardiomyozyten bei -100 mV gehalten. Um die Ströme auszulösen, wurden verschiedene Potentiale bei 0,5 Hz angewendet.

Aktionspotentiale wurden im gegenwärtigen Clamp-Modus aufgezeichnet. Um sie zu erzeugen, wurde ein Haltestrom von -40 pA durch die Patchelektrode auf die Zelle appliziert, wodurch das Membranpotential bei -80 mV gehalten wurde. Dann wurden kurze Stromimpulse (2 ms, 1 nA) bei 0,2 Hz angelegt, um APs auszulösen.

$I_{Na}$ -Ströme wurden ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV durch 400 ms lange Impulse mit -120 mV bis 40 mV induziert und in 5 mV Schritten erhöht. Die dabei ausgelösten Ströme wurden in Strom-Spannungs (IV) –Kurven, Aktivierungskurven (Membranleitfähigkeit / Spannung), Peak  $I_{Na}$  Kurven beim Membranpotential von -45 mV und late- $I_{Na}$  Kurven beim Membranpotential von -40 mV analysiert.

Die Inaktivierung der Natriumkanäle wurde durch ein zweistufiges Protokoll gemessen. Dabei wurden die Zellen zuerst durch einen konditionierten Impuls depolarisiert. Dieser dauerte 400 ms an und löste durch Spannungen von -120 mV bis 10 mV in 5 mV Schritten unterschiedliche Natriumamplituden aus. Daraufhin wurde ein Testimpuls von 100 ms Länge und -30 mV angelegt. Die Amplitude der durch die Testimpulse ausgelösten Ströme ist dabei direkt vom Maß der Inaktivierung durch den vorherigen Konditionierungsimpuls abhängig. Der Peak  $I_{Na}$  wurde aufgezeichnet und gegen die Spannung aufgetragen, wodurch die Inaktivierung ermittelt werden konnte. Das Haltepotential betrug auch -100 mV.

Die Erholung (Recovery) von Natriumkanälen wurde mittels zwei gleich großer Pulse (Doppelpuls) von jeweils 100 ms Länge beim Haltepotential von -100 mV bis -30 mV gemessen. Sie waren durch ein zunehmendes Zeitintervall in 2 ms Schritten voneinander getrennt ausgelöst worden. Die zweite Stromamplitude ist dabei vom zunehmenden Abstand (Zeitintervall) abhängig.

Der L-Typ Calciumstrom wurde ausgehend vom Haltepotential von -80 mV durch 500 ms lange Testimpulse mit -120 mV bis 60 mV induziert und in 5 mV Schritten erhöht. Vor dem Testimpuls wurden die Zellen durch einen 1 s Konditionierungsimpuls auf -40 mV depolarisiert, wodurch die  $I_{Na}$ -Kanäle inaktivierten und selektiv der Calciumstrom beurteilt werden konnte. Die ausgelösten Calciumströme wurden in Strom-

Spannungs (IV) –Kurven, Aktivierungskurven (Membranleitfähigkeit / Spannung) und Peak  $I_{Ca-L}$  Kurven beim Membranpotential von -10 mV analysiert.

Die Inaktivierung von L-Typ Calciumkanälen wurde wie bei Natriumkanälen durch ein zweistufiges Protokoll gemessen. Hierbei dauerte der Konditionierungsimpuls allerdings 1 s an und löste durch Spannungen von -120 mV bis 35 mV in 5 mV Schritten unterschiedlich Calciumamplituden aus. Der Testimpuls war 100 ms lang und wurde bei 0 mV aufgezeichnet. Das Haltepotential betrug -80 mV.

Die Erholung (Recovery) von Calciumkanälen aus der Inaktivierung wurde auch mit Hilfe von zwei gleich großen Pulsen (Doppelpuls) von 100 ms Länge und einem Haltepotential von -80 mV bis 0 mV gemessen.

Kaliumstrom-Aufnahmen unterschieden sich je nach untersuchtem Kaliumkanal.

Für  $I_{Kr}$  Analysen wurden 4 s -Depolarisationsimpulse von -60 mV bis 20 mV in 10 mV Schritten verwendet, um den Strom zu induzieren. Das Haltepotential betrug -40 mV. Die stationären Ströme wurden 5 ms vor dem Ende der Impulse gemessen.

Für  $I_{Ks}$  Analysen wurden 5 s -Depolarisationsimpulse von -80 mV bis 70 mV in 10 mV Schritten verwendet, um den Strom auszulösen. Das Haltepotential betrug -40 mV. Die stationären Ströme wurden 5 ms vor dem Ende der Impulse gemessen.

Für  $I_{to}$  Analysen wurden 400 ms -Depolarisationsimpulse vom Haltepotential von -80 mV bis 80 mV in 10 mV Schritten angewandt, um den Strom zu induzieren. Die Peak Ströme wurden 2 ms nach Beginn der Impulse gemessen.

### 2.8.1 Exkurs: Phasen eines Aktionspotentials

Das Entstehen eines Aktionspotentials (AP) in Kardiomyozyten ist von der integrativen Aktivität spezifischer Ionenströme abhängig, die zu einer schnellen Depolarisation und langsamen Repolarisation führen (Roden et al., 2002). Dabei können verschiedene Phasen innerhalb eines Aktionspotentials unterschieden werden (siehe Abbildung 7):

#### **Phase 0:**

In der Phase 0 herrscht in Kardiomyozyten ein Ruhemembranpotential von ca. -90 mV. Dieses entsteht vor allem durch eine hohe Permeabilität der Membran für Kaliumionen ( $I_{K1}$ -Strom), da das Ruhemembranpotential nahe dem Kaliumgleichgewichtspotential liegt (Roden et al., 2002).

Aufgrund einer Erregung der Herzzellen über das Erregungsleitungssystem werden spannungsabhängige Natriumkanäle geöffnet ( $I_{Na}$ ) und das Membranpotential steigt durch eine schnelle Depolarisation auf ca. +30 mV an.

### **Phase 1:**

In der Phase 1 kommt es zu einem Absinken des Membranpotentials aufgrund sich schnell inaktivierender Natriumkanäle nach der Depolarisation. Zusätzlich kommt es zum transienten Kaliumausstrom ( $I_{to}$ ), wodurch insgesamt eine partielle Repolarisation auftritt.

### **Phase 2:**

Diese Phase ist durch eine Plateauphase gekennzeichnet, welche mehrere 100 ms andauern kann. Verantwortlich dafür sind die einwärtsgerichteten Calciumkanäle vom L-Typ („long lasting“) und T-Typ („tiny“). Sie öffnen sich schon ab -30 mV, aber lösen erst in der Phase 2 die Plateauphase aus. Außerdem kommt es durch verzögerte gleichrichtende Kaliumkanäle (Öffnung mit leichter „ $I_{Kr}$ “ und starker „ $I_{Ks}$ “ Verzögerung, sowie  $I_{Kur}$ ) zum Ausströmen von Kalium, wodurch es im Verlauf zur langsamen Repolarisation kommt.

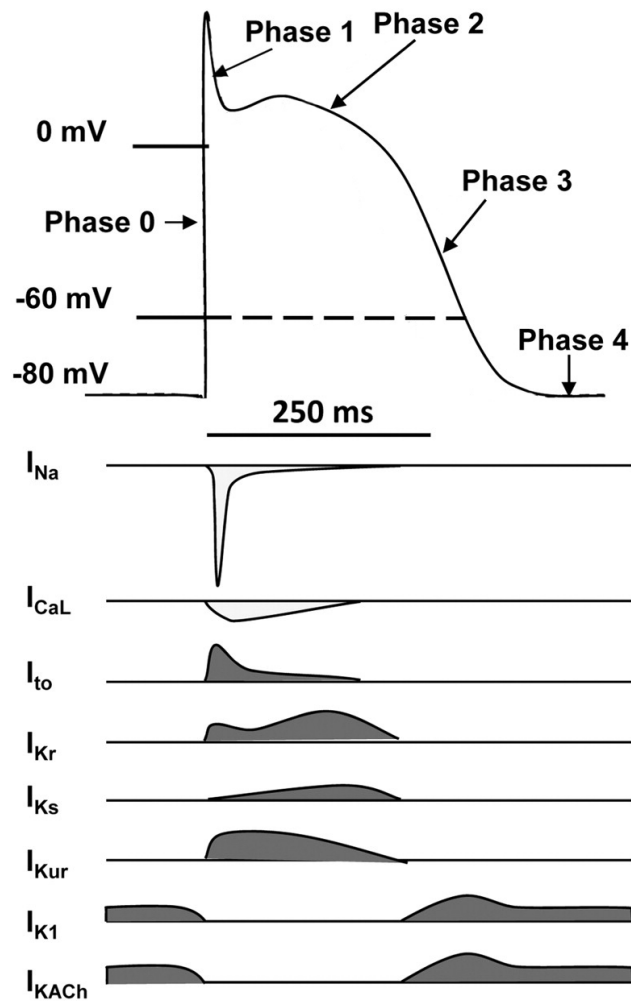
Insgesamt stellt die Phase 2 die vulnerabelste Phase für Störungen in der Aktionspotentialdauer dar.

### **Phase 3:**

Eine Abnahme des Calciumstroms sowie Zunahme der verzögerten gleichrichtenden Kaliumkanäle mündet in der Phase 3 in eine stark zunehmende Repolarisation. Die Kanäle schließen schlussendlich beim Erreichen des Membranpotentials von ca. -60 mV.

### **Phase 4:**

Der Zyklus eines Aktionspotentials endet mit dem erneuten Aktivieren von  $I_{K1}$  Kanälen, welche sich erst im hyperpolarisierten Bereich öffnen. Sie führen wieder zum Ruhemembranpotential von ca. -90 mV und stabilisieren dieses.



**Abb. 7: Phasen eines Aktionspotentials.**

$I_{Na}$ : Natriumstrom;  $I_{Ca-L}$ : L-Typ Calciumstrom;  $I_{to}$ : transienter Kaliumauswärtsstrom;  $I_{Kr}$ : „rapid“ (schneller) verzögerter Gleichrichter Kaliumstrom;  $I_{Ks}$ : „slow“ (langsamer) verzögerter Gleichrichter Kaliumstrom;  $I_{Kur}$ : ultraschnelle Komponente des verzögerten Gleichrichter Kaliumstroms;  $I_{K1}$ : einwärts gleichrichtender Kaliumstrom;  $I_{KACh}$ : Acetylcholin-aktivierte Kaliumkanäle; ( $I_{KACh}$  und  $I_{Kur}$  ausschließlich im Vorhof exprimiert“); (Iwasaki et al., 2011)

## 2.8.2 Auswertung

Die erhaltenen Patch-Clamp-Zellströme wurden mithilfe des Programms ClampFit 10.2 (Molecular Devices Corporation, USA) ausgewertet und anschließend mit SigmaPlot 11.0 (Systat GmbH, Deutschland) analysiert.

Die übertragenen Messergebnisse wurden in SigmaPlot 11.0 auf die Membrankapazität normiert. Danach wurde die Stromdichte gegen die Spannung aufgetragen und so in eine Strom-Spannungs (IV) -Beziehung gesetzt.

Um die Aktivierungs- oder Inaktivierungskinetik der verschiedenen Ströme beurteilen zu können, wurde die Membranleitfähigkeit ( $G_m$ ) und der relative Strom ( $I_m / I_{max}$ ) gegen die Spannung aufgetragen. Mithilfe der Boltzmann-Verteilung konnte die halbmaximale Spannung ( $V_{0.5}$ ) ermittelt werden, bei welcher die Hälfte der Kanäle bei der Aktivierung geöffnet bzw. bei der Inaktivierung inaktiviert sind.

Die Membranleitfähigkeit ( $G_m$ ) der Aktivierungskinetik wurde durch die Formel

$$G_m = \frac{I}{(E_m - E_{rey})} \text{ berechnet.}$$

Hierbei gab  $I$  den makroskopischen Strom an, bei dem Testmembranpotential  $E_m$  und Umkehrpotential  $E_{rey}$ , welches aus der IV-Beziehung bestimmt wurde. Wenn man die Membranleitfähigkeit ( $G_m$ ) gegen die Spannung aufträgt, sollte sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf ergeben.

Der relative Strom ( $I_m / I_{max}$ ) der Inaktivierungskinetik ergab sich durch die Auswertung der Ströme ( $I_m$ ) normiert auf den größten Wert  $I_{max}$ . Wird der Quotient gegen die Spannung aufgetragen, sollte sich auch hier ein sigmoidaler Verlauf ergeben, den man Steady-State Inaktivierungskurve nennt.

Die Erholung (Recovery) von der Inaktivierung wurde wie angesprochen mittels Doppelpuls gemessen, wobei zwei Depolarisationen nach -30 mV erfolgten. Die erste Depolarisation induzierte einen großen  $I_{Na}$ - bzw.  $I_{Ca-L}$ -Strom, welcher inaktivierte und als Referenz für den zweiten Strom fungierte. Die zweite Depolarisation wurde in zunehmenden Intervallen gemessen und war direkt von der zeitlichen Erholung abhängig. Der Peak der zweiten Depolarisation wurde in der Auswertung durch den Wert der ersten Depolarisation normalisiert und gegen das Zeitintervall  $t$  (in ms) aufgetra-

gen. Die Zeitkonstante Tau ( $\tau_h$ ) der Erholung konnte durch die Monoexponentialfunktion 1. Ordnung erhalten werden.

Der TTX-sensitive late- $I_{Na}$  wurde in den Versuchen als „Area under the curve“ gemessen, welche den Bereich von 50 bis 350 ms nach dem Beginn des Depolarisationsimpulses darstellt.

Beim Calcium-Transient kommt es, ausgelöst durch ein AP, zum kurzzeitigen („transienten“) Kalziumanstieg im Cytoplasma durch eine kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum. Die Analyse des Calcium-Transients konnte mithilfe von Fluoreszenz- und Patch-Clamp-Messungen erfolgen. Dabei wurde in den Versuchen die „Area under the curve“, Diastole und Systole im Programm ClampFit ausgewertet und in SigmaPlot der jeweilige Mittelwert berechnet. Während der Änderung des Membranstromes wurde auch die Fluoreszenz aufgezeichnet.

### 2.8.3 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse der Daten wurde das Programm InStat © (GraphPad, San Diego, USA) verwendet. Dort konnten statistisch der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und in Graphiken dargestellt werden. Zur Prüfung der Signifikanz wurde der Student-t-Test herangezogen, welcher die Daten der DCM-Zellen mit den gesunden Probandenzellen verglich. Als signifikant wurde  $p < 0,05$  angenommen, wohingegen ein Wert von  $p \geq 0,05$  als nicht signifikant angesehen wurde. Die Anzahl der verwendeten Zellen wird in den folgenden Abbildungen mit dem Buchstaben n beschrieben.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Charakterisierung patientenspezifischer hiPSC-Kardiomyozyten

Um eine erfolgreiche Erzeugung von hiPSC-Kardiomyozyten zu bestätigen, wurde die Protein- und mRNA-Expression zu Beginn (= Tag 0) und nach dem Anfangspunkt der Differenzierung zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Dafür wurden Immunfärbungen und quantitative PCR Analysen verwendet.

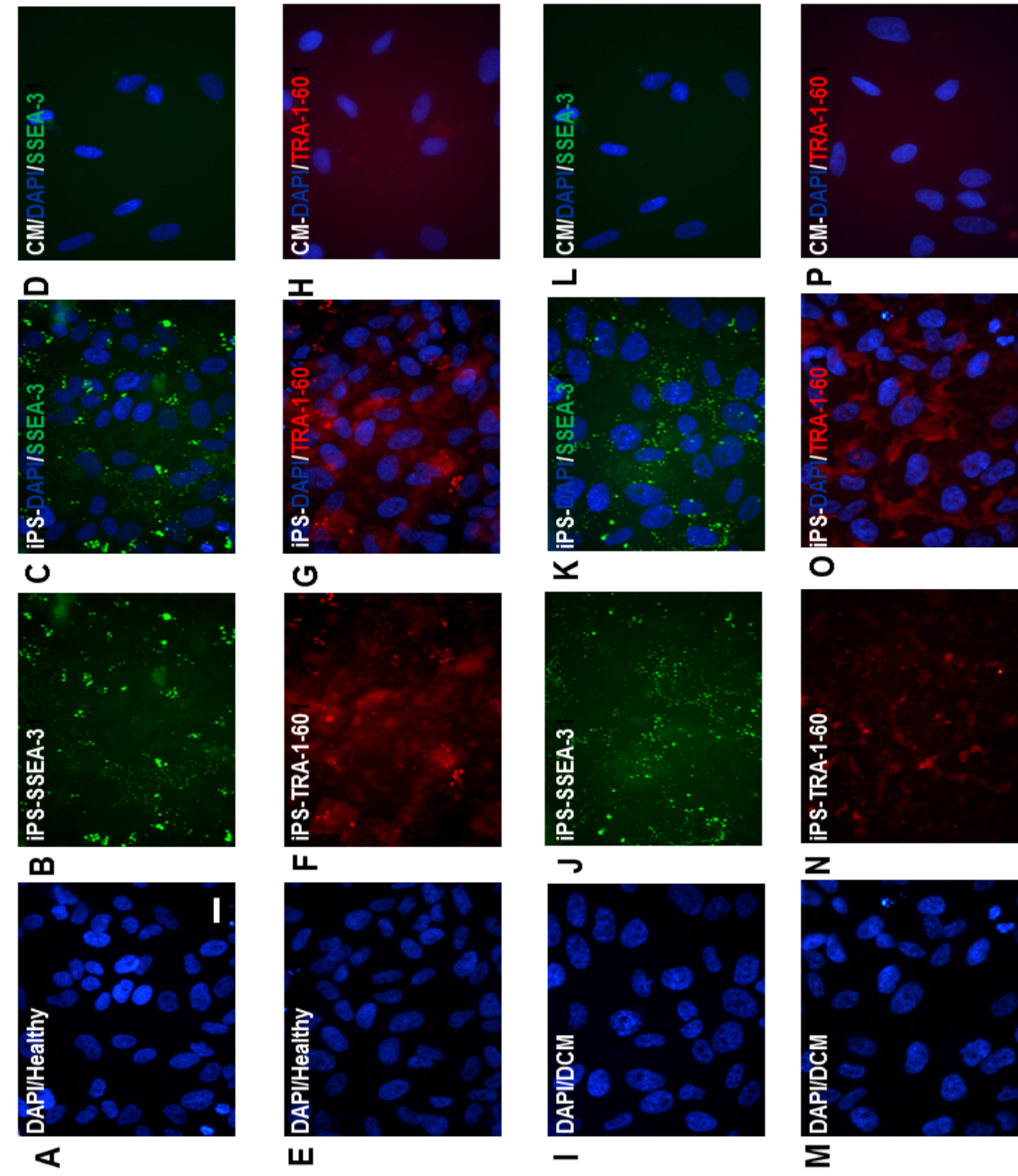
Vor Beginn (Tag 0) der Differenzierung zeigten die iPS-Zellen die charakteristische Morphologie von embryonalen Stammzellen (ESC), mit der Möglichkeit, sich in alle drei Keimblätter auszdifferenzieren zu können.

Zur Darstellung der Zellkerne wurden sie mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) gekoppelt, welcher sich in den DNA Regionen der Zellkerne anreicherte und blau fluoreszierte (Abb. 8 A, E, I, M).

Der Nachweis für embryonale Stammzellen erfolgte über die ESC-Marker SSEA-3 (StemGent) und TRA-1-60 (StemGent), welche auf der Oberfläche der Zellen exprimiert waren. Es zeigte sich eine positive grüne Immunfärbung für den ESC-Marker SSEA-3 bei gesunden (Abbildung 8 B-C) und DCM-Zellen (Abb. 8 J-K). Auch der pluripotente ESC-Marker TRA-1-60 zeigte ein positives Ergebnis bei gesunden (Abb. 8 F-G) und DCM-Zellen (Abb. 8 N-O) in Form einer roten Immunfluoreszenz. Die Zellen des DCM-Patienten wiesen im Vergleich zum gesunden Probanden während der Kultivierung keine Unterschiede in der Immunfluoreszenz auf.

Die nachgewiesene positive Immunfärbung markierte eine Reprogrammierung von Fibroblasten zu hiPSCs.

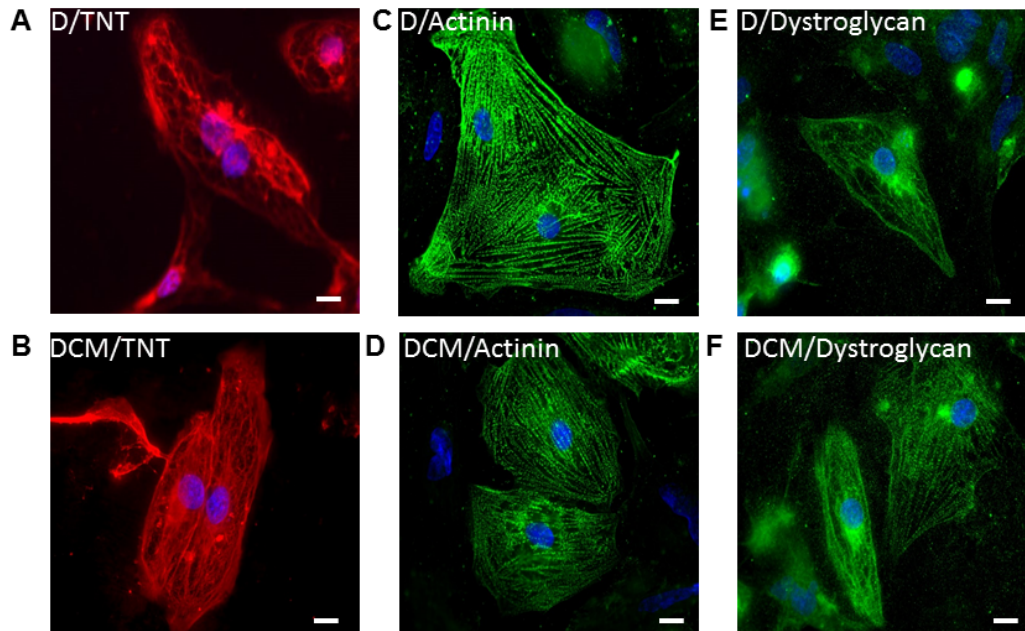




**Abbildung 8: Immunfärbung von reprogrammierten Fibroblasten zu humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs).**

**A)** hiPS-Zellen (iPS), gesunder Probanden (healthy), blaue Zellkernfluoreszenz durch DAPI (DAPI). **B)** gesunde iPS-Zellen, grüne Fluoreszenz durch SSEA-3 Markierung. **C)** gesunde iPS-Zellen, grüne und blaue Fluoreszenz durch DAPI und SSEA-3 Markierung. **D)** gesunde Kardiomyozyten (CM), erzeugt aus hiPSCs, keine SSEA-3 Markierung sichtbar. **E)** gesunde iPS-Zellen, blaue Zellkernfluoreszenz durch DAPI. **F)** gesunde iPS-Zellen, rote Fluoreszenz durch TRA-1-60 Markierung. **G)** gesunde iPS-Zellen, rote und blaue Fluoreszenz durch DAPI und TRA-1-60 Markierung. **H)** gesunde Kardiomyozyten, erzeugt aus hiPSCs, keine TRA-1-60 Markierung sichtbar. **I)** iPS-Zellen vom DCM-Patienten (DCM), blaue Zellkernfluoreszenz durch DAPI. **J)** DCM-iPS-Zellen, grüne Fluoreszenz durch SSEA-3 Markierung. **K)** DCM-iPS-Zellen, grüne und blaue Fluoreszenz durch DAPI und SSEA-3 Markierung. **L)** DCM-Kardiomyozyten, keine SSEA-3 Markierung sichtbar. **M)** DCM-iPS-Zellen, blaue Zellkernfluoreszenz durch DAPI. **N)** DCM-iPS-Zellen, rote Fluoreszenz durch TRA-1-60 Markierung. **O)** DCM-iPS-Zellen, rote und blaue Fluoreszenz durch DAPI und TRA-1-60 Markierung. **P)** DCM-Kardiomyozyten, keine TRA-1-60 Markierung sichtbar. Weißer Maßstabsbalken (in A) = 100 µM.

Am Tag 30 der Kultivierung waren die ESC-Marker nicht mehr sichtbar (Abb. 8 D, H, L und P). Hingegen zeigte sich eine positive Immunfärbung für die spezifischen Herzmarker Troponin T (rote Immunfluoreszenz) und  $\alpha$ -Actinin (grüne Immunfluoreszenz) (Abbildung 9 A+C (Gesund) und B+D (DCM)), wodurch auf eine stattgefundene Differenzierung von iPS-Zellen in Kardiomyozyten geschlossen wurde.



**Abbildung 9: Immunfärbung von hiPSC-Kardiomyozyten am Tag 30 mit Expression von Troponin T (TNT),  $\alpha$ -Actinin und Dystroglycan.**

**A)** hiPSC-Kardiomyozyten vom gesunden Probanden (D), rote Immunfärbung von Troponin T (TNT). **B)** hiPSC-Kardiomyozyten vom DCM-Patienten (DCM), rote Immunfärbung von Troponin T (TNT). **C)** hiPSC-Kardiomyozyten vom gesunden Probanden (D), grüne Immunfärbung von  $\alpha$ -Actinin. **D)** hiPSC-Kardiomyozyten vom DCM-Patienten (DCM), grüne Immunfärbung von  $\alpha$ -Actinin. **E)** hiPSC-Kardiomyozyten vom gesunden Probanden (D), grüne Immunfärbung von Dystroglycan. **F)** hiPSC-Kardiomyozyten vom DCM-Patienten (DCM), grüne Immunfärbung von Dystroglycan. Weißer Maßstabsbalken = 10 $\mu$ M.

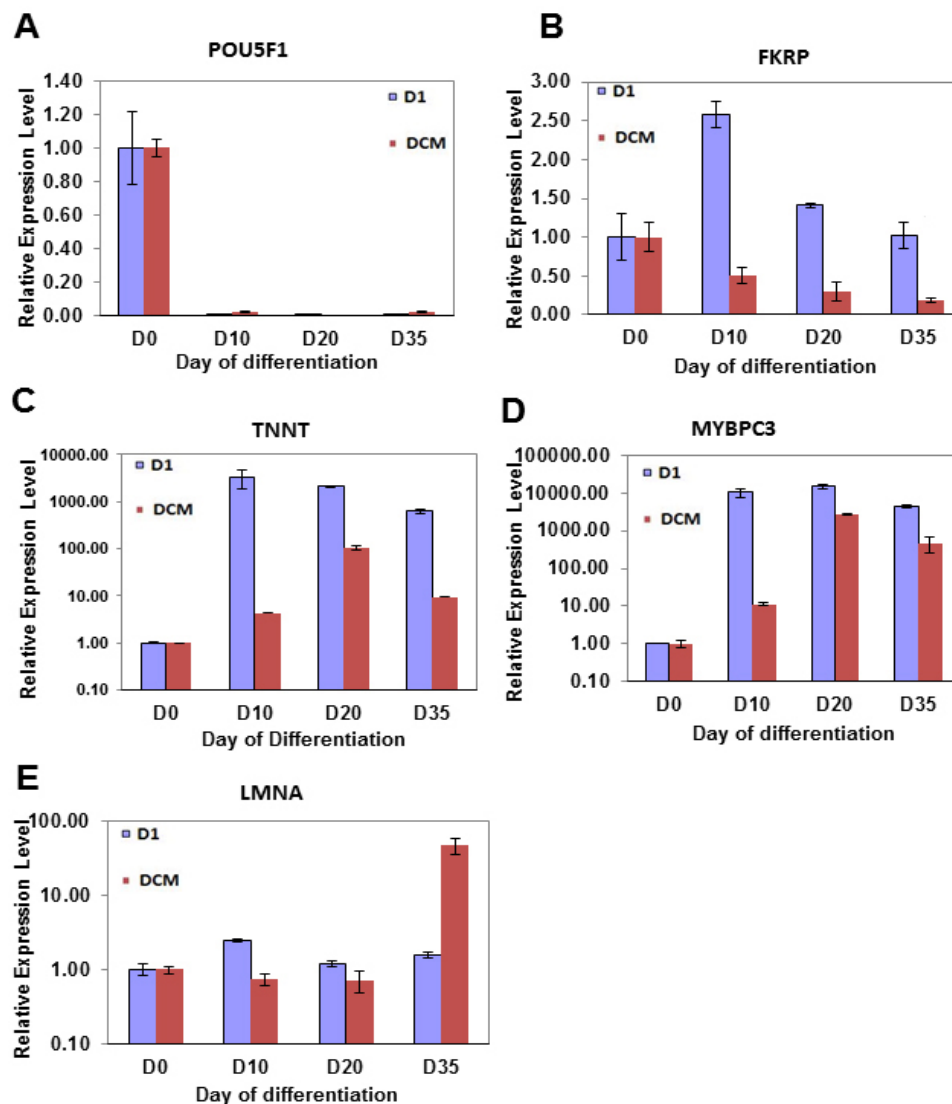
Mit Hilfe der quantitativen PCR Analyse wurde die mRNA-Expression von kardialen und pluripotenten Genen in DCM-Zellen gegenüber gesunden Zellen dargestellt.

Das Pluripotenzgen POU5F1 (POU Klasse 5 Homeobox 1, RefSeq NM\_002701.5) zeigte am Tag 0 (D0) der Differenzierung ein relatives Expressionslevel von ca. 1.00 in Bezug auf das Housekeeping-Gen GAPDH. Dies wies sowohl die gesunde (D1), als auch die DCM-Probe (DCM) auf (Abbildung 10 A). Im Verlauf nahmen beide Zelllinien bis zum Tag 35 (D35) um den Faktor 103 ab und waren kaum noch nachweisbar.

Die Betrachtung des kardialen Gens TNNT2 (Troponin T Typ 2, cardiac RefSeq NM\_000364) zeigte eine Zunahme der mRNA-Expression vom Tag 0 (D0) bis zum Tag 35 (D35) in den D1- und DCM-Proben (Abbildung 10 C). Auch die kardialen Ge-

ne MYBPC3 (Myosin-bindendes Protein C vom Herz-Typ, RefSeq NM\_000256) und LMNA (Laminin A vom Herz-Typ, RefSeq NM\_005572) nahmen im Verlauf der Differenzierung in beiden Proben zu (Abbildung 10 D-E). Insgesamt erhöhte sich das kardiale mRNA-Expressionslevel im Verlauf der Differenzierung um den Faktor  $10^3$  bis  $10^4$ .

Die Betrachtung des Fukutin-related Protein (FKRP)-Gens zeigte in der Expressionsanalyse eine Herabregulierung in DCM-Zellen (DCM), welche die Mutation (826C>A) trugen (Abbildung 10 B). In Probandenzellen (D1) nahm das Expressionslevel über die Differenzierungszeit bis Tag 10 (D10) zu, wonach es bis Tag 35 (D35) fast wieder auf die Höhe von Tag 0 (D0) abfiel. Die mRNA-Expression innerhalb der DCM-Zellen war im Vergleich zu den gesunden D1-Zellen am Tag 35 (D35) signifikant reduziert.



**Abbildung 10: Gen-Expression von reprogrammierten Fibroblasten in hiPSCs und deren Unterschiede zu hiPSC-Kardiomyozyten.**

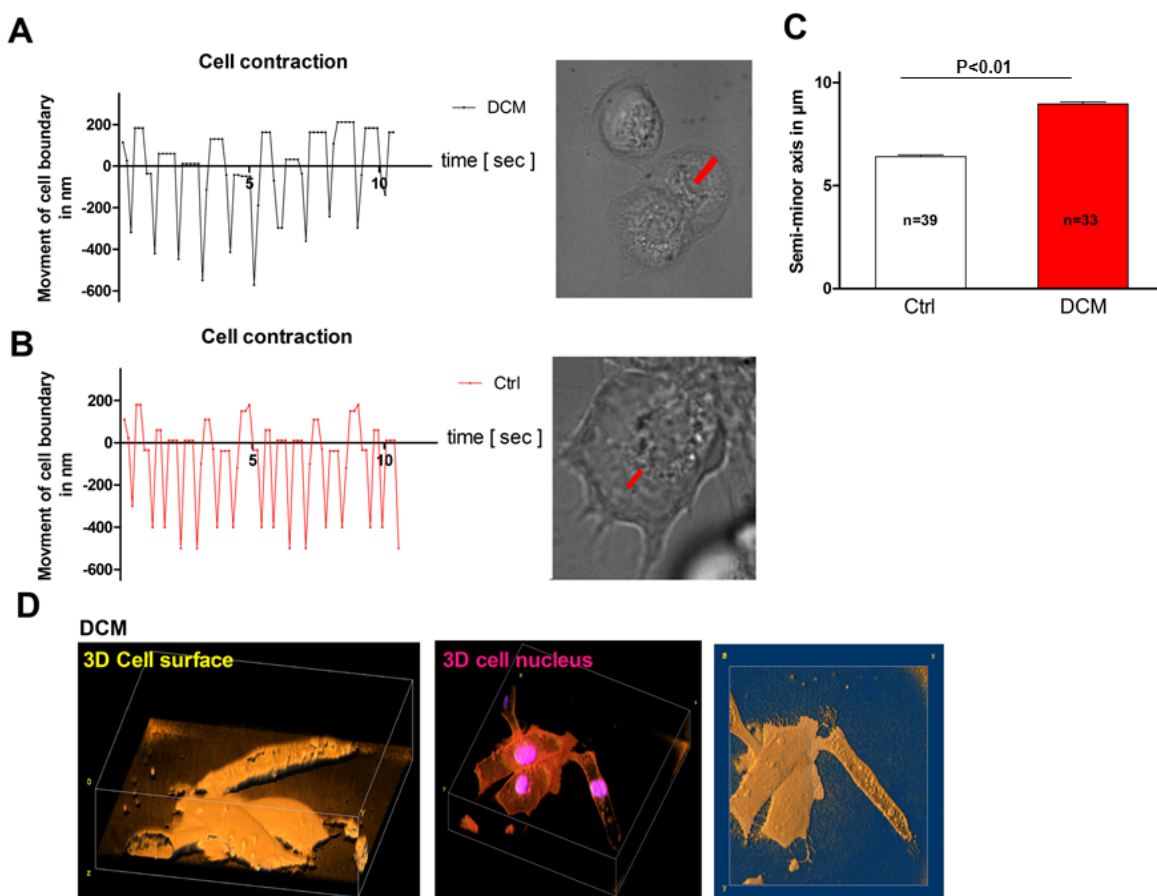
Darstellung der abnehmenden Expression des Pluripotenzgens POU5F1 (A) und Zunahme der kardialen Gene TNNT2 (C), MYBPC3 (D) und LMNA (E) im Verlauf der Differenzierung (D0=Tag 0, D10= Tag 10, D20=Tag 20 und D35=Tag 35) in gesunden Probandenzellen (D1) und DCM-Zellen (DCM). mRNA-Expression von FKRP (B) in gesunden D1- und DCM-Zellen.

### 3.2 Morphologie der Kardiomyozyten

Die Morphologie und Struktur des Sarkomers von DCM-Kardiomyozyten wurde mit Hilfe eines Konfokalmikroskops analysiert.

Wie erwähnt zeigten am Tag 30 der Differenzierung sowohl Kontroll- als auch DCM-Kardiomyozyten eine Expression der Strukturmarker  $\alpha$ -Actinin, Troponin T (TNT) und Dystroglycan (Abbildung 9). Ersichtlich war eine signifikante Reduktion von  $\alpha$ -Actinin in DCM-Kardiomyozyten im Vergleich zu gesunden Herzzellen (Abbildung 9 C-D). Eine veränderte Expression von Troponin T und Dystroglycan konnte hingegen nicht festgestellt werden (Abbildung 9 A-B und E-F).

Morphologisch fiel bei DCM-Kardiomyozyten gegenüber gesunden Kardiomyozyten eine signifikant größere Zelllänge auf (Abbildung 11 C). Die Zellkontraktionen waren tendenziell niedriger bei DCM-Kardiomyozyten und ergaben in Messungen bei DCM erkrankten Herzzellen ca. 11 Bewegungen in 10 sec im Vergleich zu 15 Bewegungen in 10 sec bei gesunden Herzzellen (Abbildung 11 A-B).



**Abbildung 11: Kontraktionsfrequenz und morphologische Analyse von hiPSC-Kardiomyozyten.**

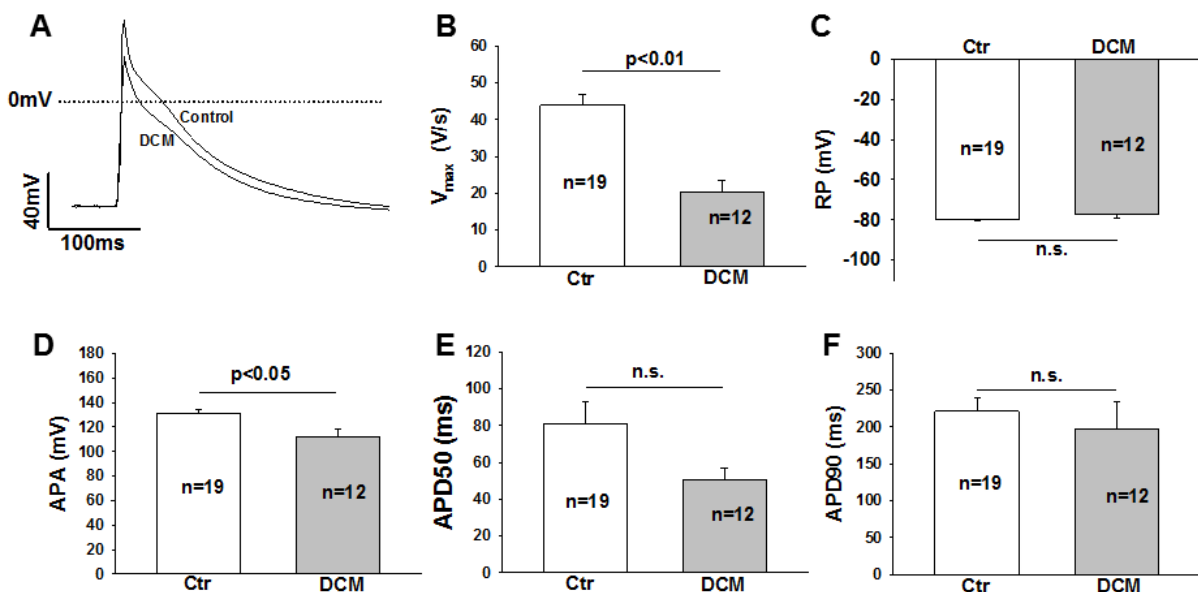
**A**) auf die Zeit (in sec) aufgetragene Zellbewegungen (in nm) von DCM hiPSC-Kardiomyozyten. **B**) auf die Zeit (in sec) aufgetragene Zellbewegungen (in nm) von gesunden hiPSC-Kardiomyozyten (Ctrl). **C**) Vergleich der Länge der Halbachse (in  $\mu\text{m}$ ) von gesunden hiPSC-Kardiomyozyten (Ctrl) mit DCM hiPSC-Kardiomyozyten (DCM). **D**) **Links:** Visualisierung der Zelloberfläche (Zellhüllenfärbung), **Mitte:** Visualisierung des Zellkerns (mittels DAPI), **rechts:** Übersichtsaufnahme; Bilder durch 3D Wiedergabe eines Konfokalmikroskops erstellt. Werte als Mittelwerte angegeben  $\pm$  Standardfehler.

### 3.3 Aktionspotentialänderungen

Aktionspotentiale (APs) wurden per Patch-Clamp-Verfahren aufgezeichnet und analysiert. Dabei waren Unterschiede zwischen den gesunden und DCM-Kardiomyozyten verzeichnet worden (siehe Tabelle 2). Eine übersichtliche Darstellung von typischen Aktionspotentialen in gesunden und DCM-Zellen erfolgte in Abbildung 12 A. DCM-Zellen wiesen darin signifikant kleinere Aktionspotentialamplituden (APA) (Abbildung 12 D) und Depolarisationsgeschwindigkeiten ( $V_{max}$ ) auf (Abbildung 12 B). Die Aktionspotentialdauer bei 50% und 90% Repolarisation (APD 50 und 90) war in DCM-Zellen kürzer, aber ohne dabei eine statistische Signifikanz zu erreichen (Abbildung 12 E-F). Das Ruhepotential war in gesunden und DCM-Kardiomyozyten ähnlich (Abbildung 12 C).

Zellen	RP	APA	$V_{max}$	APD50	APD90	n
D1	-79.50 $\pm$ 0.65	131.13 $\pm$ 5.19	45.56 $\pm$ 3.01	73.44 $\pm$ 12.58	199.94 $\pm$ 20.95	16
DCM	-77.78 $\pm$ 1.53	112.56 $\pm$ 5.26	19.56 $\pm$ 3.16	49.44 $\pm$ 6.56	174.89 $\pm$ 36.54	9

**Tabelle 2: Aktionspotential-Charakterisierungen von D1- und DCM-Kardiomyozyten (gemessen bei 1 Hz).** Werte: Mittelwert mit dem jeweiligen Standardfehler. **D1:** gesunde Kardiomyozyten, **DCM:** DCM-erkrankte Kardiomyozyten, **RP:** Ruhepotential (in mV), **APA:** Aktionspotentialamplitude (in mV),  **$V_{max}$ :** maximale Depolarisationsgeschwindigkeit (in Volt pro Sekunde), **APD50** und **90:** Aktionspotentialdauer (in ms) bei 50% oder 90% Repolarisation, **n:** Anzahl der untersuchten Zellen.



**Abbildung 12: Aktionspotentialänderungen bei hiPSC-Kardiomyozyten eines LGMD21 Patienten mit DCM.** **A)** Typische Darstellung von APs in hiPSC-Kardiomyozyten eines gesunden Probanden (Control/Ctr) und DCM-Patienten (DCM). **B)** Mittelwert der max. Depolarisationsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) in Volt pro sek. (V/s). **C)** Mittelwert des Ruhepotentials (RP) in mV. **D)** Mittelwert der Aktionspotentialamplitude (APA) in mV. **E)** Mittelwert der Aktionspotentialdauer bei 50% Repolarisation (APD50) in ms. **F)** Mittelwert der Aktionspotentialdauer bei 90% Repolarisation (APD90) in ms. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. n: Anzahl der untersuchten Zellen. n.s.: nicht signifikant.

### 3.4 Veränderungen spezifischer Ionenströme

#### 3.4.1 $I_{Na}$ -Strom

Patch-Clamp-Messungen wurden an gesunden (Ctr) und DCM-Kardiomyozyten (DCM) durchgeführt, um spezifische Ionenströme und deren Charakteristik zu analysieren.

Der Peak  $I_{Na}$  zeigte in den Messungen eine signifikante Reduktion in DCM-Kardiomyozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollzellen (Ctr) (Abbildung 13 A-B und 14 A-B). Dabei betrug der  $I_{Na}$ -Strom in DCM-Zellen  $-61,3 \pm 18,5$  pA/pF gegenüber  $-186,1 \pm 25,0$  pA/pF in gesunden Herzzellen. Auch beim late- $I_{Na}$  Strom im Zeitraum von 50 bis 350 ms wurde eine signifikante Reduktion beim Membranpotential von -40 mV gemessen. Er ergab  $234,0 \pm 48,0$  pA/pF in DCM-Zellen gegenüber  $587,0 \pm 183,0$  pA/pF gesunden Herzzellen (Abb. 13 I).

Der Activation-Strom von  $I_{Na}$  zeigte eine geringe nicht signifikante Reduzierung bei DCM-Zellen in der normierten Membranleitfähigkeit (Gm/Gmax) (Abb. 13 C). Auch die halbmaximale Spannung ( $V_{0.5}$ ) wies dies auf, erreichte aber auch keine Signifikanz (Abb. 13 D).

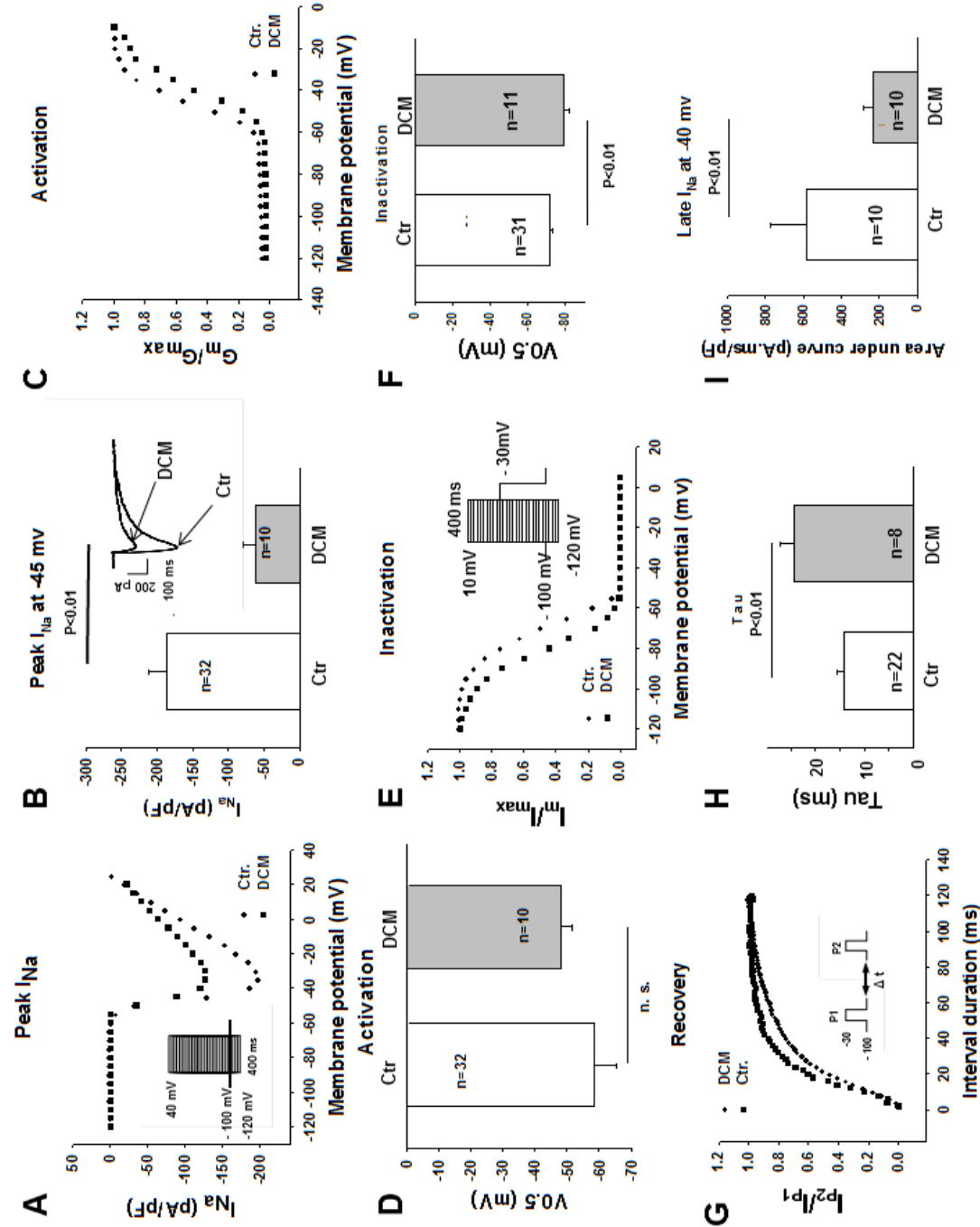
Der Inactivation-Strom von  $I_{Na}$  war in DCM-Zellen signifikant zu negativeren Potentialen verschoben worden (Abb. 13 E). Die halbmaximale Spannung ( $V_{0.5}$ ) betrug  $-79,3 \pm 2,7$  mV gegenüber  $-71,6 \pm 1,5$  mV in gesunden Kontrollzellen (Abb. 13 F).

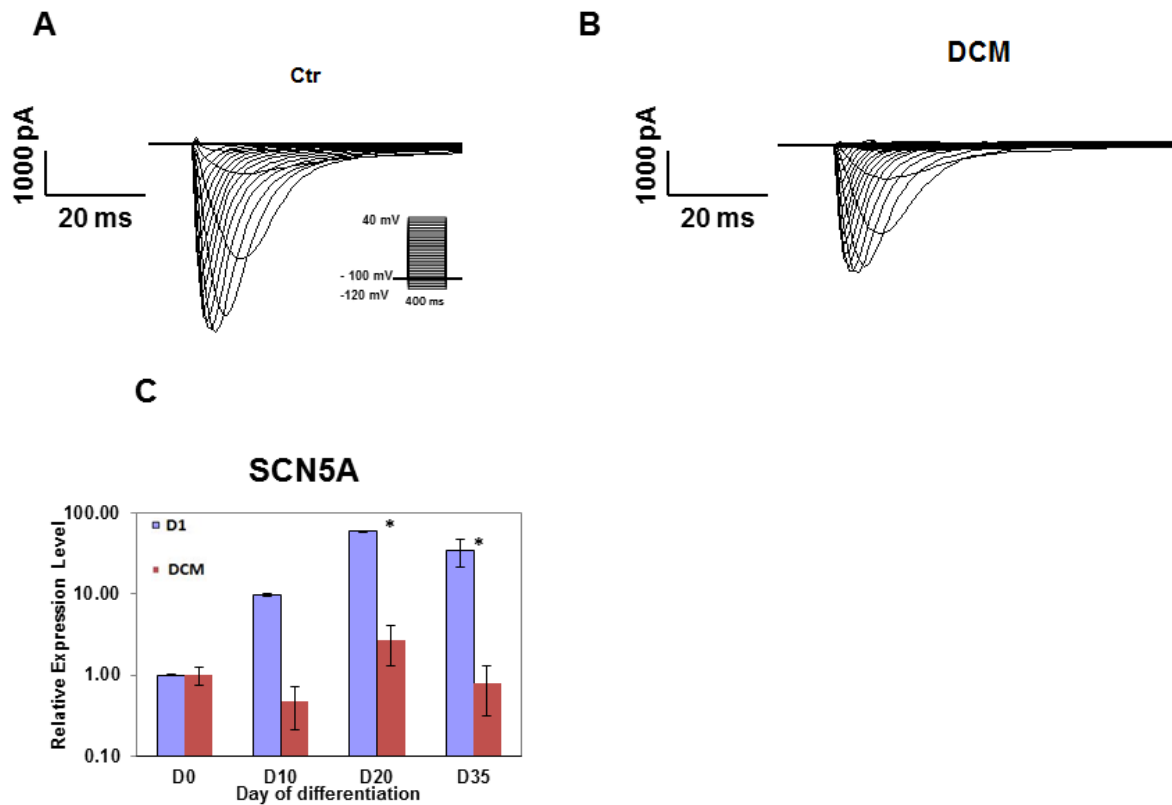
Der Recovery-Strom von der Inaktivierung zeigte eine signifikante Verlangsamung in DCM-Kardiomyozyten (Abb. 13 G). Die Zeitkonstante Tau ( $\tau_h$ ) ergab  $24,3 \pm 2,8$  ms in DCM-Zellen und  $14,2 \pm 1,2$  ms in gesunden Herzzellen (Ctr) (Abb. 13 H).

Auf Grund des veränderten  $I_{Na}$ -Stroms wurde eine quantitative PCR Analyse der SCN5A (Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5) -Expression in gesunden (D1) und DCM-Kardiomyozyten (DCM) durchgeführt (Abbildung 14 C). Die Messung erfolgte in Bezug auf das Housekeeping-Gen GAPDH. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression in DCM-Zellen gegenüber gesunden D1-Zellen. Am Tag 0 (D0) vor Beginn der Differenzierung war die Expression in beiden Zelllinien ohne nennenswerten Unterschied. Der mRNA-Spiegel in DCM-Zellen wuchs un stetig bis Tag 20 (D20), fiel aber bis zum Tag 35 (D35) unter das Ausgangsniveau von Tag 0. Der mRNA-Spiegel in D1-Zellen stieg, bis auf eine geringe Reduktion von Tag 20 zu Tag 35, stetig.

**Abbildung 13: Natriumkanal-dysfunktionen in hiPSC-Kardiomyozyten eines LGMD21-Patienten mit DCM.**

**A)** Charakteristische Strom-Spannungs (IV) -Beziehung des auf die Membrankapazität (pA/pF) normierten Peak  $I_{Na}$  von gesunden (Ctr) und DCM-Kardiomyozyten (DCM). **B)** gemittelter Peak  $I_{Na}$  und repräsentative Kurven beim Membranpotential von -45 mV. **C)** Aktivations-Kurven; die Membranleitfähigkeit (Gm/Gmax) ist gegen das Membranpotential (in mV) aufgetragen. **D)** Mittelwerte der halbmaximalen Spannung (V0.5) vom Steady-state Activation-Strom. **E)** Inactivation-Kurven; der relative Strom ( $I_m / I_{max}$ ) ist gegen das Membranpotential (in mV) aufgetragen. **F)** Mittelwerte der halbmaximalen Spannung (V0.5) vom Steady-state Inactivation-Strom. **G)** Recovery-Kurven der Inactivation; der durch die erste Depolarisation ( $I_{P1}$ ) normierte Strom  $I_{P2}$  ( $I_{P2} / I_{P1}$ ) ist gegen die Zeit (in ms) aufgetragen. **H)** Mittelwerte der Zeitkonstanten (Tau, in ms) der Erholung von der Inaktivierung. **I)** gemittelter late- $I_{Na}$  Strom beim Membranpotential von -40 mV, gemessen wurde die Fläche unter der Kurve zwischen 50 und 350 ms nach dem Beginn des Impulses. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. n: Anzahl der untersuchten Zellen. n.s.: nicht signifikant.





**Abbildung 14: Veränderungen in der Kanalexpression und den Ionenströmen von Natriumkanälen in gesunden und DCM hiPSC-Kardiomyozyten.**

**A)** charakteristischer  $I_{Na}$ -Strom (in pA) auf die Zeit (in ms) aufgetragen von gesunden hiPSC-Kardiomyozyten (Ctr). **B)** charakteristischer  $I_{Na}$ -Strom (in pA) auf die Zeit (in ms) aufgetragen von DCM hiPSC-Kardiomyozyten (DCM). **C)** Mittelwerte von SCN5A-mRNA-Spiegeln zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten (D0=Tag 0, D10= Tag 10, D20=Tag 20 und D35=Tag 35).

Werte angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*  $p < 0.05$ .



### 3.4.2 L-Typ Calciumstrom

Patch-Clamp-Messungen wurden an gesunden (Ctr) und DCM-Kardiomyozyten (DCM) durchgeführt, um spezifische Ionenströme und deren Charakteristik zu analysieren.

Der Peak  $I_{Ca-L}$  zeigte in den Messungen eine signifikante Reduktion in DCM-Kardiomyozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollzellen (Ctr) (Abbildung 15 A-B und 16 A-B). Dabei betrug der  $I_{Ca-L}$ -Strom in DCM-Zellen  $-3,7 \pm 1,0$  pA/pF gegenüber  $-7,7 \pm 1,4$  pA/pF in gesunden Herzzellen.

Der Activation- und Inactivation-Strom von  $I_{Ca-L}$  war in beiden Zelllinien ähnlich und wies keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 15 C+E). Auch die halbmaximale Spannung ( $V_{0.5}$ ) spiegelte dies wider (Abb. 15 D+F).

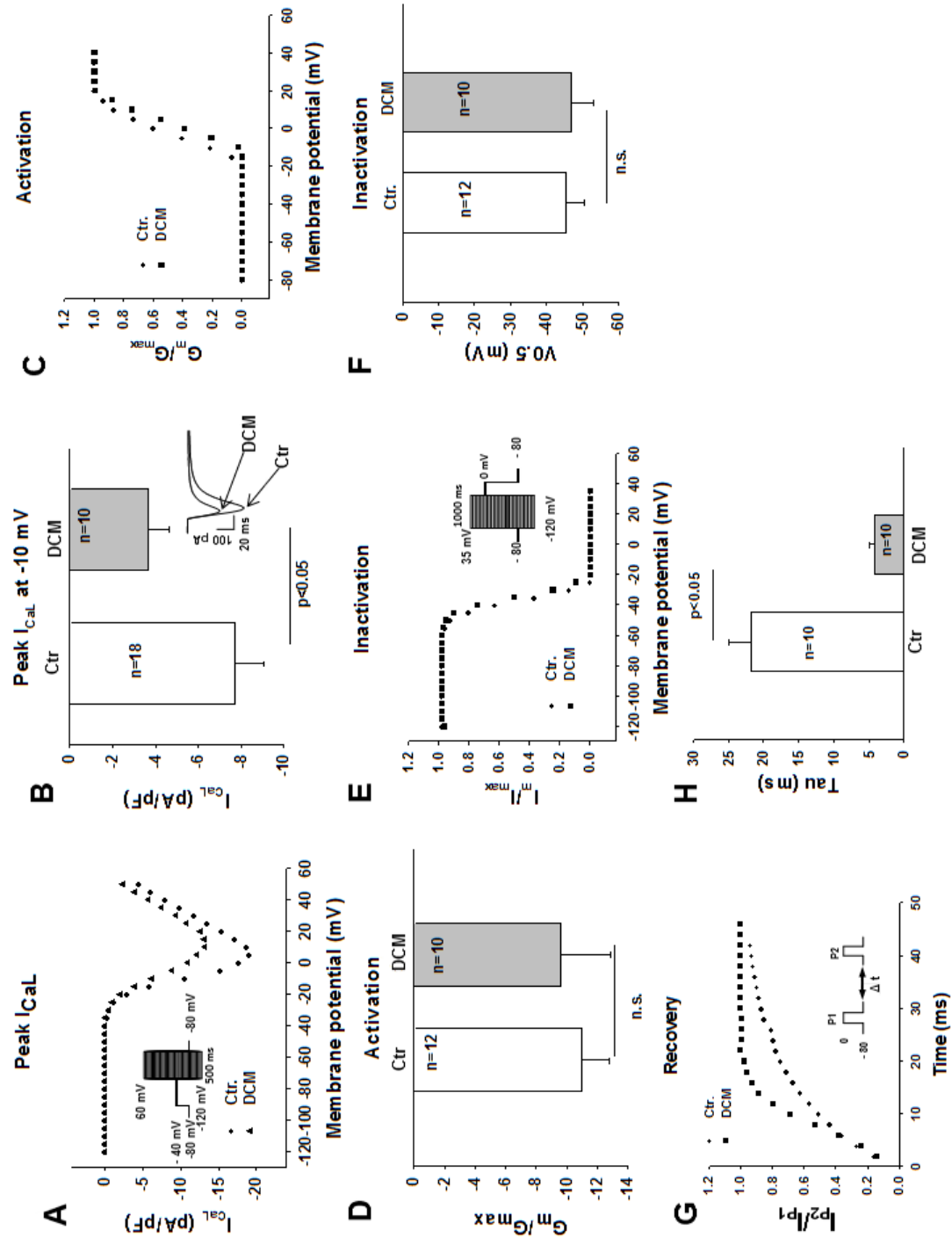
Die Erholung (Recovery) von der Inaktivierung verlief signifikant schneller in DCM-Kardiomyozyten (Abb. 15 G). Die Zeitkonstante Tau ( $\tau_h$ ) ergab  $4,2 \pm 0,7$  ms in DCM-Zellen und  $21,7 \pm 3,3$  ms in gesunden Herzzellen (Ctr) (Abb. 15 H).

Mit Bezugnahme auf den veränderten  $I_{Ca-L}$ -Strom wurde eine quantitative PCR-Analyse durchgeführt, um die Expression des CACNA1C-Gens für alpha-Untereinheiten von L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanälen zu untersuchen (Abbildung 16 C). Die Messung erfolgte in Bezug auf das Housekeeping-Gen GAPDH.

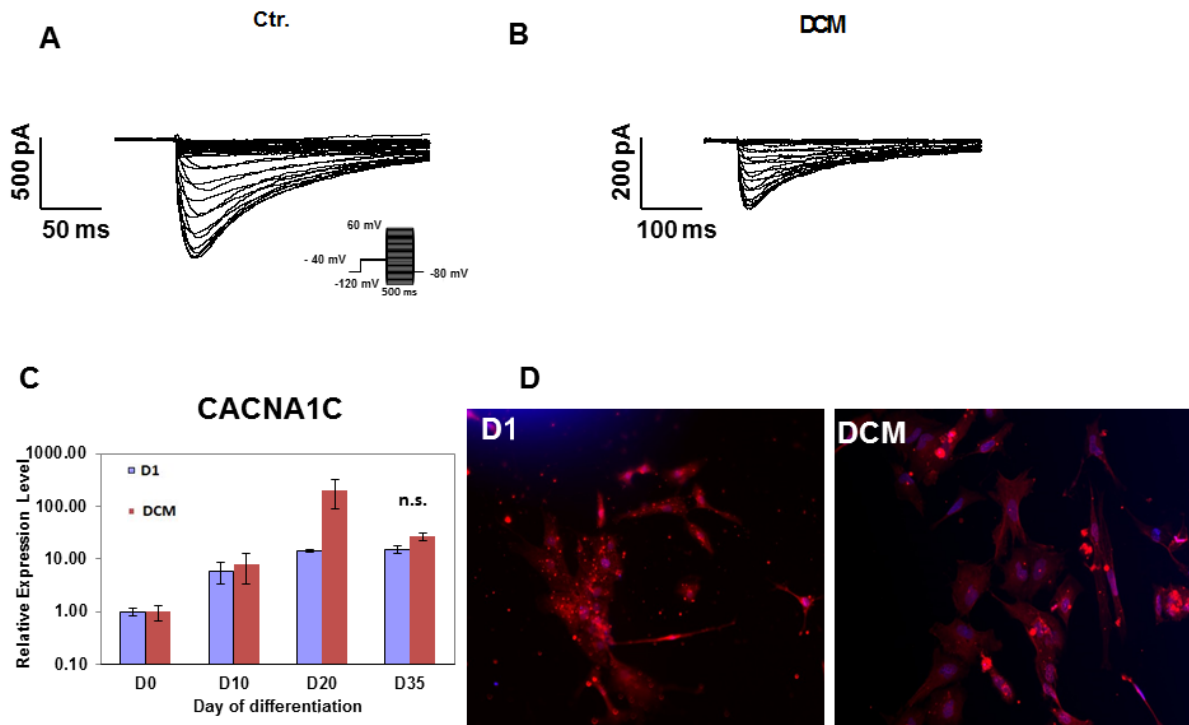
Es konnte bei der Expression in gesunden (D1) und DCM-Kardiomyozyten (DCM) kein Unterschied beobachtet werden. Am Tag 0 (D0) vor Beginn der Differenzierung war die Expression in beiden Zelllinien ohne nennenswerten Unterschied. Danach stieg in beiden Gruppen das relative Expressionslevel bis zum Differenzierungstag 35 (D35) an und erreichte ähnliche Werte ohne signifikanten Unterschied.

Auch eine Immunfluoreszenzmessung zeigte keinen Unterschied in der Expression von CACNA1C in gesunden (D1) und DCM-Kardiomyozyten (DCM) (Abbildung 16 D). In beiden Zelllinien wurde eine vergleichbare rote Immunfluoreszenz festgestellt.

**Abbildung 15: L-Typ Calcium-Kanal-Dysfunktionen in hiPSC-Kardiomyozyten eines LGMD2I-Patienten mit DCM.**



**A)** Charakteristische Strom-Spannungs (IV) -Beziehung des auf die Membrankapazität (pA/pF) normierten Peak  $I_{Ca-L}$  von gesunden (Ctr.) und DCM-Kardiomyozyten (DCM). **B)** gemittelter Peak  $I_{Ca-L}$  und repräsentative Kurven beim Membranpotential von -10 mV. **C)** Activation-Kurven; die Membranleitfähigkeit ( $G_m/G_{max}$ ) ist gegen das Membranpotential (in mV) aufgetragen. **D)** Mittelwerte der halbmaximalen Spannung ( $V_{0.5}$ ) vom Steady-state Activation-Strom. **E)** Inactivation-Kurven; der relative Strom ( $I_m / I_{max}$ ) ist gegen das Membranpotential (in mV) aufgetragen. **F)** Mittelwerte der halbmaximalen Spannung ( $V_{0.5}$ ) vom Steady-state Inactivation-Strom. **G)** Recovery-Kurven der Inactivation; der durch die erste Depolarisation ( $I_{p1}$ ) normierte Strom  $I_{p2} / I_{p1}$  ist gegen die Zeit (in ms) aufgetragen. **H)** Mittelwerte der Zeitkonstanten ( $\tau$ , in ms) der Erholung von der Inaktivierung. Werte angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. n: Anzahl der untersuchten Zellen. n.s.: nicht signifikant.



**Abbildung 16: Veränderungen in der Kanalexpression und den Ionenströmen von Calcium-Kanälen in DCM hiPSC-Kardiomyozyten.**

**A)** charakteristischer  $I_{Ca-L}$ -Strom (in pA) auf die Zeit (in ms) aufgetragen von gesunden hiPSC-Kardiomyozyten (**Ctrl**). **B)** charakteristischer  $I_{Ca-L}$ -Strom (in pA) auf die Zeit (in ms) aufgetragen von DCM hiPSC-Kardiomyozyten (**DCM**). **C)** Mittelwerte von CACNA1C-mRNA-Spiegeln zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten (D0=Tag 0, D10= Tag 10, D20=Tag 20 und D35=Tag 35). **D)** Immunfärbung von CACNA1C in gesunden (D1) und DCM-Kardiomyozyten (DCM).

Werte angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. n.s.: nicht signifikant.

### 3.4.3 Kaliumstrom

Patch-Clamp-Messungen des transienten Kaliumauswärtsstroms ( $I_{to}$ ), des schnell verzögernden gleichrichtenden Kaliumstroms ( $I_{Kr}$ ) und des langsam verzögernden gleichrichtenden Kaliumstroms ( $I_{Ks}$ ) wurden durch die Verwendung spezifischer Blocker ermöglicht. Nachdem die spezifischen Blocker 4-AP, E-4031 und Chromanol 293B in bestimmten Konzentrationen und Konstellationen (siehe Tabelle 1) eingesetzt wurden, konnten der  $I_{to}$ -,  $I_{Kr}$ - oder  $I_{Ks}$ -Strom isoliert werden.

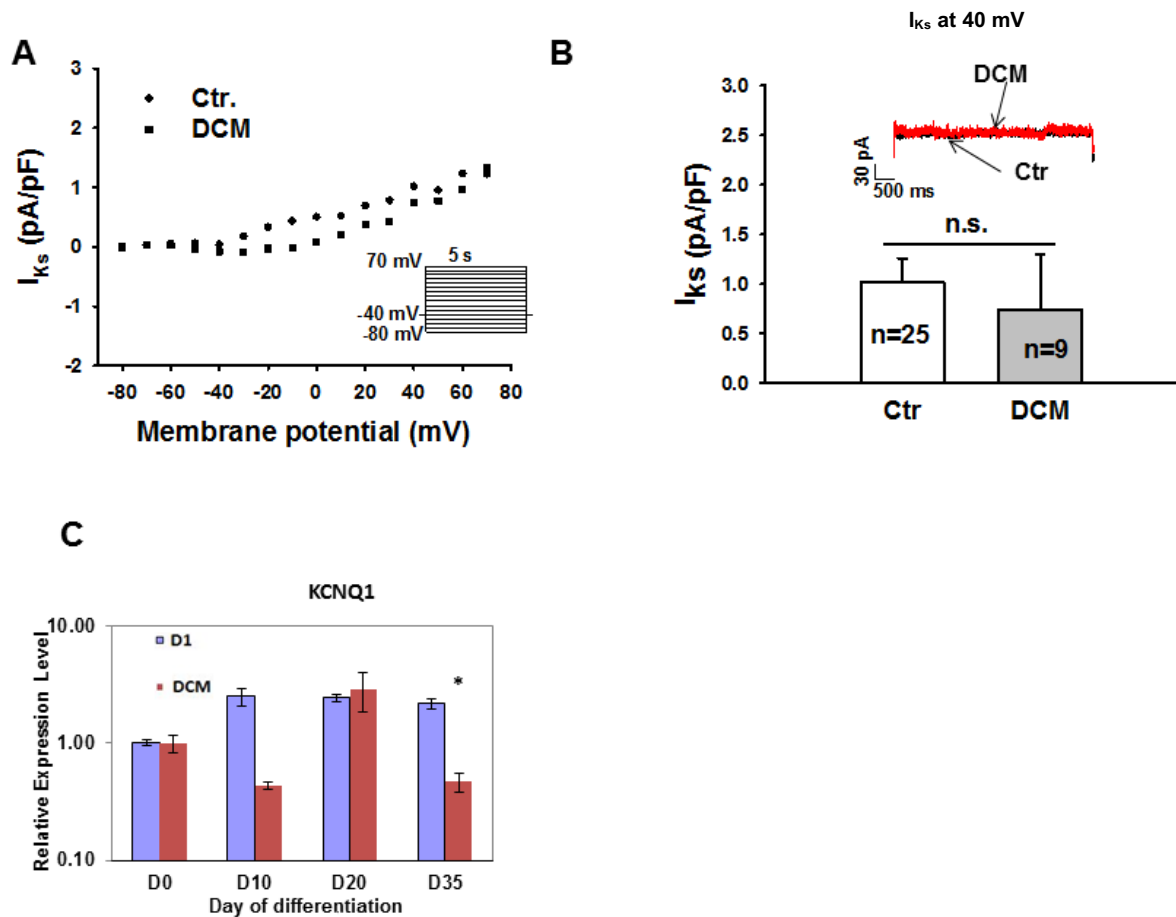
Chromanol 293B (10 $\mu$ M) konnte dabei den  $I_{Ks}$ -Strom von den anderen Strömen trennen, E-4031 (1 $\mu$ M) den  $I_{Kr}$ -Strom und 4-AP den  $I_{to}$ -Strom isolieren.

Die Genexpressionsanalysen von KCNQ1 (für  $I_{Ks}$ ) und KCND3 (für  $I_{to}$ ) zeigten in DCM-Kardiomyozyten bis zum Differenzierungstag 35 (D35) signifikant reduzierte Spiegel im Vergleich zu gesunden (D1) Zellen (Abbildung 17 C und 18 C). Die Messungen erfolgten in Bezug auf das Housekeeping-Gen GAPDH.

Die auf die Membrankapazität normierten Zellströme  $I_{Ks}$  und  $I_{to}$  wiesen keinen Unterschied zwischen gesunden und DCM-Herzzellen auf (Abb. 17 A und 18 A). Der  $I_{Ks}$ -Strom betrug beim Membranpotential von 40 mV in DCM-Zellen (DCM)  $0,6 \pm 0,3$  pA/pF gegenüber  $0,7 \pm 0,5$  pA/pF in gesunden Kardiomyozyten (Ctr) (Abb. 17 B). Der  $I_{to}$ -Strom ergab beim Membranpotential von 60 mV in DCM-Zellen (DCM)  $3,7 \pm 0,5$  pA/pF im Vergleich zu  $2,5 \pm 0,9$  pA/pF in gesunden Kontrollzellen (Ctr) (Abb. 18 B).

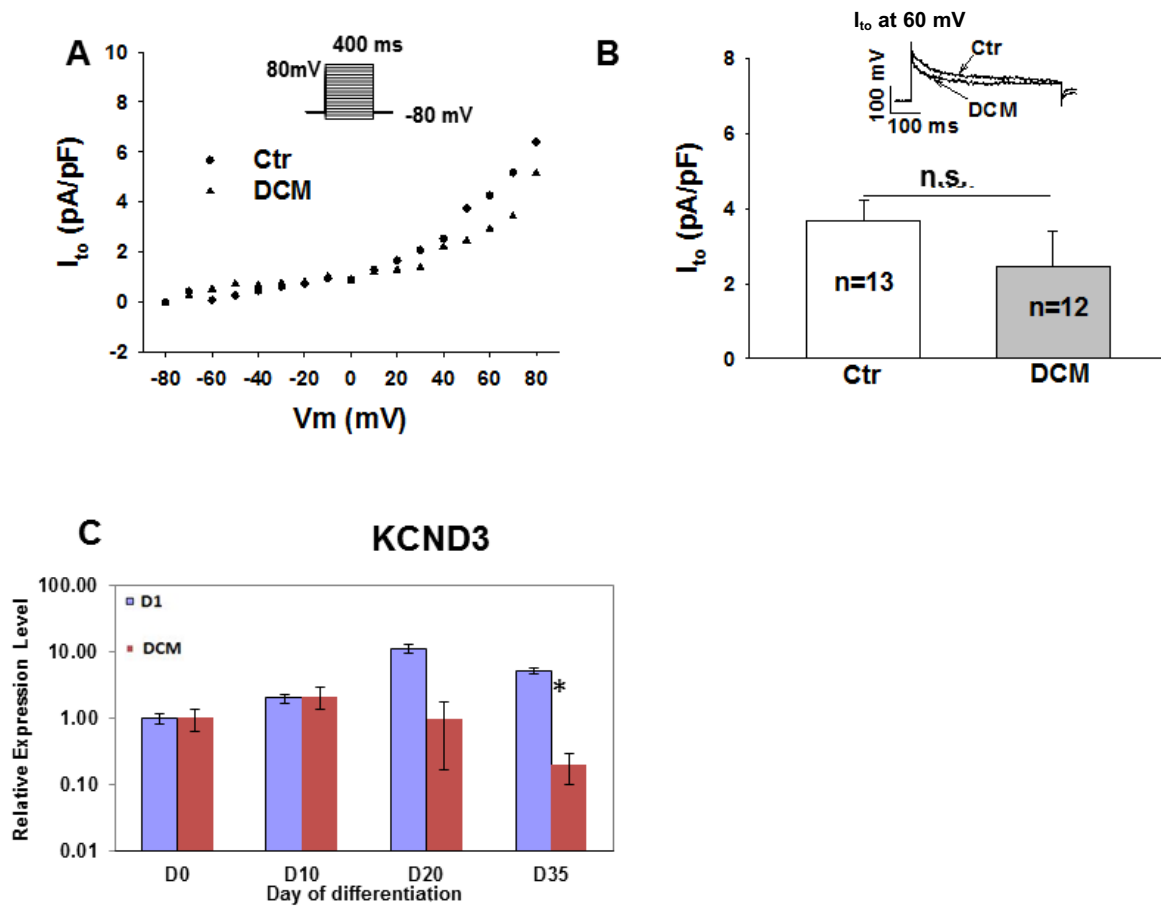
Der  $I_{Kr}$ -Kanal zeigte in der Expressionsanalyse für sein Gen KCNH2 eine signifikante Reduktion von 63 % in DCM-Kardiomyozyten (Abbildung 19 C) und wies im Vergleich zu gesunden Kontrollzellen (D1) eine zunehmende Reduktion der KCNH2-mRNA ab dem 20. Differenzierungstag (D20) auf (KCNH2-mRNA Expressionslevel 31 (DCM) gegenüber 84 (Ctr)). Die Messung erfolgte in Bezug auf das Housekeeping-Gen GAPDH.

Auch der  $I_{Kr}$ -Strom zeigte signifikant reduzierte Amplituden von 83 % in DCM-Zellen im Vergleich zu gesunden Zellen (Abbildung 19 A). Der auf die Membrankapazität normierte  $I_{Kr}$ -Strom wies beim Membranpotential von 20 mV in DCM-Kardiomyozyten (DCM)  $0,1 \pm 0,04$  pA/pF auf gegenüber  $0,6 \pm 0,13$  pA/pF in gesunden Zellen (Ctr) (Abb. 19 B).



**Abbildung 17:  $I_{Ks}$ -Kanalstrom und -Expression in DCM hiPSC-Kardiomyozyten.**

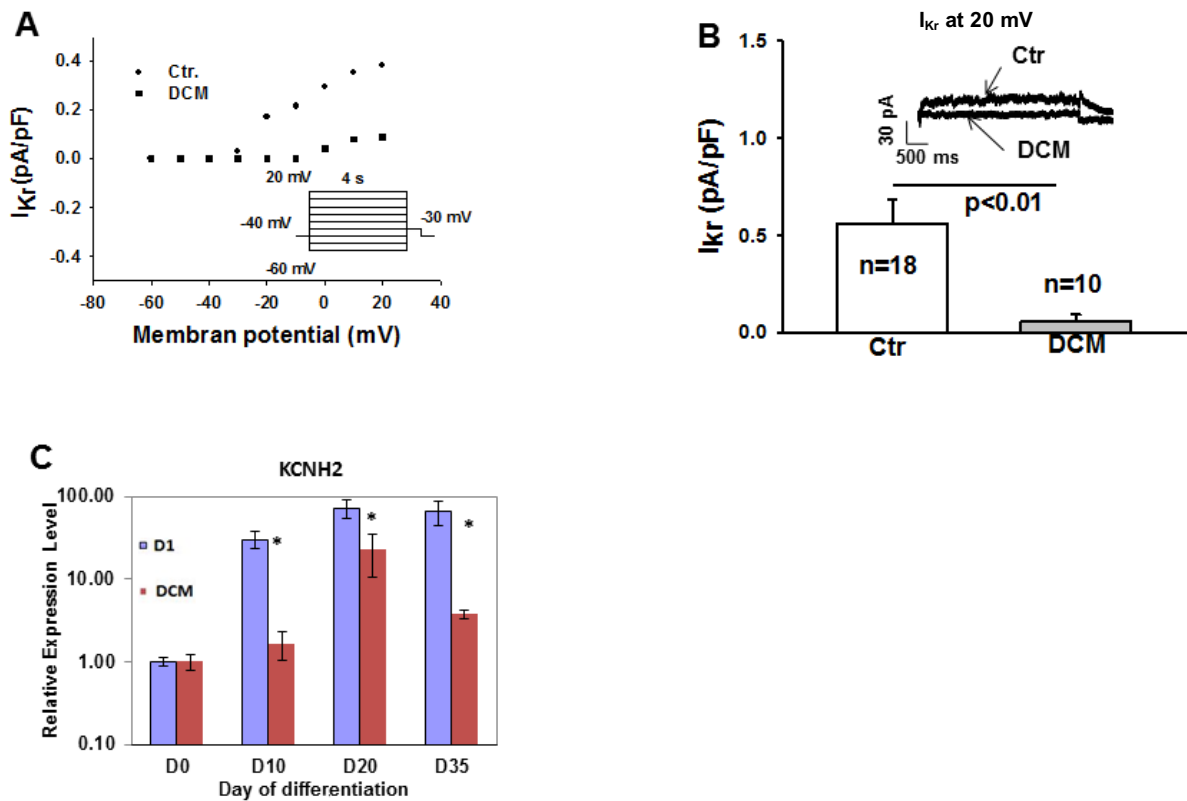
**A)** Charakteristische Strom-Spannungs (IV) -Beziehung des auf die Membrankapazität (pA/pF) normierten  $I_{Ks}$  von gesunden (Ctr) und DCM-Kardiomyozyten (DCM). Alle Ströme wurden unter Verwendung des im rechten Einschub ersichtlichen Protokolls gemessen. **B)** gemittelter  $I_{Ks}$ -Strom und repräsentative Spur beim Membranpotential von 40 mV. Rote Spur = DCM, schwarze Spur = Ctr. **C)** Mittelwerte von KCNQ1-mRNA-Spiegeln zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten (D0=Tag 0, D10= Tag 10, D20=Tag 20 und D35=Tag 35). Werte angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*  $p < 0.05$ . n: Anzahl der untersuchten Zellen.



**Abbildung 18:  $I_{to}$ -Kanalstrom und -Expression in DCM hiPSC-Kardiomyozyten.**

**A)** Charakteristische Strom-Spannungs (IV) -Beziehung des auf die Membrankapazität (pA/pF) normierten  $I_{to}$  von gesunden (Ctr) und DCM-Kardiomyozyten (DCM). Alle Ströme wurden unter Verwendung des im oberen Einschub ersichtlichen Protokolls gemessen. **B)** gemittelter  $I_{to}$ -Strom und repräsentative Spur beim Membranpotential von 60 mV. **C)** Mittelwerte von KCND3-mRNA-Spiegeln zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten (D0=Tag 0, D10= Tag 10, D20=Tag 20 und D35=Tag 35).

Werte angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*  $p < 0.05$ . n: Anzahl der untersuchten Zellen.



**Abbildung 19:  $I_{Kr}$ -Kanalstrom und -Expression in DCM hiPSC-Kardiomyozyten.**

**A)** Charakteristische Strom-Spannungs (IV) -Beziehung des auf die Membrankapazität (pA/pF) normierten  $I_{Kr}$  von gesunden (Ctr) und DCM-Kardiomyozyten (DCM). Alle Ströme wurden unter Verwendung des im rechten Einschub ersichtlichen Protokolls gemessen. **B)** gemittelter  $I_{Kr}$ -Strom und repräsentative Spur beim Membranpotential von 20 mV. **C)** Mittelwerte von KCNH2-mRNA-Spiegeln zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten (D0=Tag 0, D10= Tag 10, D20=Tag 20 und D35=Tag 35).

Werte angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. \*  $p < 0.05$ . n: Anzahl der untersuchten Zellen.

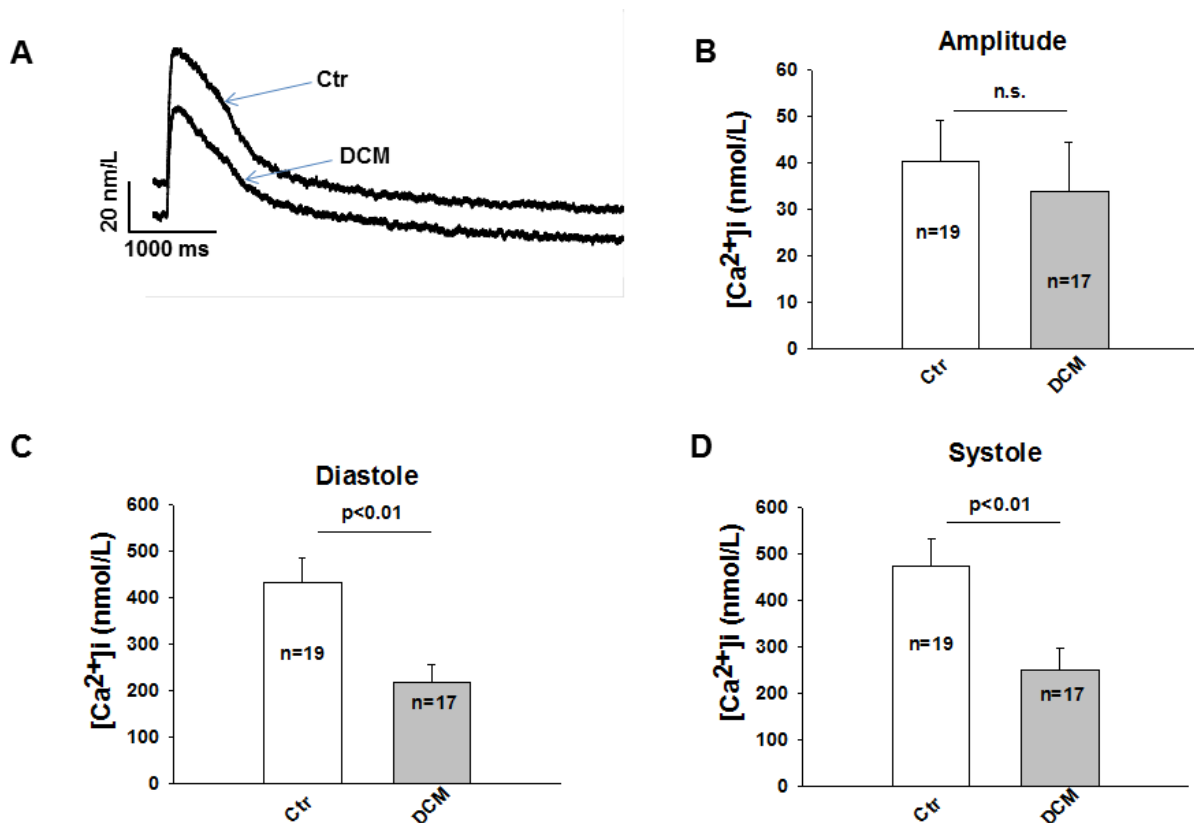
### 3.5 Veränderungen der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration

Zur Beurteilung des Calcium-Verhaltens in DCM hiPSC-Kardiomyozyten wurde die intrazelluläre Calciumkonzentration analysiert.

Dabei fiel auf, dass der Calcium-Transient in DCM-Zellen (DCM) im Vergleich zu gesunden Zellen (Ctr) reduzierte Spiegel aufwies (Abbildung 20 A), jedoch ohne signifikanten Unterschied (Abb. 20 B).

Eine signifikante Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels zeigte sich in der Diastole (Abb. 20 C) und Systole (Abb. 20 D) in DCM-Kardiomyozyten.

Diese Ergebnisse legen eine veränderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in hiPSC-Kardiomyozyten mit FKRP-Mutation nahe.



**Abbildung 20: Veränderungen in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und auf intrazellulärer Ebene in DCM hiPSC-Kardiomyozyten.**

**A)** charakteristischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient (in nmol/L) auf die Zeit (in ms) aufgetragen von gesunden (Ctr) und DCM hiPSC-Kardiomyozyten (DCM). **B)** gemittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient Amplituden (in nmol/L) von gesunden (Ctr) und DCM hiPSC-Kardiomyozyten (DCM). **C)** gemittelte diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel (in nmol/L). **D)** gemittelte systolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel (in nmol/L).

Werte angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. n: Anzahl der untersuchten Zellen.



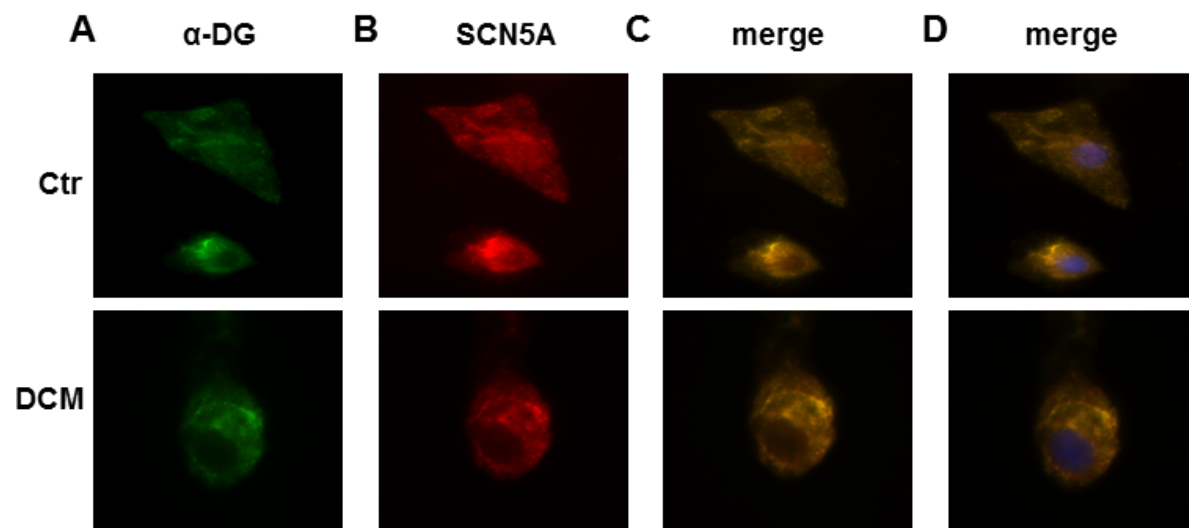
### 3.6 Next-Generation Sequencing (NGS)

Eine Next-Generation Sequencing Untersuchung wurde zur Ergänzung der Ergebnisse durchgeführt, um gesunde Probandenzellen nach FKRP- und DCM-Zellen nach SCN5A-Genmutationen zu überprüfen.

Die Analyse ergab das Fehlen einer Mutation im FKRP-Gen in den gesunden Zelllinien sowie eine fehlende Mutation im SCN5A-Gen bei DCM-Zellen.

Die Ergebnisse von Dysfunktionen sowohl bei Dystroglykanen als auch Ionenkanälen führten zu einer näheren Betrachtung des Expressionsniveaus von  $\alpha$ -Dystroglykanen und SCN5A-Kanälen in den Zellen. Dies wurde mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung von Antikörpern gegen Antigene von  $\alpha$ -Dystroglykan und SCN5A durchgeführt (Abbildung 21).

Es wurden keine Veränderungen in der Expression von glykosyliertem  $\alpha$ -Dystroglykan zwischen gesunden (Ctr) und DCM hiPSC-Kardiomyozyten (DCM) festgestellt (Abb. 21 A). Für den Nachweis wurde ein anti-d-Dystroglycan-Antikörper (IIH6C4) verwendet. Auch im Expressionsniveau von SCN5A-Kanälen wurden keine Veränderungen zwischen gesunden (Ctr) und DCM-Zellen (DCM) diagnostiziert (Abb. 21 B). Eine Mischung (merge) beider Immunfärbungen mit und ohne Kernfärbung durch DAPI spiegelte die Ergebnisse wider und zeigte das gemeinsame Vorkommen beider Antigene (Abb. 21 C-D).



**Abbildung 21: Expression und Lokalisation von  $\alpha$ -Dystroglykanen und SCN5A in hiPSC-Kardiomyozyten.** Immunfluoreszenz von gesunden (Ctr) und DCM-Kardiomyozyten (DCM) unter Verwendung von Antikörpern gegen die Antigene  $\alpha$ -Dystroglykan und SCN5A. **A)** grüne Immunfärbung mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -Dystroglykan. **B)** rote Immunfärbung mit Antikörpern gegen SCN5A. **C)** Mischung (merge) beider Immunfärbungen (gelb) ohne eine Kernfärbung mit DAPI. **D)** Mischung (merge) beider Immunfärbungen (gelb) und Kernfärbung mit DAPI (blau).

### 3.7 Gesunde Zelllinien D2 und D3

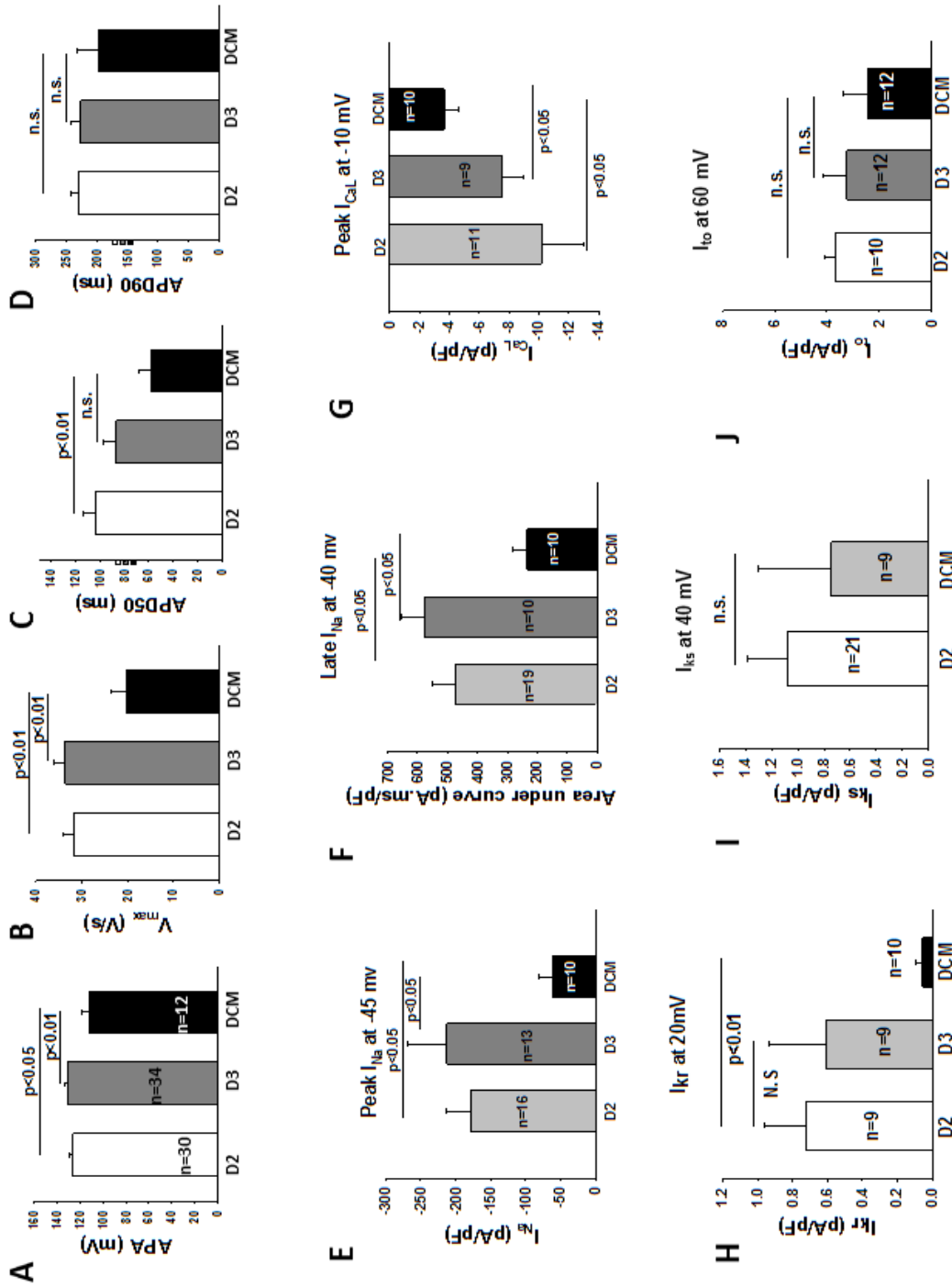
Zur Bestätigung der Korrektheit der Ergebnisse wurden einige Experimente mit weiteren Kontroll-hiPSC-Kardiomyozyten von gesunden Probanden (D2 und D3) wiederholt. Dabei wurden Aktionspotentialparameter und Ionenkanalströme von D2- und D3-Zelllinien mit DCM-Zellen verglichen (Abbildung 22).

DCM hiPSC-Kardiomyozyten wiesen im Vergleich zu D2- und D3-Zellen bei den Aktionspotentialparametern eine signifikant kleinere Aktionspotentialamplitude (APA) und geringere max. Depolarisationsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) auf (Abb. 22 A-B). Die Aktionspotentialdauer bei 50% und 90% Repolarisation (APD50/90) war kürzer, aber erreichte dabei keine statistische Signifikanz (Abb. 22 C-D). Eine Ausnahme bildeten DCM-Zellen bei APD50 gegenüber der D2-Zelllinie. Die Ergebnisse deckten sich mit denen von D1-Zellen gegenüber DCM-Zellen.

Die Ionenkanalströme wiesen in DCM-Zellen im Vergleich zu den Zelllinien D2 und D3 signifikant reduzierte Peak  $I_{Na}$ , late- $I_{Na}$ , Peak  $I_{Ca-L}$  und  $I_{Kr}$ -Ströme auf (Abb. 22 E-H). Die Kaliumkanalströme  $I_{Ks}$  und  $I_{to}$  zeigten keine signifikanten Änderungen (Abb. 22 I-J). Auch diese Ergebnisse bestätigten die vorherigen von D1-Zellen gegenüber DCM-Zellen.

Ebenfalls wurden Genexpressionsanalysen an den gesunden Zelllinien D2 und D3 wiederholt (Abbildung 23). Dabei wurden mRNA-Spiegel der Ionenkanäle SCN5A, CACNA1C, KCNQ1, KCNH2 und KCND3 sowie des Fukutin-related Proteins (FKRP) untersucht. Die quantitative PCR wurde am Differenzierungstag 40 in Bezug auf das Housekeeping-Gen GAPDH durchgeführt.

Es zeigte sich eine signifikante Reduzierung der mRNA-Expression von SCN5A, CACNA1C, KCNH2, KCND3 und FKRP in den DCM-Kardiomyozyten im Vergleich zu den D2- und D3-Zellen. Die Genexpression in DCM-Zellen von KCNQ1 zeigte eine signifikante Änderung gegenüber D2-Zellen, aber keine zu D3-Zellen. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse waren ähnlich zu denen der D1-Kontrollzellen gegenüber DCM-Zellen. Unterschiedlich waren voneinander abweichende KCNQ1 mRNA-Spiegel und eine neu aufgetretene signifikante Reduktion des CACNA1C mRNA-Spiegels.

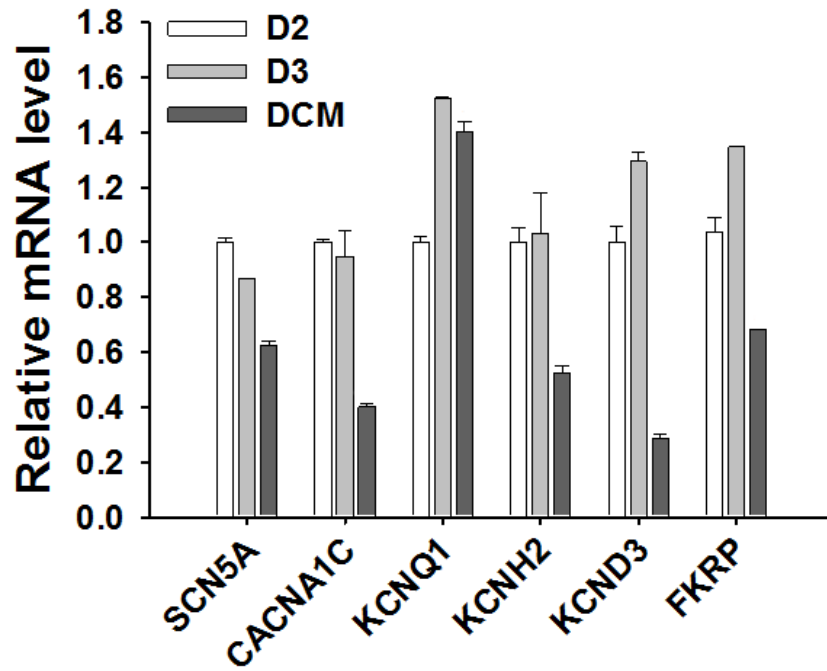


**Abbildung 22: Vergleich von Aktionspotentialparametern und Ionenkanalströmen in gesunden (D2, D3) mit DCM-Kardiomyozyten.**

Aktionspotentiale und die Ionenkanalströme  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca-L}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$  sowie  $I_{to}$  wurden in den gesunden Zelllinien D2 und D3 unter den gleichen Bedingungen wie D1-Zellen analysiert. Verglichen wurden sie mit DCM-Zellen (DCM).

**A)** Mittelwert der Aktionspotentialamplitude (APA) in mV. **B)** Mittelwert der max. Depolarisationsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) in Volt pro sek. (V/s). **C)** Mittelwert der Aktionspotentialdauer bei 50% Repolarisation (APD50) in ms. **D)** Mittelwert der Aktionspotentialdauer bei 90% Repolarisation (APD90) in ms. **E)** gemittelter Peak- $I_{Na}$  beim Membranpotential von -45 mV. **F)** gemittelter late- $I_{Na}$  Strom beim Membranpotential von -40 mV, gemessen wurde die Fläche unter der Kurve zwischen 50 und 350 ms nach dem Beginn des Impulses. **G)** gemittelter Peak  $I_{Ca-L}$  beim Membranpotential von -10 mV. **H)** gemittelter  $I_{Kr}$  Strom beim Membranpotential von 20 mV. **I)** gemittelter  $I_{Ks}$ -Strom beim Membranpotential von 40 mV. **J)** gemittelter  $I_{to}$ -Strom beim Membranpotential von 60 mV.

Werte angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. n: Anzahl der untersuchten Zellen. n.s.: nicht signifikant.



**Abbildung 23: Vergleich von Genexpressionen (Ionenkanäle und FKRP) in gesunden (D2, D3) mit DCM-Kardiomyozyten (DCM).**

Mittelwerte von mRNA-Spiegeln der Ionenkanäle **SCN5A**, **CACNA1C**, **KCNQ1**, **KCNH2** und **KCND3** sowie des Fukutin-related Proteins (**FKRP**) in gesunden Herzzellen D2 und D3 im Vergleich zu DCM-Zellen. Quantitative PCR-Analysen wurden am Tag 40 nach Beginn der Differenzierung durchgeführt.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Zusammenfassung

Einem Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 2l erkrankten Patienten mit einer DCM und wiederkehrenden ventrikulären Tachykardien wurden durch eine Hautbiopsie Zellen entnommen, erfolgreich zu induzierten pluripotenten Stammzellen generiert und in Kardiomyozyten differenziert. Sie zeigten phänotypische Eigenschaften von DCM-Kardiomyozyten und ermöglichten elektrophysiologische sowie morphologische Untersuchungen.

Die erkrankten DCM-Herzzellen wiesen hierbei im Vergleich zu gesunden Kontrollzellen eine größere Zelllänge und geringere Zellbewegung auf. Auch in der elektrophysiologischen Betrachtung waren atypische Aktionspotentiale durch signifikant reduzierte Amplituden (APA) und Depolarisationsgeschwindigkeiten ( $V_{max}$ ) erkennbar. Dies war mit Dysfunktionen des Natrium-, Calcium- und schnell verzögernden gleichrichtenden Kaliumkanals ( $I_{Kr}$ ) in Form von reduzierten Strömen übereinstimmend. Auch die Calciumkonzentration war durch einen reduzierten  $Ca^{2+}$ -Transienten und reduzierte Spiegel in der Diastole und Systole gekennzeichnet. Eine anschließende Sequenzierung mit Bezug auf die reduzierten Natriumströme konnte aber keine Mutation im SCN5A-Gen feststellen, obwohl die mRNA-Expression signifikant reduzierte Spiegel aufwies. Auch in der Immunfluoreszenz konnte keine veränderte Kanalexpression von SCN5A gefunden werden.

### 4.2 Diskussion der Methoden

#### 4.2.1 Humane induzierte pluripotente Stammzellen

Um eine elektrophysiologische und morphologische Charakterisierung von Kardiomyozyten zu ermöglichen, wurden hiPSCs von drei gesunden Probanden und einem DCM-Patienten verwendet.

HiPSCs besitzen viele Vorteile bei der Verwendung zur Modellierung von Krankheiten und deren Prozessen. Grundlegend besitzen sie die Möglichkeit, sich in alle vorkommenden Zelltypen des menschlichen Körpers ausdifferenzieren zu können, wodurch eine weitreichende Verwendung ermöglicht wird. Zudem stellen sie durch eine fortwährende Teilung eine unbegrenzte Quelle dar. Im Vergleich zu Tiermodellen besitzen sie den Vorteil, eine genetische Erkrankung spezifisch abbilden zu kön-

nen, durch den Umstand, dass sie genetisch auf den Patienten abgestimmt sind, von welchem sie abstammen (Musunuru et al., 2018). Tiermodelle weisen hingegen unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften auf und zeigen oftmals unterschiedliche Reaktionen auf Medikamente im Vergleich zu humanen Zellen (Liang et al., 2013). Auch die Verwendung von Ovarzellen des chinesischen Hamsters oder humanen embryonalen Nierenzellen zeigt Beeinträchtigungen durch genetische Aberrationen und ektopisch exprimierte Kanäle (Lu et al., 2008; McNeish, 2004). Humane induzierte pluripotente Stammzellen können somit nützlich sein in der Grundlagenforschung und einer personalisierten Therapie durch differenzierte Betrachtung von Krankheitsprozessen (Musunuru et al., 2018).

Dennoch weisen hiPSCs auch deutliche Unterschiede gegenüber adulten humanen Kardiomyozyten auf, weshalb eine umsichtige Interpretation der Ergebnisse erfolgen sollte. In der Generierung zeigten eine abnehmende mRNA-Expression von Pluripotenzgenen und eine Zunahme von Herzgenen sowie das spontane Schlagen von Zellen eine erfolgreiche Differenzierung von iPS-Zellen in Kardiomyozyten an. Doch ähneln laut Burridge et al. die Genexpressionsprofile von differenzierten hiPSC-Kardiomyozyten denen von fetalen Kardiomyozyten, deren Entwicklung im Vergleich zu adulten noch unreif erscheint. Unterschiede ergeben sich dabei wohl u.a. in der Morphologie, Elektrophysiologie, dem Calcium-Verhalten, der mitochondrialen Energiegewinnung als auch in der adrenergen Signalübertragung (Musunuru et al., 2018). Außerdem ist es hiPSCs nicht möglich, pathologische Veränderungen auf der Gewebe- und systemischen Ebene widerzuspiegeln, z.B. interstitielle Fibrose, Narbenbildung oder auch Myozyten-Desorganisation (Lan et al., 2013). Im Rahmen einer dilativen Kardiomyopathie kann dies eine Kammerdilatation oder Störung der systolischen Funktion mit beeinflussen (Brauch et al., 2009). Zu bedenken sind auch Störfaktoren, die durch verschiedene Gen-Reprogrammierungs-, Zellkultur- als auch Differenzierungsverfahren entstehen und so zur Verzerrung von experimentell erworbenen Daten beitragen können (Musunuru et al., 2018). Ebenfalls können sie durch Unterschiede im Alter (während der Differenzierung und Kulturzeit) von Kardiomyozyten variieren.

Um deutliche Unterschiede zu adulten humanen Kardiomyozyten ausschließen zu können, wären morphologische und elektrophysiologische Vergleiche benötigt

worden. Allerdings war dies nicht durchführbar aufgrund von Schwierigkeiten beim Erhalten von Herzgewebe des Patienten.

### **4.3 Diskussion der Ergebnisse**

#### **4.3.1 Zusammenhang einer FKRP-Mutation mit SCN5A-Dysfunktionen**

Die Analyse der Ionenkanäle in DCM hiPSC-Kardiomyozyten ergab einen reduzierten Peak- und late- $I_{Na}$  Strom. Die Reduktion der  $I_{Na}$ -Ströme kann durch eine veränderte Kinetik und reduzierte mRNA-Spiegel von Natriumkanälen begründet werden. Korrespondierend dazu waren in den Messungen auch eine leichte Verschiebung der Aktivierungskurve zu positiveren Potentialen, eine signifikante Verschiebung der Inaktivierungskurve zu negativeren Potentialen und eine signifikante Verlangsamung der Recovery-Kurve registriert worden. Daraufhin folgte eine Genexpressionsanalyse vom SCN5A-Gen, welche einen reduzierten mRNA-Spiegel aufwies und mit der  $I_{Na}$ -Dysfunktion übereinstimmte.

Die Ursache für eine veränderte Kanalkinetik und Genexpression kann verschiedene Faktoren beinhalten wie z.B. durch Kanalmutationen. Die Betrachtung des SCN5A-Gens erfolgte, da es mit anderen Herzerkrankungen wie z.B. dem Long-QT-Syndrom Typ 3, Sick-Sinus-Syndrom, Brugada Syndrom und Vorhofflimmern in Verbindung gebracht wird (Wilde and Bezzina, 2005). Auch ein funktioneller Zusammenhang zwischen einem Verlust von Natriumkanälen durch Mutationen in SCN5A und der Entwicklung einer DCM wurde in Studien diskutiert (Hesse et al., 2007). Sie sind sich allerdings uneinig darüber, ob eine DCM eine direkte Folge von SCN5A-Mutationen ist oder ein sekundärer Effekt durch chronische Arrhythmien (Bezzina and Remme, 2008; Hesse et al., 2007). Doch zeigte sich in der NGS-Untersuchung keine Mutation im SCN5A-Kanal in den DCM hiPSC-Kardiomyozyten vom Patienten. In der Studie von Meadows und Isom über „Natriumkanäle als Makromolekulare Komplexe“ konnte gezeigt werden, dass Natriumkanäle ein Teil von großen Multi-Protein-Komplexen sind, welche u.a. auch Teile des Zytoskeletts, Transportproteine und extrazelluläre Matrixproteine beinhalten können. Eine Störung von einem Mitglied des Komplexes kann die Funktion des assoziierten Kanals beeinflussen. Welche Komponente genau durch eine FKRP-Mutation bei LGMD2I Patienten zu einer SCN5A-Kanaldysfunktion führt, ist bisher noch nicht analysiert worden. Bekannt ist allerdings, dass Natriumkanäle mit Zytoskelettkomponenten wie dem Dystrophin-assoziierten Glykoprotein-Komplex interagieren (Bezzina and Remme, 2008; Koenig et al., 2011).

Koenig et al. zeigten dies in einem Mausmodell der Duchenne-Muskeldystrophie.

Eine mögliche Folge bei FKRP-Mutationen könnte hingegen eine gestörte Interaktion von FKRP mit Dystroglykan (DG) sein, einem integralen Membrankomplex. Das FKRP-Gen ist an der Phosphorylierung von O-verknüpfter Mannose in der  $\alpha$ -Untereinheit ( $\alpha$ -DG) beteiligt, was für eine Bindung an Laminin (in der extrazellulären Matrix) notwendig ist. Somit fungiert DG als ein molekularer Anker, der die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett unter der Plasmamembran verbindet (Kuga et al., 2012). Durch eine Mutation im FKRP-Gen könnte diese Verbindung gestört sein. Diese Vermutung konnte für die Natriumkanalfunktion in Neuronen bereits bestätigt werden (Occhi et al., 2005), wodurch es zu einer langsameren Nervenleitung und reduzierten Natriumkanaldichte kommt (Saito et al., 2003). Einen ähnlichen Effekt könnte DG daher auch auf anderes Gewebe wie das Herz besitzen. Eine positive Immunfärbung zeigte in den Ergebnissen das gemeinsame Vorkommen von  $\alpha$ -Dystroglykan und SCN5A bei DCM hiPSC-Kardiomyozyten. Dies unterstützt die Annahme, dass Dystroglykan für eine normale SCN5A-Kanalfunktion in Herzzellen von Bedeutung ist.

#### 4.3.2 Calciumhomöostase in DCM-Kardiomyozyten

Weiterhin fiel in den Ergebnissen auf, dass eine gestörte Calciumhomöostase in DCM-Kardiomyozyten existierte. Es waren signifikant reduzierte Calcium-Transient Amplituden und reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel in der Diastole und Systole beobachtet worden. Verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen sind klinisch mit einer reduzierten Kontraktionskraft (die Ejektionsfraktion lag bei dem Patienten unter 30%) und Herzversagen assoziiert. Frühere Studien hatten ein gestörtes  $\text{Ca}^{2+}$ -Verhalten in Mauszellen bereits beobachtet (Williams and Allen, 2007) und als ein Kernproblem bei Kardiomyopathien berichtet (Occhi et al., 2005). Doch auch hier ist nicht bekannt, ob dies einen kausalen Faktor darstellt oder sekundär aus einer DCM folgt (Sun et al., 2012). Es sollten auch Umweltfaktoren (u.a. Diäten, Lebensstil oder pharmakologische Mittel) bedacht werden, welche die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase beeinflussen können (Fatkin et al., 2000). Differenzierte hiPSC-Kardiomyozyten ähneln laut Musunuru et al. von der Calcium-Homöostase fetalen Kardiomyozyten und sind daher nur bedingt vergleichbar mit adulten Kardiomyozyten. Aus diesem Grund werden veränderte Calcium-Transient Amplituden in den Messungen kontrovers diskutiert (Wyles et al., 2016). Dennoch ist der reduzierte Calcium-Transient stimmig mit den gemessenen reduzier-



ten L-Typ Calciumkanalströmen und einer verminderten Kontraktionskraft des Patienten. Auch konnte in einer Wirkstoffstudie von Sun et al. mit Metoprolol (Betablocker) ein verbessertes globales  $\text{Ca}^{2+}$ -Verhalten in DCM iPSC-Kardiomyozyten erreicht werden, was eine vermutete Störung in der Calcium-Homöostase bestärkt.

#### 4.3.3 Veränderungen der Kaliumkanäle

Aufgrund von ventrikulären Tachykardien bei dem Patienten erfolgte eine Analyse der Kaliumkanäle. In früheren Studien war gezeigt worden, dass ventrikuläre Tachykardien bei DCM-Patienten mit einer Mutation im KCNQ1-Gen für  $I_{Ks}$ -Kanäle korrelieren, was zu einem Funktionsverlust mit reduzierten Strömen führte (Xiong et al., 2015). Die Mutation hatte dabei die Membranlokalisation des Proteins beeinflusst.

Die quantitative PCR-Analyse zeigte, dass am Tag 35 der Differenzierung DCM hiPSC-Kardiomyozyten reduzierte mRNA-Spiegel der Gene KCNQ1 ( $I_{Ks}$ ), KCNH2 ( $I_{Kr}$ ) und KCND3 ( $I_{to}$ ) aufwiesen. Die ebenfalls erfolgte Patch-Clamp-Messung der Kanalströme wies hingegen nur einen signifikant reduzierten  $I_{Kr}$ -Strom nach. Diese Feststellung legt nahe, dass die  $I_{Ks}$ - und  $I_{to}$ -Kanäle über einen weiteren Mechanismus verfügen müssen, wodurch sie aktiviert werden und die reduzierte Kanalexpression kompensieren. Allerdings konnte dieser Mechanismus nicht aufgedeckt werden. Es stellte sich auch hier weiterhin die Frage, ob die Entwicklung einer Kanalopathie eine primäre Folge der FKRP-Mutation darstellt oder sekundär aus der kardialen Pathologie resultiert.

#### 4.3.4 Atypische Aktionspotentiale

Analysen der Kaliumkanäle zeigten auch, dass Ionenkanaldysfunktionen relevante Teilhabe am Aktionspotential haben, wobei neben  $I_{Kr}$ -Kanälen auch  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca-L}$ -Kanäle dieses beeinflussen können. Gemessen wurden atypische Aktionspotentiale, die signifikant reduzierte Amplituden (APA) und Depolarisationsgeschwindigkeiten ( $V_{max}$ ) sowie eine geringfügige Verkürzung der Aktionspotentialdauer (APD) aufwiesen. Reduktionen der APA und  $V_{max}$  konnten durch einen reduzierten  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca-L}$ -Strom erklärt werden, wohingegen die APD auf einen Gesamteffekt der reduzierten Ströme  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca-L}$  und  $I_{Kr}$  zurückzuführen war. Betrachtet man die Flussrichtung der Ionenströme während eines Aktionspotentials (s. Abb. 7), wird sichtbar, dass der Fluss vom  $I_{Na}$ - und  $I_{Ca-L}$ -Kanal nach innen gerichtet ist und somit bei einer Reduktion die APD verkürzt. Demgegenüber besitzt der  $I_{Kr}$ -Kanal einen nach außen gerichteten Fluss und verlängert die APD bei einer Reduktion des Ionenstroms. Somit wird über

den Nettoeffekt der ein- und ausströmenden Ionen bestimmt, wie lange ein Aktionspotential dauert. Da in den Ergebnissen die APD geringfügig verkürzt war, muss die Reduktion des Einwärtsstroms ( $I_{Na}$  und  $I_{Ca-L}$ ) größer sein, als die des Auswärtsstroms ( $I_{Kr}$ ). Da alle Ströme allerdings eine Reduktion in der Patch-Clamp-Untersuchung aufwiesen, könnte dies ein Grund sein, weshalb die APD keine statistische Signifikanz aufwies.

Im Vergleich zu anderen Studien entsprachen die Aktionspotentialveränderungen unserer Kardiomyozyten denen früherer publizierter Daten, welche allerdings bei DCM-Zellen mit Titin- oder Troponin-Mutation aufgezeichnet worden waren (Brockington et al., 2001a; Meadows and Isom, 2005; Mestroni et al., 1999b).

#### 4.3.5 Herzinsuffizienz – elektrisches Remodelling

Dysfunktionen der Ionenkanalexpression und -funktion können auch durch elektrisches Remodelling bei einer Herzinsuffizienz entstehen (Koenig et al., 2011). Dabei wird die Zell- und Gewebsphysiologie beeinflusst und die normale Heterogenität der elektrophysiologischen Eigenschaften des Herzens verändert (Aiba and Tomaselli, 2010). Resultat des Umbaus können dabei Herzrhythmusstörungen sein. Im Vergleich dazu wurde aber auch belegt, dass reduzierte Expressionen von Ionenkanalgenen im Herzen zu Kardiomyopathien führen können. Dies wurde bei transgenen Mäusen, welche eine reduzierte SCN5A-Expression aufwiesen und daraufhin eine dilatative Kardiomyopathie entwickelten, nachgewiesen (Hesse et al., 2007). Somit stellen Ionenkanaldysfunktionen eine potentielle Ursache aber auch Folge bei der Entwicklung einer Kardiomyopathie dar.

Die bei dem LGMD2I-Patienten vorherrschende DCM zeigte Veränderungen in mehreren Ionenkanälen, weshalb wahrscheinlicher ist, dass die Dysfunktionen aus strukturellen oder funktionellen Veränderungen resultieren. Die FKRP-Mutation scheint dabei das Muster der elektrischen und kontraktile Dysfunktionen des Remodellings zu beeinflussen. Da die Ursache und Folge allerdings nicht strikt voneinander getrennt werden kann und es sich um einen fortwährenden Prozess handelt, kann nur eine Tendenz angenommen werden. Dies wurde auch in der Studie von Koenig et al. sichtbar, wo es durch eine Dystrophien-Mutation zum Verlust des  $I_{Na}$ -Stroms kam, welcher allerdings auch durch eine sich entwickelnde Myokardfibrose weiter beeinflusst wurde und abfiel. Auch Studien bzgl. der Behandlung von resultierenden Herzrhythmusstörungen haben überwiegend zum Ziel, Ionenkanäle und kardiale Aktions-

potentiale zu beeinflussen, wobei kein Unterschied zwischen Ursache und Folge festgelegt wird, da beide die elektrophysiologischen Eigenschaften des Herzens verändern (Aiba and Tomaselli, 2010).

#### 4.4 Ausblick

Es wurden erfolgreich hiPSC-Kardiomyozyten eines Patienten mit einer LGMD2I und DCM erzeugt, um den Mechanismus aufzudecken, welcher für wiederkehrende ventrikuläre Tachyarrhythmien verantwortlich ist.

Bei der elektrophysiologischen sowie morphologischen Analyse konnten u.a. Dysfunktionen mehrerer Ionenkanäle, eine gestörte Calciumhomöostase als auch atypische Aktionspotentiale festgestellt werden. Diese Dysfunktionen können die Anfälligkeiten des Patienten für die Entwicklung von ventrikulären Arrhythmien erklären.

Die Folge einer FKRP-Mutation im Rahmen einer LGMD2I für die morphologische und elektrophysiologische Funktion von Kardiomyozyten war bisher nicht untersucht worden, und konnte im Rahmen dieser Dissertation besser verstanden werden. Eine FKRP-Mutation führte zu einer SCN5A-Dysfunktion, ohne eine Mutation an dessen Gen nachweisen zu können. Vielmehr zeigte sich, dass Ionenkanäle ein Teil großer Multi-Protein-Komplexe sein müssen und eine Störung eines Mitglieds die Funktion des assoziierten Kanals beeinflusst. Nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob die Entstehung von Ionenkanaldysfunktionen eher eine Konsequenz oder Ursache für eine dilatative Kardiomyopathie darstellt.

Die Verwendung von hiPSCs für die Analyse von Mechanismen kardialer elektrischer Dysfunktionen konnte phänotypische Veränderungen widerspiegeln und kann somit nützlich sein für die Grundlagenforschung von seltenen Erkrankungen. Die Ergebnisse müssen zwar in einen kritischen Zusammenhang zu adultem Herzgewebe und elektrischen Remodelling bei oftmals begleitender Herzinsuffizienz gesetzt werden, dennoch bieten sie einen grundlegenden Erkenntnisgewinn und könnten pharmakologische Studien zur Therapie ermöglichen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Gliedergürtelmuskeldystrophien (Limb Girdle Muscular Dystrophie, LGMD) sind durch eine Schwäche und Degeneration der Skelettmuskulatur gekennzeichnet und betreffen dabei vor allem die Schulter- und Beckengürtelmuskulatur. Patienten mit dem Subtyp LGMD2I weisen eine Mutation im FKRP-Protein auf, deren Erbgang autosomal-rezessiv ist. Die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) und dadurch bedingte ventrikuläre Tachyarrhythmien stellt bei diesem Subtyp eine wichtige Komplikation dar und beeinflusst das Überleben und die Lebensqualität. Dennoch ist bisher wenig über die Mechanismen der zugrundeliegenden Pathologie durch die Mutation bekannt.

Aus einer Hautbiopsie wurden einem Patienten mit LGMD2I, DCM sowie rezidivierenden ventrikulären Tachyarrhythmien Zellen entnommen und zu Fibroblasten differenziert, welche eine homozygote Punktmutation im FKRP-Gen aufwiesen (826C>A; Leu276Ile). Diese wurden zusammen mit Zellen von drei gesunden Probanden zu humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) generiert und in Kardiomyozyten differenziert. Die Ionenkanalströme wurden per whole-cell Patch-Clamp-Verfahren aufgezeichnet und anschließend ausgewertet. Ebenfalls erfolgte die Analyse von strukturellen Veränderungen und der Expression verschiedener Gene mittels quantitativer PCR und Immunhistochemie.

Es konnten erfolgreich hiPSC-Kardiomyozyten erzeugt werden, welche phänotypische Eigenschaften von DCM-Kardiomyozyten widerspiegeln. Dabei wiesen hiPSC-Kardiomyozyten des Patienten atypische Aktionspotentiale auf, die durch eine reduzierte Amplitude und Depolarisationsgeschwindigkeit gekennzeichnet waren. Die Peak- und late-Na-Kanal-Ströme ( $I_{Na}$ ) sowie die Peak-L-Typ-Calciumkanal-Ströme ( $I_{Ca-L}$ ) waren signifikant reduziert. Die Expression von SCN5A und CACNA1C war in DCM-Kardiomyozyten reduziert, was mit der Reduktion von  $I_{Na}$  und  $I_{Ca-L}$  übereinstimmte. Die Kaliumkanäle wiesen einen reduzierten schnell verzögerten Gleichrichter-Kaliumstrom ( $I_{Kr}$ ) auf, während der transiente ( $I_{to}$ ) und der langsam verzögerte Gleichrichter-Kaliumstrom ( $I_{Ks}$ ) keinen Unterschied zeigten. Weiterhin war die Calciumkonzentration durch einen reduzierten  $Ca^{2+}$ -Transienten und reduzierte Spiegel in der Diastole und Systole gekennzeichnet.

Die Ergebnisse der DCM hiPSC-Kardiomyozyten wiesen auf Ionenkanaldysfunktionen hin, welche für die wiederkehrenden ventrikulären Tachyarrhythmien verantwort-

lich sind. Die Verwendung von hiPSCs für die Analyse von Mechanismen kardialer elektrischer Dysfunktionen konnte phänotypische Veränderungen widerspiegeln und ermöglichte einen grundlegenden Erkenntnisgewinn von seltenen Erkrankungen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aiba, T., and Tomaselli, G.F.** (2010). Electrical remodeling in the failing heart. *Curr Opin Cardiol* **25**, 29-36.
- Baig, M.K., Goldman, J.H., Caforio, A.L., Coonar, A.S., Keeling, P.J., and McKenna, W.J.** (1998). Familial dilated cardiomyopathy: cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease. *J Am Coll Cardiol* **31**, 195-201.
- Beech, D.J., Bernheim, L., Mathie, A., and Hille, B.** (1991). Intracellular Ca<sup>2+</sup> buffers disrupt muscarinic suppression of Ca<sup>2+</sup> current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 652-656.
- Bezzina, C.R., and Remme, C.A.** (2008). Dilated cardiomyopathy due to sodium channel dysfunction: what is the connection? *Circ Arrhythm Electrophysiol* **1**, 80-82.
- Brauch, K.M., Karst, M.L., Herron, K.J., de Andrade, M., Pellikka, P.A., Rodeheffer, R.J., Michels, V.V., and Olson, T.M.** (2009). Mutations in ribonucleic acid binding protein gene cause familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **54**, 930-941.
- Brockington, M., Blake, D.J., Prandini, P., Brown, S.C., Torelli, S., Benson, M.A., Ponting, C.P., Estournet, B., Romero, N.B., Mercuri, E., *et al.*** (2001a). Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet* **69**, 1198-1209.
- Brockington, M., Yuva, Y., Prandini, P., Brown, S.C., Torelli, S., Benson, M.A., Herrmann, R., Anderson, L.V., Bashir, R., Burgunder, J.M., *et al.*** (2001b). Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet* **10**, 2851-2859.
- Davies, K.E., and Nowak, K.J.** (2006). Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 762-773.
- Diecke, S., Lu, J., Lee, J., Termglinchan, V., Kooreman, N.G., Burrige, P.W., Ebert, A.D., Churko, J.M., Sharma, A., Kay, M.A., *et al.*** (2015). Novel codon-optimized mini-intronic plasmid for efficient, inexpensive, and xeno-free induction of pluripotency. *Sci Rep* **5**, 8081.
- Elliott, P., Andersson, B., Arbustini, E., Bilinska, Z., Cecchi, F., Charron, P., Dubourg, O., Kuhl, U., Maisch, B., McKenna, W.J., *et al.*** (2008). Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* **29**, 270-276.
- Emery, A.E.** (2002). The muscular dystrophies. *Lancet* **359**, 687-695.
- Fatkin, D., McConnell, B.K., Mudd, J.O., Semsarian, C., Moskowitz, I.G., Schoen, F.J., Giewat, M., Seidman, C.E., and Seidman, J.G.** (2000). An abnormal Ca<sup>2+</sup> response in mutant sarcomere protein-mediated familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* **106**, 1351-1359.
- Gaul, C., Deschauer, M., Tempelmann, C., Vielhaber, S., Klein, H.U., Heinze, H.J., Zierz, S., and Grothues, F.** (2006). Cardiac involvement in limb-girdle

muscular dystrophy 2I : conventional cardiac diagnostic and cardiovascular magnetic resonance. *J Neurol* **253**, 1317-1322.

**Grunig, E., Tasman, J.A., Kucherer, H., Franz, W., Kubler, W., and Katus, H.A.** (1998). Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **31**, 186-194.

**Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J.** (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**, 85-100.

**He, J.Q., Ma, Y., Lee, Y., Thomson, J.A., and Kamp, T.J.** (2003). Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* **93**, 32-39.

**Hesse, M., Kondo, C.S., Clark, R.B., Su, L., Allen, F.L., Geary-Joo, C.T., Kunnathu, S., Severson, D.L., Nygren, A., Giles, W.R., et al.** (2007). Dilated cardiomyopathy is associated with reduced expression of the cardiac sodium channel *Scn5a*. *Cardiovasc Res* **75**, 498-509.

**Itzhaki, I., Maizels, L., Huber, I., Zwi-Dantsis, L., Caspi, O., Winterstern, A., Feldman, O., Gepstein, A., Arbel, G., Hammerman, H., et al.** (2011). Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**, 225-229.

**Iwasaki, Y.K., Nishida, K., Kato, T., and Nattel, S.** (2011). Atrial fibrillation pathophysiology: implications for management. *Circulation* **124**, 2264-2274.

**Japp, A.G., Gulati, A., Cook, S.A., Cowie, M.R., and Prasad, S.K.** (2016). The Diagnosis and Evaluation of Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **67**, 2996-3010.

**Jefferies, J.L., Eidem, B.W., Belmont, J.W., Craigen, W.J., Ware, S.M., Fernbach, S.D., Neish, S.R., Smith, E.O., and Towbin, J.A.** (2005). Genetic predictors and remodeling of dilated cardiomyopathy in muscular dystrophy. *Circulation* **112**, 2799-2804.

**Jones, R.C., Francis, G.S., and Lauer, M.S.** (2004). Predictors of mortality in patients with heart failure and preserved systolic function in the Digitalis Investigation Group trial. *J Am Coll Cardiol* **44**, 1025-1029.

**Keeling, P.J., Gang, Y., Smith, G., Seo, H., Bent, S.E., Murday, V., Caforio, A.L., and McKenna, W.J.** (1995). Familial dilated cardiomyopathy in the United Kingdom. *Br Heart J* **73**, 417-421.

**Kehat, I., Gepstein, A., Spira, A., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L.** (2002). High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction. *Circ Res* **91**, 659-661.

**Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L.** (2001). Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* **108**, 407-414.

**Koenig, X., Dysek, S., Kimbacher, S., Mike, A.K., Cervenka, R., Lukacs, P., Nagl, K., Dang, X.B., Todt, H., Bittner, R.E., et al.** (2011). Voltage-gated ion channel dysfunction precedes cardiomyopathy development in the dystrophic heart. *PLoS One* **6**, e20300.



- Komajda, M., Jais, J.P., Reeves, F., Goldfarb, B., Bouhour, J.B., Juillieres, Y., Lanfranchi, J., Peycelon, P., Geslin, P., Carrie, D., et al.** (1990). Factors predicting mortality in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* **11**, 824-831.
- Kuga, A., Kanagawa, M., Sudo, A., Chan, Y.M., Tajiri, M., Manya, H., Kikkawa, Y., Nomizu, M., Kobayashi, K., Endo, T., et al.** (2012). Absence of post-phosphoryl modification in dystroglycanopathy mouse models and wild-type tissues expressing non-laminin binding form of alpha-dystroglycan. *J Biol Chem* **287**, 9560-9567.
- Lan, F., Lee, A.S., Liang, P., Sanchez-Freire, V., Nguyen, P.K., Wang, L., Han, L., Yen, M., Wang, Y., Sun, N., et al.** (2013). Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **12**, 101-113.
- Larribere, L., Wu, H., Novak, D., Galach, M., Bernhardt, M., Orouji, E., Weina, K., Knappe, N., Sachpekidis, C., Umansky, L., et al.** (2015). NF1 loss induces senescence during human melanocyte differentiation in an iPSC-based model. *Pigment Cell Melanoma Res* **28**, 407-416.
- Liang, P., Lan, F., Lee, A.S., Gong, T., Sanchez-Freire, V., Wang, Y., Diecke, S., Sallam, K., Knowles, J.W., Wang, P.J., et al.** (2013). Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity. *Circulation* **127**, 1677-1691.
- Lu, H.R., Vlamincx, E., Hermans, A.N., Rohrbacher, J., Van Ammel, K., Towart, R., Pugsley, M., and Gallacher, D.J.** (2008). Predicting drug-induced changes in QT interval and arrhythmias: QT-shortening drugs point to gaps in the ICHS7B Guidelines. *Br J Pharmacol* **154**, 1427-1438.
- Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., and Hochedlinger, K.** (2008). A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **3**, 340-345.
- Margeta, M., Connolly, A.M., Winder, T.L., Pestronk, A., and Moore, S.A.** (2009). Cardiac pathology exceeds skeletal muscle pathology in two cases of limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Muscle Nerve* **40**, 883-889.
- Maron, B.J., Towbin, J.A., Thiene, G., Antzelevitch, C., Corrado, D., Arnett, D., Moss, A.J., Seidman, C.E., Young, J.B., American Heart, A., et al.** (2006). Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* **113**, 1807-1816.
- McMinn, T.R., Jr., and Ross, J., Jr.** (1995). Hereditary dilated cardiomyopathy. *Clin Cardiol* **18**, 7-15.
- McNeish, J.** (2004). Embryonic stem cells in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 70-80.
- Meadows, L.S., and Isom, L.L.** (2005). Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc Res* **67**, 448-458.
- Mercuri, E., Brockington, M., Straub, V., Quijano-Roy, S., Yuva, Y., Herrmann, R., Brown, S.C., Torelli, S., Dubowitz, V., Blake, D.J., et al.** (2003). Phenotypic

spectrum associated with mutations in the fukutin-related protein gene. *Ann Neurol* **53**, 537-542.

**Mestroni, L., Krajinovic, M., Severini, G.M., Pinamonti, B., Di Lenarda, A., Giacca, M., Falaschi, A., and Camerini, F.** (1994). Familial dilated cardiomyopathy. *Br Heart J* **72**, S35-41.

**Mestroni, L., Maisch, B., McKenna, W.J., Schwartz, K., Charron, P., Rocco, C., Tesson, F., Richter, A., Wilke, A., and Komajda, M.** (1999a). Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy. *Eur Heart J* **20**, 93-102.

**Mestroni, L., Rocco, C., Gregori, D., Sinagra, G., Di Lenarda, A., Miocic, S., Vatta, M., Pinamonti, B., Muntoni, F., Caforio, A.L., et al.** (1999b). Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. Heart Muscle Disease Study Group. *J Am Coll Cardiol* **34**, 181-190.

**Michels, V.V., Moll, P.P., Miller, F.A., Tajik, A.J., Chu, J.S., Driscoll, D.J., Burnett, J.C., Rodeheffer, R.J., Chesebro, J.H., and Tazelaar, H.D.** (1992). The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* **326**, 77-82.

**Millat, G., Bouvagnet, P., Chevalier, P., Sebbag, L., Dulac, A., Dauphin, C., Jouk, P.S., Delrue, M.A., Thambo, J.B., Le Metayer, P., et al.** (2011). Clinical and mutational spectrum in a cohort of 105 unrelated patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Med Genet* **54**, e570-575.

**Moretti, A., Bellin, M., Welling, A., Jung, C.B., Lam, J.T., Bott-Flugel, L., Dorn, T., Goedel, A., Hohnke, C., Hofmann, F., et al.** (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med* **363**, 1397-1409.

**Musunuru, K., Sheikh, F., Gupta, R.M., Houser, S.R., Maher, K.O., Milan, D.J., Terzic, A., and Wu, J.C.** (2018). Induced Pluripotent Stem Cells for Cardiovascular Disease Modeling and Precision Medicine: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation: Genomic and Precision Medicine* **11**.

**Occhi, S., Zambroni, D., Del Carro, U., Amadio, S., Sirkowski, E.E., Scherer, S.S., Campbell, K.P., Moore, S.A., Chen, Z.L., Strickland, S., et al.** (2005). Both laminin and Schwann cell dystroglycan are necessary for proper clustering of sodium channels at nodes of Ranvier. *J Neurosci* **25**, 9418-9427.

**Petri, H., Sveen, M.L., Thune, J.J., Vissing, C., Dahlqvist, J.R., Witting, N., Bundgaard, H., Kober, L., and Vissing, J.** (2015). Progression of cardiac involvement in patients with limb-girdle type 2 and Becker muscular dystrophies: a 9-year follow-up study. *Int J Cardiol* **182**, 403-411.

**Pinto, Y.M., Elliott, P.M., Arbustini, E., Adler, Y., Anastasakis, A., Bohm, M., Duboc, D., Gimeno, J., de Groote, P., Imazio, M., et al.** (2016). Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J* **37**, 1850-1858.

**Poppe, M., Bourke, J., Eagle, M., Frosk, P., Wrogemann, K., Greenberg, C., Muntoni, F., Voit, T., Straub, V., Hilton-Jones, D., et al.** (2004). Cardiac and respiratory failure in limb-girdle muscular dystrophy 2I. *Ann Neurol* **56**, 738-741.

- Roden, D.M., Balsler, J.R., George, A.L., Jr., and Anderson, M.E.** (2002). Cardiac ion channels. *Annu Rev Physiol* **64**, 431-475.
- Saito, F., Moore, S.A., Barresi, R., Henry, M.D., Messing, A., Ross-Barta, S.E., Cohn, R.D., Williamson, R.A., Sluka, K.A., Sherman, D.L., et al.** (2003). Unique role of dystroglycan in peripheral nerve myelination, nodal structure, and sodium channel stabilization. *Neuron* **38**, 747-758.
- Sasaki, K., Sakata, K., Kachi, E., Hirata, S., Ishihara, T., and Ishikawa, K.** (1998). Sequential changes in cardiac structure and function in patients with Duchenne type muscular dystrophy: a two-dimensional echocardiographic study. *Am Heart J* **135**, 937-944.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J.** (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**, 1101-1108.
- Sigworth, F.J., and Neher, E.** (1980). Single Na<sup>+</sup> channel currents observed in cultured rat muscle cells. *Nature* **287**, 447-449.
- Sun, N., Yazawa, M., Liu, J., Han, L., Sanchez-Freire, V., Abilez, O.J., Navarrete, E.G., Hu, S., Wang, L., Lee, A., et al.** (2012). Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med* **4**, 130ra147.
- Sveen, M.L., Thune, J.J., Kober, L., and Vissing, J.** (2008). Cardiac involvement in patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2 and Becker muscular dystrophy. *Arch Neurol* **65**, 1196-1201.
- Tiburcy, M., Hudson, J.E., Balfanz, P., Schlick, S., Meyer, T., Chang Liao, M.L., Levent, E., Raad, F., Zeidler, S., Wingender, E., et al.** (2017). Defined Engineered Human Myocardium With Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modeling and Repair. *Circulation* **135**, 1832-1847.
- Trafford, A.W., Diaz, M.E., and Eisner, D.A.** (1999). A novel, rapid and reversible method to measure Ca buffering and time-course of total sarcoplasmic reticulum Ca content in cardiac ventricular myocytes. *Pflugers Arch* **437**, 501-503.
- van Berlo, J.H., de Voogt, W.G., van der Kooij, A.J., van Tintelen, J.P., Bonne, G., Yaou, R.B., Duboc, D., Rossenbacker, T., Heidbuchel, H., de Visser, M., et al.** (2005). Meta-analysis of clinical characteristics of 299 carriers of LMNA gene mutations: do lamin A/C mutations portend a high risk of sudden death? *J Mol Med (Berl)* **83**, 79-83.
- van Spaendonck-Zwarts, K.Y., van Rijsingen, I.A., van den Berg, M.P., Lekanke Deprez, R.H., Post, J.G., van Mil, A.M., Asselbergs, F.W., Christiaans, I., van Langen, I.M., Wilde, A.A., et al.** (2013). Genetic analysis in 418 index patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: overview of 10 years' experience. *Eur J Heart Fail* **15**, 628-636.
- Wahbi, K., Meune, C., Hamouda el, H., Stojkovic, T., Laforet, P., Becane, H.M., Eymard, B., and Duboc, D.** (2008). Cardiac assessment of limb-girdle muscular dystrophy 2l patients: an echography, Holter ECG and magnetic resonance imaging study. *Neuromuscul Disord* **18**, 650-655.
- Walter, M.C., Petersen, J.A., Stucka, R., Fischer, D., Schroder, R., Vorgerd, M., Schroers, A., Schreiber, H., Hanemann, C.O., Knirsch, U., et al.** (2004). FKRP (826C>A) frequently causes limb-girdle muscular dystrophy in German patients. *J Med Genet* **41**, e50.

- Wilde, A.A., and Bezzina, C.R.** (2005). Genetics of cardiac arrhythmias. *Heart* **91**, 1352-1358.
- Williams, I.A., and Allen, D.G.** (2007). Intracellular calcium handling in ventricular myocytes from mdx mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H846-855.
- Wyles, S.P., Li, X., Hrstka, S.C., Reyes, S., Oommen, S., Beraldi, R., Edwards, J., Terzic, A., Olson, T.M., and Nelson, T.J.** (2016). Modeling structural and functional deficiencies of RBM20 familial dilated cardiomyopathy using human induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* **25**, 254-265.
- Xiong, Q., Cao, Q., Zhou, Q., Xie, J., Shen, Y., Wan, R., Yu, J., Yan, S., Marian, A.J., and Hong, K.** (2015). Arrhythmogenic cardiomyopathy in a patient with a rare loss-of-function KCNQ1 mutation. *J Am Heart Assoc* **4**, e001526.
- Xu, C., Police, S., Rao, N., and Carpenter, M.K.** (2002). Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* **91**, 501-508.
- Zhang, J., Wilson, G.F., Soerens, A.G., Koonce, C.H., Yu, J., Palecek, S.P., Thomson, J.A., and Kamp, T.J.** (2009). Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* **104**, e30-41.
- Zwi, L., Caspi, O., Arbel, G., Huber, I., Gepstein, A., Park, I.H., and Gepstein, L.** (2009). Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Circulation* **120**, 1513-1523.

## 7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

**Abbildung 1:** Mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer: Circulation, Issue 113, Volume 14, Apr 11, 2006, Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies, Barry J. Maron, Jeffrey A. Towbin, Gaetano Thiene, Charles Antzelevitch, Domenico Corrado, Donna Arnett, Arthur J. Moss, Christine E. Seidman, James B. Young.

**Abbildung 2:** Aus der MSD Manual Ausgabe für Patienten (in den USA und Kanada als Merck Manual und in anderen Ländern als MSD Manual bekannt), bearbeitet von Robert Porter. Copyright (2018) von Merck Sharp & Dohme Corp., einer Tochtergesellschaft von Merck & Co, Inc., Kenilworth, NJ, USA. URL: <http://www.msdmanuals.com/de-de/heim> [Stand: 01.01.2018].

**Abbildung 6:** Mit freundlicher Genehmigung von Leica Microsystems CMS GmbH. URL: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique/> [Stand: 24.01.2018].

**Abbildung 7:** Mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer: Circulation, Issue 20, Volume 124, Nov 15, 2011, Atrial fibrillation pathophysiology: Implications for management, Iwasaki, Y.K., Nishida, K., Kato, T., and Nattel, S.

## 8 PUBLIKATIONEN

### 8.1 Originalarbeiten und Poster

El-Battrawy, I., Zhao, Z., Lan, H., Li, X., Yücel, G., Lang, S., Sattler, K., **Schünemann, J.-D.**, Zimmermann, W.-H., Cyganek, L., *et al.* (2018). **Ion Channel Dysfunctions in Dilated Cardiomyopathy in Limb-Girdle Muscular Dystrophy.** *Circulation: Genomic and Precision Medicine* **11**.

El-Battrawy, I., Zhao, Z., Lan, H., **Schünemann, J.D.**, Sattler, K., Buljubasic, F., Patocskai, B., Li, X., Yucel, G., Lang, S., *et al.* (2018). **Estradiol protection against toxic effects of catecholamine on electrical properties in human-induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes.** *Int J Cardiol* **254**, 195-202.

Ibrahim El-Battrawy, Ralf Bauer, Regina Pribe, Kleopatra Rapti, **Jan-Dierk Schünemann**, Zhihan Zhao, Gökhan Yücel, Bence Patocskai, Siegfried Lang, Michael Behnes, Boris Rudic, Erol Tülümen, Malte Tiburcy, Wolfram-Hubertus Zimmermann, Jochen Utikal, Thomas Wieland, Patrick Most, Hugo A. Katus, Martin Borggrefe, Ibrahim Akin, Oliver J. Müller, Xiao-Bo Zhou. (2016). **Sodium and calcium channel dysfunctions in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with limb-girdle muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy.** Poster 82. Jahrestagung der DGK, Mannheim.

## 9 LEBENS LAUF

### PERSONALIEN

Name und Vorname: Schünemann, Jan-Dierk  
Geburtsdatum: 15.06.1990  
Geburtsort: Rotenburg (Wümme)  
Familienstand: ledig  
Vater: Dietrich Schünemann  
Mutter: Ulrike Schünemann geb. Siems

### SCHULISCHER UND BERUFLICHER WERDEGANG

1997 – 2001 Grundschule Barme  
2001 – 2003 Orientierungsstufe Dörverden  
2003 – 2010 Domgymnasium Verden  
15.06.2010 Abitur  
2010 – 2012 Ausbildung zum Rettungsassistenten

### UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2012/13 Beginn des Studiums Humanmedizin  
an der Medizinischen Fakultät Mannheim  
08.09.2014 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)  
2014 – 2017 Hauptstudium  
Seit 08.2015 Doktorand an der I. Medizinischen Klinik der Medizinischen  
Fakultät Mannheim  
12.10.2017 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)  
21.05.2018 Beginn Praktisches Jahr

### BERUFLICHE ZUSATZAUSBILDUNG/ENGAGEMENT

30.06.2012 ACLS Provider  
Seit 2016 Ehrenamtliche Tätigkeit bei der Johanniter-Unfall-Hilfe e.V.

## 10 DANKSAGUNG

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. Ibrahim Akin bedanken, für die Überlassung des hochinteressanten Themas und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es unter seiner Leitung zu bearbeiten.

Herrn Dr. med. Ibrahim El-Battrawy danke ich besonders für die hervorragende Betreuung, wichtige sachliche Hinweise und seine ständige Hilfsbereitschaft. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich bedanken.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors für die tolle Unterstützung, das konstruktive Arbeitsklima und wertvolle Anregungen.

Für die besten Ratschläge und ein immer offenes Ohr für alle Belange möchte ich mich bei Katharina bedanken, ohne dich wäre diese Arbeit nicht so entstanden.

Vielen Dank auch an meine Eltern, welche mich in allen Lebenslagen unterstützt haben und immer an meiner Seite standen. Diese Arbeit soll euch gewidmet sein.

Meiner Schwester Britta sei Dank geschuldet für alle Momente neben dem Studium und der Dissertation, welche für neue Kräfte sorgten.