

Aus der I. Medizinischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Borggrefe)

Ionenkanaldysfunktionen in Arrhythmogener Rechtsventrikulärer Kardiomyopathie mit Desmoglein-2-Mutation

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

vorgelegt von
Christoph Tombers

aus
Trier
2020

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

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Plötzlicher Herztod	3
1.2 Kardiomyopathien.....	3
1.2.1 Dilatative Kardiomyopathie (DCM).....	4
1.2.2 Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM).....	4
1.2.3 Restriktive Kardiomyopathie (RCM).....	5
1.2.4 Non-Compaction-Kardiomyopathie	5
1.2.5 Tako-Tsubo-Kardiomyopathie	6
1.2.6 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC).....	6
1.3 Stand der Forschung	7
1.4 Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC).....	9
1.5 Ziele der Arbeit	11
2 MATERIAL UND METHODEN.....	12
2.1 Patientenvorstellung	12
2.2 Generierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen	13
2.3 Zellkultursystem.....	14
2.4 Polymerase-Kettenreaktion	15
2.5 Immunfluoreszenz	16
2.6 Western-Blot.....	16
2.7 Patch-Clamp.....	17
2.8 Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration	18
2.9 Statistische Auswertung	18

3	ERGEBNISSE	20
3.1	Charakterisierung der patientenspezifischen hiPSC.....	20
3.2	Immunfluoreszenz	22
3.3	Polymerase-Kettenreaktion	24
3.3.1	Relative Genexpressionsraten im zeitlichen Verlauf.....	24
3.3.2	Relative Genexpressionsraten am Ende der Differenzierung (d35)...	26
3.4	Patch-Clamp.....	27
3.4.1	Aktionspotentiale der hiPSC-CMs.....	27
3.4.2	Ionenkanaleigenschaften	29
3.4.3	Sensitivität gegenüber adrenerger Stimulation	33
3.4.4	Arrhythmogene Ereignisse	35
3.5	Western-Blot.....	36
4	DISKUSSION	37
4.1	Abstract	37
4.1	Einordnung der Arbeit in den aktuellen Stand der Forschung	37
4.2	Unveränderte Desmoglein-2-Konzentration	40
4.3	Abnormale Aktionspotentialeigenschaften.....	40
4.4	Unterschiede der Ionenkanalströme	41
4.5	Unterschiede der Genexpressionsraten	42
4.6	Intermolekulare Wechselwirkungen.....	42
4.7	Gesteigerte Sensitivität gegenüber adrenerger Stimulation	43
4.8	„from bench to bedside“ – Konsequenzen für Patienten.....	45
4.9	Limitationen	45
4.9.1	Humane induzierte pluripotente Stammzellen	45
4.9.2	Individuelle Unterschiede.....	47
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	48
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	50

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS DES ANHANGS.....	56
7 ANHANG.....	57
7.1 Generierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen	57
7.2 Versuchsprotokolle – Zellkultur	59
7.3 Versuchsprotokolle – Polymerase-Kettenreaktion	83
7.4 Versuchsprotokoll – Immunfluoreszenz.....	97
7.5 Versuchsprotokolle – Western-Blot	100
7.6 Versuchsprotokolle – Patch-Clamp und Kalzium-Fluoreszenz	110
7.7 Tabellarischer Anhang.....	115
7.7.1 Verwendetes Material: allgemeiner Laborbedarf und Zellkultur	115
7.7.2 Verwendetes Material: spezielle Anwendungsbereiche.....	117
7.7.3 Verwendetes Material: Software und Hardware	120
7.7.4 Übersicht der Hersteller und Lieferanten	122
7.8 Votum der Ethikkommission	123
7.9 Ergänzende Ergebnisse der Polymerase Kettenreaktion	124
7.9.1 Untereinheit kardialer Kalziumkanäle	124
7.9.2 Untereinheiten kardialer Natriumkanäle.....	125
7.9.3 Untereinheiten kardialer Kaliumkanäle	126
7.9.4 Datentabelle der relativen Genexpressionsrate an d35	128
7.10 Limitationen und Interpretierbarkeit der PCR-Daten	128
8 LITERATURVERZEICHNIS DES ANHANGS.....	131
9 LEBENS LAUF	133
10 VERÖFFENTLICHUNG.....	134
11 DANKSAGUNG	135

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aktionspotentialeigenschaften

APA	Amplitude des Aktionspotentials
APD	Dauer des Aktionspotentials
APD50	APD bei 50% der Repolarisation
APD90	APD bei 90% der Repolarisation
RP	Ruhemembranpotential (eng. Resting Potential)
V_{max}	maximale Aufstrom-Geschwindigkeit des Aktionspotentials

Ionenkanäle

I_{Ca-L}	Long-Lasting einwärtsgerichteter Kalziumkanal
I_{KATP}	ATP-abhängiger Kaliumkanal
I_{Kr}	gering verzögerter gleichrichtender Kaliumkanal
I_{KS}	stark verzögerter gleichrichtender Kaliumkanal
I_{Na}	spannungsabhängiger Natriumkanal
I_{NCX}	Natrium-Kalzium-Austauscher
I_{SK}	kalziumaktivierter Kaliumkanal
I_{to}	transienter Kaliumausstrom

Genabschnitte / Primer

CACNA1C	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C
DSG2	Desmoglein-2
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GJA1	Gap-Junction Alpha-1 Protein (Connexin-43)
KCND3	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member 3
KCNH2	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 2
KCNIP2	Potassium Voltage-Gated Channel Interacting Protein 2
KCNJ2	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 2
KCNK3	Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 3
KCNQ1	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1
POU5F1	POU Class 5 Homeobox 1
SCN10A	Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit X
SCN1B	Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit I
SCN3B	Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit III
SCN5A	Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit V
TNNI3	Cardiac Muscle Troponin I
TNNT2	Cardiac Muscle Troponin T

weitere Abkürzungen

AP	Aktionspotential
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
ATP	Adenosintriphosphat
BMP-4	Bone Morphogenetic Protein 4
c	Faktor Zellreihe
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CM	Kardiomyozyten
cTnT	kardiales Troponin T (Protein)
d0 / ... / d35	Tag 0 / ... / Tag 35 nach Beginn des Differenzierungsprotokolls
D1	Spender eins
D2	Spender zwei
DAD-like	Delayed After Depolarisation-like
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSG2	Desmoglein-2
EAD-like	Early After Depolarisation-like
hiPSC	humane induzierte pluripotente Stammzellen
hiPSC-CMs	hiPSC-derived Cardiomyocytes
iPSC	induzierte pluripotente Stammzellen
Iso	Isoprenalin
IV-Kurven	Strom-Spannungs-Kurven
KLF4	Kruppel-like Factor 4
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
n	Stichprobengröße / Anzahl der Proben
ns	nicht signifikant
OCT4	Octamer-binding Transcription Factor 4
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHT	Plötzlicher Herztod
PKP2	Plakophilin-2
p-Wert	Signifikanzwert / Irrtumswahrscheinlichkeit
SEM	Standard Error of the Mean
SOX2	Sex Determining Region Y Box 2
SSEA4	Stage-specific Embryonic Antigen 4
t	Faktor Zeit

1 EINLEITUNG

1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Plötzlicher Herztod

Im Jahr 2016 sind in Deutschland 338.687 Menschen an Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems gestorben. Damit bilden die Krankheiten dieser Gruppe in der Liste des Statistischen Bundesamtes die häufigste Todesursache in Deutschland ¹.

Bei ca. 20 % aller durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachten Todesfälle tritt das Ableben dabei schnell und meist völlig unverhofft ein – man spricht von einem plötzlichen Herztod (PHT). Per Definition handelt es sich um ein unerwartetes Herz-Kreislauf-Versagen mit daraus resultierendem natürlichen Tod infolge einer kardialen Ursache ². Auf diese Weise sterben in Deutschland pro Jahr ca. 65.000 Menschen ³. In ca. 80% der Fälle wird der PHT durch eine koronare Herzkrankheit verursacht ¹. Seit Jahren ist zwar bekannt, dass es eine Reihe von Lebensstilfaktoren gibt, mit denen Patienten ihr eigenes kardiovaskuläres Risikoprofil selbst beeinflussen können, bei einigen Entitäten aus der Gruppe der Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist letztlich jedoch die genetische Prädisposition entscheidend ^{2, 3}. In schätzungsweise fünf bis zehn Prozent der Fälle lässt sich ein PHT auf eine Kardiomyopathie zurückführen, welche den Patienten und deren Angehörigen im Vorhinein häufig völlig unbekannt war oder nur sehr wenige Symptome zeigte ^{3, 4}.

1.2 Kardiomyopathien

Erkrankungen, die durch eine strukturelle Veränderung des Herzens charakterisiert sind, werden Kardiomyopathien genannt. Die Einteilung erfolgt zunächst dahingehend, ob es sich um eine primäre (meist genetisch bedingte) Kardiomyopathie oder um eine sekundäre Kardiomyopathie, welche als Folge einer anderen Krankheit oder äußerer Einflüsse auftritt, handelt ⁴. Darüber hinaus haben die World Health Organization (WHO) und die International Society and Federation of Cardiology (ISFC) im Jahr 1995 eine Einteilung anhand von häufigen morphologischen Erscheinungsformen getroffen.

Man unterscheidet die dilatative Kardiomyopathie (DCM), die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), die restriktive Kardiomyopathie (RCM) und die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ⁵. Je nach Ursache,

Morphologie und Klinik des Patienten ergeben sich die verschiedensten therapeutischen Procedere.

1.2.1 Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist die häufigste Form der Kardiomyopathien und zeichnet sich durch eine enddiastolische Volumen- und Druckbelastung im linken Ventrikel und linken Vorhof aus. Daraus resultiert ein Kontraktionsverlust des Arbeitsmyokards, was wiederum eine verminderte Ejektionsfraktion bedingt und zu Rückwärts- und Vorwärtsversagen der linken und/oder der rechten Herzhälfte führt. Dieser systolische Pumpfehler manifestiert sich klinisch oft mit dem Bild einer Herzinsuffizienz ⁶.

Die DCM entsteht meist idiopathisch oder sekundär durch ischämische oder valvuläre Schäden ⁷. Neben der Behandlung der ursächlichen Erkrankung bei sekundärer Genese, steht therapeutisch vor allem die medikamentöse Behandlung der Herzinsuffizienz im Vordergrund. Ein implantierbarer Kardioverter/Defibrillator (ICD) kann gemäß der aktuellen Leitlinie der European Society of Cardiology (ESC) ab einer linksventrikulären Ejektionsfraktion von weniger als 35% zur Prävention des plötzlichen Herztodes durch ventrikuläre Tachyarrhythmien indiziert sein ². Darüber hinaus ist die DCM weltweit die führende Indikation für eine Herztransplantation ⁸.

1.2.2 Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)

Bei der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) steht eine Verdickung des linken Ventrikels im Vordergrund, was zu einem diastolischen Compliance-Fehler führt. Der „Nachweis einer diastolischen Wanddicke > 15 mm in einem oder mehreren Myokardsegmenten des linken Ventrikels durch ein bildgebendes Verfahren, die nicht durch erhöhte Füllungsdrücke erklärt ist“, ist gemäß der aktuellen HCM-Leitlinie das diagnostische Kriterium für Erwachsene ⁹. Kommt es dadurch zu einer Verengung des linksventrikulären Ausflusstraktes, bezeichnet man diese Form der HCM als hypertrophe obstruktive Kardiomyopathie (HOCM) ⁹.

Gemeinsam mit der Myokarditis stellen HCM und HOCM eine der häufigsten kardialen Todesursachen bei jungen Menschen, vor allem bei jungen Athleten, dar. In den meisten Fällen handelt es sich um eine primäre Genese – die HCM ist eine der

häufigsten hereditären Herzerkrankungen. Dabei liegt meist ein Gendefekt in Abschnitten vor, die für Proteine des Sarkomers kodieren (am häufigsten: Myosin heavy-chain 7 oder Myosin-Binding-Protein C3) und mit unterschiedlicher Penetranz autosomal-dominant vererbt werden ¹⁰.

HCM-Patienten bleiben in der Regel über lange Zeit hin asymptomatisch bis sich die Krankheit im fortgeschrittenen Stadium durch eine Herzinsuffizienz oder durch einen plötzlichen Herztod manifestiert. Die Therapie besteht aus Betablockern oder Kalziumkanalblockern. Bei fortgeschrittenen Befunden gilt es, die hypertrophen Areale mittels Katheter-Ablation oder operativ zu verkleinern ^{2,9}.

1.2.3 Restriktive Kardiomyopathie (RCM)

Die restriktive Kardiomyopathie (RCM) ist eine sehr seltene Erkrankung, bei der es durch eine Vermehrung von Bindegewebe zu einer Minderung der ventrikulären Elastizität während der Diastole kommt. In der Folge nimmt die Füllung der Ventrikel ab und es kommt zu einem Rückstau des Blutvolumens in die Vorhöfe, was langfristig zu einer Vergrößerung dieser führt. Ätiologisch unterscheidet man eine myokardiale von einer endokardialen Form. Symptomatisch wird die restriktive Kardiomyopathie meist in Form einer Herzinsuffizienz oder einer ventrikulären Tachyarrhythmie ¹¹. Wie bei der dilatativen Kardiomyopathie steht therapeutisch die Behandlung der ursächlichen Erkrankung an erster Stelle, wobei gleichzeitig eine symptomatische Therapie der Herzinsuffizienz erfolgen sollte ². Als Ultima Ratio kann eine Herztransplantation erfolgen ⁸.

1.2.4 Non-Compaction-Kardiomyopathie

Die Non-Compaction-Kardiomyopathie ist eine seltene und angeborene Krankheit, die anatomisch charakterisiert ist durch das Vorhandensein einer prominenten Trabekularisierung mit tiefen intertrabekulären Recessus, welche mit dem linken Ventrikel, nicht aber mit den Koronararterien, verbunden sind ¹².

Es besteht aktuell kein Konsens in der Fachwelt was die Diagnosekriterien dieser Krankheit betrifft, und aufgrund dieser fehlenden Standardisierung ist die Prävalenz der Non-Compaction-Kardiomyopathie unbekannt. Eine spezifische Therapie besteht

gegenwärtig nicht. Je nach Risikoprofil wird eine therapeutische Antikoagulation zur Vermeidung von thromboembolischen Ereignissen empfohlen ¹³.

1.2.5 Tako-Tsubo-Kardiomyopathie

Die Tako-Tsubo-Kardiomyopathie beschreibt eine akute, stressinduzierte Störung des linken Ventrikels, welche mit verschiedenen Wandbewegungsstörungen einhergeht. Typischerweise kommt es zu einer apikalen Akinesie mit resultierender Ballonierung der Herzspitzenregion. Das echokardiographische Bild ähnelt dabei einem in Japan gebräuchlichen Krug namens „Tako-Tsubo“, der zum Fangen von Tintenfischen verwendet wird ¹⁴.

Betroffen sind überwiegend postmenopausale Frauen, und als Auslöser dient häufig emotionaler (und/oder physischer) Stress, weshalb die Tako-Tsubo-Kardiomyopathie auch als „broken-heart-syndrome“ bezeichnet wird. Klinisch präsentiert sie sich mit den Symptomen eines akuten Koronarsyndroms (ACS) und kann mit ähnlich schweren Komplikationen, wie z.B. akuter Herzinsuffizienz oder malignen Arrhythmien einhergehen ¹⁵.

1.2.6 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) wird auch arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie (ARVD) genannt. Als synonyme Abkürzung findet sich in der wissenschaftlichen Fachliteratur auch die Kombination beider Bezeichnungen (ARVD/C). Im Rahmen dieser Arbeit wird zur besseren Übersichtlichkeit ausschließlich die Abkürzung ARVC verwendet.

Bei der ARVC handelt es sich um eine seltene Erkrankung des Herzens, welche durch ventrikuläre Tachyarrhythmien, einen voranschreitenden Verlust von Kardiomyozyten und der Einlagerung von Binde- und Fettgewebe in das Herzmuskelgewebe charakterisiert ist ¹⁶. Die ARVC ist eine der führenden Ursachen für den plötzlichen Herztod bei jungen Athleten bis zum Alter von 35 Jahren ¹⁷, nicht zuletzt, weil die Arrhythmien häufig während körperlicher Belastung auftreten ¹⁸. Es existieren verschiedene Formen der ARVC, deren Klassifikation sich auf die primär betroffene

Herzregion bezieht. In der mit Abstand am häufigsten auftretenden und damit namensbestimmenden Form der ARVC ist zunächst nur der rechte Ventrikel betroffen. In progredienten Stadien der Krankheit kann der linke Ventrikel ebenfalls betroffen sein ¹⁹. Es werden insgesamt drei Subtypen unterschieden, nämlich (i) der klassische rechts-dominante Subtyp; (ii) der biventrikuläre Subtyp mit früher biventrikulärer Beteiligung; (iii) der links-dominante Subtyp mit vorherrschender linksventrikulärer Beteiligung ²⁰.

Das typische Manifestationsalter liegt im Kindes- und jungen Erwachsenenalter, aber auch bei älteren Menschen können Erstmanifestationen auftreten ²¹. Männer erkranken dabei etwa zwei- bis dreimal häufiger als Frauen ²². Die Prävalenz der ARVC beträgt global betrachtet 1:2000 bis 1:5000, wobei starke regionale Schwankungen auftreten ²⁰. Eine familiäre Häufung kann in etwa der Hälfte aller Fälle beobachtet werden. Hierbei findet sich in der Regel ein autosomal-dominanter Erbgang mit unterschiedlicher Penetranz ²³. Die meisten der bekannten Mutationen betreffen Genabschnitte (z.B. Plakophilin-2, Desmoglein-2 oder Desmoplakin), die für Desmosomen, also jene Adhäsionsbereiche, die für die Zell-Zell-Kontakte der Kardiomyozyten verantwortlich sind, kodieren ²⁴.

Der genaue pathophysiologische Mechanismus wie diese Mutationen zu dem beschriebenen Verlust von Kardiomyozyten, der damit einhergehenden Einlagerung von Binde- und Fettgewebe in das Herzmuskelgewebe und schließlich zu ventrikulären Tachykardien führen, ist noch nicht hinreichend geklärt ²⁵.

1.3 Stand der Forschung

Um zu verstehen wie die typischen Mutationen der Desmosomen beim Menschen zu den klinischen Symptomen führen, unter denen ARVC-Patienten leiden, müsste man ihnen in verschiedenen Phasen der Erkrankung endomyokardiale Biopsien entnehmen und diese im Labor untersuchen.

Da eine solche Probenentnahme jedoch mit gefährlichen Komplikationen wie z.B. der Perforation des Herzens einhergehen kann, ist dies für Forschungszwecke ethisch nicht vertretbar ²⁶. Darüber hinaus wird die ARVC oft erst im fortgeschrittenen Stadium

oder sogar erst post mortem diagnostiziert ²⁷. Besonders die für das Verständnis der Pathogenese wichtige Anfangsphase der Krankheit lässt sich daher kaum in vivo untersuchen.

In einem transgenen Mausmodell mit Überexpression eines mutierten Desmoglein-2 Gens (DSG2) wurden bereits erste Hinweise für die Pathogenese der ARVC mit DSG2-Mutation entdeckt. So konnte bewiesen werden, dass die Mutation des Strukturelements DSG2 der kardialen Desmosomen schon vor Beginn von Nekrose und fibröser Umbauten einen Einfluss auf die ventrikuläre Reizweiterleitung und die arrhythmogene Anfälligkeit hat ²⁸. Es wurde weiterhin eine verminderte Dichte von spannungsabhängigen Natriumkanälen (I_{Na} -Strom) und einer damit einhergehenden verminderten Aufstrom-Geschwindigkeit der Aktionspotentiale beobachtet. Außerdem wurde gezeigt, dass der Kanal gemeinsam mit DSG2 und anderen Proteinen einen makromolekularen Komplex bildet ²⁸. Den Autoren nach unterstützt dies die Hypothese, dass in den interkalierenden Disks (ID) eine Verknüpfung zwischen Strukturen bestehe, die zuvor als unabhängig galten ²⁹. Andere Arbeitsgruppen wiesen in einer Reihe weiterer Studien eine Interaktion zwischen Plakophilin-2 (PKP2), Connexin-43 (Cx43), Ankyrin-G (AnkG) und Nav1.5 (SCN5A) nach, wodurch heute eine Assoziation zwischen Desmosomen, Gap-Junctions und dem Na^+ -Ionenkanalkomplex vermutet wird ^{30, 31}.

Die Unterschiede zwischen dem menschlichen Herz und dem Herz einer Maus limitieren jedoch die Interpretation und die Anwendbarkeit der Daten auf die Pathogenese beim Menschen. Gemeinsam mit den oben beschriebenen limitierenden Faktoren einer in vivo Untersuchung hinderte dies die Erforschung der Krankheit ARVC maßgeblich. Die Möglichkeit der Verwendung von humanen Kardiomyozyten, welche aus induzierten pluripotenten Stammzellen eines Patienten differenziert wurden (patientenspezifische hiPSC-CMs), bietet eine Alternative, die pathophysiologischen Mechanismen der Kardiomyopathien (u.a. der ARVC) auf Zellebene zu untersuchen, ohne dabei endomyokardiale Biopsien nehmen zu müssen.

In den vergangenen Jahren ist es bereits einigen Arbeitsgruppen gelungen ein in vitro Zellkulturmodell der ARVC mithilfe von patientenspezifischen hiPSC-CMs zu generieren ^{26, 32, 33}. Es konnten nun direkt an menschlichen Kardiomyozyten, die in der

Petrischale gewachsen sind, zahlreiche Schlüsselfaktoren der ARVC nachgewiesen und analysiert werden³³⁻³⁵. So wurde beispielsweise gezeigt, dass hiPSC-CMs eines ARVC-Patienten mit PKP2-Mutation eine reduzierte Dichte des assoziierten desmosomalen Proteins Plakoglobin, sowie des Gap-Junction-Proteins Connexin-43 hatten. Des Weiteren stellten sich die Desmosomen geweitet, verzerrt und mit gesteigerter Lipid-Ansammlung dar^{32,33}. Darüber hinaus konnte in einem hiPSC-CMs-Zellkulturmodell nachgewiesen werden, dass eine Koaktivierung von PPAR α /PPAR γ (Peroxisomen-Proliferator aktivierter Rezeptor Alpha/Gamma), die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die Fettsäureoxidation wichtig in der Pathogenese der ARVC sind²⁶.

Welche funktionellen Einflüsse die Mutationen der für desmosomale Proteine kodierenden Genabschnitte auf die Expression und Funktion der kardialen Ionenkanäle haben, wurde bisher noch nicht detailliert in humanen Kardiomyozyten auf der Ebene der zellulären Elektrophysiologie untersucht.

1.4 Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC)

Für viele Jahrzehnte, nämlich seit der Entdeckung von Stammzellen und deren Differenzierung zu verschiedenen Gewebetypen, galt in der Medizin das Dogma, es handele sich bei der Zellentwicklung um eine Einbahnstraße. Diese Annahme geriet erst nach der Jahrtausendwende ins Wanken, als es dem Team um Shin'ya Yamanaka von der Universität Kyoto in Japan gelang, durch verschiedene Experimente die Differenzierungspotenz von somatischen Zellen zu beeinflussen.

Zum einen konnte gezeigt werden, dass embryonale Stammzellen in der Lage sind, mit ihnen fusionierte Körperzellen zu einem pluripotenten Zustand umzuprogrammieren, zum anderen gelang es mithilfe von Über- bzw. Unterexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren, eine Transdifferenzierung von somatischen Zelltypen zu erreichen³⁶. Auf diese Erkenntnisse aufbauend postulierte Yamanaka die Hypothese, es müsse möglich sein, eine bereits differenzierte somatische Zelle durch Gene von embryonalen Stammzellen in einen pluripotenten Zustand zurückzusetzen. Er bediente sich des Prinzips der Transduktion und brachte mithilfe von Retroviren die DNA der infrage kommenden Gene in das Genom von Maus-Fibroblasten ein. Im Jahr 2006 führte die Kombination der vier Gene c-Myc,

KLF4 (Krüppel-like Factor 4), OCT4 (Octamer-binding Transcription Factor 4) und SOX2 (Sex Determining Region Y Box 2) schließlich zu der erhofften Reprogrammierung von Fibroblasten in einen pluripotenten Zustand ³⁷ – die erste Generation von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) war entstanden!

Durch die Zugabe des Homöoboxproteins NANOG als Transkriptionsfaktor zum Erhalt der iPSC konnte schon im darauffolgenden Jahr (zeitgleich mit zwei anderen Laboren) erfolgreich eine lebende Chimäre durch die Injektion von iPSC in eine Blastozyste von Mausembryos erzeugt werden ^{38, 39}. Zeitgleich arbeiteten mehrere Teams daran, auch aus menschlichen Körperzellen iPSC zu erzeugen. Dies gelang erstmals Ende 2007 und lieferte darüber hinaus gleich den Beweis, dass es möglich ist, aus humanen iPSC die Differenzierung in somatische Zellen aller drei Keimblätter durchzuführen ^{34, 40, 41}.

Die Möglichkeiten, die sich nun schlagartig ergaben, eröffneten völlig neue Forschungsgebiete: die Stammzellforschung war nun nicht mehr auf Zellmaterial von menschlichen Embryonen angewiesen. Dies könnte die Antwort auf ein ethisches Dilemma sein, das nicht nur die Fachwelt beschäftigt. Außerdem wurde der Traum von patientenspezifischem Gewebe aus dem medizinischen Labor, welches eigens für die Implantation gezüchtet wurde, etwas realistischer. Aufgrund der Tragweite seiner Arbeit wurde Yamanaka im Jahr 2012 vom Karolinska-Institut in Stockholm mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

Erste Experimente zur therapeutischen Implantation von Gewebekomponenten, welche aus einer hiPSC-Zellkultur hervorgegangen sind, lieferten bereits erfolgversprechende Ergebnisse ^{35, 42, 43}. Bis zur Implantation von funktionsfähigen Organen aus dem Labor wird es jedoch noch einige Jahre dauern. Die Tissue-Engineering-Arbeitsgruppen sehen sich noch mit diversen Hürden konfrontiert, und die Protokolle der hiPSC-Generierung durchlaufen eine ständige Optimierung ⁴⁴.

Anstelle von Biopsien des Zielgewebes kann einem Patienten nun einmalig eine Hautprobe entnommen werden, um daraus patientenspezifische hiPSC zu generieren. Diese können nun unter standardisierten Bedingungen zu somatischen Zellen, zum Beispiel Kardiomyozyten, differenziert und mit Zellen eines gesunden Spenders verglichen werden („Disease in a Dish“) ^{32, 33, 35}. Neben der Grundlagenforschung der Pathomechanismen können die Zellkulturmodelle auch genutzt werden, um den Effekt von Pharmaka oder physischen Reizen auf verschiedene Gewebetypen zu untersuchen ⁴⁵⁻⁴⁷.

1.5 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll erstmals in einem hiPSC-Zellkulturmodell der ARVC die Hypothese geprüft werden, ob die strukturellen und metabolischen Veränderungen aufgrund einer Desmoglein-2-Mutation Einflüsse auf die Ionenkanal- und Aktionspotentialeigenschaften der Kardiomyozyten haben.

Dafür wird einem ARVC-Patienten mit bekannter Mutation im Desmoglein-2 Gen eine Hautprobe entnommen, um aus den darin enthaltenen Fibroblasten humane induzierte pluripotente Stammzellen zu generieren, welche dann wiederum als Ausgangsmaterial für die Differenzierung von Kardiomyozyten dienen werden. Mit diesen sogenannten hiPSC-CMs soll ein Modell entstehen, das die phänotypischen Eigenschaften der ARVC abbildet und zum grundlegenden Verständnis des Pathomechanismus beiträgt. Als Kontrollgruppe dienen dabei zwei verschiedene und unabhängige hiPSC-Zelllinien von gesunden Spendern (fortan D1 und D2 genannt).

Mittels Patch-Clamp-Technik und Kalzium-Imaging-Technik soll auf der Ebene der zellulären Elektrophysiologie die Funktion verschiedener kardialer Ionenkanäle untersucht werden. Neben diesen funktionellen Untersuchungen sollen anhand von quantitativer Echtzeit-PCR Rückschlüsse auf die mRNA-Expression der zugehörigen Untereinheiten der kardialen Ionenkanäle gezogen werden. Anhand von Western-Blot und Immunfluoreszenz sollen sowohl quantitative als auch histomorphologische Aspekte der zellulären Proteine analysiert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientenvorstellung

Ein 13-jähriges Mädchen wurde wegen häufiger ventrikulärer Extrasystolen und Bewusstlosigkeit während des Sports kardiologisch vorgestellt. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten vermehrte Arrhythmien und vermehrte ventrikuläre Extrasystolen nach der Gabe von Epinephrin und dem Einsatz von ventrikulärer Stimulation. Endomyokardiale Biopsien zeigten für ARVC typische Einlagerungen von Binde- und Fettgewebe in das Herzmuskelgewebe. Anhand von Next-Generation-Sequencing (NGS) konnte eine Missense-Mutation im DSG2-Gen (G-zu-A-Substitution des Nukleotids p.Gly6389Arg) nachgewiesen werden. Im Familienscreening zeigte ihr Vater, eine Tante väterlicherseits sowie deren Tochter die gleiche Mutation (vgl. Abbildung 1).

Der Vater des Mädchens, ein 50-jähriger Mann, konnte für die Studie als Spender einer Hautbiopsie rekrutiert werden. Abbildung 2 zeigt das Elektrokardiogramm des Spenders mit den ARVC-typischen T-Negativierungen in den präkordialen Ableitungen V1-V3. Echokardiographisch, sowie im kardialen MRT, stellte sich das Herz des Vaters mit einer normalen biventrikulären Funktion dar.

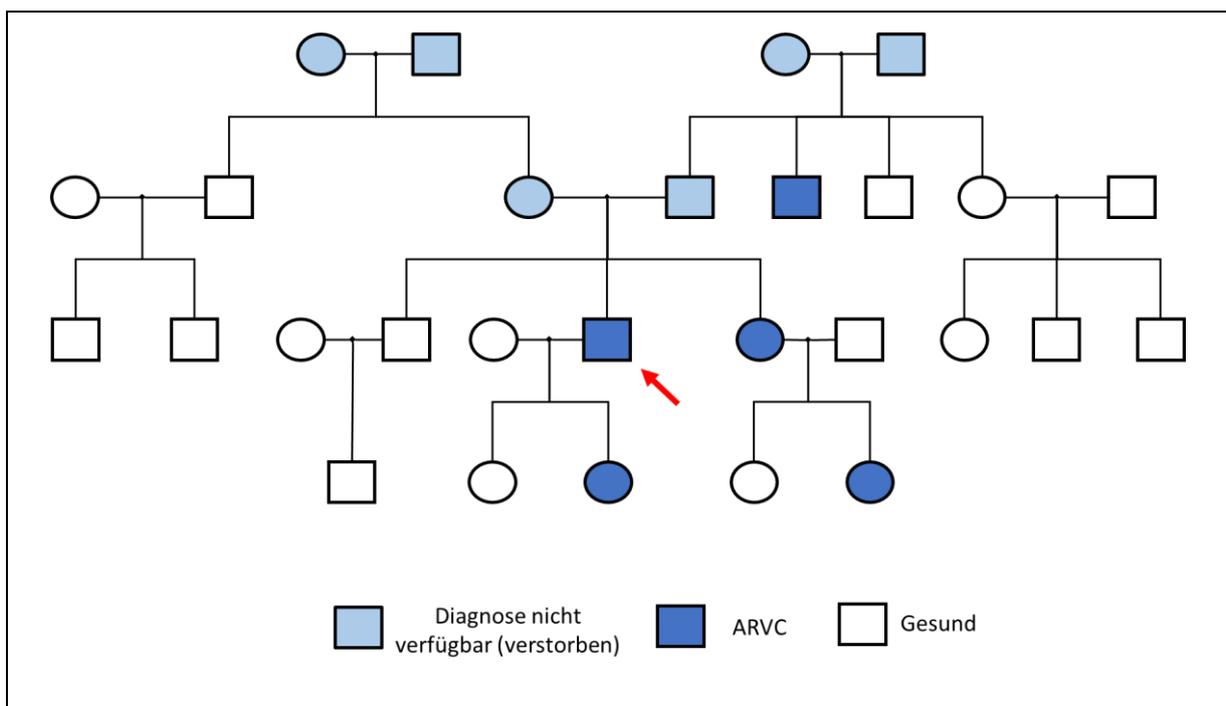


Abbildung 1 – Familienstammbaum der Patientin; der Pfeil markiert den Vater, welcher als Spender einer Hautbiopsie für die Studie rekrutiert wurde.



Abbildung 2 – Elektrokardiogramm des Spenders mit invertierten T-Wellen in den präkordialen Ableitungen V1-V3 (rote Pfeile als Markierung); Schreibgeschwindigkeit 50 mm/s, 10 mm/mV.

2.2 Generierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen

Die Generierung der in dieser Studie verwendeten hiPSC erfolgte in externen spezialisierten Laboren (Kollaboration mit der Universitätsmedizin Göttingen). Zunächst wurde eine Primärkultur von Fibroblasten aus sterilen Hautbiopsien der Spender angelegt, anschließend wurde die Umprogrammierung dieser Fibroblasten zu hiPSC, sowie eine Erfolgskontrolle durchgeführt. Erst wenn die Pluripotenz nachgewiesen wurde (vgl. Kapitel 3.1), wurden die hiPSC-Reihen an unser Labor versandt.

Die hiPSC-Zellreihe „D1“ wurde durch eine Kooperation der Skin-Cancer-Unit des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg und der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsmedizin Mannheim generiert. Zum Einsatz kamen dafür Lentivirus-Partikel, die den rtTA-Transaktivator (reverse

tetracycline-controlled Transactivator) trugen und eine Inducible-Polycistronic-Cassette mit den Faktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC^{48, 49}. Die Zellreihe „D1“ wurde in unserem Labor bereits für verschiedene Projekte verwendet, weshalb im Rahmen dieser Studie auf eine ausführlichere Charakterisierung verzichtet werden kann und die Eignung als gesunde Kontrollprobe vorausgesetzt wird^{45, 46}. Die Generierung der hiPSC-Reihe „D2“, welche von einem gesunden unabhängigen Donor stammt, erfolgte in der Stem-Cell-Unit des Herzforschungszentrums Göttingen. Dafür wurde das „MIP 247 CoMiP 4in1 with shRNA p53“-Mini-Intronic-Plasmid-Intron der Firma Addgene verwendet (vgl.⁵⁰).

Die im Mittelpunkt dieser Studie stehende ARVC-hiPSC-Reihe wurde ebenfalls in der Stem-Cell-Unit des Herzforschungszentrums Göttingen generiert. Es wurde das „CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit“ verwendet, wobei das Protokoll des Herstellers modifiziert wurde.

Eine detailliertere Beschreibung findet sich im Anhang dieser Arbeit (siehe Kapitel 7.1, Seite 57).

2.3 Zellkultursystem

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kardiomyozyten verwendet, welche aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen differenziert wurden (hiPSC-CMs). Dieser Prozess ist sehr zeitaufwändig, kosten- und arbeitsintensiv und besteht aus vielen einzelnen Schritten. Die detaillierten Versuchsprotokolle befinden sich im Anhang dieser Arbeit (Kapitel 7.2, Seite 59ff). Das verwendete Differenzierungsprotokoll entstammt der Arbeitsgruppe Tiburcy/Zimmermann aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Herzzentrums Göttingen und wurde unserem Labor freundlicherweise schon vor der Veröffentlichung im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt (vgl.⁵¹).

Am Ende des Differenzierungsprotokolls konnten in den 24-Wellplatten kontrahierende Zellcluster von Kardiomyozyten beobachtet werden (siehe Abbildung 3). Im Alter von 35 bis 50 Tagen nach Beginn des Differenzierungsprotokolls wurden die Kardiomyozyten aus den 24-Wellplatten gelöst und für Experimente verwendet.

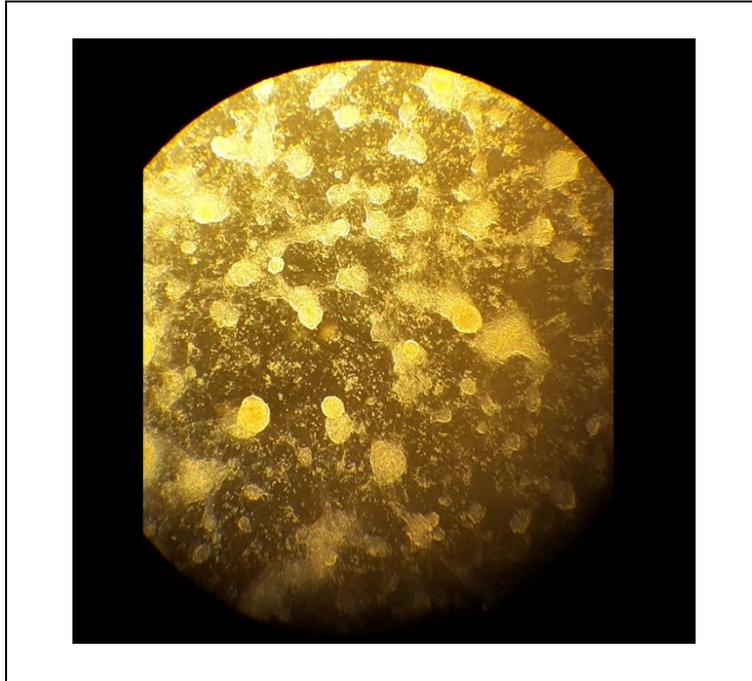


Abbildung 3 – Fotografie durch das Okular des Mikroskops bei zehnfacher Vergrößerung; Zellcluster von Kardiomyozyten am 18. Tag nach Beginn des Differenzierungsprotokolls (d18).

2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, „PCR“) ist eine Möglichkeit, die Konzentration von Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) im Zytoplasma von Zellen zu quantifizieren und darüber Rückschlüsse auf die Genexpression der zugehörigen Proteine zu erhalten.

Dafür lysiert man zunächst die Zellen mehrerer Wells, bereitet das Lysat über verschiedene Zwischenschritte zu einer reinen mRNA-Probe auf und generiert daraus anschließend mittels reverser Transkription eine komplementäre DNA (cDNA). Diese dient wiederum der quantitativen real-time PCR als Ausgangsmaterial. Das messtechnische Äquivalent, das am Ende dieser Untersuchungen als Rohdaten vorliegt, ist der sogenannte c(T)-Wert. Unter Verwendung der $\Delta\Delta c(T)$ -Methode wird schließlich die relative Genexpressionsrate ermittelt (vgl. ⁵²).

Im Anhang dieser Arbeit sind die Versuchsprotokolle aller Arbeitsschritte inklusive der angewendeten Reagenzien, sowie weitere Erläuterungen der Methodik ausführlich dargestellt (vgl. Kapitel 7.3).

2.5 Immunfluoreszenz

Das Verfahren der Immunfluoreszenz (IF) ermöglicht die Sichtbarmachung von zellulären Gewebeeigenschaften (Epitope) in der Mikroskopie. Das Prinzip beruht dabei auf der Affinität von Antikörpern (AK) zu einem Epitop im Sinne einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Durch die Konjugation des Primärantikörpers mit einem Fluoreszenzfarbstoff gelingt der spezifische Nachweis des Epitops an der entsprechenden Stelle auf dem Objektträger (direkte IF). Bei geringer Antigendichte können (meist polyklonale) Sekundärantikörper eingesetzt werden, welche ihrerseits an den Primärantikörper binden und einer Amplifizierung der Signalstärke dienen (indirekte IF).

Die Schwierigkeit der Immunfluoreszenz liegt unter anderem darin, dass das Epitop dem Antikörper zugänglich gemacht werden muss (Demaskierung), ohne dabei die Struktur der Zelle oder des Epitops zu zerstören. Für intrazelluläre Epitope muss dafür die Zellmembran permeabilisiert werden. In Kapitel 7.4 des Anhangs kann das Versuchsprotokoll, das auf die im Rahmen dieser Studie verwendeten vereinzelt Kardiomyozyten optimiert wurde, nachgelesen werden.

2.6 Western-Blot

Die Methode des Western-Blots ermöglicht eine quantitative Analyse von Proteinen. Ähnlich zum Vorgehen bei der PCR-Analyse sind zunächst mehrere Zellen zu lysieren und das Lysat ist über verschiedene Zwischenschritte aufzubereiten. Die Proteine werden mittels Elektrophorese auf ein Gel übertragen und dabei abhängig von ihrer atomaren Masse in Banden aufgetrennt. Anschließend werden die Proteinbanden durch einen Elektrotransfer mit einem Tank-Blot-System auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen, wodurch sie der Bindung eines Immunkonjugats zugänglich gemacht werden. Diese spezifische Immundetektion von bestimmten Proteinen beruht auf der im Kapitel 2.5 („Immunfluoreszenz“) beschriebenen Antigen-Antikörper-Reaktion.

Detaillierte Versuchsprotokolle der einzelnen Arbeitsschritte und weitere Erläuterungen der Methode Western-Blot befinden sich im Anhang dieser Arbeit (siehe Kapitel 7.5).

2.7 Patch-Clamp

Zur Untersuchung der Aktionspotential-Morphologie und der Ströme der am Aktionspotential beteiligten Ionenkanäle wurde im Rahmen dieser Arbeit die Patch-Clamp-Technik in der Whole-Cell-Konfiguration angewendet und mittels der etablierten funktionellen Parametern der zellulären Elektrophysiologie analysiert.

Hierbei wird zunächst eine spezialisierte Pipette mittels Mikromanipulator vorsichtig auf einen intakten, kontrahierenden Kardiomyozyten gedrückt. Der zwischen den Pipettenspitzen befindliche Membranabschnitt wird als „Patch“ bezeichnet. Durch Anlegen eines Unterdrucks entsteht eine als „Gigaseal“ bezeichnete Versiegelung zwischen dem Pipettenrand und der Zellmembran. Dieser Gigaseal besitzt einen Abdichtungswiderstand in der Größenordnung von mehreren Gigaohm. Ein Strom, der durch einen Ionenkanal innerhalb des Patches fließt, folgt dem Weg des geringsten Widerstandes und fließt daher durch den Pipetteninhalt, wo er durch die dort angebrachte Patch-Elektrode messbar wird. Bei diesem als Attached-Cell-Konfiguration bezeichneten Zustand ist die Zellmembran noch vollständig intakt.

Wird ausgehend von der Attached-Cell-Konfiguration der angelegte Unterdruck soweit erhöht, dass zwar der Patch geöffnet wird, der Gigaseal aber intakt bleibt, so entsteht eine Verbindung zwischen dem Pipetteninhalt und dem Zytosol des Kardiomyozyten. Gegen die extrazellulär gelegene Badlösung besteht weiterhin eine Isolation durch den Widerstand des Gigaseals. Dadurch kann nun nicht nur der Strom von einzelnen, auf dem Patch befindlichen Ionenkanälen abgeleitet werden, sondern der Strom über alle Ionenkanäle der gesamten Zellmembran. Daher bezeichnet man diese Konfiguration als Whole-Cell-Konfiguration.

Je nachdem welcher Ionenkanalstrom gemessen werden soll, variiert die Zusammensetzung der Bad- und der Pipettenlösung. Darüber hinaus müssen die von außen applizierten Spannungen und Stromstärken angepasst werden. Es wurden etablierte Standard-Patch-Clamp-Aufnahmetechniken verwendet. Die technischen Parameter der Patch-Clamp-Messungen, die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, eine Auflistung der eingesetzten Materialien und Geräte, sowie eine detailliertere Beschreibung des Vorgehens befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Kapitel 7.6.1).

2.8 Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration

Eine zentrale Rolle in der elektromechanischen Kopplung von Kardiomyozyten spielt die intrazelluläre Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$). Die Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration von vereinzelt Kardiomyozyten (vgl. Kapitel 7.2.6) erfolgt mit der Technik der Kalzium-Fluoreszenz, wobei die Zellen mit dem fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikator Fluo-3 AM angereichert werden und nach einer standardisierten Inkubationszeit eine Fluoreszenz-Messung durchgeführt wird. Ein ausführliches Versuchsprotokoll der Kalzium-Fluoreszenz findet sich in Kapitel 7.6.2 des Anhangs dieser Arbeit. Die Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) wurden durch die folgende Formel beschrieben:

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

[mit 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] (vgl. ⁵³)

2.9 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen erfolgten im Rahmen dieser Studie mit den Programmen InStat© (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) und SigmaPlot 11.0 (Systat GmbH, Deutschland). Alle Daten dieser Arbeit sind als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean) angegeben, wobei einzelne Ausnahmen an der entsprechenden Stelle angegeben und erläutert werden.

Um zu bestimmen, ob zur Analyse der Daten ein parametrischer oder nicht-parametrischer Test benötigt wird, wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet. Bei kontinuierlichen Variablen wurde der Student-t-Test im Fall von einer Normalverteilung herangezogen, bei nicht normalverteilten Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Um kategoriale Variablen zu vergleichen, wurde der Fisher-Test für vier Gruppen und der Chi-Quadrat-Test (Unabhängigkeitstest) für mehr als vier Gruppen verwendet.

Sollten mehrere Vergleiche durchgeführt werden, wurde für parametrische Daten ein one-way bzw. two-way ANOVA mit Bonferroni-Post-Test und für nicht-parametrische Daten ein Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-Multiple-Comparisons-Post-Test verwendet. Zum Vergleich von Daten vor und nach der Applikation eines Arzneimittels wurde der gepaarte t-Test durchgeführt.

Bei einem zweiseitigen p-Wert kleiner als 0,05 wurde Signifikanz angenommen. Mit dem Buchstaben „n“ sind jeweils die Anzahl der verwendeten Zellen (bei Patch-Clamp) oder die Anzahl der biologischen Replikate, also die Anzahl voneinander unabhängiger Lysatproben (bei Western-Blot und PCR) angegeben.

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung der patientenspezifischen hiPSC

Die in der Stem-Cell-Unit des Herzforschungszentrums Göttingen generierten hiPSC wurden vor dem Versand an unser Labor auf den Erfolg der Umprogrammierung hin kontrolliert. Neben der Beurteilung des Aussehens, welches der für humane pluripotente Stammzellen typischen Morphologie entsprach (Abbildung 4 A) und dem positiven Nachweis der alkalischen Phosphatase Aktivität (nicht abgebildet), konnten mit verschiedenen Methoden Pluripotenzmarker nachgewiesen werden (Abbildung 4 B-E). „ARVCb1. Fbro“ bezeichnet dabei die vom Spender entnommene Hautbiopsie. Die daraus generierten und an unser Labor versandten patientenspezifischen hiPSC tragen die Bezeichnungen „isARVCb1.2“, „isARVCb1.3“ und „isARVCb1.4“. Zur besseren Übersicht ist in Abbildung 4 nur die Analyse eines repräsentativen Klons („isARVCb1.2“) dargestellt.

Anhand einer Durchflusszytometrieanalyse von OCT4 und TRA-1-60 wurde eine homogene Stammzellpopulation in allen hiPSC-Reihen nachgewiesen (Abbildung 4 B). Mittels Western-Blot wurden die endogenen Pluripotenzmarker OCT4, SOX2, NANOG, LIN28 (Cell Lineage Abnormal 28), FOXD3 (Forkhead Box D3) und GDF3 (Growth Differentiation Factor 3) nachgewiesen (Abbildung 4 C). Darüber hinaus erfolgte auch der immunhistochemische Nachweis von OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, SSEA4 (Stage-specific Embryonic Antigen 4) und TRA-1-60 an den hiPSC-Reihen (Abbildung 4 D). Innerhalb einer „embryoid body (EB) formation“ wurde das spontane Differenzierungspotenzial der generierten patientenspezifischen hiPSC mittels Western-Blot analysiert. Keimblätterspezifische Gene für Endoderm (α -Fetoprotein und Albumin), Mesoderm (kardiales Troponin T und Myosin-Schwerkette 6), sowie Ektoderm (Tyrosinhydroxylase und Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2) wurden in einer kontrollierten Wachstumsumgebung während der Differenzierung der EBs (Tag 0, 8, 8+25) exprimiert. Die Expression des Pluripotenzmarkers OCT4 nahm im Rahmen der spontanen Differenzierung ab (nicht abgebildet). Der Nachweis von keimblattspezifischen Markern bei spontan differenzierten hiPSC-Reihen erfolgte ergänzend durch immunhistochemisches

Anfärben von endodermalem α -Fetoprotein (AFP), mesodermalem α -smooth-muscle-actin (α -SMA) und ektodermalem β III-Tubulin (Abbildung 4 E).

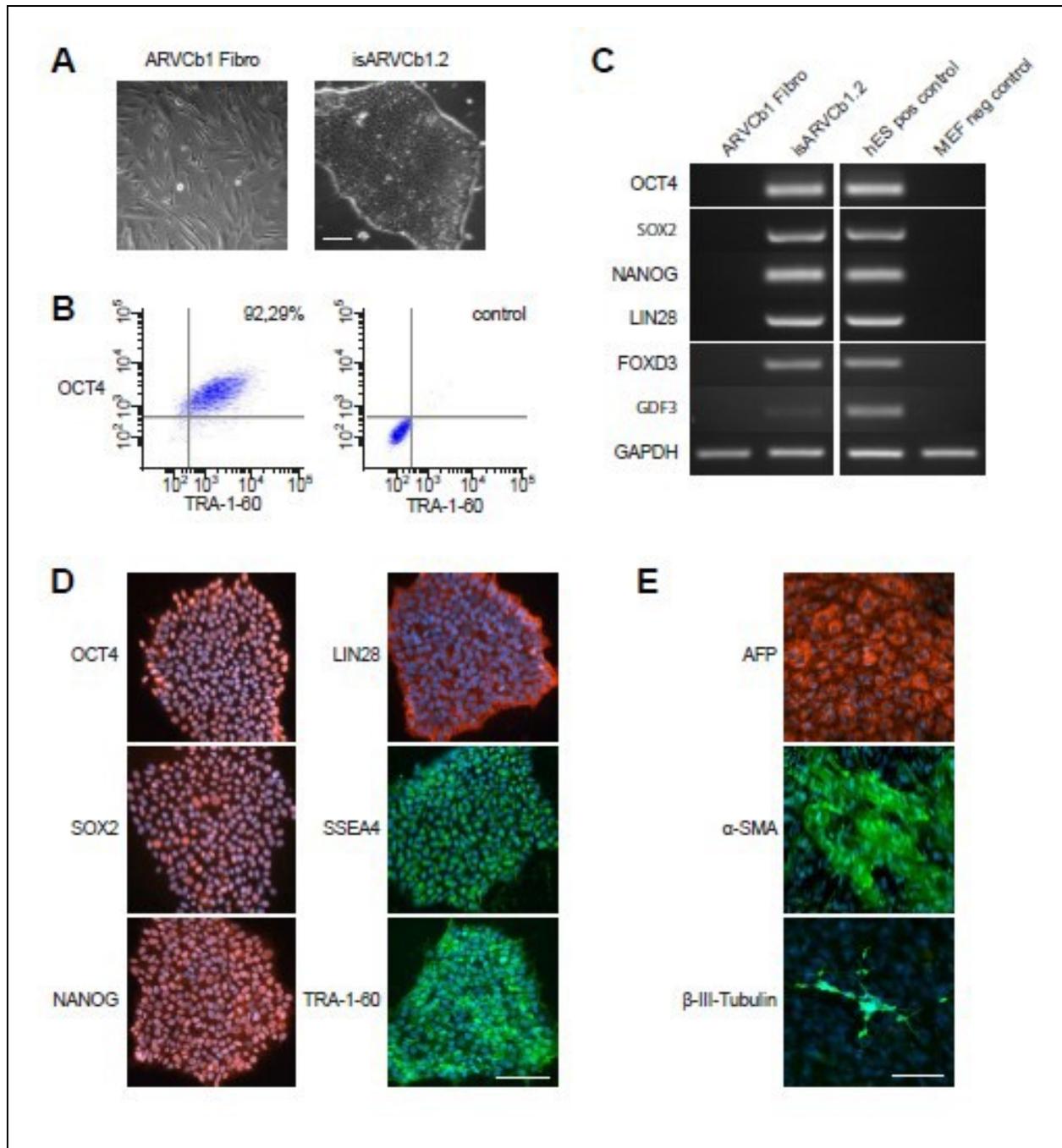


Abbildung 4 – Qualitätskontrolle der generierten hiPSC-Zelllinien „isARVCb1.2“ (ein repräsentativer Klon) durch die Stem-Cell-Unit des Herzforschungszentrums Göttingen; **(A)** Mikroskopie der Zellreihen; „ARVCb1. Fbro“ = Hautfibroblasten/Primärkultur der Hautbiopsie; „isARVCb1.2“ = generierte hiPSC-Zelllinie; Nachweis der typischen Morphologie von humanen pluripotenten Stammzellen (rechts); Maßstab entspricht 100 μ m; **(B)** Durchflusszytometrieanalyse der Pluripotenzmarker OCT4 (Abszisse) und TRA-1-60 (Ordinate); Nachweis einer homogenen Stammzellpopulation; **(C)** Nachweis der endogenen Pluripotenzmarker OCT4, SOX2, NANOG, Cell Lineage Abnormal 28 (LIN28), Forkhead Box D3 (FOXD3) und Growth Differentiation Factor 3 (GDF3) mittels Western-Blot; humane embryonale Stammzellen (hES) als Positivkontrolle; embryonale Maus-Fibroblasten (MEF) als Negativkontrolle; **(D)** Immunhistochemischer Nachweis der Pluripotenzmarker OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, SSEA4 und TRA-1-60; Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt; Maßstab entspricht 100 μ m; **(E)** Immunhistochemischer Nachweis von keimblassspezifischen Markern bei spontan differenzierter hiPSC-Reihe: endodermales α -Fetoprotein (AFP), mesodermales α -smooth-muscle-actin (α -SMA) und ektodermales β III-Tubulin; Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt; Maßstab entspricht 100 μ m.

In unserem Labor erfolgte dann die standardisierte Differenzierung der patientenspezifischen hiPSC zu Kardiomyozyten (vgl. Kapitel 7.2.5). Als Kontrolle der erfolgreichen Differenzierung konnte häufig schon vor dem Abschluss des Protokolls eine optische Beurteilung der typischen Morphologie der Kardiomyozyten-Cluster (siehe Abbildung 3, S. 15) und das Beobachten von synchronen Kontraktionen ebener dieser unter dem Mikroskop erfolgen. Ebenfalls zur Erfolgskontrolle der Differenzierung zu Kardiomyozyten diente der immunhistochemische Nachweis verschiedener kardialer Strukturproteine (vgl. Kapitel 3.2 „Immunfluoreszenz“). Die elektrophysiologischen Eigenschaften der hiPSC-CMs an Tag 35 bis 50 nach Beginn der Differenzierung, welche im Rahmen dieser Studie ausführlich untersucht wurden, bestätigten anhand des kardialen Aktionspotenzial und der funktionellen Ionenkanalströme (vgl. Kapitel 3.4 „Patch-Clamp“), ebenso wie die Ergebnisse der PCR von Tag 0 bis 35 der Differenzierung (vgl. Kapitel 3.3 „Polymerase-Kettenreaktion“), die erfolgreiche Generierung von Kardiomyozyten aus patientenspezifischen humanen induzierten pluripotenten Stammzellen.

3.2 Immunfluoreszenz

Um den Aufbau der Kardiomyozyten beurteilen zu können, wurden mittels Immunfluoreszenz verschiedene Proteine markiert und abgeleuchtet.

35 bis 60 Tage nach Beginn der Differenzierung, also in dem Zeitraum, in dem auch die elektrophysiologischen Messungen mittels Patch-Clamp-Technik und Kalzium-Imaging-Technik durchgeführt wurden, konnten bei hiPSC-CMs der ARVC- und der D1-Zellreihe die kardialen Strukturproteine Troponin T und Alpha Actinin nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 5 A). Im gleichen Zeitraum wurden ebenfalls die Myosin-Leichtketten 2 und 4 in der Immunfluoreszenz nachgewiesen, auch hier demaskierten sich keine Unterschiede zwischen D1- und ARVC-Zellen (vgl. Abbildung 5 B).

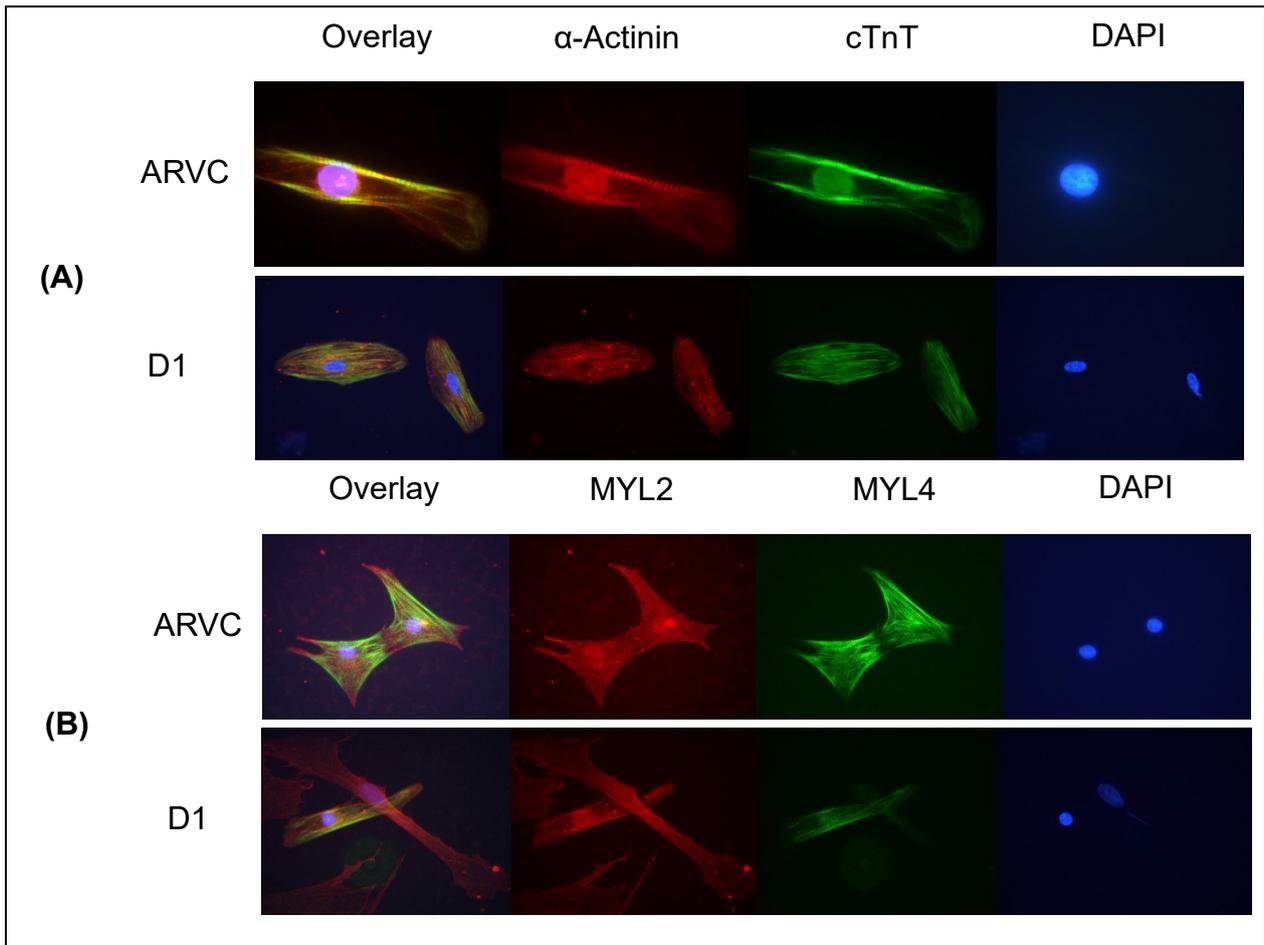


Abbildung 5 – Immunhistochemischer Nachweis spezifischer kardialer Marker an vereinzelt Kardiomyozyten, generiert aus hiPSC eines gesunden Spenders (D1) und eines ARVC-Patienten; **(A)** rot = α -Actinin, grün = kardiales Troponin T (cTnT), blau = Zellkern (DAPI) und Overlay von einem ARVC-Kardiomyozyt (100x) und zwei D1-Kardiomyozyten (40x); Tag 40 nach Beginn der Differenzierung; **(B)** rot = Myosin-Leichtkette 2 (MYL2), grün = regulatorische Myosin-Leichtkette 4 (MYL4), blau = Zellkern (DAPI) und Overlay von jeweils zwei D1- und ARVC-Kardiomyozyten (jeweils 40x); Tag 40 nach Beginn der Differenzierung.

Die genannten Immunfluoreszenzversuche wurden jeweils an vier verschiedenen Zellkulturpassagen wiederholt ($n=4$), wobei zu berücksichtigen ist, dass sich bei jeder der Durchführungen einige hundert vereinzelt Zellen auf dem Objektträger befanden und bei der Mikroskopie beurteilt wurden. Abbildung 5 zeigt exemplarisch immer nur einen Bildausschnitt aus einer der durchgeführten Versuche.

3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Zur quantitativen Analyse der Genexpression wurden insgesamt elf biologische Replikate der Zellreihe D1 mit vier biologischen Replikaten der Zellreihe ARVC verglichen [$n(D1) = 11$; $n(ARVC) = 4$]. Jedes biologische Replikat besteht dabei aus fünf Lysatproben, welche an den Tagen 0, 10, 20, 25 und 35 nach Beginn der Differenzierung gewonnen wurden. Die biologischen Replikate entstammen acht verschiedenen D1-Passagen bzw. drei verschiedenen ARVC-Passagen. Jede einzelne Lysatprobe wurde im Rahmen der PCR mindestens doppelt gemessen (technische Replikate).

3.3.1 Relative Genexpressionsraten im zeitlichen Verlauf

Zunächst erfolgte die Relativierung der Genexpressionsraten über die für Tag 0 nach Beginn der Differenzierung (d0) gemessenen Werte der Kontrollgruppe (hier: Zelllinie D1). Der Mittelwert aller biologischen Replikate dieser Gruppe diente als Relativierungsfaktor für die statistische Analyse aller Messungen des jeweiligen Primers. Mittels 2-Way-Anova können dabei die Faktoren Zeit (t) und Zellreihe (c) getrennt voneinander betrachtet werden.

3.3.1.1 Pluripotenzmarker und kardiale Strukturproteine

Die Genexpressionsrate des Pluripotenzmarkers **POU5F1** (POU class 5 homeobox 1; Synonym: OCT4) zeigte hinsichtlich des Faktors Zeit einen signifikanten Abfall um den Faktor 10^3 von d0 bis d35 [$p < 0,001$; $d0(D1) = 1,00 \pm 1,08$; $d35(D1) = 0,00174 \pm 0,00128$; $n(D1) = 5$; $d0(ARVC) = 0,62 \pm 0,54$; $d35(ARVC) = 0,00168 \pm 0,00123$; $n(ARVC) = 4$]. Zwischen den beiden Zellreihen bestand dabei kein Unterschied im Niveau der Genexpression (vgl. Abbildung 6 A).

Für das kardiale Strukturprotein Connexin-43 konnte weder für den Faktor Zellreihe noch für den Faktor Zeit ein Unterschied im Ausmaß der Genexpression des kodierenden Genabschnitts **GJA1** gefunden werden (vgl. Abbildung 6 B).

Bei den beiden Genabschnitten TNNT2 und TNNI3, welche für das kardiale Troponin T und I kodieren, ließ sich mittels PCR eine signifikante Zunahme der Genexpression

im zeitlichen Verlauf nachweisen. Im Fall von **TNNT2** konnte ein Anstieg um den Faktor 10^3 von d0 zu d35 bei beiden Zellreihen nachgewiesen werden [$p < 0,001$; $d_0(D1) = 1,00 \pm 0,37$; $d_{35}(D1) = 2026,37 \pm 1460,90$; $n(D1) = 5$; $d_0(ARVC) = 0,59 \pm 0,33$; $d_{35}(ARVC) = 1472,46 \pm 1014,06$; $n(ARVC) = 4$] (vgl. Abbildung 6 C). Für **TNNI3** betrug der Anstieg der Genexpression von d0 zu d35 einen Faktor von 10^2 bei beiden Zellreihen [$p < 0,001$; $d_0(D1) = 1,00 \pm 0,12$; $d_{35}(D1) = 274,62 \pm 15,48$; $n(D1) = 4$; $d_0(ARVC) = 0,17 \pm 0,06$; $d_{35}(ARVC) = 110,84 \pm 30,44$; $n(ARVC) = 4$] (vgl. Abbildung 6 D).

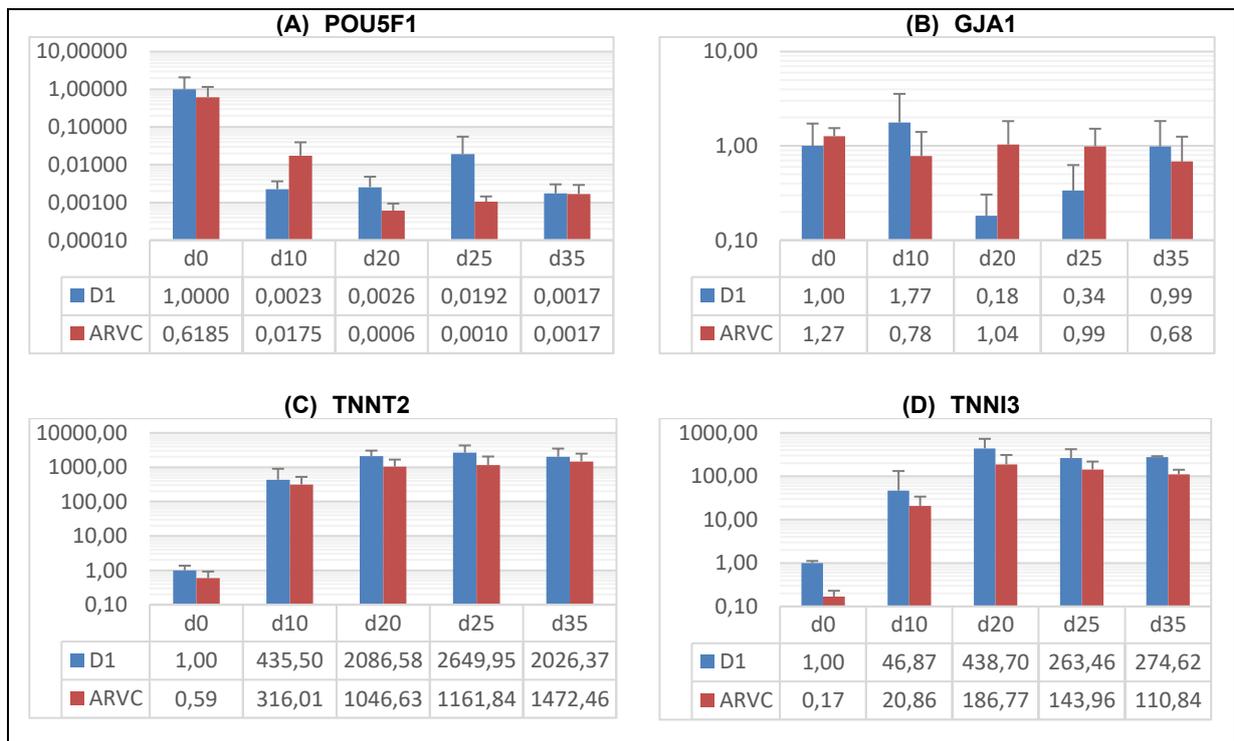


Abbildung 6 – Relative Genexpressionsraten im zeitlichen Verlauf (d0, d10, d20, d25, d35) für Pluripotenzmarker und kardiale Strukturproteine; Zellreihen: ARVC (rot) und D1 (blau); Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM; p-Wert-Berechnung erfolgte mittels 2-Way-Anova mit t = Faktor Zeit und c = Faktor Zellreihe; n = Anzahl biologischer Replikate. **(A) POU5F1**; $p(t) < 0,001$; $p(c) = 0,27$; $n(D1) = 5$; $n(ARVC) = 4$. **(B) GJA1**; $p(t) = 0,69$; $p(c) = 0,31$; $n(D1) = 7$; $n(ARVC) = 4$. **(C) TNNT2**; $p(t) < 0,001$; $p(c) = 0,029$; $n(D1) = 5$; $n(ARVC) = 4$. **(D) TNNI3**; $p(t) < 0,001$; $p(c) = 0,013$; $n(D1) = 4$; $n(ARVC) = 4$.

3.3.1.2 Desmoglein-2

Sowohl für den Faktor Zeit als auch für den Faktor Zellreihe ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von Desmoglein-2 nachweisen (vgl. Abbildung 7).

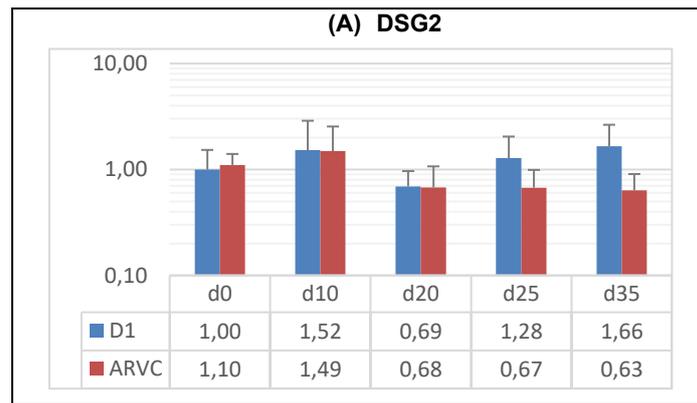


Abbildung 7 – Relative Genexpressionsraten im zeitlichen Verlauf (d0, d10, d20, d25, d35) für Desmoglein-2; Zellreihen: ARVC (rot) und D1 (blau); Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM; p-Wert-Berechnung erfolgte mittels 2-Way-Anova mit t = Faktor Zeit und c = Faktor Zellreihe; n = Anzahl biologischer Replikate. **(A) DSG2**; $p(t)=0,26$; $p(c)=0,17$; $n(D1)=5$; $n(ARVC)=4$.

3.3.1.3 Untereinheiten kardialer Kalzium-, Natrium- und Kaliumkanäle

Die PCR-Ergebnisse der 2-Way-Anova-Analyse (Faktor Zeit und Faktor Zellreihe über 35 Tage der Differenzierung) für die Ionenkanaluntereinheiten der kardialen Kalzium-, Natrium- und Kaliumkanäle sind an dieser Stelle zur besseren Übersichtlichkeit nicht abgebildet, sondern finden sich im Anhang dieser Arbeit (siehe Kapitel 7.9 „Ergänzende Ergebnisse der Polymerase Kettenreaktion“, Seite 124).

3.3.2 Relative Genexpressionsraten am Ende der Differenzierung (d35)

Um die Genexpressionsraten der beiden Zellreihen D1 und ARVC an Tag 35 nach Beginn des Differenzierungsprotokolls (d35) zu vergleichen, wurde der Mittelwert aller biologischen Replikate der Zellreihe D1 zum Zeitpunkt d35 als Relativierungsfaktor eingesetzt. Dadurch wird für jeden untersuchten Genabschnitt nicht der gesamte Beobachtungszeitraum berücksichtigt, sondern es erfolgt ein Querschnittsvergleich der Genexpressionsraten zu dem Zeitpunkt, an dem auch die funktionellen Untersuchungen der kardialen Ionenkanäle mittels Patch-Clamp erfolgten (siehe Kapitel 3.4).

Wie bei in Abbildung 8 ersichtlich, konnte bei dieser Art der statistischen Auswertung nur für die **SCN5A**-Untereinheit (Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit V) der kardialen Natriumkanäle ein signifikanter Unterschied ermittelt werden, welcher sich als eine Verminderung des Expressions-Niveaus der ARVC-Zelllinie gegenüber der gesunden Kontrollgruppe darstellt [$p=0,0015$; $d35(D1) = 1,00 \pm 0,36$; $d35(ARVC) = 0,19 \pm 0,09$; $n(D1) = 11$; $n(ARVC) = 4$].

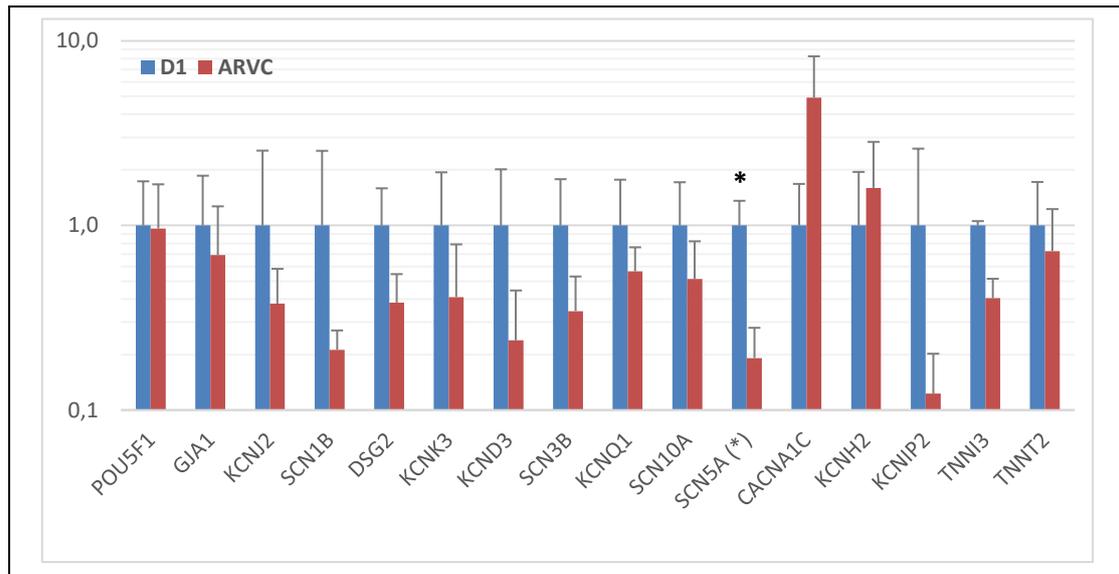


Abbildung 8 – Relative Genexpressionsraten zum Zeitpunkt d35 für alle untersuchten Genabschnitte (**POU5F1** = POU class 5 homeobox 1, **GJA1** = Gap-Junction Alpha-1 protein, **KCNJ2** = Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 2, **SCN1B** = Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit I, **DSG2** = Desmoglein-2, **KCNK3** = Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 3, **KCND3** = Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member 3, **SCN3B** = Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit III, **KCNQ1** = Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1, **SCN10A** = Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit X, **SCN5A** = Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit V, **CACNA1C** = Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C, **KCNH2** = Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 2, **KCNIP2** = Potassium Voltage-Gated Channel Interacting Protein 2, **TNNI3** = Cardiac muscle troponin I, **TNNT2** = Cardiac muscle troponin T); Zellreihen: ARVC (rot) und D1 (blau); Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = Anzahl biologischer Replikate; (*) = $p < 0,05$; für die zugehörige Datentabelle siehe (Tabelle 20, Seite 128).

3.4 Patch-Clamp

3.4.1 Aktionspotentiale der hiPSC-CMs

Der Nachweis von Aktionspotentialen, deren Aussehen dem von menschlichen Kardiomyozyten entsprechen, war der erste Schritt in der elektrophysiologischen Charakterisierung der hiPSC-CMs. Abbildung 9 zeigt exemplarisch je ein Aktionspotential (engl. action potential, „AP“) der im Rahmen dieser Analyse untersuchten Zellreihen.

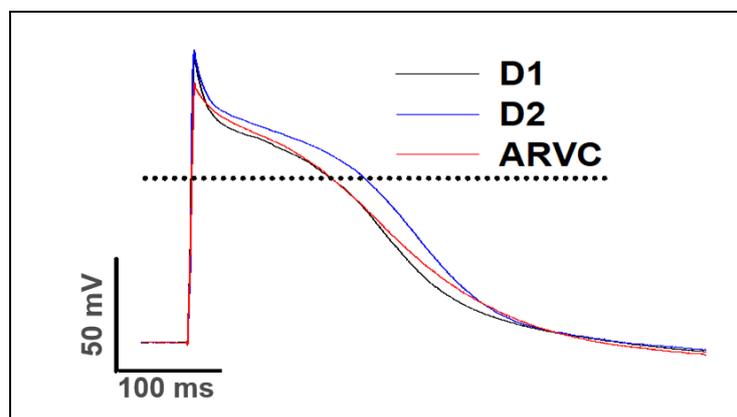


Abbildung 9 - Repräsentative Aufnahme der Aktionspotentiale von spontan schlagenden hiPSC-CMs der untersuchten Zellreihen; schwarz = D1, blau = D2, rot = ARVC; die gepunktete Linie markiert die Baseline.

Die Aktionspotentialamplitude (APA) der ARVC-hiPSC-CMs war gegenüber der gesunden Kontrollgruppe in signifikantem Ausmaß reduziert [$p < 0,01$ zu D1; $p < 0,05$ zu D2; vgl. Abbildung 10 A]. Für die maximale Aufstrom-Geschwindigkeit des APs (engl. upstroke velocity, V_{max}) konnte bei der ARVC-Zelllinie ebenfalls eine signifikante Reduktion der Messwerte nachgewiesen werden [$p < 0,01$ zu D1; $p < 0,01$ zu D2; vgl. Abbildung 10 B].

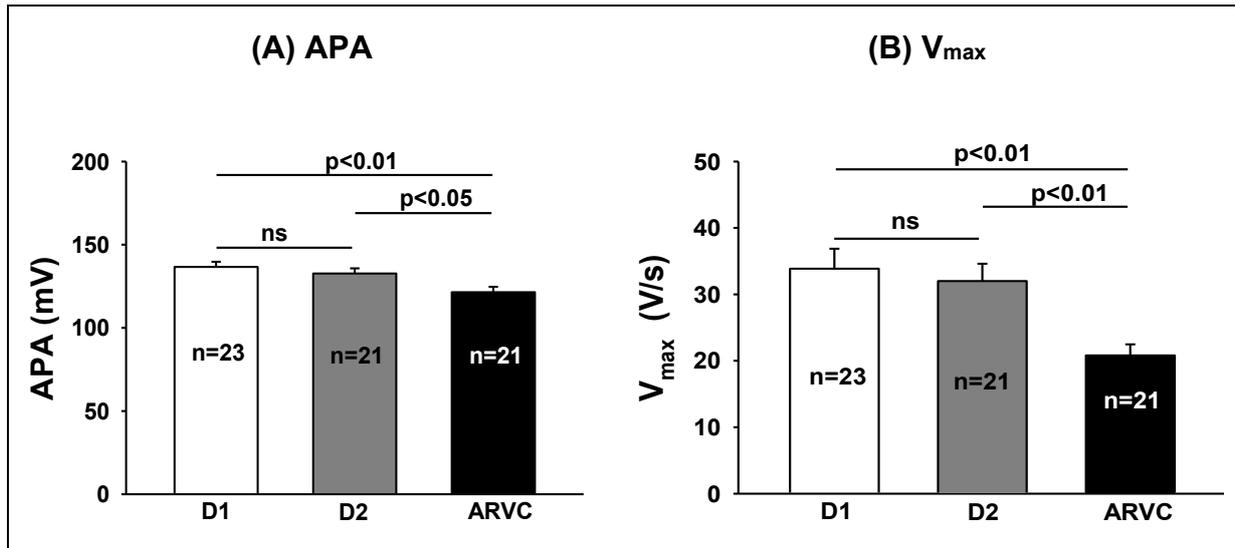


Abbildung 10 – Unterschiede bei der APA und bei V_{max} des Aktionspotentials in den ARVC-hiPSC-CMs gegenüber der hiPSC-CMs der gesunden Spender (D1 & D2); (A) Aktionspotentialamplitude (APA) in mV; (B) maximale Aufstrom-Geschwindigkeit der Aktionspotentiale (V_{max}) in V/s; Werte entsprechen Mittelwert \pm SEM; n = Anzahl untersuchter Zellen; ns = $p > 0,05$.

Bei dem Ruhemembranpotential (RP) und der Dauer der Aktionspotentiale bei 50%iger Repolarisation (APD50) bzw. bei 90%iger Repolarisation (APD90) gab es innerhalb der drei Zelllinien keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abbildung 11 A-C).

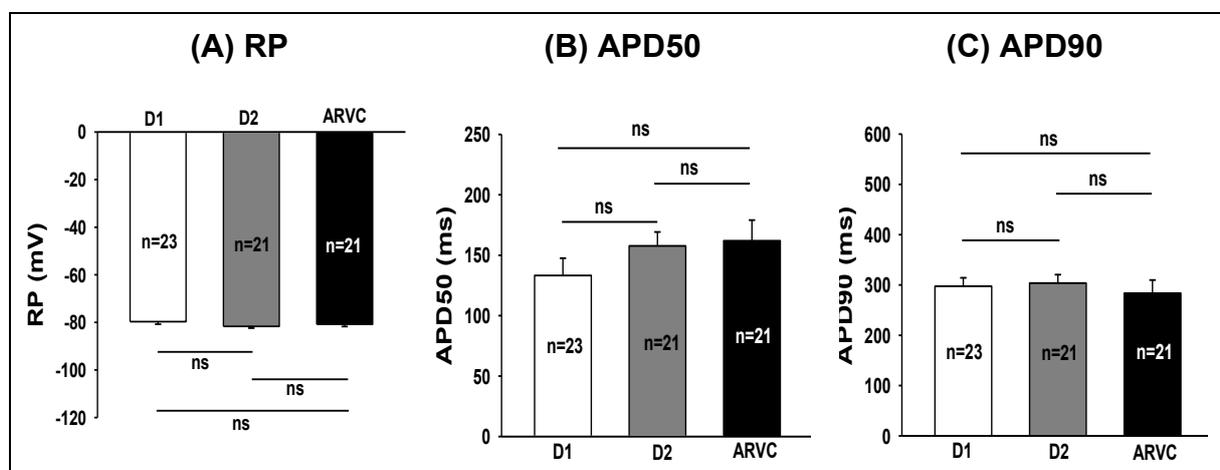


Abbildung 11 – keine Unterschiede beim RP und der APD der Aktionspotentiale in den untersuchten Zellreihen; (A) Ruhemembranpotential (RP) in mV; (B) Aktionspotentialdauer bei 50%iger Repolarisation (APD50) in ms; (C) Aktionspotentialdauer bei 90%iger Repolarisation (APD90) in ms; Werte entsprechen Mittelwert \pm SEM; n = Anzahl untersuchter Zellen; ns = $p > 0,05$.

3.4.2 Ionenkanaleigenschaften

Um die Ursache der zuvor beschriebenen Unterschiede bei den Parametern der AP-Kurve aufzudecken, wurden im nächsten Schritt die Ströme der kardialen Ionenkanäle (I_{Na} , I_{NCX} , I_{to} , I_{SK} , I_{KS} , I_{Ca-L} , I_{KATP} und I_{Kr}) gemessen.

Abbildung 12 zeigt für die untersuchten Zellreihen zunächst je eine repräsentative Bildspur und die Strom-Spannungs-Kurven (IV-Kurven) der kardialen Ionenkanäle I_{Na} (spannungsabhängiger Natriumkanal), I_{NCX} (Natrium-Kalzium-Austauscher), I_{to} (transienter Kaliumausstrom), I_{SK} (kalziumaktivierter Kaliumkanal), I_{KATP} (ATP-abhängiger Kaliumkanal) und I_{Kr} (gering verzögerter gleichrichtender Kaliumkanal).

Dabei zeigte sich, dass die Peak-Ströme von I_{Na} , I_{NCX} , I_{to} , I_{SK} und I_{KATP} in der Zellreihe ARVC in signifikantem Ausmaß reduziert waren (vgl. Abbildung 13 A-E). Der Peak-Strom von I_{Kr} wies dem gegenüber eine signifikante Erhöhung bei der ARVC-Zellreihe auf (vgl. Abbildung 13 F). Bei allen genannten Ionenkanalströmen ist zu beachten, dass sich innerhalb der gesunden Kontrollgruppe keine Unterschiede zwischen der Zellreihe D1 und D2 finden ließen.

Bei den Messwerten der Ionenkanalströme I_{Ca-L} (Long-Lasting einwärtsgerichteter Kalziumkanal, Synonym: L-Typ Kalziumkanal) und I_{KS} (stark verzögerter gleichrichtender Kaliumkanal) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei untersuchten Zellreihen gefunden werden. Abbildung 14 zeigt für I_{Ca-L} und I_{KS} jeweils eine repräsentative Bildspur und die IV-Kurven der untersuchten Zellreihen. Die graphische Darstellung der zugehörigen Peak-Ströme bei einer für den jeweiligen Kanal festgelegten Spannung zeigt Abbildung 15. Diese Abbildung beinhaltet außerdem die entsprechenden Messwerte des late- I_{Na} -Stroms, für den ebenfalls keine signifikanten Unterschiede detektierbar waren.

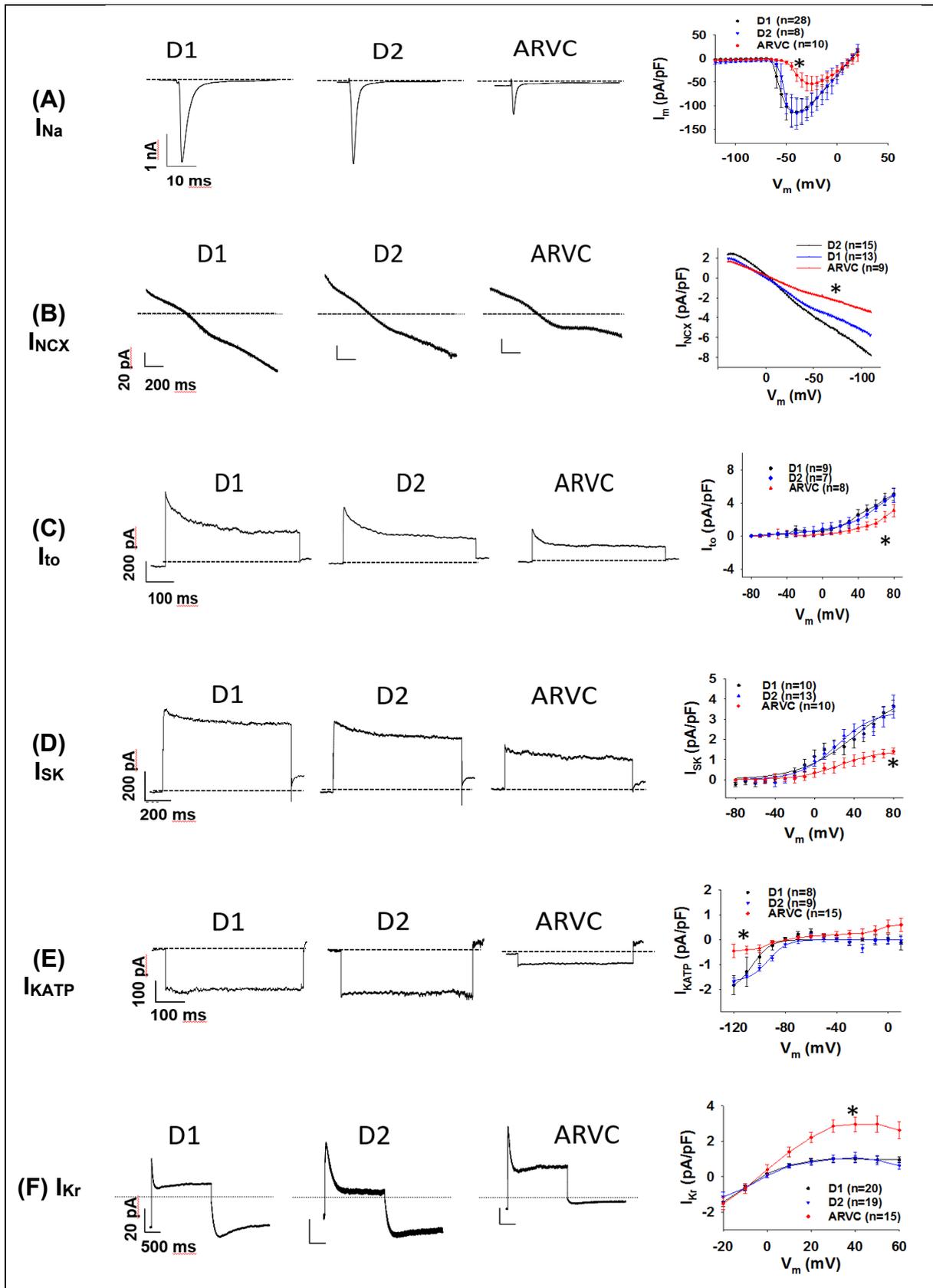


Abbildung 12 – repräsentative Bildspuren und Strom-Spannungs-Beziehungen (IV-Kurven) der Ionenkanalströme I_{Na} , I_{NCX} , I_{to} , I_{SK} , I_{KATP} und I_{Kr} , gemessen bei hiPSC-CMs einer ARVC-Zelllinie und den Zelllinien der Kontrollgruppe (D1 & D2); **(A)** spannungsabhängiger Natriumstrom (I_{Na}); **(B)** Na^+/Ca^{2+} -Austauscher (I_{NCX}); die Ströme wurden bei einem Ramp-Pulse von 1600 ms von +60 bis -100 mV und einem Holding-Potential von -40 mV aufgenommen; **(C)** Transient-Outward Kaliumkanal (I_{to}); **(D)** Ca^{2+} -aktivierter Kaliumkanal (I_{SK}); **(E)** ATP-abhängiger Kaliumkanal (I_{KATP}); **(F)** gering verzögerter gleichrichtender Kaliumkanal (I_{Kr}); Die gepunktete Linie markiert die Baseline; Werte entsprechen Mittelwert \pm SEM; n = Anzahl untersuchter Zellen; * = $p < 0,05$ bei einem Vergleich von ARVC mit D1.

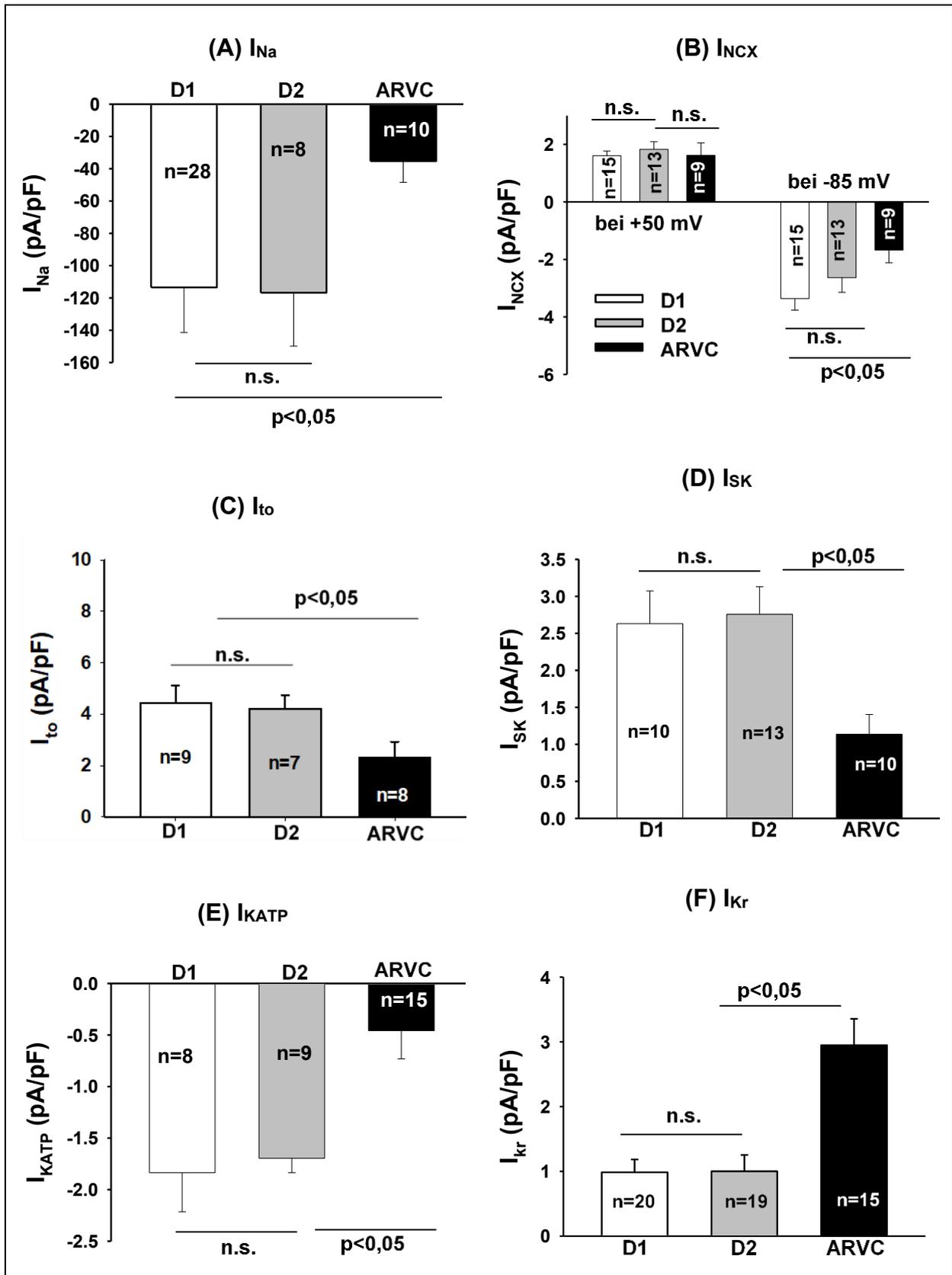


Abbildung 13 – Unterschiede bei den Ionenkanalströmen I_{Na} , I_{NCX} , I_{to} , I_{SK} , I_{KATP} und I_{Kr} der ARVC-hiPSC-CMs gegenüber der hiPSC-CMs der gesunden Spender (D1 & D2); **(A)** Peak-Natriumstrom (I_{Na}) bei -40 mV; **(B)** Peak-Strom des Na/Ca-Austauscher (I_{NCX}) bei +50 mV und bei -85mV; **(C)** Peak-Strom des Transient-Outward Kaliumkanals (I_{to}) bei +70 mV; **(D)** Peak-Strom des Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanals (I_{SK}) bei +60 mV; **(E)** Peak-Strom des ATP-abhängigen Kaliumkanals (I_{KATP}) bei -120 mV; **(F)** Peak-Strom des gering verzögerten gleichrichtenden Kaliumkanals (I_{Kr}) bei +40 mV; Werte entsprechen Mittelwert \pm SEM; Peak-Ströme in pA/pF; n = Anzahl untersuchter Zellen; n.s. = $p > 0,05$.

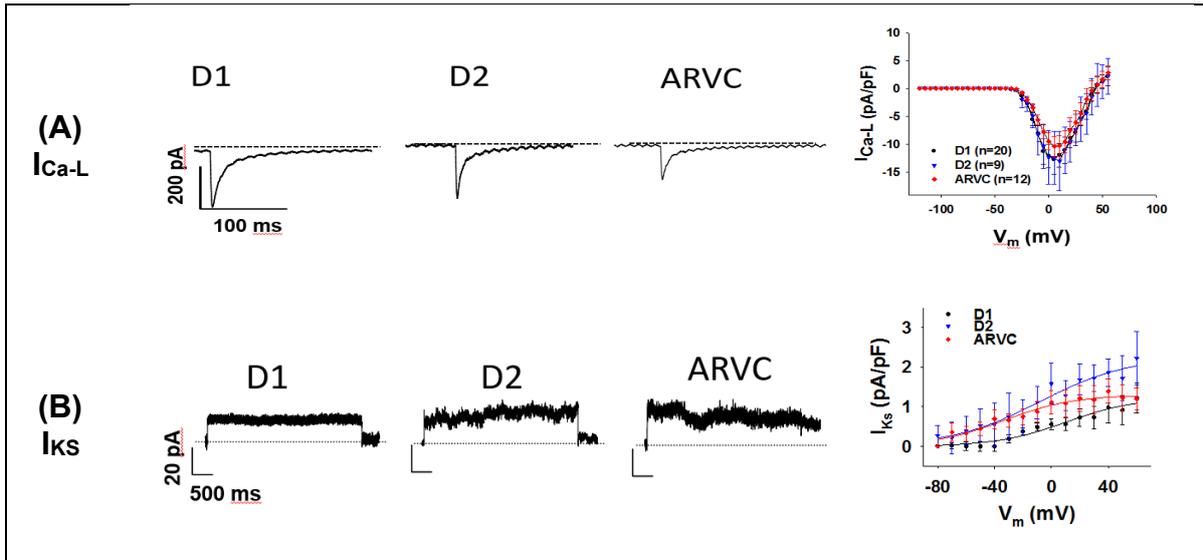


Abbildung 14 – repräsentative Bildspuren und Strom-Spannungs-Beziehungen (IV-Kurven) der Ionenkanalströme I_{Ca-L} und I_{Ks} , gemessen bei hiPSC-CMs einer ARVC-Zelllinie und den Zelllinien der Kontrollgruppe (D1 & D2); **(A)** Long-Lasting einwärtsgerichtete Kalziumkanäle (I_{Ca-L}); **(B)** stark verzögerte gleichrichtende Kaliumkanäle (I_{Ks}); Die gepunktete Linie markiert die Baseline; Werte entsprechen Mittelwert \pm SEM; n = Anzahl untersuchter Zellen.

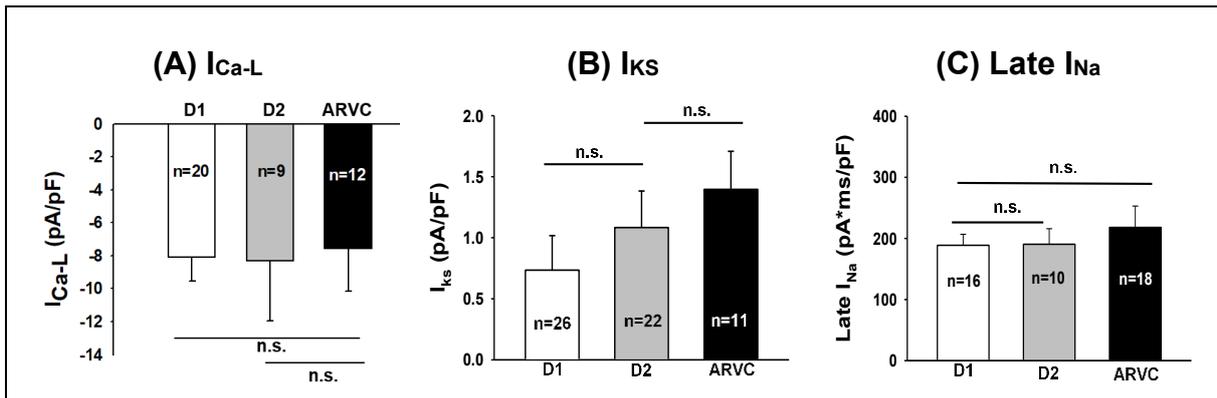


Abbildung 15 – keine Unterschiede bei den Ionenkanalströmen I_{Ca-L} , I_{Ks} und late- I_{Na} innerhalb der untersuchten Zellreihen; **(A)** Peak-Strom des L-typ Kalziumkanals (I_{Ca-L}) bei 0 mV; **(B)** Peak-Strom der stark verzögerten gleichrichtenden Kaliumkanäle (I_{Ks}) bei +40 mV; **(C)** Late-Natriumstrom (I_{Na}) bei -40 mV; Werte entsprechen Mittelwert \pm SEM; Peak-Ströme in pA/pF; n = Anzahl untersuchter Zellen; n.s. = $p > 0,05$.

3.4.3 Sensitivität gegenüber adrenerger Stimulation

Wie in Kapitel 1.2.6 der Einleitung beschrieben, ist für ARVC-Patienten ein gehäuftes Auftreten maligner Arrhythmien unter körperlicher Belastung bekannt¹⁸. Die nächste Etappe der elektrophysiologischen Untersuchung diente daher der Suche nach einem entsprechenden Korrelat, welches dieses Phänomen auf zellulärer Ebene erklären könnte. Um dieses zu simulieren wurden die Kardiomyozyten einer adrenergen Stimulation ausgesetzt.

Dafür wurden die Messungen der Aktionspotential-Parameter und die Messungen der beteiligten Ionenkanäle vor und nach der Applikation von Isoprenalin (Iso) wiederholt. Sowohl bei den hiPSC-CMs der gesunden Spender als auch bei den Zellen des ARVC-Modells verkürzte sich die Dauer des Aktionspotentials (APD50 und APD90) unter Anwesenheit von Isoprenalin nachweislich. Es wurden drei verschiedene Iso-Konzentrationen appliziert (0,1 μM , 1,0 μM und 10 μM), wobei für alle Zellreihen beobachtet werden konnte, dass das Ausmaß der APD-Verkürzung im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Beziehung von der Iso-Konzentration abhängig ist (vgl. Abbildung 16). Beim Vergleich der Zellreihen untereinander präsentierte sich die APD-Verkürzung durch Isoprenalin bei den ARVC-Zellen in einem signifikant höherem Ausmaß als bei den D1-Zellen [$p < 0,01$ bei 0,1 μM Iso; $p < 0,05$ bei 1 μM Iso; $p > 0,05$ bei 10 μM Iso; vgl. Abbildung 16].

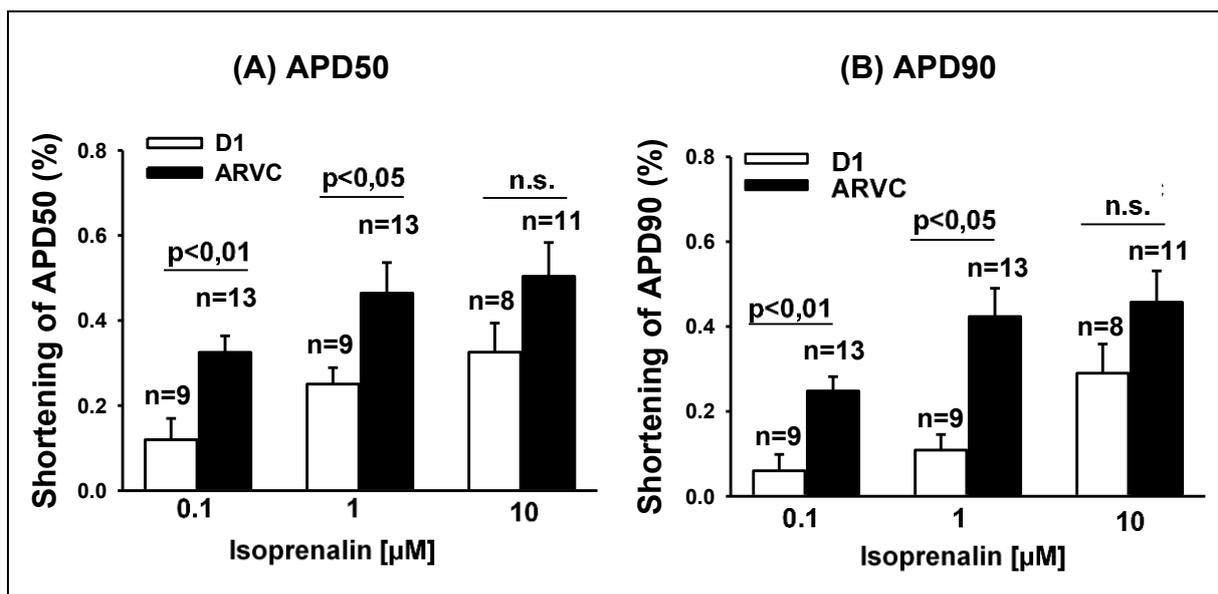


Abbildung 16 – Konzentrationsabhängiger Effekt von Isoprenalin auf die Dauer des Aktionspotentials (APD); Prozentwerte wurden anhand der Formel $(APD_{\text{Iso}} - APD_{\text{Ctr}}) / APD_{\text{Ctr}} * 100$ ermittelt, wobei APD_{Iso} den Wert unter Einfluss von Isoprenalin und APD_{Ctr} den Wert in Abwesenheit von Isoprenalin darstellt; (A) Durch Isoprenalin hervorgerufene Verkürzung der APD50; (B) Durch Isoprenalin hervorgerufene Verkürzung der APD90; Werte entsprechen Mittelwert \pm SEM; n = Anzahl untersuchter Zellen; n.s. = $p > 0,05$.

Zur weiteren Abklärung wurden die Ionenkanalströme unter oben genannten Bedingungen analysiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass bei den ARVC-hiPSC-CMs die Anwesenheit von Isoprenalin (1 μ M) eine signifikant stärker ausgeprägte Hemmung des I_{NCX} hervorruft als bei den Zellreihen der gesunden Spender (vgl. Abbildung 17 A). Zwar konnte auch bei den Ionenkanälen I_{Na} , I_{to} und I_{KATP} eine Reduzierung des Stromflusses in Anwesenheit von Isoprenalin (1 μ M) nachgewiesen werden, die Unterschiede im Ausmaß der Hemmung lagen bei den verschiedenen Zellreihen aber nicht im signifikanten Bereich (vgl. Abbildung 17 B-D).

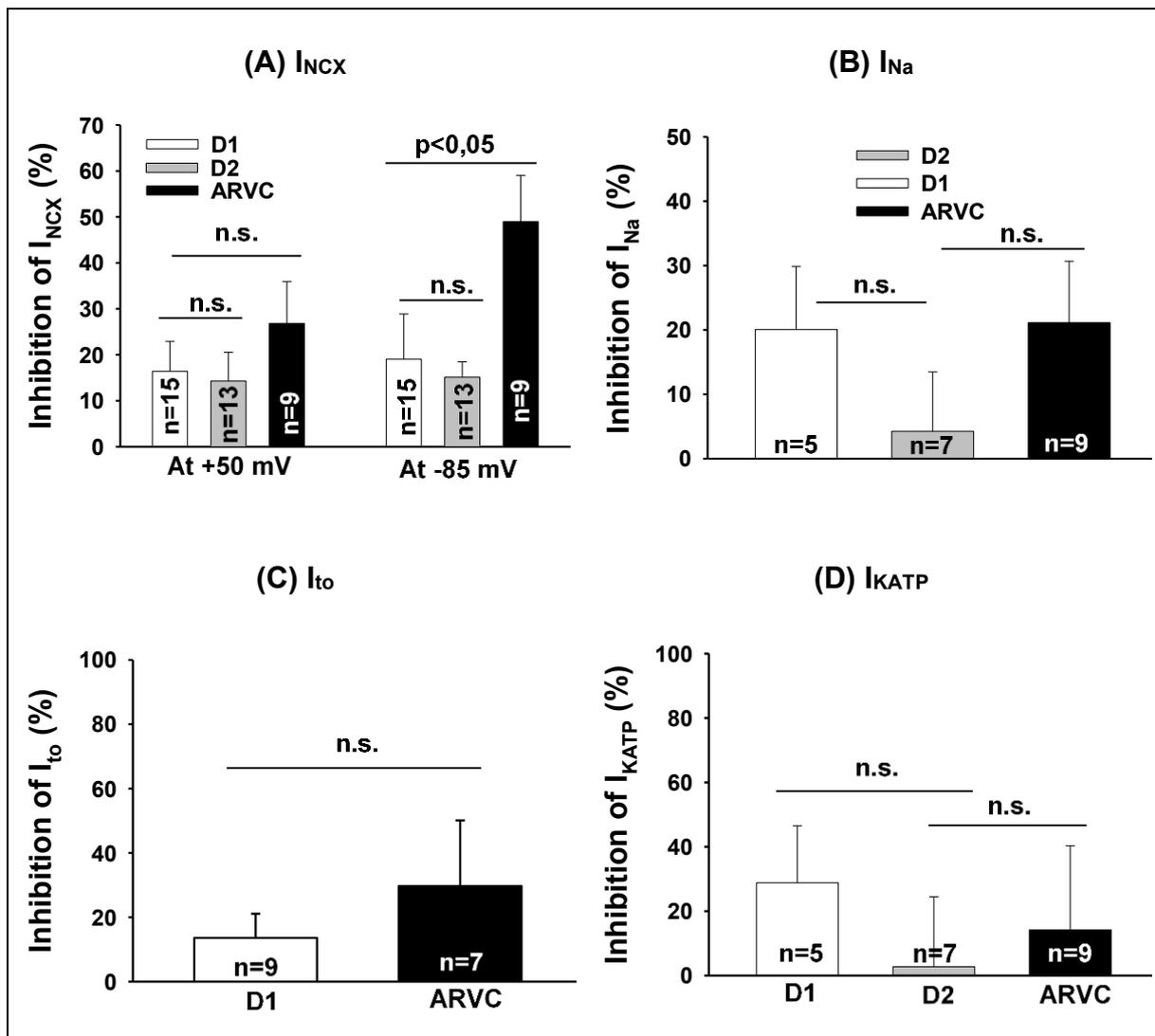


Abbildung 17 – Effekt von Isoprenalin (1 μ M) auf die kardialen Ionenkanalströme. Prozentwerte wurden anhand der Formel $(V_{Iso} - V_{Ctr}) / V_{Ctr} * 100$ ermittelt, wobei V_{Iso} den Wert unter Einfluss von Isoprenalin und V_{Ctr} den Wert in Abwesenheit von Isoprenalin darstellt; **(A)** Durch Isoprenalin hervorgerufene Hemmung von I_{NCX} bei +50 mV und bei -85 mV; **(B)** Durch Isoprenalin hervorgerufene Hemmung von Peak- I_{Na} bei -35 mV; **(C)** Durch Isoprenalin hervorgerufene Hemmung von Peak- I_{to} bei +70 mV; **(D)** Durch Isoprenalin hervorgerufene Hemmung von I_{KATP} bei -120 mV; Werte entsprechen Mittelwert \pm SEM; n = Anzahl untersuchter Zellen; n.s. = $p > 0,05$.

3.4.4 Arrhythmogene Ereignisse

Zur Beurteilung von Arrhythmogenen Ereignissen wurde bei spontan schlagenden Kardiomyozyten mit der Kalzium-Imaging-Technik der Kalziumtransient gemessen (vgl. Abbildung 18 A).

In Anwesenheit von Epinephrin ($10 \mu\text{M}$) ließen sich bei zuvor regelmäßig schlagenden hiPSC-CMs sowohl Early-After-Depolarisation-like (EAD-like) als auch Delayed-After-Depolarisation-like (DAD-like) Events auslösen. Bei der ARVC-Zellreihe war die Häufigkeit dieser durch Epinephrin ($10 \mu\text{M}$) ausgelösten Events signifikant höher als bei den Zelllinien D1 und D2 (vgl. Abbildung 18 B)

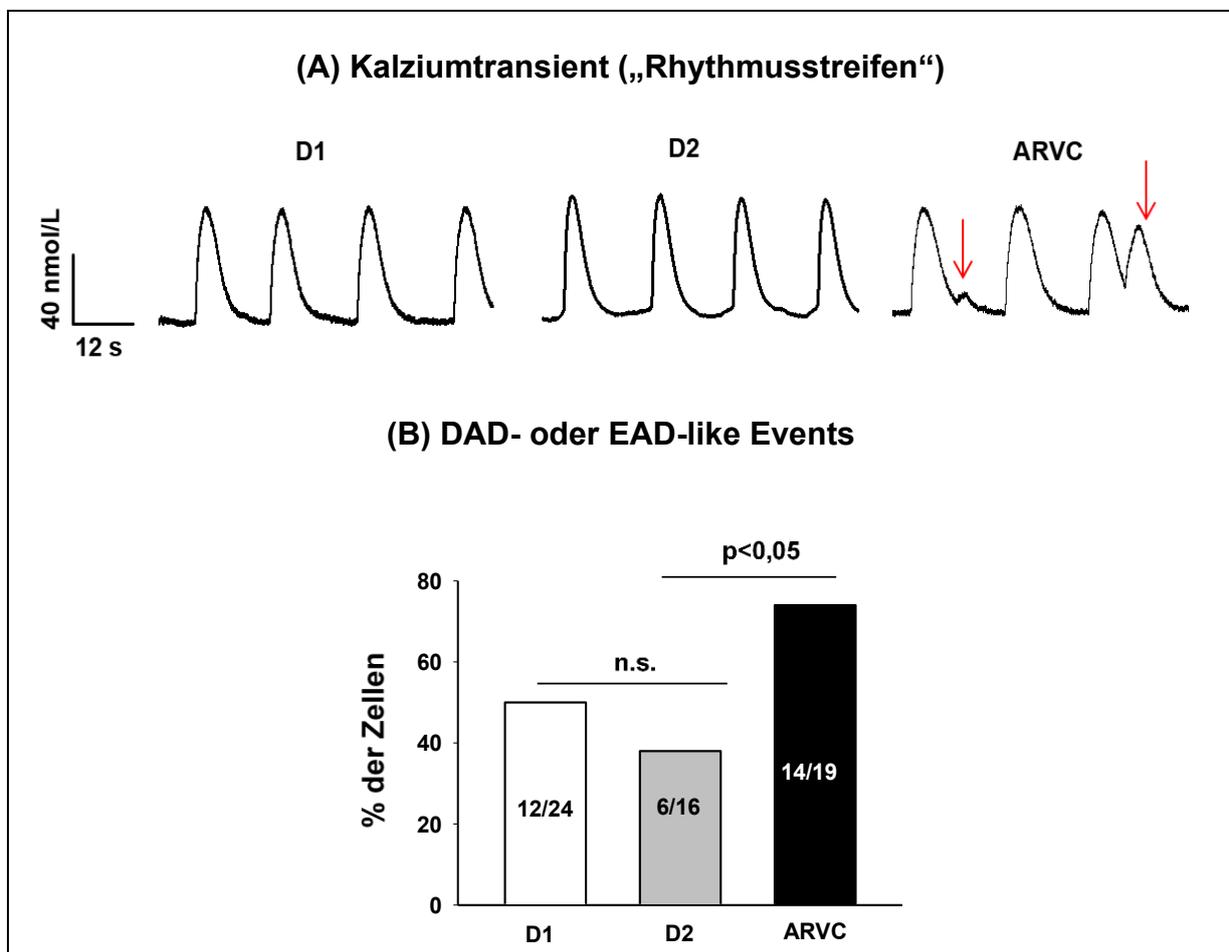


Abbildung 18 – Untersuchung der Kalziumhomöostase der Zellen bei spontan schlagenden hiPSC-CMs mit der Kalzium-Imaging-Technik (Flo-3); **(A)** repräsentative Bildspur des Kalziumtransienten in den Zelllinien ARVC, D1 und D2 in Anwesenheit von Epinephrin ($10 \mu\text{M}$). Die Pfeile markieren arrhythmogene (EAD-like oder DAD-like) Events; **(B)** Anteil der Zellen, die in Anwesenheit von Epinephrin ($10 \mu\text{M}$) arrhythmogene (EAD-like oder DAD-like) Events zeigten; **(C)** Werte entsprechen Mittelwert \pm SEM; n.s. = $p > 0,05$.

3.5 Western-Blot

Zur Untersuchung der Proteinkonzentration von Desmoglein-2, dem Protein, in dessen kodierendem Genabschnitt die Mutation des ARVC-Patienten dieser Studie lokalisiert ist, wurden insgesamt sechs verschiedene Zelllysate (4x ARVC, 2x D1) mittels Western-Blot analysiert. Dabei konnte, wie Abbildung 19 A zeigt, für jede Probe der Nachweis der Proteine Desmoglein-2 und GAPDH erfolgen. Hierbei ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der GAPDH-normalisierten Desmoglein-2-Konzentration der beiden Zellreihen aufdecken.

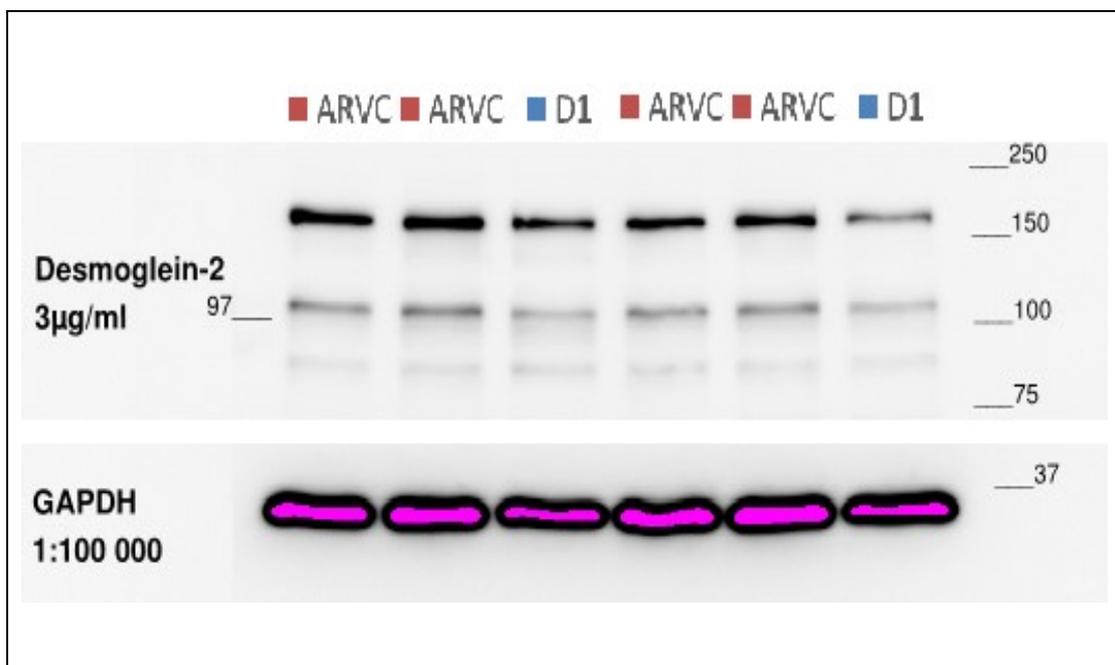


Abbildung 19 - Western-Blot von Desmoglein-2 und GAPDH von ARVC-Lysaten (rot) und D1-Lysaten (blau); exemplarische Aufnahme einer Blotmembran nach der Immundetektion mit spezifischen Antikörpern für die genannten Proteine.

4 DISKUSSION

4.1 Abstract

Im Rahmen dieser Studie wurde erstmals ein ARVC-Zellkulturmodell mittels patientenspezifischen hiPSC-CMs eines Patienten mit einer Mutation im DSG-2-Gen etabliert. Der Schwerpunkt der Studie lag dabei auf der zellulären Elektrophysiologie der Kardiomyozyten, und es konnten weitreichende Unterschiede zwischen den hiPSC-CMs des ARVC-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe aufgedeckt werden.

Das Aktionspotential stellte sich verändert dar, was durch eine reduzierte Aufstrom-Geschwindigkeit charakterisiert wurde. Des Weiteren ließen sich mehrere Ionenkanalfehlfunktionen dokumentieren, und es konnte außerdem eine gesteigerte Sensitivität der ARVC-hiPSC-CMs gegenüber adrenerger Stimulation nachgewiesen werden. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten weitreichende Folgen für die zukünftigen Therapieoptionen von ARVC-Patienten haben.

4.1 Einordnung der Arbeit in den aktuellen Stand der Forschung

Die ARVC ist eine seltene und meist autosomal dominant vererbte Krankheit, mit der bislang dreizehn verschiedene Gene in Verbindung gebracht werden konnten^{17, 20}. In mehr als der Hälfte aller Fälle sind dabei desmosomale Gene, wie zum Beispiel Plakophilin-2 (PKP2), Plakoglobin (JUP), Desmocollin-2 (DSC2), Desmoplakin (DSP) oder Desmoglein-2 (DSG2) betroffen²¹. Darüber hinaus wurden auch einige nicht-desmosomale Gene identifiziert, welche ebenfalls ursächlich für eine ARVC-Erkrankung sein können. Hier sind unter anderem das transmembrane Protein-43, Desmin, Titin, Phospholamban und der Ryanodin-Rezeptor-2 zu nennen⁵⁴⁻⁵⁶. Unter allen bekannten Mutationen, welche bei ARVC-Patienten nachgewiesen werden konnten, ist dabei die Gruppe der PKP2-betreffenden Varianten am häufigsten⁵⁷⁻⁵⁹.

Dass Mutationen, die zu Veränderungen in desmosomalen Genen führen, einen Einfluss auf die korrekte Reizweiterleitung innerhalb des Herzmuskelgewebes haben können, ist bereits seit langem bekannt. Als Ursache wird hierfür die Fehlfunktion der Zell-Zell-Kontakte, also der interkalierenden Disks (ID) und der Gap-Junctions, vermutet, welche zu einem Ablösen der Kardiomyozyten voneinander führt und durch

unzureichende Reparaturvorgänge einen fibrösen Umbau des Gewebes mit Fettablagerungen hervorruft. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden die Arrhythmien von ARVC-Patienten daher zumeist als eine Folge der morphologischen Veränderungen interpretiert, die eine korrekte Reizweiterleitung behindert ^{17, 23, 60}.

Inzwischen werden jedoch weitere Mechanismen vermutet, die zum Auftreten von Arrhythmien bei ARVC-Patienten beitragen können. Grund hierfür sind eine wachsende Anzahl von Publikationen, die durch Studien an Menschen und Tieren zeigen konnten, dass elektrophysiologische Veränderungen den strukturellen Veränderungen vorausgehen ^{28, 61, 62}.

In einem transgenen Mausmodell der ARVC mit Überexpression eines mutierten Desmoglein-2 Gens (Dsg2-N271S) konnten an den isolierten Herzen der Mäuse (Apparatur nach Langendorff) eine gestörte ventrikuläre Reizweiterleitung und eine gesteigerte arrhythmogene Anfälligkeit nachgewiesen werden, bevor Nekrosen oder ein fibröser Umbau innerhalb der Herzen nachweisbar war ²⁸.

Analog dazu zeigte eine kombinierte Arbeit aus einem Mausmodell (mit genetischer Deletion eines Desmoplakin-Allels) und einer humanen Fall-Kontroll-Studie (zehn Patienten mit heterozygoter Mutation im Desmoplakin-Gen wurden verglichen mit zwölf Patienten mit supraventrikulären Tachykardien), dass bei Maus und Mensch eine Erkrankung des Desmoplakins zu einer Connexin-Fehllokalisierung führt. Dies führte zu signifikanten Änderungen der Repolarisations-Kinetik des Reizleitungssystems, bevor morphologische Änderungen bei der konventionellen Herzbildgebung (humane Fall-Kontroll-Studie) bzw. bei der histologischen Untersuchung der Herzen (murine Deletionsstudie) festgestellt werden konnten ⁶¹.

Gemeinsam mit den Daten der Studie, die im Rahmen dieser Dissertation vorgestellt wird, legt dies nahe, dass Veränderungen der Kardiomyozyten auf Einzelzellniveau bei ARVC-Patienten die Erregungsleitung beeinträchtigen kann - unabhängig von bestehenden strukturellen Veränderungen des Myokards. Das Krankheitsverständnis bezüglich des Auftretens von Arrhythmien bei ARVC-Patienten kann dadurch erweitert werden. Schließlich könnte dadurch zukünftig die Diagnostik der ARVC weiterentwickelt werden.

Obwohl sich unser Verständnis der pathophysiologischen Hintergründe der ARVC in den letzten Jahren weiterentwickelt hat und wir insbesondere hinsichtlich der Struktur- und Stoffwechselfehlfunktionen einige Erkenntnisse zu verzeichnen haben, müssen besonders die Veränderungen der zellulären Elektrophysiologie noch geklärt werden. Aufgrund des Hindernisses kontrahierende menschliche Herzmuskelzellen für elektrophysiologische Untersuchungen zu erhalten, fehlen Daten über die zelluläre Elektrophysiologie bei nativen menschlichen Kardiomyozyten von ARVC-Patienten.

In der jüngeren Vergangenheit wurden bereits einige Studien veröffentlicht, in denen unter Verwendung von hiPSC-CMs verschiedener ARVC-Patienten mit bekannten PKP2-Mutationen erfolgreich ein ARVC-Zellkulturmodell etabliert werden konnte, welches den Phenotyp der Erkrankung widerspiegelte und pathophysiologische Aspekte näher beleuchtete. Eine solche Studie konnte nachweisen, dass bei ARVC-hiPSC-CMs (mit Mutationen in den Nukleotiden p.Ala325Cys und p.Thr50Ser des PKP2-Gens) der Proteingehalt des desmosomalen Proteins Plakoglobin und des Gap-Junction-Proteins Connexin-43 reduziert war, dass die Anstiegszeit der Feldpotentiale verlängert war und dass sich die Desmosomen verbreitert und verzerrt darstellten ³². In ähnlicher Weise konnte in einer anderen Studie beobachtet werden, dass die ARVC-hiPSC-CMs (mit einer Missense-Mutation im Nukleotid p.Leu614Pro des PKP2-Gens) einen verringerten Spiegel der Proteine Plakophilin-2 und Plakoglobin aufwiesen und dass sie sich in der morphologischen Analyse vergrößert und mit mehr Lipidansammlungen präsentierten ³³. Bei Untersuchungen des Metabolismus in hiPSC-CMs eines ARVC-Patienten (mit einer Mutation im Nukleotid p.Gly894Gly des PKP2-Gens) zeigten sich eine verminderte β -Catenin-Aktivität sowie eine abnormale Koaktivierung der Alpha- und Gamma-Untereinheiten des Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptors (PPAR α /PPAR γ) ²⁶. Da für PPAR γ eine wichtige regulatorische Funktion im Glukosemetabolismus und in der Fettspeicherung bekannt ist ⁶³, kann diese Veränderung des Stoffwechsels mitverantwortlich für die oben genannten Lipidansammlungen sein.

In der Zusammenschau dieser Studien ergibt sich die Schlussfolgerung, dass patientenspezifische hiPSC-CMs mit bekannten Mutationen im PKP2-Gen eine gute Möglichkeit bieten, um den Phänotyp der ARVC nachzubilden. Der Fokus dieser Studien lag dabei jedoch meist auf der Nachbildung und Untersuchung von morphologischen und metabolischen Aspekten der Krankheit.

Die vorliegende Studie dieser Dissertation hat sich daher zum Ziel gesetzt, die elektrophysiologischen Eigenschaften der ARVC auf Einzelzellebene zu untersuchen und die Mechanismen aufzudecken, welche unabhängig von strukturellen Veränderungen des Myokards zu Arrhythmien bei ARVC-Patienten führen können. Dafür wurde ein Zellkulturmodell etabliert, das unter Verwendung von hiPSC-CMs eines ARVC-Patienten (mit einer Mutation im Nukleoid p.Gly6389Arg des DSG2-Gens) den Phänotyp der Erkrankung widerspiegelte.

4.2 Unveränderte Desmoglein-2-Konzentration

Sowohl die mittels Western-Blot bestimmte DSG2-Proteinkonzentration als auch die in PCR-Analysen gemessene Genexpressionsrate für DSG2 zeigte sich dabei in den ARVC-hiPSC-CMs unverändert, was nahe legt, dass die Mutation des Studienpatienten nicht zu einer Reduktion der Proteinmenge, sondern zu einer Fehlfunktion des DSG2-Proteins führt. Ob in den untersuchten Zellen dieser Arbeit ebenfalls strukturelle oder metabolische Fehlfunktionen nachweisbar sind, wie sie bei den zuvor zitierten Studien mit PKP2-genmutierten Zellreihen gefunden wurden, ist Gegenstand zukünftiger Studien.

4.3 Abnormale Aktionspotentialeigenschaften

Der erste Schritt der elektrophysiologischen Untersuchungen der ARVC-Zelllinie und der zwei Zelllinien gesunder Spender galt der Aufnahme von Aktionspotentialen und deren Charakterisierung anhand der gängigen AP-Parameter (APA, APD, RP, V_{max}).

Dabei konnten bei den ARVC-hiPSC-CMs abnormale Aktionspotentiale beobachtet werden. Es zeigten sich eine reduzierte APA und eine reduzierte V_{max} im direkten Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe (siehe Kapitel 3.4.1). In Anbetracht der Bedeutung dieser Parameter (besonders V_{max}) für die korrekte Reizweiterleitung innerhalb und zwischen den Kardiomyozyten, kann dies per se eine mögliche Erklärung für das Auftreten von Reizleitungsdysfunktionen bei ARVC-Patienten liefern.

In der Zusammenschau mit den zuvor genannten Studien weisen diese Beobachtungen daher bereits auf eine mögliche Schlüsselrolle der zellulären elektrophysiologischen Fehlfunktionen in der Pathogenese der ARVC hin, welche als unabhängig von dem zumeist diskutierten Mechanismus der gestörten Reizweiterleitung in morphologisch veränderten Arealen gilt.

4.4 Unterschiede der Ionenkanalströme

Um die Ursache für die beobachteten Änderungen der Aktionspotentiale (Reduktion der APA und V_{\max} ohne Einfluss auf die APD) aufzudecken, wurden als nächstes die elektrophysiologischen Untersuchungen der Zelllinien durch Messungen der Ionenkanalströme erweitert.

Wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, lieferten diese Messungen den Nachweis von veränderten Ionenkanalströmen bei den ARVC-hiPSC-CMs gegenüber den Zellen der gesunden Spender. Es wurde ein reduzierter Ionenkanalstrom von I_{Na} , I_{to} , I_{SK} , I_{KATP} und I_{NCX} sowie ein erhöhter Ionenkanalstrom von I_{Kr} beobachtet.

Dabei kommt vor allem dem reduzierten I_{Na} -Ionenkanalstrom eine besondere Bedeutung zu, da dieser einerseits als Erklärung für die reduzierte V_{\max} und die reduzierte APA herangezogen werden kann (also potentiell verantwortlich für die Arrhythmogenese der ARVC ist) und andererseits im Einklang mit den Messergebnissen in der zuvor erwähnten transgenen Mausmodell-Studie (DSG2-N271S) steht ²⁸. Hinsichtlich der übrigen beschriebenen Unterschiede der Ionenkanalströme ist hervorzuheben, dass sich ihre Effekte vermutlich aufgrund gegensätzlicher Auswirkungen auf die Aktionspotentiale annihilieren. Während ein reduzierter I_{NCX} und ein erhöhter I_{Kr} die APD verkürzen können, wirken sich ein reduzierter Ionenkanalstrom von I_{to} , I_{SK} und I_{KATP} hingegen prolongierend auf die APD aus. In der Summe der Effekte führte dies dazu, dass sich die APD in den ARVC-hiPSC-CMs nicht verändert darstellte (vgl. Kapitel 3.4.1).

Die Tatsache, dass sich bei den ARVC-hiPSC-CMs dieser Studie Änderungen in diversen Ionenkanälen und in unterschiedlichem Ausmaß nachweisen ließen, lässt vermuten, dass bei ARVC-Patienten mit anderen Genmutationen auch sehr unterschiedliche Ionenkanalveränderungen möglich sind. Die APD könnte sich daher

bei anderen Patienten verändert darstellen. Tatsächlich konnten durch minimalinvasive kardiale elektrophysiologische Untersuchungen (EPU) bereits verlängerte epikardiale Activation-Recovery-Intervalle (ein Ersatz für die lokale APD) und verlängerte ventrikuläre Aktivierungszeiten bei ARVC-Patienten dokumentiert werden, was laut den Autoren eine elektrophysiologische Komponente der ARVC wahrscheinlich macht ⁶⁴.

Die Zusammenschau dieser klinischen Beobachtungen mit den Messergebnissen dieser Dissertation erlaubt die Schlussfolgerung, dass Ionenkanaldysfunktionen für die Arrhythmogenese der ARVC verantwortlich sein können.

4.5 Unterschiede der Genexpressionsraten

Zusätzlich erfolgte mittels PCR eine quantitative Analyse der mRNA-Konzentrationen von den Untereinheiten der kardialen Ionenkanäle. Diese Messungen sollten dem Erkenntnisgewinn bezüglich der Fragestellung dienen, ob die zuvor beschriebenen Veränderungen der Ionenkanalströme das Resultat einer abnormalen Genexpressionsrate bei den ARVC-hiPSC-CMs sein könnten.

Die SCN5A-Genexpression zeigte sich in der ARVC-Zellreihe vermindert und kann eine Ursache für den reduzierten I_{Na} -Ionenkanalstrom sein. Bezüglich der übrigen gemessenen Expressionsraten der Ionenkanaluntereinheiten lieferten die durchgeführten PCR-Experimente keine ausreichende Erklärung für die zuvor beschriebenen elektrophysiologischen Unterschiede.

4.6 Intermolekulare Wechselwirkungen

Die zuvor beschriebenen und diskutierten Ergebnisse werfen die Frage auf, wie eine Mutation im kodierenden Gen von Desmoglein-2 (G-zu-A-Substitution des Nukleotids p.Gly6389Arg), also einem desmosomalen Protein, so weitreichende Veränderungen verschiedener kardialer Ionenkanalströme und deren Genexpressionsraten hervorrufen kann.

Für das Protein PKP2, welches (wie zuvor beschrieben) bei der ARVC am häufigsten von Mutationen betroffen ist, konnte bereits nachgewiesen werden, dass es gemeinsam mit SCN5A, Connexin-43 und Ankyrin-G (AnkG) kolokalisiert ist und einen funktionellen Komplex bildet³⁰. Diese intermolekulare Wechselwirkungen konnten durch weitere Studien belegt werden: Bei neonatalen Kardiomyozyten von Ratten wurde durch Zugabe bestimmter Oligonukleotide die Expression von PKP2 beeinflusst, und somit verschiedene Zellkulturreihen erstellt, welche anschließend durch Patch-Clamp, Optical-Mapping und immunhistochemische Untersuchungen analysiert wurden^{31, 65}. Eine Reduzierung der PKP2-Expression führte dabei zu einer verminderten interzellulären Bindungsstärke der Gap-Junctions⁶⁵, sowie zu einer Veränderung der Strömungseigenschaften kardialer Natriumkanäle und der Weiterleitung der Aktionspotentiale³¹.

Gemeinsam mit den Ergebnissen dieser Dissertationsschrift stützt dies die Hypothese, dass molekulare Wechselwirkungen zwischen Ionenkanaluntereinheiten und desmosomalen Proteinen (wie PKP2 und DSG2) existieren.

4.7 Gesteigerte Sensitivität gegenüber adrenerger Stimulation

Im Anschluss an die elektrophysiologischen Untersuchungen unter Standardbedingungen wurden die Patch-Clamp-Messungen auf ein weiteres Themengebiet ausgeweitet: Da aus klinischen Beobachtungen bekannt ist, dass ARVC-Patienten besonders häufig unter körperlicher Anstrengung Arrhythmien erleiden, liegt eine Beteiligung der adrenergen Stimulation nahe¹⁸. Das derzeit gängige Krankheitsmodell der ARVC führt dies auf eine erhöhte Dehnung während der starken und schnellen Herzkontraktionen beim Sport zurück, welche die bereits geschädigten Zell-Zell-Kontakte der Kardiomyozyten zusätzlich belastet und die korrekte Reizweiterleitung unterbricht. Im Rahmen dieser Studie sollte geprüft werden, ob die Sensitivität der ARVC-hiPSC-CMs gegenüber adrenerger Stimulation verändert ist.

Aus diesem Grund erfolgte die Etablierung eines Zellkulturmodells zur Simulierung von Sport, was durch die Applikation verschiedener Isoprenalin-Konzentrationen auf die vereinzelt Kardiomyozyten umgesetzt wurde. Hierbei konnte für alle Zellreihen beobachtet werden, dass die Applikation von Isoprenalin eine APD-Verkürzung

hervorrufft, welche im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Beziehung von der Isoprenalin-Konzentration abhängig war. Durch das Wiederholen der Messungen verschiedener Ionenkanal-Ströme unter der Wirkung von Isoprenalin konnte eine gesteigerte Inhibition des I_{NCX} als Auslöser für die APD-Verkürzung aufgedeckt werden (vgl. Kapitel 3.4.3). Obwohl sich bezüglich der basalen APD keine signifikanten Unterschiede zwischen den beschriebenen Zellreihen finden ließen, präsentierte sich sowohl die Isoprenalin-bedingte Inhibition des I_{NCX} als auch die daraus resultierende Verkürzung der APD bei den ARVC-hiPSC-CMs in einem signifikant höheren Ausmaß als bei den gesunden Zelllinien. Diese Daten lassen sich mit einer bereits zuvor zitierten Studie vereinbaren, in der eine Koaktivierung der Alpha- und Gamma-Untereinheit des Peroxisomen-Proliferator aktivierten Rezeptors (PPAR α /PPAR γ) in hiPSC-CMs eines ARVC-Patienten (mit einer Mutation im Nukleotid p.Gly894Gly des PKP2-Gens) nachgewiesen wurde und mit einer verlängerten APD bei jedoch ebenfalls unveränderter basaler APD assoziiert wurde ²⁶. Die Daten dieser Studie legen die Vermutung nahe, dass nicht ausschließlich Ionenkanalfehlfunktionen eine Rolle für das Auftreten der Arrhythmien bei ARVC-Patienten haben, sondern auch andere Kofaktoren.

Da sowohl für Verlängerungen als auch für Verkürzungen der APD bekannt ist, dass sie Arrhythmien auslösen können, bieten die hier dargestellten Ergebnisse eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Anfälligkeit von ARVC-Patienten im Rahmen von körperlicher Belastung Arrhythmien zu erleiden. Tatsächlich konnten durch Messungen des Kalzium-Transienten in Anwesenheit von Isoprenalin nachgewiesen werden, dass die Häufigkeit von Isoprenalin-induzierten arrhythmogenen Ereignissen (EAD-like oder DAD-like Events) bei den ARVC-hiPSC-CMs signifikant höher ist (vgl. Kapitel 3.4.4).

Das hier beschriebene Zellkulturmodell zur Simulation von Sport lieferte also (i) den Hinweis für eine gesteigerte Sensitivität der ARVC-Zelllinie gegenüber adrenerger Stimulation, (ii) den Nachweis einer daraus resultierenden erhöhten arrhythmogenen Anfälligkeit und darüber hinaus (iii) eine mögliche Erklärung für die Ursache dieser Phänomene, nämlich eine gesteigerte Isoprenalin-induzierte Inhibition des I_{NCX} bei den ARVC-Zellen, welche zu einer stärkeren Verkürzung der APD in Anwesenheit von Isoprenalin führte.

4.8 „from bench to bedside“ – Konsequenzen für Patienten

Vor allem die aufgedeckten Mechanismen, die eine mögliche Erklärung für die Häufung maligner Arrhythmien im Rahmen von körperlich anstrengenden Tätigkeiten bietet, könnten in einigen Jahren zu einem pharmakologischen Therapie- bzw. Präventionskonzept für sporttreibende ARVC-Patienten beitragen. Es gilt nun durch weitere Studien herauszufinden, ob sich die beschriebenen Phänomene in Zellreihen von Patienten mit anderen Mutationen replizieren lassen und inwieweit eine Übertragung auf adulte humane Kardiomyozyten möglich ist. Im Anschluss könnten, auch mithilfe des hier vorgestellten hiPSC-CMs-Zellkulturmodell der ARVC, Wirksamkeitsstudien von Ionenkanal-modulierenden Pharmaka stattfinden.

Zunächst leitet sich daraus jedoch die Empfehlung ab, dass Patienten mit einer ARVC jegliche Form von Katecholamin-Stress (emotionaler oder physischer Art) meiden sollten, da dies aufgrund einer erhöhten Sensitivität kardialer Ionenkanäle zum Auftreten von Arrhythmien führen kann. Darüber hinaus könnte eine prophylaktische Gabe von Betablockern und/oder anderen antiarrhythmischen Medikamenten (z.B. I_{Kr} -Blocker wie Sotalol oder Nifekalant) einen positiven Effekt auf die Symptomlast oder das Outcome der Patienten aufweisen.

Unabhängig davon tragen die vorliegenden Ergebnisse zu einem verbesserten Verständnis der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie bei, in welchem die Entstehung der Arrhythmien nicht mehr allein als eine Folge der stattfindenden Umbaumaßnahmen des Myokards interpretiert wird.

4.9 Limitationen

4.9.1 Humane induzierte pluripotente Stammzellen

Auf die vorteilhaften Eigenschaften, die humane induzierte pluripotente Stammzellen aufweisen und die sie als Modellsystem für die Untersuchung menschlicher Krankheiten qualifizieren, wurde bereits in der Einleitung dieser Arbeit eingegangen. Da sie menschlichen Ursprungs sind, tragen sie menschliche Genome. Aufgrund der Pluripotenz können sie grundsätzlich in jeden somatischen Zelltyp des menschlichen Körpers differenziert werden und als Stammzellen können sie theoretisch unendlich viele identische Zellnachkommen generieren^{34, 40, 41}. Bei der Verwendung solcher

patientenspezifischer hiPSC als Zellkulturmodell einer bestimmten Krankheit existieren jedoch einige Limitationen, welche bei der kritischen Auseinandersetzung mit der Methodik dieser Arbeit zu diskutieren sind.

Zwar besitzen die patientenspezifischen hiPSC das gleiche Genom wie die Fibroblasten des Spenders, aus dessen Hautbiopsie sie gewonnen wurden, in welchem Ausmaß die verschiedenen Reprogrammierungsverfahren und das gesamte Zellkultursystem jedoch epigenetische Einflüsse nehmen, ist noch nicht ausreichend erforscht ⁶⁶.

Auch die am Ende des Differenzierungsprotokolls erhaltenen Zellen weisen gegenüber adulten humanen Kardiomyozyten einige Unterschiede auf, die eine Übertragung der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus limitieren. Zahlreiche Studien kamen zu der Schlussfolgerung, dass hiPSC-CMs, wie sie im Rahmen dieser Studie verwendet wurden, in vielerlei Hinsicht eher mit fetalen als mit adulten Kardiomyozyten vergleichbar sind ^{26, 66-69}. Im Blick auf die Morphologie äußerte sich dies beispielsweise durch eine rundere und kürzere Form, einem geringeren Länge-zu-Breite-Verhältnis und einem mononukleären Erscheinungsbild der hiPSC-CMs gegenüber den langen, zylindrischen und meist polynukleären adulten Kardiomyozyten ^{66, 68}. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Struktur des sarkoplasmatischen Retikulums und die Dichte der Quertubuli bei hiPSC-CMs denen fetaler Kardiomyozyten ähneln, was gegenüber adulten Kardiomyozyten zu Unterschieden im zellulären Kalzium-Handling führt ⁶⁶. Darüber hinaus wurden in differenzierten hiPSC-CMs weniger Mitochondrien als in adulten Kardiomyozyten nachgewiesen, was in Bezug auf den Metabolismus zu einem geringeren Anteil der β -Oxidation und einer höheren Abhängigkeit von der Glykolyse führte ^{26, 66}.

Bei der Diskussion der Methoden ist auch zu berücksichtigen, dass im Rahmen der morphologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen dieser Studie immer mit vereinzelt Zellen gearbeitet wurde, welche sowohl aus physiologischer als auch aus pathophysiologischer Sicht nicht mit dem Organ Herz als Ganzem zu vergleichen sind. So bleibt schließlich die Frage offen, inwieweit die unter kontrollierten Laborbedingungen gewonnenen Daten von vereinzelt Zellen übertragbar sind auf

komplexe Gewebe eines Organismus, welcher ständig wechselnden systemischen Einflüssen ausgesetzt ist.

Dennoch bieten hiPSC-CMs eine beispiellose Möglichkeit, phänotypische Eigenschaften einer Krankheit zu modellieren und auf der Ebene von einzelnen Zellen morphologisch und elektrophysiologisch zu untersuchen.

4.9.2 Individuelle Unterschiede

Zwar wurde bei der Planung aller Experimente dieser Studie auf eine hohe Anzahl biologischer Replikate aus jeweils verschiedenen Zellkulturpassagen und Differenzierungsreihen geachtet, letztlich ist jedoch die Tatsache, dass die hiPSC-CMs von nur einem ARVC-Patienten und von nur zwei gesunden Spendern stammen als Studienlimitation aufzuführen. Aus diesem Grund können individuelle Unterschiede als Ursache der gewonnenen Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden.

Neben der Rekrutierung weiterer Spender und einer damit einhergehenden Vergrößerung des „Patientenkollektivs“ bestehen für zukünftige Studien noch weitere Möglichkeiten, um individuelle Unterschiede durch ein erweitertes Studiendesign ausschließen zu können. Durch Bearbeitung des Genoms der hiPSC-Linien kann die (mutmaßlich) krankheitsassoziierte Mutation sowohl korrigiert werden als auch in eine Wildtyp-hiPSC-Linie eingebracht werden. Das rigoroseste Studiendesign wäre demnach dasjenige, in dem mindestens die vier folgenden hiPSC-Zelllinien miteinander verglichen werden: (i) eine patientenspezifische hiPSC-Zelllinie eines ARVC-Patienten mit Desmoglein-2-Mutation, (ii) eine hiPSC-Zelllinie des gleichen ARVC-Patienten mit Korrektur der Desmoglein-2-Mutation, (iii) eine hiPSC-Zelllinie eines gesunden Spenders und (iv) eine hiPSC-Zelllinie des gleichen gesunden Spenders mit eingebrachter Mutation des Desmoglein-2-Gens. Das Paaren (engl. „matchen“) von gesundem Spender und ARVC-Patienten nach Alter, Geschlecht, Ethnizität und ggf. weiteren Gesichtspunkten kann dabei die Qualität der Studie noch weiter erhöhen ⁶⁶.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ist eine seltene und unheilbare Herzkrankheit, welche durch ventrikuläre Tachyarrhythmien, den voranschreitenden Verlust von Kardiomyozyten und einer damit einhergehenden Einlagerung von Binde- und Fettgewebe in das Herzmuskelgewebe charakterisiert ist. Die ARVC ist eine der führenden Ursachen des plötzlichen Herztodes, wobei erkrankte junge Athleten besonders gefährdet sind. Die exakten pathophysiologischen Mechanismen der Krankheit wurden noch nicht aufgedeckt.

Zwar wurden inzwischen einige strukturelle und metabolische Dysfunktionen erforscht, elektrophysiologische Daten von betroffenen Kardiomyozyten fehlen jedoch noch. Aufgrund des Hindernisses native humane Kardiomyozyten für eine solche Studie zu gewinnen, bieten Kardiomyozyten, welche aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen eines ARVC-Patienten generiert wurden (sogenannte hiPSC-CMs), eine beispiellose Möglichkeit, die zelluläre Elektrophysiologie der Krankheit zu erforschen.

Dafür wurden im Rahmen dieser Studie hiPSC-CMs aus Hautproben von einem ARVC-Patienten mit einer Desmoglein-2-Mutation generiert und mit Zellen von zwei gesunden Spendern verglichen. Mittels Patch-Clamp-Technik, Kalzium-Fluoreszenz, Polymerase-Kettenreaktion, Immunfluoreszenz und Western-Blot wurden experimentelle Daten gewonnen.

Es konnten diverse Unterschiede zwischen den beschriebenen Zellreihen gefunden werden. So zeigte sich die Amplitude (APA) und die maximale Aufstrom-Geschwindigkeit (V_{max}) der Aktionspotentiale bei den ARVC-hiPSC-CMs reduziert, wobei die Dauer (APD) und das Ruhemembranpotential (RP) der Aktionspotentiale unverändert war. Die reduzierten Parameter (APA und V_{max}) resultierten aus einem niedrigeren Peak-Natrium-Ionenkanalstrom (I_{Na}) bei der ARVC-Zellreihe. Der Grund für fehlende Unterschiede in den Parametern APD und RP könnte durch die folgenden entgegenwirkenden Ionenkanaldysfunktionen zu erklären sein. Die Ströme des transienten Ausstrom-Kaliumkanals (I_{to}), des ATP-abhängigen Kaliumkanals (I_{KATP}) und des kalziumaktivierten Kaliumkanals (I_{SK}) waren in den ARVC-Zellen reduziert, was die APD verlängern kann. Dahingegen war der Strom des gering verzögerten

gleichrichtenden Kaliumkanals (I_{Kr}) erhöht und der Strom des Natrium-Kalzium-Austauschers (I_{NCX}) reduziert, was eine Verkürzung der APD hervorrufen kann.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Isoprenalin (Iso) in allen untersuchten Zellreihen zu einer Verkürzung der APD und einer Inhibition des I_{NCX} -Stroms führte, wobei die Effekte von Iso in den ARVC-hiPSC-CMs stärker ausgeprägt waren. Die Kardiomyozyten der ARVC-Zellreihe zeigte häufiger arrhythmogene Ereignisse, was durch eine höhere Sensitivität gegenüber adrenerger Stimulation erklärt werden kann.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass im Rahmen dieser Studie zum ersten Mal ein ARVC-Zellkulturmodell eines Patienten mit einer Desmoglein-2-Mutation etabliert und zur elektrophysiologischen Charakterisierung der Krankheit verwendet wurde. In den ARVC-hiPSC-CMs wurden abnormale Aktionspotentiale, diverse Ionenkanalfehlfunktionen und eine erhöhte Sensitivität gegenüber adrenerger Stimulation nachgewiesen.

Die Daten dieser Studie erweitern das bisherige Verständnis der Entstehungsmechanismen der Arrhythmien von ARVC-Patienten durch einige elektrophysiologische Fehlfunktionen auf dem Einzelzellniveau und könnten in der Zukunft zur Entwicklung einer Therapie der Krankheit beitragen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Destatis Statistisches Bundesamt: Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen. [online] Available at: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HerzKreislaufErkrankungen.html> [Accessed 22 Jan. 2019].
2. Adrian, L, Werner, C, Laufs, U: [ESC Guidelines 2016 - Heart Failure]. *Dtsch Med Wochenschr*, 142: 1123-1127, 2017.
3. Martens, E, Sinner, MF, Siebermair, J, Raufhake, C, Beckmann, BM, Veith, S, Duvel, D, Steinbeck, G, Kaab, S: Incidence of sudden cardiac death in Germany: results from an emergency medical service registry in Lower Saxony. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*, 16: 1752-1758, 2014.
4. Asakura, M, Kitakaze, M: [Classification of cardiomyopathy]. *Masui*, 63: 5-15, 2014.
5. Pelliccia, F, Limongelli, G, Autore, C, Gimeno-Blanes, JR, Basso, C, Elliott, P: Sex-related differences in cardiomyopathies. *International journal of cardiology*, 2018.
6. Lakdawala, NK, Winterfield, JR, Funke, BH: Dilated cardiomyopathy. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology*, 6: 228-237, 2013.
7. Felker, GM, Thompson, RE, Hare, JM, Hruban, RH, Clemetson, DE, Howard, DL, Baughman, KL, Kasper, EK: Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *The New England journal of medicine*, 342: 1077-1084, 2000.
8. Taylor, DO, Edwards, LB, Boucek, MM, Trulock, EP, Aurora, P, Christie, J, Dobbels, F, Rahmel, AO, Keck, BM, Hertz, MI: Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult heart transplant report--2007. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 26: 769-781, 2007.
9. Authors/Task Force, m, Elliott, PM, Anastasakis, A, Borger, MA, Borggrefe, M, Cecchi, F, Charron, P, Hagege, AA, Lafont, A, Limongelli, G, Mahrholdt, H, McKenna, WJ, Mogensen, J, Nihoyannopoulos, P, Nistri, S, Pieper, PG, Pieske, B, Rapezzi, C, Rutten, FH, Tillmanns, C, Watkins, H: 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal*, 35: 2733-2779, 2014.
10. Morita, H, Rehm, HL, Menesses, A, McDonough, B, Roberts, AE, Kucherlapati, R, Towbin, JA, Seidman, JG, Seidman, CE: Shared genetic causes of cardiac hypertrophy in children and adults. *The New England journal of medicine*, 358: 1899-1908, 2008.
11. Schutte, DP, Essop, MR: Clinical profile and outcome of idiopathic restrictive cardiomyopathy. *Circulation*, 103: E83, 2001.
12. Paule, P, Braem, L, Mioulet, D, Jop, B, Theron, A, Gil, JM, Heno, P, Fourcade, L: [Left ventricular noncompaction: a cardiomyopathy in young individuals. Description of first cases in Africa]. *Med Trop (Mars)*, 67: 587-593, 2007.
13. Sarma, RJ, Chana, A, Elkayam, U: Left ventricular noncompaction. *Progress in cardiovascular diseases*, 52: 264-273, 2010.

14. Dias, A, Nunez Gil, IJ, Santoro, F, Madias, JE, Pelliccia, F, Brunetti, ND, Salmoirago-Blotcher, E, Sharkey, SW, Eitel, I, Akashi, YJ, El-Battrawy, I, Franco, E, Akin, I, Jaguszewski, M, Dawson, D, Figueredo, VM, Napp, LC, Christensen, TE, Hebert, K, Ben-Dor, I, Ozaki, Y, Garcia-Garcia, HM, Kajita, AH, Akasaka, T, Kurisu, S, Lerman, A, Waksman, R: Takotsubo syndrome: State-of-the-art review by an expert panel - Part 1. *Cardiovasc Revasc Med*, 2018.
15. Huseynov, A, El-Battrawy, I, Ansari, U, Schramm, K, Zhou, X, Lang, S, Borggrefe, M, Akin, I: Age related differences and outcome of patients with Takotsubo syndrome. *J Geriatr Cardiol*, 14: 632-638, 2017.
16. Xu, Z, Zhu, W, Wang, C, Huang, L, Zhou, Q, Hu, J, Cheng, X, Hong, K: Genotype-phenotype relationship in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by desmosomal gene mutations: A systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*, 7: 41387, 2017.
17. Herren, T, Gerber, PA, Duru, F: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a not so rare "disease of the desmosome" with multiple clinical presentations. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*, 98: 141-158, 2009.
18. Rojas, A, Calkins, H: Present understanding of the relationship between exercise and arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Trends in cardiovascular medicine*, 25: 181-188, 2015.
19. Pinamonti, B, Dragos, AM, Pyxaras, SA, Merlo, M, Pivetta, A, Barbati, G, Di Lenarda, A, Morgera, T, Mestroni, L, Sinagra, G: Prognostic predictors in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: results from a 10-year registry. *European heart journal*, 32: 1105-1113, 2011.
20. Akdis, D, Brunckhorst, C, Duru, F, Saguner, AM: Arrhythmogenic Cardiomyopathy: Electrical and Structural Phenotypes. *Arrhythmia & electrophysiology review*, 5: 90-101, 2016.
21. Marcus, FI, Edson, S, Towbin, JA: Genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a practical guide for physicians. *Journal of the American College of Cardiology*, 61: 1945-1948, 2013.
22. Meyer, S, van der Meer, P, van Tintelen, JP, van den Berg, MP: Sex differences in cardiomyopathies. *European journal of heart failure*, 16: 238-247, 2014.
23. Basso, C, Corrado, D, Marcus, FI, Nava, A, Thiene, G: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet*, 373: 1289-1300, 2009.
24. Asimaki, A, Tandri, H, Huang, H, Halushka, MK, Gautam, S, Basso, C, Thiene, G, Tsatsopoulou, A, Protonotarios, N, McKenna, WJ, Calkins, H, Saffitz, JE: A new diagnostic test for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *The New England journal of medicine*, 360: 1075-1084, 2009.
25. Corrado, D, Basso, C, Pilichou, K, Thiene, G: Molecular biology and clinical management of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Heart*, 97: 530-539, 2011.
26. Kim, C, Wong, J, Wen, J, Wang, S, Wang, C, Spiering, S, Kan, NG, Forcales, S, Puri, PL, Leone, TC, Marine, JE, Calkins, H, Kelly, DP, Judge, DP, Chen, HS: Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature*, 494: 105-110, 2013.
27. Hamid, MS, Norman, M, Quraishi, A, Firoozi, S, Thaman, R, Gimeno, JR, Sachdev, B, Rowland, E, Elliott, PM, McKenna, WJ: Prospective evaluation of relatives for familial arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia reveals a need to broaden diagnostic criteria. *Journal of the American College of Cardiology*, 40: 1445-1450, 2002.

28. Rizzo, S, Lodder, EM, Verkerk, AO, Wolswinkel, R, Beekman, L, Pilichou, K, Basso, C, Remme, CA, Thiene, G, Bezzina, CR: Intercalated disc abnormalities, reduced Na(+) current density, and conduction slowing in desmoglein-2 mutant mice prior to cardiomyopathic changes. *Cardiovascular research*, 95: 409-418, 2012.
29. Delmar, M: The intercalated disk as a single functional unit. *Heart rhythm*, 1: 12-13, 2004.
30. Sato, PY, Coombs, W, Lin, X, Nekrasova, O, Green, KJ, Isom, LL, Taffet, SM, Delmar, M: Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc. *Circulation research*, 109: 193-201, 2011.
31. Sato, PY, Musa, H, Coombs, W, Guerrero-Serna, G, Patino, GA, Taffet, SM, Isom, LL, Delmar, M: Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circulation research*, 105: 523-526, 2009.
32. Caspi, O, Huber, I, Gepstein, A, Arbel, G, Maizels, L, Boulos, M, Gepstein, L: Modeling of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with human induced pluripotent stem cells. *Circulation Cardiovascular genetics*, 6: 557-568, 2013.
33. Ma, D, Wei, H, Lu, J, Ho, S, Zhang, G, Sun, X, Oh, Y, Tan, SH, Ng, ML, Shim, W, Wong, P, Liew, R: Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *European heart journal*, 34: 1122-1133, 2013.
34. Yu, J, Vodyanik, MA, Smuga-Otto, K, Antosiewicz-Bourget, J, Frane, JL, Tian, S, Nie, J, Jonsdottir, GA, Ruotti, V, Stewart, R, Slukvin, II, Thomson, JA: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318: 1917-1920, 2007.
35. Zhang, J, Wilson, GF, Soerens, AG, Koonce, CH, Yu, J, Palecek, SP, Thomson, JA, Kamp, TJ: Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circulation research*, 104: e30-41, 2009.
36. Yamanaka, S, Blau, HM: Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*, 465: 704-712, 2010.
37. Takahashi, K, Yamanaka, S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676, 2006.
38. Okita, K, Ichisaka, T, Yamanaka, S: Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448: 313-317, 2007.
39. Wernig, M, Meissner, A, Foreman, R, Brambrink, T, Ku, M, Hochedlinger, K, Bernstein, BE, Jaenisch, R: In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 448: 318-324, 2007.
40. Park, IH, Zhao, R, West, JA, Yabuuchi, A, Huo, H, Ince, TA, Lerou, PH, Lensch, MW, Daley, GQ: Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451: 141-146, 2008.
41. Takahashi, K, Tanabe, K, Ohnuki, M, Narita, M, Ichisaka, T, Tomoda, K, Yamanaka, S: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131: 861-872, 2007.
42. Ghaedi, M, Niklason, LE, Williams, J: Development of Lung Epithelium from Induced Pluripotent Stem Cells. *Curr Transplant Rep*, 2: 81-89, 2015.
43. Nguyen, D, Hagg, DA, Forsman, A, Ekholm, J, Nimkingratana, P, Brantsing, C, Kalogeropoulos, T, Zaunz, S, Concaro, S, Brittberg, M, Lindahl, A, Gatenholm, P, Enejder, A, Simonsson, S: Cartilage Tissue Engineering by the 3D

- Bioprinting of iPS Cells in a Nanocellulose/Alginate Bioink. *Scientific reports*, 7: 658, 2017.
44. Tonge, PD, Corso, AJ, Monetti, C, Hussein, SM, Puri, MC, Michael, IP, Li, M, Lee, DS, Mar, JC, Cloonan, N, Wood, DL, Gauthier, ME, Korn, O, Clancy, JL, Preiss, T, Grimmond, SM, Shin, JY, Seo, JS, Wells, CA, Rogers, IM, Nagy, A: Divergent reprogramming routes lead to alternative stem-cell states. *Nature*, 516: 192-197, 2014.
 45. El-Batrawy, I, Lang, S, Zhao, Z, Akin, I, Yucel, G, Meister, S, Patocskai, B, Behnes, M, Rudic, B, Tulumen, E, Liebe, V, Tiburcy, M, Dworacek, J, Zimmermann, WH, Utikal, J, Wieland, T, Borggreffe, M, Zhou, XB: Hyperthermia Influences the Effects of Sodium Channel Blocking Drugs in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *PLoS one*, 11: e0166143, 2016.
 46. Yucel, G, Zhao, Z, El-Batrawy, I, Lan, H, Lang, S, Li, X, Buljubasic, F, Zimmermann, WH, Cyganek, L, Utikal, J, Ravens, U, Wieland, T, Borggreffe, M, Zhou, XB, Akin, I: Lipopolysaccharides induced inflammatory responses and electrophysiological dysfunctions in human-induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *Scientific reports*, 7: 2935, 2017.
 47. Itzhaki, I, Maizels, L, Huber, I, Zwi-Dantsis, L, Caspi, O, Winterstern, A, Feldman, O, Gepstein, A, Arbel, G, Hammerman, H, Boulos, M, Gepstein, L: Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature*, 471: 225-229, 2011.
 48. Larribere, L, Wu, H, Novak, D, Galach, M, Bernhardt, M, Orouji, E, Weina, K, Knappe, N, Sachpekidis, C, Umansky, L, Beckhove, P, Umansky, V, De Schepper, S, Kaufmann, D, Ballotti, R, Bertolotto, C, Utikal, J: NF1 loss induces senescence during human melanocyte differentiation in an iPSC-based model. *Pigment cell & melanoma research*, 28: 407-416, 2015.
 49. Maherali, N, Ahfeldt, T, Rigamonti, A, Utikal, J, Cowan, C, Hochedlinger, K: A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*, 3: 340-345, 2008.
 50. Diecke, S, Lu, J, Lee, J, Termglinchan, V, Kooreman, NG, BurrIDGE, PW, Ebert, AD, Churko, JM, Sharma, A, Kay, MA, Wu, JC: Novel codon-optimized mini-intronic plasmid for efficient, inexpensive, and xeno-free induction of pluripotency. *Scientific reports*, 5: 8081, 2015.
 51. Tiburcy, M, Hudson, JE, Balfanz, P, Schlick, S, Meyer, T, Chang Liao, ML, Levent, E, Raad, F, Zeidler, S, Wingender, E, Riegler, J, Wang, M, Gold, JD, Kehat, I, Wettwer, E, Ravens, U, Dierickx, P, van Laake, LW, Goumans, MJ, Khadjeh, S, Toischer, K, Hasenfuss, G, Couture, LA, Unger, A, Linke, WA, Araki, T, Neel, B, Keller, G, Gepstein, L, Wu, JC, Zimmermann, WH: Defined Engineered Human Myocardium With Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modeling and Repair. *Circulation*, 135: 1832-1847, 2017.
 52. Schmittgen, TD, Livak, KJ: Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*, 3: 1101-1108, 2008.
 53. Trafford, AW, Diaz, ME, Eisner, DA: A novel, rapid and reversible method to measure Ca buffering and time-course of total sarcoplasmic reticulum Ca content in cardiac ventricular myocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 437: 501-503, 1999.
 54. Lorenzon, A, Boffagna, G, Bauce, B, De Bortoli, M, Li Mura, IE, Calore, M, Dazzo, E, Basso, C, Nava, A, Thiene, G, Rampazzo, A: Desmin mutations and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *The American journal of cardiology*, 111: 400-405, 2013.

55. Roux-Buisson, N, Gandjbakhch, E, Donal, E, Probst, V, Deharo, JC, Chevalier, P, Klug, D, Mansencal, N, Delacretaz, E, Cosnay, P, Scanu, P, Extramiana, F, Keller, D, Hidden-Lucet, F, Trapani, J, Fouret, P, Frank, R, Fressart, V, Faure, J, Lunardi, J, Charron, P: Prevalence and significance of rare RYR2 variants in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: results of a systematic screening. *Heart rhythm*, 11: 1999-2009, 2014.
56. van der Zwaag, PA, van Rijsingen, IA, Asimaki, A, Jongbloed, JD, van Veldhuisen, DJ, Wiesfeld, AC, Cox, MG, van Lochem, LT, de Boer, RA, Hofstra, RM, Christiaans, I, van Spaendonck-Zwarts, KY, Lekanne dit Deprez, RH, Judge, DP, Calkins, H, Suurmeijer, AJ, Hauer, RN, Saffitz, JE, Wilde, AA, van den Berg, MP, van Tintelen, JP: Phospholamban R14del mutation in patients diagnosed with dilated cardiomyopathy or arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: evidence supporting the concept of arrhythmogenic cardiomyopathy. *European journal of heart failure*, 14: 1199-1207, 2012.
57. Hall, CL, Sutanto, H, Dalageorgou, C, McKenna, WJ, Syrris, P, Futema, M: Frequency of genetic variants associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in the genome aggregation database. *Eur J Hum Genet*, 26: 1312-1318, 2018.
58. Sonoda, K, Ohno, S, Otuki, S, Kato, K, Yagihara, N, Watanabe, H, Makiyama, T, Minamino, T, Horie, M: Quantitative analysis of PKP2 and neighbouring genes in a patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by heterozygous PKP2 deletion. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology*, 19: 644-650, 2017.
59. van der Zwaag, PA, Jongbloed, JD, van den Berg, MP, van der Smagt, JJ, Jongbloed, R, Bikker, H, Hofstra, RM, van Tintelen, JP: A genetic variants database for arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Hum Mutat*, 30: 1278-1283, 2009.
60. Asimaki, A, Kleber, AG, Saffitz, JE: Pathogenesis of Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *The Canadian journal of cardiology*, 31: 1313-1324, 2015.
61. Gomes, J, Finlay, M, Ahmed, AK, Ciaccio, EJ, Asimaki, A, Saffitz, JE, Quarta, G, Nobles, M, Syrris, P, Chaubey, S, McKenna, WJ, Tinker, A, Lambiase, PD: Electrophysiological abnormalities precede overt structural changes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to mutations in desmoplakin-A combined murine and human study. *European heart journal*, 33: 1942-1953, 2012.
62. Kaplan, SR, Gard, JJ, Protonotarios, N, Tsatsopoulou, A, Spiliopoulou, C, Anastasakis, A, Squarcioni, CP, McKenna, WJ, Thiene, G, Basso, C, Brousse, N, Fontaine, G, Saffitz, JE: Remodeling of myocyte gap junctions in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a deletion in plakoglobin (Naxos disease). *Heart rhythm*, 1: 3-11, 2004.
63. Jones, JR, Barrick, C, Kim, KA, Lindner, J, Blondeau, B, Fujimoto, Y, Shiota, M, Kesterson, RA, Kahn, BB, Magnuson, MA: Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 6207-6212, 2005.
64. Andrews, CM, Srinivasan, NT, Rosmini, S, Bulluck, H, Orini, M, Jenkins, S, Pantazis, A, McKenna, WJ, Moon, JC, Lambiase, PD, Rudy, Y: Electrical and Structural Substrate of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Determined Using Noninvasive Electrocardiographic Imaging and Late

- Gadolinium Magnetic Resonance Imaging. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology*, 10, 2017.
65. Deo, M, Sato, PY, Musa, H, Lin, X, Pandit, SV, Delmar, M, Berenfeld, O: Relative contribution of changes in sodium current versus intercellular coupling on reentry initiation in 2-dimensional preparations of plakophilin-2-deficient cardiac cells. *Heart rhythm*, 8: 1740-1748, 2011.
66. Musunuru, K, Sheikh, F, Gupta, RM, Houser, SR, Maher, KO, Milan, DJ, Terzic, A, Wu, JC, American Heart Association Council on Functional, G, Translational, B, Council on Cardiovascular Disease in the, Y, Council on, C, Stroke, N: Induced Pluripotent Stem Cells for Cardiovascular Disease Modeling and Precision Medicine: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Genom Precis Med*, 11: e000043, 2018.
67. Robertson, C, Tran, DD, George, SC: Concise review: maturation phases of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem cells*, 31: 829-837, 2013.
68. Snir, M, Kehat, I, Gepstein, A, Coleman, R, Itskovitz-Eldor, J, Livne, E, Gepstein, L: Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*, 285: H2355-2363, 2003.
69. Yang, X, Pabon, L, Murry, CE: Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circulation research*, 114: 511-523, 2014.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS DES ANHANGS

ASC	Ascorbinsäure
BSA	bovines Serumalbumin
CHIR99021	[Eigenname / keine Abkürzung]
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFBM	Human Fibroblast Medium
IHC	Immunhistochemie
IWP4	[Eigenname / keine Abkürzung]
KM	kardiales Medium
LMW	Low Molecular Weight
MM	mesodermales Medium
MP	Milchpulver
NTC	no Template Control
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PSS	Standard Patch Solution
ROCK	Rho-assozierte Kinase
RPMI	"Roswell Park Memorial Institute"-Medium
RT	Raumtemperatur
RT-AMV	reverse Transkriptase aus Avian Myeloblastosis Virus
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	serumfreies Medium
SLS	Sodium Lactate Solution
TBS	Tris-buffered Saline
TBST	Tris-buffered Saline with Tween20
TEA-Cl	Tetraethylammonium-Chlorid
TTX	Tetrodotoxin
U	Units, Einheiten
UV	Ultraviolett
WB	Western-Blot
Wnt	[Eigenname / keine Abkürzung]

7 ANHANG

Um den Rahmen der Arbeit nicht zu überschreiten, wurden in Kapitel 2 („Material und Methoden“) lediglich ein kurzer Überblick der verwendeten Methoden aufgeführt. Das folgende Kapitel meiner Dissertationsschrift soll dem tiefgehenden Verständnis dienen und dem Leser ermöglichen, anhand der detaillierten Versuchsprotokolle die praktischen Aspekte der experimentellen Studie zu wiederholen. Bei den Versuchsprotokollen wurde zugunsten der Lesbarkeit bewusst auf die Nennung des vertreibenden Herstellers, dem Firmensitz und der Bestellnummer jedes einzelnen Verbrauchsmaterials verzichtet. Eine Übersicht dieser Daten ist in tabellarischer Form in Kapitel 7.7 (Seite 115) zu finden.

7.1 Generierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Studie drei Zellreihen von verschiedenen Spendern untersucht und miteinander verglichen. Dem weiter oben vorgestellten ARVC-Patienten dienten dabei eine gesunde weibliche Spenderin (D1) und ein gesunder männlicher Spender (D2) als Kontrollgruppe. Ausgangsmaterial für die Generierung der hiPSC bildete eine drei bis fünf Millimeter große Hautbiopsie, die unter sterilen Bedingungen entnommen und innerhalb von 48 Stunden an ein spezialisiertes Labor gesendet wurde. Während des Transports wurde die Biopsie in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit einem Zusatz von 200 U/ml Penicillin und 200 µg/ml Streptomycin (Pen/Strep) aufbewahrt. In dem externen Labor erfolgte dann die Aufbereitung der Hautbiopsie (Primärkultur von Fibroblasten), die Umprogrammierung dieser Fibroblasten zu hiPSC, sowie die anschließende Erfolgskontrolle. Erst wenn die Pluripotenz nachgewiesen wurde (vgl. Kapitel 3.1), wurden die hiPSC-Reihen an unser Labor versandt.

Für die Primärkultur der Fibroblasten wurde die Hautbiopsie in 0,5 bis 1 mm große Stücke geschnitten und mit der Epidermis nach oben in eine Zellkulturschale überführt. Dort wurde täglich das Nährmedium (human fibroblast medium, „HFBM“) gewechselt, welches sich aus DMEM mit 10% FBS (fetal bovine serum), 1x MEM (minimal essential medium) mit nicht essenziellen Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin, 50 µM 2-

Mercaptoethanol, 10 ng/ml bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) und 1% Pen/Strep zusammensetzte ⁴⁹.

Die hiPSC-Zellreihe „D1“ entstammte einer gesunden weiblichen Spenderin und wurde durch eine Kooperation der Skin-Cancer-Unit des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg und der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsmedizin Mannheim generiert. Zum Einsatz kamen dafür Lentivirus-Partikel, die den rtTA-Transaktivator (reverse tetracycline-controlled transactivator) trugen und eine Inducible-Polycistronic-Cassette mit den Faktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC ^{48, 49}. Die Zellreihe „D1“ wurde in unserem Labor bereits für verschiedene Projekte verwendet, weshalb im Rahmen dieser Studie auf eine ausführlichere Charakterisierung verzichtet werden kann und die Eignung als gesunde Kontrollprobe vorausgesetzt wird ^{45, 46}. Die Generierung der hiPSC-Reihe „D2“, welche von einem gesunden männlichen Spender stammt, erfolgte in der Stem-Cell-Unit des Herzforschungszentrums Göttingen. Dafür wurde das „MIP 247 CoMiP 4in1 with shRNA p53“-Mini-Intronic-Plasmid-Intron der Firma Addgene verwendet (vgl. ⁵⁰).

Die im Mittelpunkt dieser Studie stehende ARVC-hiPSC-Reihe wurde ebenfalls in der Stem-Cell-Unit des Herzforschungszentrums Göttingen generiert. Es wurde das „CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit“ verwendet, wobei das Protokoll des Herstellers modifiziert wurde:

1,5 x 10⁴ Fibroblasten wurden zwei Tage vor der Transduktion in zwei mit Matrigel beschichtete Wells einer 24-Wellplatte überführt und mit HFBM versehen. Bei einer 40-50 prozentigen Konfluenz wurde ein Sentai-Viruscocktail (hKOS : hc-Myc : hKLF4) mit einer MOI (multiplicity of infection) von 10 : 10 : 6 entsprechend der gezählten Zellzahl im Well (typischerweise 2,5 x 10⁴) dem HFBM zugegeben, um die Transduktion durchzuführen. Nach 24 Stunden wurde das Virus entfernt und fortan täglich das HFBM gewechselt. Am siebten Tag nach der Transduktion wurden die Zellen auf eine mit Matrigel beschichtete 6-Wellplatte überführt, dabei wurden verschiedene Zelldichten getestet. Als Medium erhielten die passagierten Zellen ein mit 500 µM Natriumbutyrat und 2 µM Thiazovivin-supplementiertes HFBM. Ab dem achten Tag wurde zu E8-Medium (incl. 500 µM Natriumbutyrat) gewechselt und ein täglicher Wechsel des Mediums durchgeführt. Die Zellen wurden lichtmikroskopisch

dahingehend kontrolliert, ob sich die Zellmorphologie und das Aussehen der Kolonien zu einem iPSC-typischem Erscheinungsbild verändern (typischerweise nach zwei bis drei Wochen). Einzelne ausgewählte Kolonien wurden, wenn sie diese Kriterien erfüllten, aus der Zellkultur gelöst, auf eine mit Matrigel beschichtete 12-Wellplatte überführt und in E8-Medium mit 2 μM Thiazovivin kultiviert. Die Stammzellreihen wurden daraufhin mindestens zehnmals passagiert, bevor mit der Pluripotenz-Charakterisierung und den Differenzierungsexperimenten begonnen wurde. Die Passagierung erfolgte mittels der „Versene-Solution“ von Thermo Fisher Scientific, am Folgetag wurde dem E8-Medium 2 μM Thiazovivin zugefügt.

7.2 Versuchsprotokolle – Zellkultur

Der sorgfältige Umgang mit allem, was die Zellkultur direkt oder indirekt beeinflussen kann, ist entscheidend für den Erfolg einer Studie, wie sie in dieser Arbeit vorgestellt wird. Gelingt es nicht, am Ende der zeit- und kostenintensiven Zellkultur die gewünschten Cluster von schlagenden funktionellen Kardiomyozyten aus den hiPSC zu differenzieren, können keine Experimente durchgeführt werden.

Die notwendige Sorgfalt bezieht sich dabei nicht nur auf das Einhalten der verschiedenen Protokolle hinsichtlich von Wirkkonzentrationen und Einwirkzeiten der Supplemente und Medien, sondern auch auf die Hygiene im Zellkulturlabor. Die Steri-Bank, der Zellkulturinkubator und das Mikroskop sind vor und nach jedem Gebrauch gründlich zu desinfizieren. Soweit möglich ist mit steril verpacktem Einwegmaterial zu arbeiten, Mehrwegmaterial ist vor dem Gebrauch zu autoklavieren. Auch jeder in der Zellkultur tätige Mitarbeiter muss Handschuhe und Kittel tragen und sich regelmäßig die Hände desinfizieren. Eine bakterielle Infektion von einzelnen Zellkulturflaschen oder Petrischalen im Inkubator (bei 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit) kann sich schnell ausbreiten und bedroht den gesamten Inhalt des Inkubators. Dies kann im schlimmsten Fall zu einem Stillstand der Experimente für alle Mitglieder der Arbeitsgruppe führen.

Dass trotz größter Sorgfalt nicht jede gestartete Differenzierungspassage gleich gute Ergebnisse liefert, muss jedem mit biologischem Material arbeitenden Wissenschaftler klar sein. Um dennoch eine Art Planungssicherheit in der Durchführung der

Experimente zu gewährleisten, ist in regelmäßigen Abständen (z.B. alle 14 Tage) eine Differenzierungspassage der jeweiligen Zelllinie zu starten.

7.2.1 Übersicht: Vom Kryotube zum schlagenden Kardiomyozyt

Die im Kapitel 2.2 („Generierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen“) beschriebenen hiPSC werden nach erfolgreichem Nachweis der Pluripotenz in Form von tiefgefrorenen Kryotubes an unser Labor versandt. Gelagert werden sie in Flüssigstickstoff-Tanks bei -170°C . Möchte man mit der Zellkultur einer so gelagerten hiPSC-Reihe beginnen, taut man das Kryotube unter kontrollierten Bedingungen auf und überführt den Inhalt auf eine mit Matrigel beschichtete T-75-Zellkulturflasche (Kapitel 7.2.2). Der Prozess des Überführens in eine neue T-75-Zellkulturflasche bezeichnet man als Passagieren oder Passage (Kapitel 7.2.3). Die erste Zellkulturflasche trägt die Passagenzahl null (p00), bei jeder weiteren Überführung steigt die Passagenzahl um eins an. Es wird empfohlen, mindestens bis zur fünften Passage (p05) mit dem Start des Differenzierungsprotokolls zu warten, da dies der Erfahrung nach bessere Ausgangsbedingungen für eine erfolgreiche Differenzierung liefert. Außerdem sind zeitnah wieder neue Kryotubes der gestarteten hiPSC-Reihe zu generieren und zu konservieren, um die Zellreihe auch in Zukunft im eigenen Labor vorrätig zu haben (Kapitel 7.2.8). Die Geschwindigkeit, mit der die Kolonien der hiPSC in der Zellkulturflasche wachsen, variiert von Zellreihe zu Zellreihe. Die Dichte der Zellen nach einer Passage nimmt dabei maßgeblichen Einfluss auf das Zeitintervall zwischen zwei Passagierungsschritten. Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellreihen und unter Berücksichtigung des im Anhang beschriebenen Versuchsprotokolls kann mit $7 (\pm 3)$ Tagen zwischen zwei Passagierungsschritten gerechnet werden.

Bevor mit dem Differenzierungsprotokoll begonnen werden kann, müssen die hiPSC von der T-75-Zellkulturflasche gelöst werden und in eine mit Matrigel beschichtete 24-Wellplatte überführt werden (Kapitel 7.2.4). Dabei muss die Zahl der Zellen pro Well standardisiert werden. Bei dieser Überführung müssen die Zellen so vereinzelt werden, dass sich die Zell-Zell-Kontakte lösen. Durch die chemischen oder physikalischen Reize darf dabei jedoch keine unwillkürliche Differenzierung angeregt werden. Nach einer Ruhezeit von mindestens 15 h kann nun in der 24-Wellplatte mit

dem Differenzierungsprotokoll begonnen werden (Tag 0 bzw. d0). Dieses Protokoll entstammt der Arbeitsgruppe Tiburcy/Zimmermann aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Herzzentrums Göttingen und wurde unserem Labor freundlicherweise schon vor der Veröffentlichung im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt ⁵¹.

Von nun an wird bei den Zellen täglich das Nährmedium gewechselt. Durch verschiedene Faktoren, die dem Medium zugegeben werden, wird die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen über mesodermale Zellen hin zu Kardiomyozyten gesteuert. Der Ablauf lässt sich grob in vier Phasen unterteilen:

- (i) In den ersten drei Tagen werden die hiPSC über die vier Faktoren Activin A, BMP-4, FGF-2 und CHIR99021, welche dem Nährmedium zugegeben werden und den Wnt-Signalweg aktivieren, zu mesodermalen Stammzellen differenziert.
- (ii) Es folgt eine zehntägige Phase, in der durch die Zugabe von IWP-4 der Wnt-Signalweg inhibiert wird und die Differenzierung der mesodermalen Zellen zu Kardiomyozyten vorangetrieben wird.
- (iii) Da sich nie alle Zellen zu Kardiomyozyten differenzieren, sondern immer auch ein Teil zu Fibroblasten, anderen bindegewebigen oder sonstigen Zellreihen entwickeln, muss im Rahmen der Zellkultur immer von einer Mischkultur gesprochen werden. Um das Verhältnis in dieser Mischkultur zugunsten eines höheren Anteils an Kardiomyozyten zu verbessern, folgt von Tag 13-17 eine metabolische Selektionsphase. Durch Zugabe eines Nährmediums, welches abgesehen von Lactat keinen metabolisierbaren Energieträger enthält, werden nur solche Zellen einen Selektionsvorteil erfahren, die Lactat verwerten können. Dies trifft in der Mischkultur nur auf Zellen zu, deren Stoffwechsel dem eines Kardiomyozyten entsprechen.
- (iv) Am 18. Tag (d18) nach Beginn der Differenzierung ist das Protokoll abgeschlossen. Der Erfolg lässt sich lichtmikroskopisch und oft sogar mit bloßem Auge durch eine regelmäßige Kontraktion der Zellcluster erkennen. Abbildung 3 (Seite 15) zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme zu diesem Zeitpunkt. Um sicher zu gehen, dass die Zellen einen reifen Zustand erreicht haben und keine Zellen für Experimente verwendet werden, die ihre

Differenzierung noch nicht abgeschlossen haben, wird bis zum 35. Tag nach Beginn der Differenzierung (d35) gewartet. In dieser Phase werden die Zellen täglich mit frischem serumfreien Medium „gefüttert“.

Ein detailliertes Protokoll mit konkreten Handlungsanweisungen für jeden einzelnen Tag des Differenzierungsprotokolls beinhaltet Kapitel 7.2.5. Von dem Zeitpunkt des erstmaligen Auftauens und der Inkulturnahme der Zelllinie bis zum Ende des Differenzierungsprotokolls (d35) sind in der Regel mehr als drei Monate vergangen.

Zur Verwendung der patientenspezifischen hiPSC-CMs in Experimenten sind diese entsprechend vorzubereiten und ggf. auf andere Zellkultursysteme zu überführen. Für die funktionellen Untersuchungen mittels Patch-Clamp-Technik und die Immunfluoreszenz werden vereinzelte Kardiomyozyten benötigt (vgl. Kapitel 7.2.6). Bei der Probengewinnung für die Polymerase-Kettenreaktion und für den Western-Blot kann das Material direkt aus den 24-Well-Platten asserviert werden (vgl. Kapitel 7.3.1 und 7.5.1).

7.2.2 Start einer hiPSC-Reihe

Die Arbeit an einer hiPSC-Reihe beginnt mit dem Auftauen des Kryotubes und dem Überführen der darin befindlichen Zellen in eine mit Matrigel beschichtete T-75-Zellkulturflasche.

Benötigtes Material:

- 22 ml E8-Medium (RT)
- 11 µl ROCK-Inhibitor
- Falcon® T-75-Zellkulturflasche (mit Matrigel beschichtet)
- 50 ml Falcon® Tubes, Pipetten, Mikropipetten, Eppendorf-Pipettiergefäße

Vorbereitung:

Die mit Matrigel beschichtete T-75-Zellkulturflasche muss vor Beginn mindestens 40 Minuten bei 37°C inkubieren (maximal 15h).

Die 22 ml E8-Medium auf Raumtemperatur vorwärmen und 11 µl ROCK-Inhibitor zugeben (Zielkonzentration ROCK-Inhibitor: 5 µM).

Durchführung:

Die mit Matrigel beschichtete T-75-Zellkulturflasche aus dem Inkubator nehmen und die enthaltene Flüssigkeit vollständig absaugen; den Boden der Flasche dabei nicht berühren. Die Flasche mit 10 ml E8-Medium (incl. 5 μ M ROCK-Inhibitor) befüllen und bei 37°C im Inkubator aufbewahren. 5 ml E8-Medium (incl. 5 μ M ROCK-Inhibitor) in ein 50 ml Falcon®-Tube vorlegen. Dann das Kryotube aus dem flüssigen Stickstoff nehmen und mit Desinfektionsmittel auf Alkoholbasis absprühen und abtupfen. Das Auftauen erfolgt in der Hand und darf durch Reibung beschleunigt werden. Anschließend erneut desinfizieren und abtupfen. Den Inhalt des Kryotubes mit einer 1 ml-Mikropipette in das vorbereitete Falcon®-Tube überführen. Dabei langsam auf- und abpipettieren, um die Scherkräfte an der Pipettenspitze zu minimieren. Bei 1200 rpm für 4 Minuten zentrifugieren und den Überstand vollständig absaugen. Erneut 5 ml E8-Medium (incl. 5 μ M ROCK-Inhibitor) in das Falcon®-Tube überführen und das am Boden befindliche Pellet mit den hiPSC durch vorsichtiges Schwenken der Flüssigkeit im Falcon®-Tube resuspendieren. Die E8-Medium-Zellsuspension mit einer entsprechenden Pipette bei niedrigster Saug- und Auswurfgeschwindigkeit des Pipetus in die schon vorhandenen 10 ml des E8-Mediums (incl. 5 μ M ROCK-Inhibitor) in der T-75-Zellkulturflasche überführen. Durch horizontales Hin- und Herbewegen werden die Zellen gleichmäßig verteilt.

Schließlich wird die T-75-Zellkulturflasche bei 37°C in den Inkubator gestellt und dort für mindestens 18 h nicht bewegt, um das Anhaften der Zellen an die Matrigelschicht zu ermöglichen („ruhen lassen“). Ab dann wird beim täglichen Wechsel des Nährmediums („füttern“) E8-Medium ohne ROCK-Inhibitor verwendet.

7.2.3 Splitten/Passagieren

Der Transfer von hiPSC auf eine neue T-75-Zellkulturflasche kann aus verschiedenen Gründen notwendig werden. Zum einen wird durch wiederholtes Passagieren eine Selektion von gut wachsenden Zellen erreicht, sodass vereinfacht gesagt werden kann, dass eine hohe Passagenzahl tendenziell bessere Ergebnisse in der Zellkultur liefert. Zum anderen löst der Kontakt von Zellkolonien, die horizontal gegeneinander wachsen, einen spontanen Differenzierungsreiz aus und ist daher zu vermeiden. Darüber hinaus wird es je nach dem Zellmaterialbedarf der geplanten Experimente

gelegentlich notwendig, vor dem Aussäen und dem Start des Differenzierungsprotokolls mehrere T-75-Zellkulturflaschen mit hiPSC der gleichen Zellreihe und der gleichen Passagenummer zu versehen.

Benötigtes Material:

- 22 ml 2 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure; RT)
- 22 ml E8 Medium (RT); +15 ml für jede weitere T-75 Flasche
- 22 µl ROCK-Inhibitor; +7,5 µl für jede weitere T-75 Flasche
- Falcon® T-75-Zellkulturflasche (mit Matrigel beschichtet)
- 50 ml Falcon® Tubes, Pipetten, Mikropipetten, Eppendorf-Pipettiergefäße

Vorbereitung:

Die mit Matrigel beschichtete T-75-Zellkulturflasche muss vor Beginn mindestens 40 Minuten bei 37°C inkubieren (maximal 15 h). Je 22 ml 2 mM EDTA und 22 ml E8-Medium auf Raumtemperatur vorwärmen, dann jeweils 11 µl ROCK-Inhibitor zugeben (Zielkonzentration ROCK-Inhibitor: 5 µM).

Durchführung:

Die "neue", mit Matrigel beschichtete, T-75-Zellkulturflasche aus dem Inkubator nehmen und die enthaltene Flüssigkeit vollständig absaugen; den Boden der Flasche dabei nicht berühren. Die Flasche mit 12 ml E8-Medium (incl. 5 µM ROCK-Inhibitor) befüllen und beiseitestellen (RT).

Von der "alten", bereits mit Zellen bewachsenen, T-75-Flasche das enthaltene Nährmedium absaugen und zweimalig mit je 6 ml 2 mM EDTA (incl. 5 µM ROCK-Inhibitor) waschen und erneut absaugen. Dann einmalig mit 9 ml 2 mM EDTA (incl. 5 µM ROCK-Inhibitor) befüllen und 3 bis 6 Minuten einwirken lassen.

Während der Einwirkzeit unter dem Mikroskop regelmäßig kontrollieren, dass sich keine einzelnen Zellen von den Clustern lösen. Sobald kleine Zwischenräume innerhalb der einzelnen Cluster entstehen (Abbildung 20 B+C), kann davon ausgegangen werden, dass sich die Zell-Zell-Kontakte genügend gelockert haben.

Die Flüssigkeit aus der Flasche vollständig absaugen. 5 ml des E8-Mediums (incl. 5 µM ROCK-Inhibitor) mit einer schräg an den Boden der Flasche gehaltenen 10 ml Pipette im „BlowOut“-Modus des Pipetus (höchste Pumpgeschwindigkeit) auswerfen. Auf diese Weise werden die Zellen auf einer Fläche von ca. 10 cm² vom Boden der Flasche abgespült. Die gelösten Zellen liegen nun in kleinen Clustern von ca. 10²- 10⁵ Zellen vor (Abbildung 21). Um zu verhindern, dass sich die Zellcluster weiter

verkleinern und zu viele einzelne Zellen abgelöst werden, muss von nun an häufiges Auf- und Abpipettieren vermieden werden und die Pump- und Sauggeschwindigkeit des Pipetus so niedrig wie möglich eingestellt werden.

Mit einer 10 ml Pipette das Medium (und die darin schwebenden Zellcluster) vorsichtig in das Tube mit den restlichen 5 ml E8-Medium (incl. 5 μ M ROCK-Inhibitor) überführen. 1 ml dieses Mediums in die „neue“, zuvor beiseite gestellte T-75-Flasche überführen. Mittels Licht-Mikroskopie wird die Zelldichte in der Kulturflasche beurteilt. Für optimale Wachstumsbedingungen sollte zwischen den Clustern ausreichend Platz zur Verfügung stehen (ca. 2 cm). Auf eine gleichmäßige Verteilung der Zellen achten, dafür die Flasche horizontal hin- und herbewegen. Weiter in Milliliter-Portionen Zellen in die Flasche überführen, bis die gewünschte Zelldichte erreicht wird.

Schließlich die neue Passage bei 37°C in den Zellkulturinkubator stellen und dort für mindestens 18 h ruhen lassen. Ab dann wird beim Wechsel des Nährmediums E8-Medium ohne ROCK-Inhibitor verwendet.

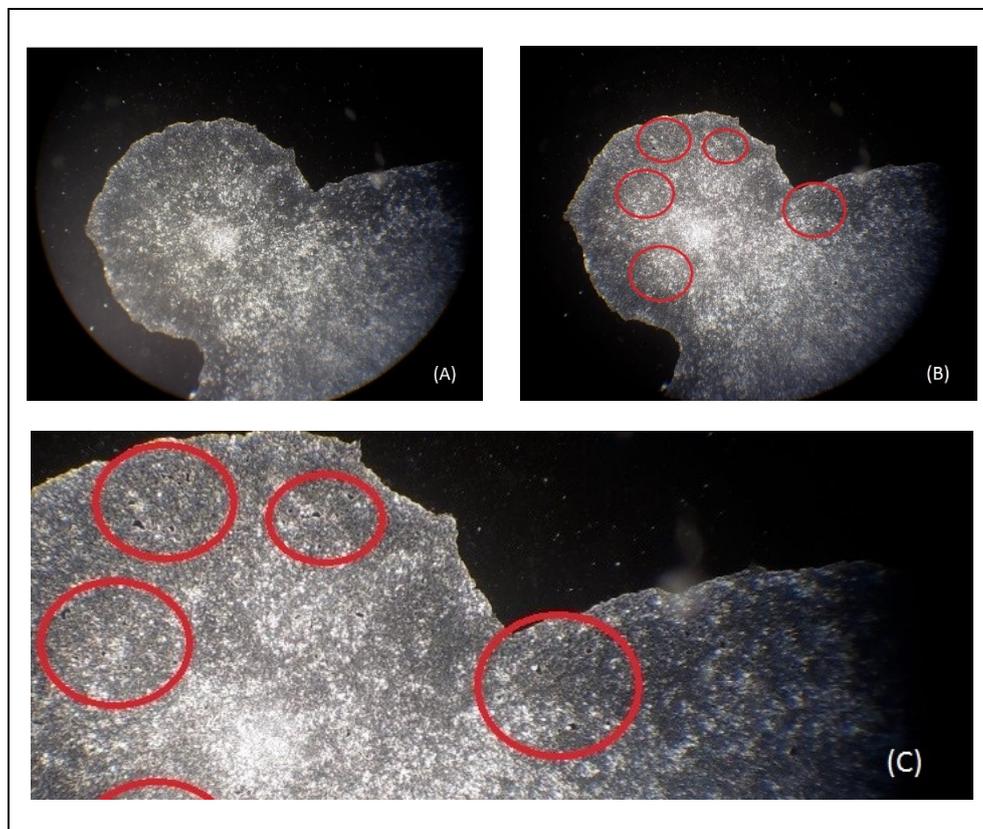


Abbildung 20 – Fotografie durch Okular des Mikroskops bei 40x Vergrößerung; (A) hiPSC-Kolonie unmittelbar nach Zugabe von 2 mM EDTA (incl. ROCK-Inhibitor); (B) nach 5 Minuten Einwirkzeit, rote Kreise markieren exemplarische Lockerungszonen; (C) vergrößerter Ausschnitt (digitaler Zoom) aus (B).

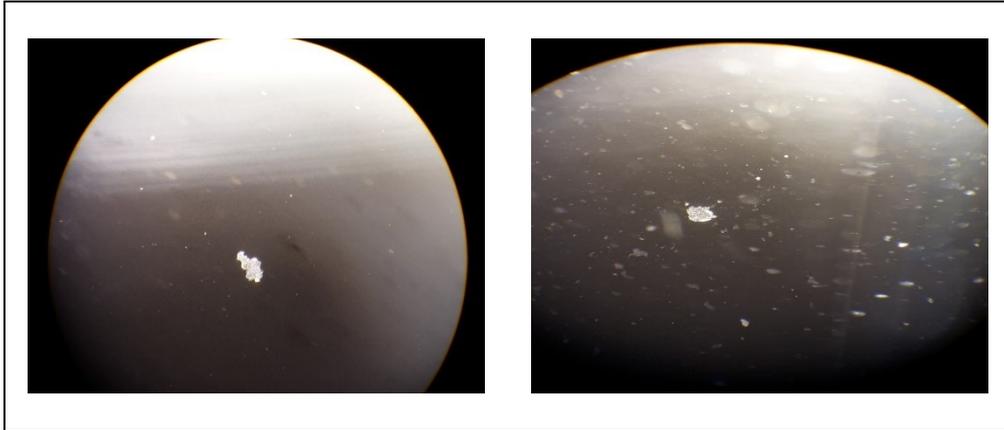


Abbildung 21 - Fotografie durch Okular des Mikroskops bei 40x Vergrößerung; noch freischwebende hiPSC-Zellcluster nach Passage in eine neue T-75-Zellkulturflasche

7.2.4 hiPSC auf 24-Wellplatte überführen („Aussaat“)

Vor dem Beginn der Differenzierung von hiPSC zu Kardiomyozyten müssen die Stammzellen von der T-75-Zellkulturflaschen auf eine 24-Well-Platte überführt werden, ohne dass dabei (durch chemische oder physikalische Reize) eine spontane und unkontrollierte Differenzierung in andere Zellreihen, wie zum Beispiel Fibroblasten, induziert wird.

Benötigtes Material:

- 25 ml E8 Medium (RT)
- 22 ml 2mM EDTA (RT)
- 25 µl ROCK-Inhibitor
- 20 µl 0,4% Trypanblaulösung
- 24-Wellplatte (mit Matrigel beschichtet)
- Neubauer-Zählkammer
- Cell-Scraper
- 50 ml Falcon® Tubes, Pipetten, Mikropipetten, Eppendorf-Pipettiergefäße

Vorbereitung:

Die 24-Wellplatte für mindestens 40 Minuten bei 37°C inkubieren. 22 ml 2 mM EDTA und 25 ml E8-Medium auf Raumtemperatur vorwärmen, dann 11 µl (EDTA) bzw. 12,5 µl (E8-Medium) vom ROCK-Inhibitor zugeben (Zielkonzentration ROCK-Inhibitor: 5 µM). Die Neubauer-Zählkammer mit Leitungswasser abspülen und mit einem trockenen Zellstofftuch abwischen. Das Deckglas mit etwas Druck seitlich auf die Trägerstege schieben bis Newtonsche Interferenzfarben zu sehen sind.

Durchführung:

Von der T-75-Zellkulturflasche das enthaltene Medium vollständig absaugen und zweimalig mit je 6 ml 2 mM EDTA (incl. 5 μ M ROCK-Inhibitor) waschen. Dann einmalig mit 9 ml 2 mM EDTA (incl. 5 μ M ROCK-Inhibitor) befüllen und einwirken lassen. Derweil kann die Flüssigkeit in der 24-Wellplatte vollständig abgesaugt und die Platte beiseitegestellt werden.

Anders als bei der Passagierung der hiPSC von T-75-Flasche zu T-75-Flasche darf die Einwirkzeit des EDTAs großzügig bemessen werden, da die interzellulären Verbindungen gelockert werden sollen. Nach ca. 8 bis 10 Minuten das EDTA aus der T-75-Flasche absaugen und 10 ml E8-Medium (incl. 5 μ M ROCK-Inhibitor) zugeben. Mit einem Zell-Scraper den Boden der T-75-Flasche vorsichtig abschaben. Das Medium mit der Zellsuspension mit einer 10 ml Pipette aufsaugen und im „BlowOut“-Modus über den Boden der T-75-Zellkulturflasche ausspülen. Diesen Vorgang zehnmal wiederholen, dabei den ganzen Boden der Flasche abspülen. Anschließend alles in ein 50 ml Falcon®-Tube überführen.

In einem Eppendorf-Pipettiergefäß 20 μ l der Zellsuspension mit 20 μ l 0,4% Trypanblaulösung durch Auf- und Abpipettieren mischen.

20 μ l dieser Mischung zur Beschickung der Neubauer-Zählkammer seitlich auftragen, durch die Kapillarkräfte wird ein definiertes Volumen eingesogen. Im Lichtmikroskop die ungefärbten Zellen pro Quadrat zählen. Zellen mit blau gefärbtem Zytosol nicht mitzählen, da deren Membran Leckagen aufweist und die Zellen demnach tot sind. Auf diese Weise mindestens 4 Quadrate zählen und das arithmetische Mittel bilden. Die so ermittelte Zahl mit 2×10^4 multiplizieren, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten. Je nach Ergebnis der Zählung muss die Zellsuspension entweder mit weiterem E8-Medium (incl. 5 μ M ROCK-Inhibitor) verdünnt werden oder die Wells müssen mit mehr Material befüllt werden. Es gilt als Richtwert eine Zellkonzentration von 200.000 Zellen pro Well bei einer Füllmenge zwischen 0,5 und 1,5 ml. Nach dem Befüllen der Wells durch horizontales Hin- und Herbewegen der Platte eine gleichmäßige Verteilung der Zellen sicherstellen und die Platte anschließend für mindestens 15 Stunden in dem Zellkulturinkubator ruhen lassen bevor mit dem Differenzierungsprotokoll begonnen wird.

7.2.5 Differenzierung zu Kardiomyozyten

Das in diesem Abschnitt beschriebene Protokoll entstammt der Arbeitsgruppe Zimmermann aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Herzzentrums Göttingen und darf daher im Rahmen dieser Arbeit nur so detailliert beschrieben werden, wie es bereits durch die Urheber in eigenen Publikationen veröffentlicht wurde (siehe ⁵¹).

Das Protokoll lässt sich in vier verschiedene Phasen einteilen (vgl. Kapitel 2.3 Zellkultursystem). Im Folgenden wird detailliert das Vorgehen an jedem einzelnen Tag des Differenzierungsprotokolls beschrieben. Die Mengenangaben werden dabei sowohl allgemeingültig formuliert als auch exemplarisch für einen Bedarf von 50 ml Medium angegeben.

7.2.5.1 Phase i: Activin A, BMP-4, CHIR99021, FGF-2

Tag 0 (d0): Pro Well werden 1 ml kardiales Medium (KM) zur Durchführung von zwei Waschschritten benötigt, dafür wie in Kapitel 7.2.9.14 beschrieben vorgehen und die benötigte Menge bei Raumtemperatur beiseitestellen.

Zum Ansetzen des mesodermalen Nährmediums wird darüber hinaus pro Well je 0,5 ml KM benötigt, welches jedoch auf 37°C zu erwärmen ist (für ca. 1 h). Das 37°C warme KM durch Zugabe von 2% B-27 und 200 µmol/L ASC zu serumfreiem Medium (SF) weiterverarbeiten (vgl. Kapitel 7.2.9.15). Dann in der folgenden Reihenfolge 1 µmol/L CHIR99021, 5 ng/ml BMP4, 9 ng/ml Activin A und 5 ng/ml FGF-2 zugeben und nach jedem zugegebenen Faktor durch zweimaliges Auf- und Abpipettieren mischen. Das so fertiggestellte mesodermale Medium (MM) in dem Inkubator bei 37°C beiseitestellen.

Das in den Wells enthaltene Medium vollständig absaugen. Dafür die 24-Wellplatte leicht schräg halten und die Absaugküvette an den niedrigsten Punkt halten. Fortan immer an der gleichen Stelle absaugen um den Verlust von Zellmaterial zu minimieren. Die Wells mit 0,5 ml KM (RT) befüllen. Die Pipettenspitze beim Befüllen von Wells immer seitlich an die Wand des Wells halten und das Medium langsam einlaufen lassen. Dann die 24-Wellplatte etwas horizontal hin- und herbewegen und das KM wieder absaugen. Diesen Waschschrift ein zweites Mal durchführen.

Je 0,5 ml MM in die Wells geben und die 24-Wellplatte wieder in den Zellkulturinkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchte stellen.

Pipettierschema für 50 ml mesodermales Medium (MM):

- 49 ml kardiales Medium (vgl. Kapitel 7.2.9.14)
- 1 ml B-27 (vgl. Kapitel 7.2.9.7)
- 50 µl 200mM ASC (vgl. Kapitel 7.2.9.6)
- 5 µl 10mM CHIR99021 (vgl. Kapitel 7.2.9.12)
- 25 µl 10µg/ml BMP-4 (vgl. Kapitel 7.2.9.10)
- 45 µl 10µg/ml Activin A (vgl. Kapitel 7.2.9.9)
- 25 µl 10µg/ml FGF-2 (vgl. Kapitel 7.2.9.11)

Tag 1 (d1) und Tag 2 (d2): Analog zum Vortag pro Well je 0,5 ml MM vorbereiten. Das enthaltene Medium aus den Wells vollständig absaugen und durch 0,5 ml MM pro Well ersetzen. Ein Waschschrift ist an diesen Tagen nicht nötig.

7.2.5.2 Phase ii: IWP-4

Tag 3 (d3): Pro Well werden 0,5 ml KM (RT) und 1 ml SF (37°C) benötigt, welche wie zuvor beschrieben vorzubereiten sind. Mit dem KM wird ein Waschschrift durchgeführt (vgl. d0), um Rückstände der vier Faktoren aus der ersten Phase des Differenzierungsprotokolls zu beseitigen und Interaktionen vorzubeugen. Dem SF wird nach vollständigem Erwärmen pro Milliliter SF je ein Mikroliter des 50 mM IWP-4 zugegeben, wodurch die Wirkkonzentration des IWP-4 auf 50 µmol/L eingestellt wird. Die Wells mit jeweils 1 ml SF (incl. 50 µmol/L IWP-4) beladen.

Pipettierschema für 50 ml serumfreies Medium (incl. 50 µmol/L IWP-4):

- 49 ml kardiales Medium (vgl. Kapitel 7.2.9.14)
- 1 ml B-27 (vgl. Kapitel 7.2.9.7)
- 50 µl 200mM ASC (vgl. Kapitel 7.2.9.6)
- 50 µl 50mM IWP-4 (vgl. Kapitel 7.2.9.13)

Tag 4 (d4): Pause.

Tag 5 (d5): Das enthaltene Medium aus den Wells absaugen und durch 0,5 ml SF (incl. 50 µmol/L IWP-4) pro Well ersetzen.

Tag 6 (d6): Analog zum zuvor beschriebenen Vorgehen 0,5 ml KM und 0,5 ml SF (incl. 50 µmol/L IWP-4) pro Well vorbereiten. Etwa die Hälfte des in den Wells enthaltenen Mediums absaugen, mit dem Zeigefinger je dreimal sanft gegen alle vier Kanten der 24-Wellplatte klopfen und den restlichen Inhalt der Wells absaugen. Mit je

0,5 ml KM die Wells befüllen, die Platte horizontal hin- und herbewegen und erneut den Inhalt vollständig absaugen. Dieser erweiterte Waschschrift soll auch avitale Zellen von der Matrigelschicht lösen und aus der Zellkultur entfernen. Die Wells mit je 0,5 ml SF (incl. 50 µmol/L IWP-4) befüllen.

Tag 7 (d7): Pause.

Tag 8 (d8): Wie Tag 7 (d6).

Tag 9 (d9): Pause.

Tag 10 (d10): Das enthaltene Medium aus den Wells absaugen und durch 1 ml SF (incl. 50 µmol/L IWP-4) pro Well ersetzen.

Tag 11 (d11): Pause.

Tag 12 (d12): Das enthaltene Medium aus den Wells absaugen und durch 0,5 ml SF (incl. 50 µmol/L IWP-4) pro Well ersetzen.

7.2.5.3 Phase iii: Selektionsmedium

Tag 13 (d13): Den Inhalt der Wells vollständig absaugen und mit je 0,5 ml sterilem PBS („Phosphate Buffered Saline“; w/o Ca²⁺, Mg²⁺; RT) einen Waschschrift durchführen. Die Wells mit 0,5 ml Selektionsmedium (vgl. Kapitel 7.2.9.16) befüllen.

Pipettierschema für 49,85 ml Selektionsmedium (SM):

- 49 ml RPMI (-Glucose, -Glutamin)
- 500 µl Pen/Strep (vgl. Kapitel 7.2.9.2)
- 250 µl 440mM SLS (vgl. Kapitel 7.2.9.8)
- 100 µl 50mM 2-Mercaptoethanol

Tag 14 (d14) bis Tag 17 (d17): Vor dem Absaugen des Mediums die 24-Wellplatte an allen vier Kanten je dreimalig mit dem Zeigefinger beklopfen, dann den Inhalt der Wells absaugen und je 0,5 ml SM hinzufügen.

7.2.5.4 Phase iv: Reifung der Kardiomyozyten

Tag 18 (d18): Einen letzten Waschschrift mit je 0,5 ml sterilem PBS (w/o Ca²⁺, Mg²⁺; RT) durchführen und die Wells mit 0,5 ml SF beladen.

Zu diesem Zeitpunkt ist das Differenzierungsprotokoll abgeschlossen und es sollten sich unter dem Mikroskop Zellcluster verschiedener Größen präsentieren (vgl. Abbildung 3, S. 15), welche regelmäßige Kontraktionen zeigen.

Es ist jedoch nicht davon auszugehen, dass bereits alle Zellen die Differenzierung vollständig abgeschlossen haben. Bis die Zellen für Experimente verwendet werden können wird daher bis zu Tag 35 nach Beginn der Differenzierung (d35) gewartet. Bis dahin ist das Nährmedium in den Wells täglich zu erneuern (je 0,5 ml SF).

7.2.6 Vereinzelung der Kardiomyozyten

Sowohl für die elektrophysiologischen Untersuchungen mittels Patch-Clamp-Technik als auch für die histo-morphologische Begutachtung mittels Immunfluoreszenz müssen die Kardiomyozyten nach erfolgreichem Abschluss des Differenzierungsprotokolls vereinzelt vorliegen. Darüber hinaus können die genannten Experimente nicht in einer 24-Wellplatte durchgeführt werden. Das hier beschriebene Protokoll kombiniert die Vereinzelung der am Ende des Differenzierungsprotokolls in Clustern vorliegenden Kardiomyozyten (vgl. Abbildung 3, S. 15) mit dem Überführen auf die jeweiligen für die Durchführung der Experimente notwendigen Kulturschalen. Die hier angegebenen Dosierungen und Inkubationszeiten wurden für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten ARVC-Zellreihe optimiert. Eine einheitliche Durchführung auch für die gesunden Kontrollgruppen (D1- und D2-Zellreihe) ist essenziell für den Grad der Reproduzierbarkeit und die interne Kongruenz der Studie. Beschrieben wird hier exemplarisch die Vereinzelung von Zellen aus einem Well einer 24-Wellplatte – das Protokoll kann nahezu beliebig skaliert werden.

Benötigtes Material:

- 300 µl Trypsin (37°C)
- 200 µl FBS (37°C) + 200 µl RPMI 1650 (37°C)
- 12 ml SF (37°C)
- 1,5 ml Eppendorf-Gefäße, Falcon® Tubes, 1 ml Mikropipette
- je nach Indikation: 6 Patch-Clamp-Dishes oder 6 IHC-Chamber-Slides
- 50 ml Falcon® Tubes, Pipetten, Mikropipetten, Eppendorf-Pipettiergefäße

Vorbereitung:

Je nach geplantem Experiment die benötigten mit Matrigel beschichteten Kulturschalen (Chamber-Slides für Immunfluoreszenz bzw. Dishes für Patch-Clamp) im Zellkulturinkubator für mindestens 40 Minuten inkubieren. Dann die enthaltene Flüssigkeit absaugen und stattdessen mit serumfreiem Medium befüllen. Dabei 1 ml SF in die Dishes und 250 µl SF in je eine Kammer der Chamber-Slides geben. Das

restliche SF wird wie die 300 µl Trypsin bis zum Gebrauch bei 37°C aufbewahrt. 200 µl FBS und 200 µl RPMI 1650 werden bei Raumtemperatur zu einem 1 : 1 Verhältnis in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und ebenfalls auf 37°C erwärmt.

Durchführung:

Das Medium aus dem Well komplett absaugen und 300 µl Trypsin zu den Zellen in das Well pipettieren. Die 24-Well-Platte für 4 Minuten bei 37°C inkubieren.

Dann mit einer 1 ml-Mikropipette fünfmal kräftig auf- und abpipettieren. Hier zügig arbeiten um die Einwirkzeit des Trypsins nicht zu prolongieren. Durch die anschließende Zugabe der 1 : 1 Mischung von FBS und PRMI 1650 wird das Trypsin blockiert. Den Inhalt des Wells in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführen. Nun durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren unter Zuhilfenahme einer 100 µl-Mikropipette die gelösten Zellcluster durch die Scherkräfte an der Pipettenspitze verkleinern. Das Eppendorf-Gefäß bei 1700 rpm für vier Minuten zentrifugieren und anschließend den Überstand absaugen. Das im Eppendorf-Gefäß verbliebene Pellet in einem Milliliter SF resuspendieren, dafür erneut mit der 1 ml-Mikropipette fünfmal kräftig auf- und abpipettieren. Anschließend den Inhalt in das Falcon®-Tube mit dem verbleibenden SF überführen. Durch das häufige Auf- und Abpipettieren und die Zentrifugation sollten die Zellcluster nun soweit verkleinert worden sein, dass mit bloßem Auge keine schwebenden Teilchen mehr zu sehen sind. Schließlich die bereits vorgeladenen Kulturschalen mit den vereinzelt Zellen bestücken. Dabei empfiehlt sich eine langsame Titration in 250 µl Schritten um sich an die gewünschte Zellkonzentration heranzutasten. Durch horizontales Hin- und Herbewegen können die Zellen gleichmäßig verteilt werden. Nach dem Befüllen der Kulturschalen mit den vereinzelt Kardiomyozyten sollten diese für mindestens 12 Stunden im Zellkulturinkubator „ruhen“ bevor das Medium gewechselt wird. Nach dem Wechsel des Mediums können die Zellen für die geplanten Experimente genutzt werden.

7.2.7 Beschichten mit Matrigel

Alle in der Zellkultur verwendeten Platten, Flaschen oder Petrischalen müssen am Boden mit einer künstlichen Extrazellulärmatrix beschichtet sein. Einerseits würden weder die hiPSC noch die CMs ohne eine solche Schicht am Boden haften bleiben, was bei jedem Wechsel des Nährmediums zu einem hohen Zellmaterialverlust führen

würde, andererseits kann bei freischwebenden Zellclustern die mikroskopische Verlaufskontrolle nicht dediziert erfolgen. Das nahezu zweidimensionale, horizontale Wachstum der Zellen ist zudem fundamental für die Entwicklung eines funktionellen Synzytiums und die etablierte Methode im Rahmen der von uns verwendeten Protokolle.

Die benötigten Kultursysteme können bei der Beschichtung einheitlich behandelt werden, der Materialbedarf richtet sich dabei nach der Fläche des Bodens. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der häufig verwendeten Systeme und die dafür benötigte Menge an Matrigel, allgemeingültig berechnet sich der Materialbedarf durch die Kenngröße 125 µl Matrigel in PBS (1 : 30) pro cm² Bodenfläche des verwendeten Kultursystems.

Benötigtes Material:

- Matrigel
- PBS (w/o Ca²⁺/Mg²⁺)
- 1 ml-Mikropipette, 10ml-Pipette, Falcon®-Tubes
- zu beschichtende Kultursysteme (T-75 Flasche, 24-Well-Platte, Chamber-Slides, Patch-Clamp-Dish, etc.)
- 50 ml Falcon® Tubes, Pipetten, Mikropipetten, Eppendorf-Pipettiergefäße

Vorbereitung:

Das tiefgefrorene Matrigel auf Eis auftauen (3-4 h) und das PBS (w/o Ca²⁺/Mg²⁺) im Eisbad kühlen. Das verwendete steril verpackte Einwegmaterial und die Zellkultursysteme im Kühlschrank bei 4°C vorkühlen.

Durchführung:

Wenn das Matrigel flüssig ist, kann es mit der Mikropipette unter Verwendung von vorgekühlten Pipettenspitzen in dem eiskalten PBS (w/o Ca²⁺/Mg²⁺) im Verhältnis 1 : 30 gelöst werden. Zum Beispiel 1 ml Matrigel in 29 ml PBS (w/o Ca²⁺/Mg²⁺) lösen. Bei Raumtemperatur wird Matrigel gelförmig und lässt sich nicht pipettieren. Auch mit flüssigem Matrigel muss langsam pipettiert werden, da es sonst im PBS ausfallen kann. Wie in Tabelle 1 angegeben das vorgekühlte Kultursystem mit der entsprechenden Menge der Matrigel-PBS-Lösung beladen, dabei ebenfalls mit kühlen Pipettenspitzen arbeiten. Wird das mit Matrigel beschichtete Kultursystem nicht sofort benötigt, kann man es bis zu zwei Wochen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahren. Dafür mit Parafilm luftdicht verschließen und vor Einsatz in der Zellkultur gründlich von außen desinfizieren. Während der Lagerung bei 4°C bleibt das Matrigel im PBS gelöst. Die anhaftende künstliche Extrazellulärmatrixschicht am Boden des Kultursystems bildet

sich erst beim Erwärmen. Daher muss das Kultursystem vor Einsatz in der Zellkultur für mindestens 40 Minuten (bis maximal 15 Stunden) bei 37°C inkubiert werden. Anschließend wird die enthaltene Flüssigkeit gründlich abgesaugt. Dabei sollte mit der Absaugpipette nur in einer Ecke gearbeitet und das Kultursystem schräg gehalten werden, um die Matrigelschicht nicht zu beschädigen.

Kultursystem	Bodenfläche [cm ²]	1:30 Lösung Matrigel in PBS [ml]	Matrigel [µl]	PBS (w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺) [ml]
T-75 Flasche	75	9,375	313	9,06
24-Wellplatte	24 x 2 = 48	0,25 pro Well (insgesamt 6)	200	5,8
Chamber-Slide	4 x 1,7 = 6,8	0,213 pro Chamber (insgesamt 0,85)	28	0,82
Patch-Clamp-Dish (IBIDI/FLAT)	8	1	33	0,97
Allgemein	F	0,125 x F = Y	1/30 x Y x 10 ³	29/30 x Y

Table 1 - Berechnung des Materialbedarfs für die Beschichtung von Zellkultursystemen mit Matrigel

7.2.8 hiPSC-Kryotubes herstellen

Um eine Zellreihe zu einem späteren Zeitpunkt erneut kultivieren zu können, muss eine ausreichende Anzahl an hiPSC-Kryotubes vorrätig sein. Wie diese hergestellt und gelagert werden können, wird hier beschrieben. Die Stammzellen werden dafür zunächst vom Boden der T-75-Zellkulturflasche gelöst und in Form von in E8-Medium freischwebenden Zellclustern, bestehend aus ca. 10²- 10⁵ Zellen, in ein Falcon®-Tube überführt. Das Protokoll ist bis zu diesem Zeitpunkt analog zum Kapitel 7.2.3 „Splitten/Passagieren“ und kann dort detailliert nachgelesen werden. Dementsprechend kann mittels Kryotubes auch E8-Medium-Zellsuspension asserviert werden, welche beim Passagieren von hiPSC übriggeblieben ist. Für das Befüllen der besagten Kryotubes wird nun, ausgehend von X ml E8-Medium-Zellsuspension, noch folgendes Material benötigt:

- 0,2*X ml DMSO (Dimethylsulfoxid; RT)
- 0,8*X ml FBS (RT)
- Frosty Boy
- 2*X Kryotubes (beschriftet mit Datum, Zellreihe, Passage)

Durchführung:

Exemplarisch wird die Durchführung hier nun mit 10 ml E8-Medium-Zellsuspension beschrieben. Die 2 ml DMSO und 8 ml FBS, jeweils auf Raumtemperatur vorgewärmt, in ein Falcon®-Tube pipettieren. Mit dieser 20%igen Lösung von DMSO in FBS wird nun eine 1 : 1 Mischung mit der E8-Medium-Zellsuspension hergestellt.

Je 1ml der Mischung in 1 Kryotube pipettieren. Beim Pipettieren und Mischen von Flüssigkeiten, in denen Zellcluster schweben, muss vorsichtig und langsam gearbeitet werden, um zu verhindern, dass sich zu viele einzelne Zellen von den Clustern lösen. Den Frosty Boy mit den Kryotubes beladen und für 24 h in einen -80°C Eisschrank stellen. Anschließend und endgültig werden die Kryotubes in flüssigem Stickstoff bei -170°C gelagert.

7.2.9 Supplemente und Medien

Im Rahmen der Zellkultur werden regelmäßig diverse Supplemente sowie Nähr- bzw. Spülmedien verwendet. Diese Materialien werden vom Hersteller jedoch in den seltensten Fällen direkt gebrauchsfertig geliefert und müssen daher zunächst vorbereitet werden. Die richtige „Zubereitung“ ist oft, genauso wie die fachgerechte Lagerung, maßgeblich für den Erfolg oder Misserfolg der Zellkultur mitverantwortlich und soll daher in diesem Abschnitt beschrieben werden.

7.2.9.1 Matrigel

Wie im Kapitel 7.2.7 („Beschichten mit Matrigel“) beschrieben, benötigen die Zellen zum Anhaften am Boden der jeweiligen Zellkultursysteme eine künstliche Extrazellulärmatrix. Die von der Firma Corning Inc. vertriebene „Matrigel® Growth Factor Reduced Basement Membrane Matrix“ genügt diesen Anforderungen und ist vergleichsweise einfach zu handhaben. Extrahiert wird das Produkt laut Hersteller aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkom von Mäusen, einem Tumor der in besonders hohem Maß Extrazellulärmatrix-Proteine wie Laminin, Kollagen IV und Heparinsulfat-Proteoglykane bildet ^{70, 71}.

Geliefert wird das Produkt in Glasflaschen mit 10 ml Inhalt auf Trockeneis und muss beim Eintreffen ins Labor sofort bei -20°C gelagert werden. Das enthaltene Material wird bei Temperaturen um den Gefrierpunkt flüssig und ist bei Raumtemperatur

gelartig. Häufiges Wechseln zwischen den Aggregatzuständen sollte vermieden werden. Beschichtet man große Mengen von Kultursystemen auf einmal kann eine ganze 10 ml Glasflasche mit Matrigel wie in Kapitel 7.2.7 („Beschichten mit Matrigel“) beschrieben auf Eis aufgetaut und vollständig aufgebraucht werden. Andernfalls sollte man den Inhalt der Glasflasche in 1 ml Aliquote aufteilen und diese bei -20°C lagern. Für das Pipettieren von Matrigel enthaltenden Lösungen wird die Verwendung von vorgekühlten Pipettenspitzen, Eppendorf-Gefäßen und Falcon®-Tubes empfohlen. Das Arbeiten auf Eis erleichtert die Handhabung, muss aber unter Berücksichtigung der Hygiene-Vorschriften in der Zellkultur mit besonderer Vorsicht erfolgen. Die zum Beschichten der Kultursysteme hergestellte 1 : 30 Lösung von Matrigel mit PBS (w/o Ca²⁺/Mg²⁺) eignet sich nicht zum Aufbewahren und muss daher vor dem Einsatz frisch hergestellt werden (siehe Kapitel 7.2.7 „Beschichten mit Matrigel“).

7.2.9.2 Pen/Strep

Zur Kontaminationseindämmung werden allen Nährmedien die Antibiotikakombination Penicillin und Streptomycin zugefügt. Durch die zellwandsynthesehemmende Wirkung des Penicillins und die Hemmung der bakteriellen 30S-Ribosomenuntereinheit des Streptomycins ergibt sich ein breiter Wirkungsbereich im grampositiven und gramnegativen Spektrum. Geliefert wird eine 100ml-Flasche, deren Lösung 10.000 Einheiten („U“) Penicillin und 10.000 µg Streptomycin pro Milliliter enthält. In der Zellkultur wird jeweils 1% der Nährmedien durch diese Lösung ersetzt, wodurch sich eine Wirkkonzentration von 100 U/ml bzw. 100 µg/ml ergibt. Die Lösung wird in 15 ml Aliquote aufgeteilt und bei -20°C für bis zu 6 Monate gelagert; im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrtes Pen/Strep sollte innerhalb von 30 Tagen aufgebraucht werden. Erneutes Einfrieren wird nicht empfohlen.

7.2.9.3 E8-Medium

Das „TeSR™-E8™ Medium“ von Stemcell Technologies wird entsprechend der Herstellerangaben vor Gebrauch aus den im Lieferumfang enthaltenen Komponenten zusammengefügt. Die beiden Supplemente (25 ml 20X-Supplement und 1 ml 500X-Supplement) werden bei -20°C gelagert und müssen dementsprechend zunächst bei Raumtemperatur bzw. bei 4°C aufgetaut werden. Vom schnelleren Aufwärmen bei 37°C ist abzusehen. Den kompletten Inhalt der Supplemente in die 474 ml des

„TeSR™-E8™ Basalmediums“ überführen. Anschließend 5 ml (1%) aus der Lösung entnehmen, verwerfen und durch 5 ml Pen/Strep ersetzen. Den gesamten Inhalt durch Drehen der Flasche mischen. Gelagert wird das Medium im Kühlschrank bei 4°C.

7.2.9.4 ROCK-Inhibitor

Der unter dem Handelsnamen „StemMACS™ Y27632“ verfügbare membranpermeable Inhibitor der Rho-assoziierten Kinase (ROCK) wird in der Zellkultur verwendet, um die Überlebenswahrscheinlichkeit und die Klonierungseffizienz von hiPSC nach der Dissoziation zu erhöhen. Dieser Effekt wird über eine kompetitive Hemmung der beiden Isoformen ROCK I (p160ROCK, ROCK β) und ROCK II (ROCK α) erreicht, was zu einer verminderten Apoptoserate führt ^{72, 73}.

ROCK-Inhibitor wird als weißes Pulver in einem Kryotube auf Trockeneis geliefert (Darreichungsform 2 mg) und bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch in der Zellkultur wird eine 10 mM Stammlösung hergestellt. Dafür werden 624 μ l DMSO (Raumtemperatur) in das Kryotube pipettiert und das darin befindliche Pulver durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gelöst. Falls noch ein Fällungsprodukt sichtbar ist, das Kryotube mehrmals schwenken und für 2-3 Minuten bei 37°C inkubieren. Anschließend auf 30 μ l Aliquote verteilen, schockgefrieren und bei -20°C lagern (Haltbarkeit: 6 Monate). Angebrochene Aliquote sollten innerhalb von einem Monat verbraucht werden und können im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

Beim Umgang mit ROCK-Inhibitor sollte stets der direkte Lichteinfall vermieden werden. Vor der Zugabe von ROCK-Inhibitor ist das entsprechende Medium bereits auf 37°C vorzuwärmen.

7.2.9.5 EDTA

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) ist ein Komplexbildner und wird in der Zellkultur besonders wegen seiner Fähigkeit zur Bildung stabiler Chelatkomplexe verwendet. Darüber hinaus kann es als Kalziumpuffer und in geringem Umfang als Antioxidans fungieren. Geliefert wird EDTA in einer 0,5 M Stammlösung, welche für die Zellkultur auf eine Konzentration von 2 mM verdünnt wird:

Mittels Feinwaage werden 225 mg NaCl abgewogen und unter Zuhilfenahme eines Magnetrührers in 250 ml PBS (w/o Ca, Mg) aufgelöst bis keine Kristalle mehr sichtbar sind. Anschließend fügt man 1 ml der 0,5 M EDTA Stock Solution (pH 8.0) hinzu. Vor Gebrauch in der Zellkultur muss die Lösung sterilfiltriert werden. Die Aliquotierung erfolgt in 50 ml Falcon®-Tubes, welche im Kühlschrank bei 4°C für bis zu 2 Monate gelagert werden können.

7.2.9.6 ASC

L-Ascorbinsäure dient als Antioxidationsmittel und wird in der Zellkultur zur Verminderung des oxidativen Stresses durch Sauerstoffradikale verwendet.

“L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate“ wird als weißes Pulver in einer Darreichungsform von 5 g geliefert.

Um eine 200 mM Stammlösung zu erhalten werden mittels Feinwaage 500 mg in 8,63 ml Wasser (Aqua dest.) gelöst. Anschließend wird die Lösung sterilfiltriert und als 60 µl Aliquote schockgefroren, um bei -20°C gelagert zu werden. Einzelne Aliquote vor Gebrauch im Kühlschrank bei 4°C auftauen lassen und dort bis zu 14 Tage lagern.

7.2.9.7 B-27

B-27 Supplement ist ein serumfreier Ergänzungsstoff zur Unterstützung des Wachstums und wurde für die Zellkultur neuronaler Zellen entwickelt. Vom Hersteller angegebene Inhaltsstoffe sind: „Antioxidant Cocktail, Insulin, Vitamin A“.

Erhältlich ist das Supplement als 50x Flüssigkeit in zwei Darreichungsformen (10 ml und 100 ml). Es wird auf Trockeneis geliefert und wird bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wird das Supplement bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend als 1 ml Aliquot im Kühlschrank bei 4°C verwahrt. Erneutes Schockgefrieren und Lagern bei -20°C ist nach dem Aliquotieren ebenfalls möglich. Bei 4°C gelagertes B-27 sollte innerhalb von 10 Tagen aufgebraucht werden. Beim Umgang mit B-27 sollte stets der direkte Lichteinfall vermieden werden.

7.2.9.8 SLS

Die in der Zellkultur eingesetzte Natriumlactatlösung (Sodium Lactate Solution, „SLS“) wird vor Gebrauch als 440 mM Lösung in HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) zubereitet.

Dafür 500 µl der gelieferten 60% (w/w) Sodium Lactat Solution (gelagert bei RT) in 4,5 ml 1M-HEPES Solution (gelagert bei 4°C) lösen und sterilfiltrieren. Anschließend auf 500 µl Aliquote verteilen, schockgefrieren und bei -20°C lagern (Haltbarkeit: 6 Monate). Angebrochene Aliquote sollten innerhalb von einem Monat verbraucht werden und können im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

7.2.9.9 Activin A

Das zur Gruppe der TGF-β (transforming growth factor beta) Superfamilie gehörende Zytokin Activin A spielt eine Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen wie beispielsweise bei der Morphogenese von Geweben, bei Inflammation, bei Reparaturvorgängen, im Fortpflanzungssystem und bei der Karzinogenese^{74, 75}. Im Rahmen der Zellkultur wird sich der Einfluss auf die Zellproliferation und Zelldifferenzierung zu Nutzen gemacht.

Geliefert wird Activin A als weißes Pulver auf Trockeneis - bis zum Gebrauch in der Zellkultur soll es bei -20°C gelagert werden. Verwendet wird es als 10 µg/ml Stammlösung, dafür 1 ml kardiales Medium (4°C) in ein Kryotube pipettieren, mehrfach umschwenken und für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Anschließend erneut umschwenken. Auf 100 µl Aliquote verteilen und schockgefrieren. Die Lagerung erfolgt wieder bei -20°C für bis zu sechs Monate. Angebrochene Aliquote sollten rasch aufgebraucht werden, das Aufbewahren von mehr als 10 Tagen bei 4°C sowie häufiges Auf- und Abtauen sind zu vermeiden.

7.2.9.10 BMP-4

Die Gruppe der BMPs (bone morphogenetic proteins) lässt sich ebenfalls der zuvor genannten Superfamilie der TGF-β-Liganden zuordnen. Das Zytokin BMP-4 wird von der frühen Embryogenese bis zum Erwachsenenalter exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der Bildung von Mesenchym, in der epidermalen Determination, der

Entwicklung von Organen und bei Gewebereparaturvorgängen^{76, 77}. Da sich die beiden Zytokine Activin A und BMP-4 in ihrer Wirkung auf komplexe Weise beeinflussen, spielt das richtige Verhältnis eine große Rolle im Rahmen der Differenzierung von hiPSC zu Kardiomyozyten^{78, 79}.

BMP-4 wird von der gleichen Firma wie Activin A vertrieben und wird in gleicher Darreichungsform geliefert (10 µg weißes Pulver, auf Trockeneis). Bezüglich Lagerung, Handhabung und Haltbarkeit ist analog dem oben beschriebenen Protokoll zu verfahren.

7.2.9.11 FGF-2

Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) gehört zu der Familie der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren und besitzt ein weites Spektrum an Funktionen. So fördert es die Angiogenese, wirkt mitogen und stimuliert die Proliferation von Mesenchym-, Neuroektoderm- und Endothelzellen^{80, 81}.

FGF-2 wird als weißes Pulver in einem Kryotube auf Trockeneis geliefert (Darreichungsform 100 µg) und wird bei -20°C gelagert. Zum Gebrauch im Rahmen des Differenzierungsprotokolls ist eine 10 µg/µl Lösung herzustellen, was in zwei Schritten erfolgt. Zunächst die 100 µg durch Zugabe von 1 ml sterilem Wasser (37°C) und mehrmaligem Schwenken auflösen. Anschließend mit 9 ml sterilem PBS (w/o Ca²⁺, Mg²⁺; 37°C) verdünnen. Durch sanftes Auf- und Abpipettieren mit der 1 ml-Mikropipette vermischen. Die 10 µg/µl Lösung in 500 µl-Aliquote aufteilen, schockgefrieren und bei -20°C für bis zu drei Monate aufbewahren. Angebrochene Aliquote sollten rasch aufgebraucht werden, das Aufbewahren von mehr als 10 Tagen bei 4°C sowie häufiges Auf- und Abtauen sind zu vermeiden.

7.2.9.12 CHIR99021

„StemMACS™ CHIR99021“ ist ein hochselektiver Inhibitor der Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK-3) und wirkt damit stark aktivierend auf den Wnt/β-Catenin Signaltransduktionswegs⁸². Es inhibiert laut Herstellerangaben beide Isoformen der GSK-3 (GSK-3α und GSK-3β), ohne dabei Kreuzreaktionen mit Cyclin-abhängigen

Kinasen (CDKs) hervorzurufen. Es spielt eine Schlüsselrolle in vielen Protokollen, bei denen die Differenzierung pluripotenter Zellen beeinflusst werden soll ⁸²⁻⁸⁵.

CHIR99021 wird als weißes Pulver in einem Kryotube auf Trockeneis geliefert (Darreichungsform 2 mg) und wird bei -20°C gelagert. In der Zellkultur wird eine 1 mM Lösung eingesetzt, welche in zwei Schritten hergestellt wird. Zunächst werden 429 µl DMSO (37°C) in das Kryotube überführt, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und für 2-5 Minuten bei 37°C inkubiert. Diese 10 mM Lösung wird in 20 µl Aliquote aufgeteilt, schockgefroren und kann für 6 Monate bei -20°C aufbewahrt werden. Beim Auftauen eines 20 µl Aliquote wird diesem 180 µl DMSO (37°C) hinzugefügt (1:10, ergibt 200 µl von 1 mM Lösung). Diese Lösung nicht erneut einfrieren, bei 4°C lagern und innerhalb von 7 Tagen aufbrauchen.

7.2.9.13 IWP-4

IWP-4 ist ein Inhibitor des Wnt/β-Catenin Signaltransduktionswegs und beeinflusst somit die Entwicklung verschiedener Zelltypen. Der Inhibitor verhindert einerseits die Palmitoylierung des Wnt-Proteins durch die membrangebundene O-Acyltransferase Porcupine, andererseits wird die Phosphorylierung des Lrp6-Rezeptors (Low-density lipoprotein receptor-related protein 6) geblockt. In der Folge nimmt intrazellulär sowohl die Dvl2- als auch die β-Catenin-Konzentration ab (Dvl2 = Segment polarity protein dishevelled homolog) ⁸³.

IWP-4 wird als weißes Pulver in einem Kryotube auf Trockeneis geliefert (Darreichungsform 1mg) und bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch in der Zellkultur wird eine 5 mM Stammlösung hergestellt. Dafür werden 403 µl DMSO (Raumtemperatur) in das Kryotube pipettiert und das darin befindliche Pulver durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gelöst. Anschließend für 20 Minuten bei 37°C in den Inkubator stellen. Falls noch ein Fällungsprodukt sichtbar ist, das Kryotube mehrmals schwenken und erneut für 20 Minuten bei 37°C inkubieren. Wenn die Lösung klar ist, wird die 5 mM Stammlösung in 55 µl Aliquote verteilt, schockgefroren und bei -20°C gelagert (Haltbarkeit: 6 Monate). Angebrochene Aliquote sollten innerhalb von 7 Tagen verbraucht werden und können im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

Beim Umgang mit IWP-4 sollte stets der direkte Lichteinfall vermieden werden. Vor der Zugabe von IWP-4 ist das entsprechende Medium bereits auf 37°C vorzuwärmen.

7.2.9.14 Kardiales Medium

„Kardiales Medium“ (KM) dient in der Zellkultur von Kardiomyozyten und während des Differenzierungsprotokolls als Nährmedium für die Zellen und enthält Glucose, Aminosäuren sowie ein auf Hydrogencarbonat basierendes Puffersystem (außerdem: Salze, Vitamine und Phenolrot als pH-Indikator).

Von einer 500 ml Flasche „Roswell Park Memorial Institute“-Medium (RPMI 1640) werden 10 ml verworfen und durch 5 ml Pen/Strep sowie 5 ml Na-Pyruvat (100 mM) ersetzt. Das so hergestellte KM kann in der Originalflasche des Herstellers für einen Monat bei 4°C aufbewahrt werden.

7.2.9.15 Serumfreies Medium

Die für die Zellkultur benötigte Menge an kardialem Medium in Falcon®-Tubes überführen, mit 2% B-27 und 0,1% ASC (entspricht Endkonzentration von 200 µmol/L) versetzen und bei 37°C für mindestens eine Stunde inkubieren. Diesem „serumfreien Medium“ (SM) erst dann andere Faktoren zugeben, wenn es auf 37°C erwärmt wurde. [Beispiel 50 ml SF gewünscht: 49 ml KM + 1 ml B-27 + 50 µl ASC]

7.2.9.16 Selektionsmedium

Um am Ende des Differenzierungsprotokolls die Reinheit der Mischkultur zugunsten von Kardiomyozyten zu erhöhen, wird für eine gewisse Zeitspanne eine metabolische Selektion durchgeführt, indem die Zellen in einem Selektionsmedium (SM) kultiviert werden, welches frei von Glucose und Glutamin ist. Als Energielieferant wird stattdessen Lactat beigemischt, was zwar von Kardiomyozyten, nicht aber von den anderen Zellen der Mischkultur metabolisiert werden kann. Außerdem wird 2-Mercaptoethanol hinzugefügt, welches eine vorzeitige Oxidierung des Lactats verhindert. Um 49,85 ml dieses Selektionsmediums herzustellen, benötigt man 49 ml RPMI (-Glucose, -Glutamin), 500 µl Pen/Strep, 250 µl SLS (440 mM) sowie 100 µl 2-Mercaptoethanol (50 mM). Alles in ein 50 ml Falcon®-Tube pipettieren und durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren mischen. Das SM kann für einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen bei 4°C gelagert werden; vor Einsatz in der Zellkultur ist es auf Raumtemperatur zu erwärmen (Dauer ca. 1 h).

7.3 Versuchsprotokolle – Polymerase-Kettenreaktion

Eine zentrale Fragestellung bei der Charakterisierung einer Zellreihe ist, in welchem Ausmaß bestimmte Proteine exprimiert werden. Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, „PCR“) ist eine Möglichkeit, um diesbezüglich objektivierbare Messergebnisse zu sammeln. Davon ausgehend, dass das Verhältnis der Proteinsynthese proportional ist zu der Menge der für das entsprechende Protein kodierenden Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA), soll die Konzentration dieser mRNA gemessen werden. Dafür lysiert man die Zellen mehrerer Wells und mischt das Zytoplasma, was als „Poolen“ bezeichnet wird. Das Lysat muss durch mehrere Zwischenschritte aufbereitet werden, bevor es quantitativ analysiert werden kann. Zunächst müssen gezielt nur die Nukleinsäuren der Zellen asserviert werden, anschließend die Desoxyribonukleinsäure (DNA) entfernt werden, sodass eine nahezu reine mRNA-Probe vorliegt. Es erfolgt eine photometrische Bestimmung der Reinheit und der Konzentration der Probe. Da allerdings noch keine Unterscheidung von verschiedenen mRNAs möglich ist, wird mittels reverser Transkription eine komplementäre DNA (cDNA) generiert. Diese dient wiederum der quantitativen real-time PCR als Ausgangsmaterial.

Durch die Verwendung spezifischer Primer werden in der quantitativen real-time PCR gezielt nur die Genabschnitte polymerisiert, welche für das zu untersuchende Protein kodieren. Um eine Aussage über die Quantität des Ausgangsmaterials treffen zu können, enthält der PCR-Mastermix neben den entsprechenden Primern, den Enzymen und den Basen für die Elongation zusätzlich einen Fluoreszenz-Farbstoff, der an der kleinen Furche der Doppelstrang-DNA interkaliert und nur im gebundenen Zustand fluoreszierend ist. Am Ende jedes Zyklus, also nach jeder Elongation, erhöht sich somit das Ausmaß der Fluoreszenz. Dies wird während der PCR gemessen und schließlich durch einen c(T)-Wert ausgedrückt. Dieser Wert gibt einen arithmetisch ermittelten Zeitpunkt an, zu dem die Fluoreszenz einen von der Maschine für den jeweiligen Lauf ermittelten Schwellenwert übersteigt. Je kleiner dieser c(T)-Wert ist, desto früher hat eine Probe diesen Schwellenwert überstiegen und desto größer war folglich die Ausgangskonzentration der entsprechenden cDNA.

Mit dem c(T)-Wert eines bestimmten Genabschnitts und dem c(T)-Wert eines Housekeeping-Gens der jeweiligen Probe wurde anschließend unter Verwendung der

$\Delta\Delta c(T)$ -Methode die relative Genexpressionsrate ermittelt (vgl. ⁵²). Als Housekeeping-Gen diente im Rahmen dieser Studie GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase).

Um nachzuweisen, dass ausschließlich DNA-Fragmente amplifiziert wurden, die durch die Auswahl des Primers gewünscht sind, erfolgt nach der PCR eine Schmelzkurvenanalyse. Dabei wird die Temperatur kontinuierlich erhöht und das Fluoreszenzniveau ermittelt. Die Denaturierung des Doppelstrangs zu zwei einzelsträngigen Molekülen (Schmelzen) ist abhängig von der Länge und der Basenzusammensetzung des DNA-Fragmentes. Nach einer selektiven Polymerisation haben nahezu alle DNA-Doppelstränge in der Probe die gleiche Schmelztemperatur.

Von der Probengewinnung bis zum statistisch auswertbaren Messergebnis lässt sich die PCR in fünf Arbeitsschritte unterteilen, welche zeitlich unabhängig voneinander durchgeführt werden können und in den folgenden Kapiteln ausführlich beschrieben werden.

7.3.1 Zelllyse und Homogenisierung

Der Zeitpunkt, an dem die Zelllyse und die Homogenisierung durchgeführt wird, ist abhängig von der Fragestellung und wird dementsprechend durch das Alter der Zellen (Tag nach Beginn der Differenzierung) vorgegeben. Im Fall dieser Studie wurden die Tage 0, 10, 20, 25 und 35 nach Beginn der Differenzierung als Zeitpunkt der Zelllyse und Homogenisierung gewählt. Jede Zellreihe bedarf einer unterschiedlichen Handhabung. Außerdem muss abhängig von der Zelldichte im Well von Passage zu Passage entschieden werden, wie viele Wells jeweils miteinander zu poolen sind. Die hier angegebenen Mengen wurden für die im Rahmen der Studie untersuchten ARVC-Zellreihe optimiert. In den meisten Fällen lieferte eine aus drei Wells gepoolte Probe eine ausreichend hohe RNA-Konzentration. Es wird das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet; das mitgelieferte Protokoll wurde modifiziert und wird daher hier ausführlich beschrieben.

Benötigtes Material (für 3 Wells):

- 500 µl RLT-Lysepuffer
- 5 µl beta-Mercaptoethanol (>98%)
- 1 Quiashredder spin column
- 6 ml steriles Aqua dest.
- Mikropipetten, Eppendorf-Pipettiergefäße

Vorbereitung:

Aus der RLT-Lysepuffer-Flasche 500 µl in ein Eppendorf-Gefäß überführen und 5 µl beta-Mercaptoethanol (>98%) zugeben. Dabei unter dem Abzug arbeiten.

Durchführung:

Das Medium aus den drei Wells vollständig absaugen und 500 µl des RLT-Lysepuffers (incl. 1:100 beta-Mercaptoethanol) in das erste Well pipettieren. Dieser RLT-Lysepuffer enthält unter anderem Guanidiniumthiocyanat, eine stark chaotrope Verbindung mit hoher Denaturierungspotenz. Proteine (unter anderem RNasen) werden somit inaktiviert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren (ca. 10x) den Inhalt des Wells resuspendieren bis mit bloßem Auge keine Teilchen mehr sichtbar sind. Dann den Inhalt des ersten Wells in das zweite Well überführen und wie zuvor beschrieben zu einer homogenen Lösung resuspendieren, anschließend beim dritten Well analog vorgehen. Das gelöste Material aller drei Wells auf den Filter einer QIAshredder-spin-column überführen und für zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren (Homogenisierung). Währenddessen sollten die Wells zweimal mit je 500 µl sterilem Wasser gespült werden, um Rückstände des beta-Mercaptoethanols zu entfernen. Nach der Zentrifugation kann der Filter verworfen werden. Den Durchfluss asservieren und in flüssigem Stickstoff schockfrieren. Das homogenisierte Lysat ist bei -20°C für mindestens 6 Monate lagerbar.

7.3.2 RNA-Aufbereitung und Photometrie

Der in diesem Abschnitt beschriebene Arbeitsschritt lässt sich gut skalieren. Um Arbeitszeit einzusparen, empfiehlt es sich mit der Durchführung zu warten, bis mehrere Lysatproben (z.B. 8-16) aufbereitet werden sollen. Die hier angegebenen Mengen gelten für eine einzelne Probe.

Benötigtes Material:

- 10 µl DNase-Stammlösung (*)
- 70 µl RDD-Puffer
- 500 µl Ethanol 70%
- 700 µl RW1-Puffer (*)
- 1 ml RPE-Puffer
- 435 µl RNase-freies Wasser
- 1 RNeasy-mini-column + 5 RNeasy-collection-tubes
- UV-Küvetten, Eppendorf-Gefäße
- Mikropipetten, Eppendorf-Pipettiergefäße

(*) Die DNase-Stammlösung und der RW1-Puffer werden in einer für den direkten Gebrauch ungeeigneten Form geliefert und müssen vor erstmaligem Gebrauch entsprechen vorbereitet werden (siehe unten).

Vorbereitung:

Die Lysatprobe aus Kapitel 7.3.1 für 15 Minuten auf dem Heating-Block bei 37°C auftauen. In ein Eppendorf-Gefäß 10 µl der DNase-Stammlösung und 70 µl des RDD-Puffers überführen und durch langsames Schwenken mischen.

Nur bei erstmaligem Gebrauch des RNeasy Mini Kits muss der RW1-Puffer, der als Konzentrat geliefert wird, mit 96-100%igem Ethanol zu einem 1 : 4 Verhältnis gemischt werden. Die DNase-Stammlösung ist kein Bestandteil des RNeasy Mini Kits und muss separat bestellt werden. Es wird als tiefgefrorenes Mikrogranulat auf Trockeneis geliefert und ist vor dem erstmaligen Gebrauch in 550 µl RNase-freiem Wasser zu lösen. Da ein häufiger Wechsel des Aggregatzustandes zu vermeiden ist, empfiehlt sich eine Aliquotierung zu 50 µl Aliquote, welche bei -20°C für mindestens 6 Monate gelagert werden können.

Durchführung:

500 µl Ethanol (70%) zu der aufgetauten Lysatprobe geben und durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren mischen. Als nächstes wird die Probe in eine RNeasy-mini-column („Säule“) pipettiert. Da das Volumen der Säule auf 800 µl beschränkt ist, muss zunächst die erste Hälfte der Probe überführt werden und für 15 Sekunden bei 12.000 rpm zentrifugiert werden. Den Durchfluss verwerfen und anschließend mit der zweiten Hälfte der Probe analog verfahren. Die RNeasy-mini-column enthält eine Membran auf Siliciumdioxid-Basis (Silicagel), welche mit einem spezialisierten salzreichen Puffersystem ausgestattet ist. Durch das zugefügte Ethanol werden die

Bindungseigenschaften für RNA laut dem Hersteller soweit optimiert, dass bis zu 100 µg RNA an der Membran gebunden werden kann. Dabei soll nur RNA gebunden werden, deren Länge 200 Nukleotide übersteigt, was eine möglichst hohe mRNA-Fraktion gewährleisten soll (5.8S rRNA, 5S rRNA und tRNAs werden nicht gebunden; vgl. Handbuch des Herstellers).

350 µl RW1-Puffer in die Säule pipettieren, für 15 Sekunden bei 12.000 rpm zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen (Waschschritt 1). Dann die RNeasy-mini-column in ein neues RNeasy-collection-tube stecken und 80 µl der vorbereiteten DNase-Lösung (1:7 in RDD-Puffer) direkt auf die Membran pipettieren. Für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen. Am Ende der Inkubationszeit einen weiteren Waschschritt mit 350 µl RW1-Puffer durchführen.

Die Säule erneut in ein neues RNeasy-collection-tube stecken, 500 µl RPE-Puffer hinzufügen, für 15 Sekunden bei 12.000 rpm zentrifugieren und den Durchfluss wegschütten (Waschschritt 3). Einen vierten Waschschritt analog zum dritten durchführen, jedoch diesmal für zwei Minuten bei 12.000 rpm zentrifugieren. Dann noch einmal für eine Minute bei 14.000 rpm zentrifugieren und die Säule anschließend wieder in ein neues RNeasy-collection-tube überführen. Um die an der Membran gebundene und durch mehrere Waschschriffe gereinigte RNA zu lösen, 35 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettieren und für eine Minute bei 12.000 rpm zentrifugieren. Die RNeasy-mini-column kann nun verworfen werden, der Durchfluss enthält nun die RNA-Probe und muss sorgfältig in einem 300 µl Eppendorf-Gefäß asserviert werden. In einem separaten 300 µl Eppendorf-Gefäß 198 µl RNase-freies Wasser und 2 µl der RNA-Probe zusammenführen und durch langsames Schwenken mischen (nicht vortexen). Diese 1:100 verdünnte RNA-Probe nun vollständig in eine UV-Küvette überführen. Analog dazu in einer zweiten UV-Küvette 200 µl RNase-freies Wasser als Negativkontrolle („blank“) vorbereiten.

Am Photometer (Bio Photometer, eppendorf) folgende Einstellungen tätigen: „RNA -> Dilution -> 2 µl + 198 µl“. Zuerst mit der blank-Probe die Emission auf null setzen und anschließend die Emission der verdünnten RNA-Probe messen. Das Gerät gibt durch die getätigten Einstellungen direkt die Konzentration in [µg/µl] an.

Auch die aufbereitete RNA-Probe kann für einen späteren Zeitpunkt bei -20°C gelagert werden.

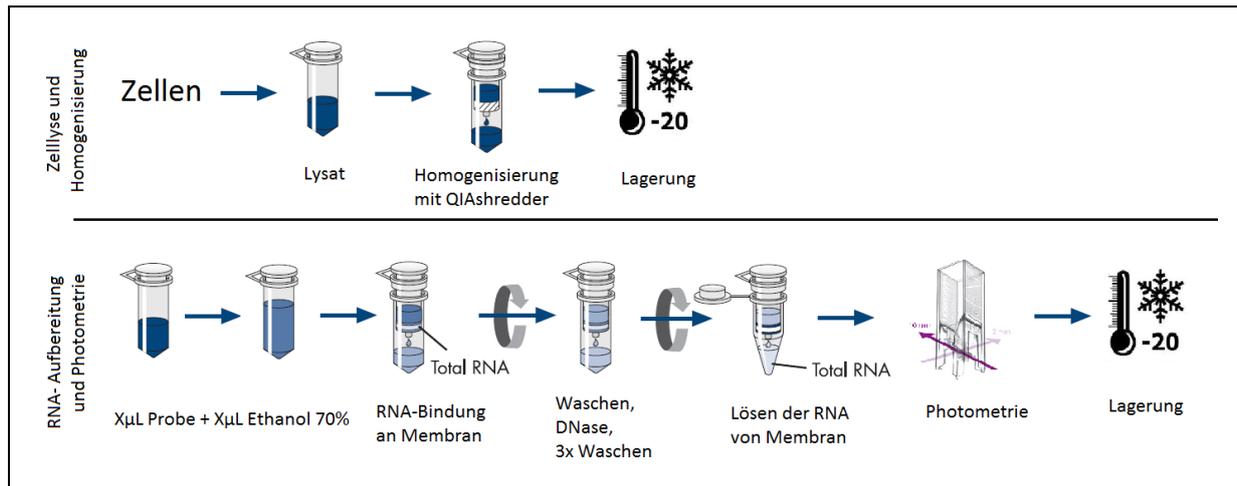


Abbildung 22 - modifizierter Ablauf der RNA-Präparation mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen; für originale Abbildung siehe Handbuch des Herstellers (im Lieferumfang enthalten).

7.3.3 Reverse Transkription

Für die Umschreibung von mRNA zu cDNA wird die reverse Transkriptase AMV („RT-AMV“) der Firma Roche verwendet. Die Abkürzung AMV steht dabei für das Avian Myeloblastosis Virus, aus dessen RNA-Genom das Enzym generiert wird. Laut Herstellerangaben beinhaltet das Produkt drei aktive Formen des Enzyms, nämlich eine α -, eine β - und eine $\alpha\beta$ -Form. Die letztgenannte stellt die aktivste Form dar und besitzt eine RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität (zur Generierung eines RNA-DNA-Hybridstrangs), einen RNase-H-Anteil (zum Abbau des RNA-Anteils des Hybridstrangs) sowie eine DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität (zur Vervollständigung des einzel- zum doppelsträngigen DNA-Strangs). Um den optimalen Wirkungsgrad des Enzyms zu erreichen, wird dem Reaktionsgemisch (Mastermix, „MaMi“) ein im Lieferumfang enthaltener RT-Puffer zugegeben. Dieser enthält auch die für die Reaktion obligatorischen Mn^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen. Darüber hinaus setzt sich der Mastermix aus den folgenden Inhaltsstoffen zusammen: einem Nucleotidmix, der bei der Elongation als Substrat dient; einer RNase Out-Lösung, die im Fall einer etwaigen Verunreinigung mit der ubiquitären RNase diese inaktivieren soll; ggf. Wasser zur Verdünnung bei hohen mRNA-Konzentrationen; Bovinem Serum Albumin (BSA), das die Stabilität des Endproduktes erhöhen soll. Da die RT-AMV ohne einen Primer nicht an der mRNA angreifen kann, muss dieser zunächst angelagert werden (Annealing).

Insgesamt lässt sich der Ablauf der reversen Transkription also in drei Phasen gliedern, wobei als erste eigenständige Phase die Berechnung der Pipettiertabelle und die Vorbereitung des Mastermixes zu nennen ist. Daran schließt sich das Annealing des Primers an den mRNA-Strang als zweite Phase und die eigentliche reverse Transkription, also die Umschreibung von mRNA zu cDNA als dritte Phase an.

7.3.3.1 Phase i: Berechnung der Pipettiertabelle (Vorbereitung)

Um standardisierte Konzentrationen als Ausgangsmaterial zu erhalten, ist die RNA-Probe auf 3 µg pro 25,7 µl mit Wasser zu verdünnen. Die Berechnung kann automatisiert mithilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms (z.B. Excel) erfolgen (vgl. Tabelle 2).

RNA Konz. [µg/µl]	3µg RNA entspricht [µl]	RNA [µl]	25µM p(dT) ₁₅ [µl]		Wasser [µl]	Mastermix [µl]	
0,15	20,0	20,0	6,0	RT-1 Programm	5,7	13,35	RT-2 Programm
0,20	15,0	15,0	6,0	RT-1 Programm	10,7	13,35	RT-2 Programm
0,25	12,0	12,0	6,0	RT-1 Programm	13,7	13,35	RT-2 Programm
0,30	10,0	10,0	6,0	RT-1 Programm	15,7	13,35	RT-2 Programm
0,35	8,6	8,6	6,0	RT-1 Programm	17,1	13,35	RT-2 Programm
0,40	7,5	7,5	6,0	RT-1 Programm	18,2	13,35	RT-2 Programm
0,45	6,7	6,7	6,0	RT-1 Programm	19,0	13,35	RT-2 Programm
0,50	6,0	6,0	6,0	RT-1 Programm	19,7	13,35	RT-2 Programm

Tabelle 2 - exemplarische Pipettiertabelle für RNA-Proben mit niedrigerer Konzentration als 0,5 µg/µl

Der Arbeitsschritt der reversen Transkription lässt sich gut skalieren und es bietet sich daher an, mehrere Proben gleichzeitig zu behandeln. Der Materialbedarf ist hier für eine einzelne mRNA-Probe aufgeführt. Die Berechnung der benötigten Mengen für mehrere Proben kann, unter Berücksichtigung einer Pipettierreserve von zwei bis drei Proben, ebenfalls in das Tabellenkalkulationsprogramm eingepflegt werden.

Benötigtes Material (für eine mRNA-Probe):

- mRNA und RNase-freies Wasser nach Pipettiertabelle
- 6 µl 25µM p(dT)₁₅-Primer
- 9 µl 5x RT-Puffer
- 1 µl dNTP Mix (10mM je Nucleotid)
- 2,3 µl RNase Out
- 0,45 µl BSA (10mg/ml)
- 0,6 µl RT-AMV
- 100 µl PCR-Pipettiergefäß, 1 ml Eppendorf-Pipettiergefäß
- Mikropipetten, Eppendorf-Pipettiergefäße

Vorbereitung:

Der Mastermix für die reverse Transkription ist nicht stabil lagerbar und muss daher jedes Mal frisch hergestellt werden. Dafür die mit „MaMix“ markierten Reagenzien aus der Liste der benötigten Materialien der Reihe nach in ein Eppendorf-Pipettiergefäß überführen und anschließend durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren mischen. Die RT-AMV an dieser Stelle noch nicht hinzufügen.

Da einige der enthaltenen Reagenzien vom Hersteller nicht gebrauchsfertig geliefert werden, müssen diese vor dem erstmaligen Gebrauch vorbereitet werden:

Das BSA wird in einer Konzentration von 20mg/ml geliefert und muss 1:1 mit einem Milliliter RNase-freies Wasser auf eine Arbeitskonzentration von 10 mg/ml verdünnt werden. Es kann bei -20°C gelagert werden.

Der 25 µM p(dT)₁₅-Primer wird als Lyophilisat in einer Portionsgröße von 40 µg bzw. 8 nmol geliefert. Vor erstmaligem Gebrauch muss es in 320 µl RNase-freies Wasser gelöst werden, dafür bei Raumtemperatur für fünf Minuten langsam per Hand schwenken.

7.3.3.2 Phase ii: Annealing des Primers

Das zuvor berechnete Volumen der mRNA-Probe in ein 100 µl PCR-Gefäß überführen, dazu 6 µl des 25 µM p(dT)₁₅-Primers pipettieren und durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren mischen. Das PCR-Gefäß verschließen und in das RT-Gerät (peqstar, Peqlab Biotechnologie GmbH) stellen, dann das RT-1 Programm wie unten beschrieben programmieren und starten. Während des Erwärmens auf 72°C lagert sich der Primer an die mRNA-Stränge an.

```
RT-1- Programm:  
Heat Lid to 110.0°C  
Temp. 72.0°C for 4' 0"  
Store forever at 4.0°C
```

7.3.3.3 Phase iii: reverse Transkription

Nach Ablauf des RT-1 Programms die zuvor berechnete Menge RNase-freies-Wasser in das PCR-Gefäß überführen. Dem Mastermix pro mRNA-Probe je 0,6 µl RT-AMV zufügen, durch dreimaliges (langsames) Auf- und Abpipettieren mischen und anschließend 13,35 µl des nun fertigen Mastermixes in das PCR-Gefäß überführen.

Den gesamten Inhalt erneut langsam mischen, das Gefäß verschließen und in das RT-Gerät (peqstar, Peqlab Biotechnologie GmbH) stellen. Dann wie unten beschrieben das RT-2 Programm programmieren und starten. Die durch das RT-AMV katalysierte Reaktion besitzt ein Temperaturoptimum von 42°C. Bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten kann davon ausgegangen werden, dass das Umschreiben der mRNA zu cDNA vollständig abgelaufen ist. Das anschließende Erwärmen auf 94°C dient der Inaktivierung der Enzyme. Die (ca. 45 µl enthaltende) Probe kann nach Ablauf des RT-2 Programms bei -20°C gelagert werden.

RT-2 Programm:
Heat Lid to 110.0°C
Temp. 42.0°C for 1h 30' 0"
Temp. 94.0°C for 10' 0"
Store forever at 4.0°C

7.3.4 Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion

Für die quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion wird neben der cDNA-Probe ein spezifischer Primer benötigt, welcher an der cDNA bindet und als Startpunkt für die Amplifikation der entsprechenden Gensequenz dient.

Durch die Auswahl der Primer erfolgte eine Analyse der Genabschnitte **POU5F1** (POU class 5 homeobox 1; Synonym: OCT4; Pluripotenzmarker), **GJA1** (Gap-Junction Alpha-1 protein; Synonym: Connexin-43; Strukturprotein von Kardiomyozyten), **DSG2** (Desmoglein-2; Strukturprotein von Kardiomyozyten; Ort der Mutation des Patienten der Studie), **TNNI3** (Cardiac muscle troponin I; Strukturprotein von Kardiomyozyten), **TNNT2** (Cardiac muscle troponin T; Strukturprotein von Kardiomyozyten), **SCN5A** (Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit V; Synonym: NaV1.5; Untereinheit eines kardialen Natriumkanals), **SCN10A** (Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit X; Synonym: NaV1.8; Untereinheit eines kardialen Natriumkanals), **SCN1B** (Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit I; Untereinheit eines kardialen Natriumkanals), **SCN3B** (Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit III; Untereinheit eines kardialen Natriumkanals), **CACNA1C** (Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C; Untereinheit eines kardialen Kalziumkanals), **KCNJ2** (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 2; Untereinheit eines kardialen Kaliumkanals), **KCNK3** (Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K

Member 3; Untereinheit eines kardialen Kaliumkanals), **KCND3** (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member 3; Untereinheit eines kardialen Kaliumkanals), **KCNQ1** (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1; Untereinheit eines kardialen Kaliumkanals), **KCNH2** (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 2; Untereinheit eines kardialen Kaliumkanals) und **KCNIP2** (Potassium Voltage-Gated Channel Interacting Protein 2; Untereinheit eines kardialen Kaliumkanals). Die Normierung der Daten erfolgte durch die $\Delta\Delta c(T)$ -Methode und dem Housekeeping-Gen **GAPDH** (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; Enzym der Glycolyse).

Alle weiteren Reagenzien, wie zum Beispiel das Enzym DNA-Polymerase, die als Substrat dienenden Nukleotide oder die Fluoreszenzfarbstoffe für die Quantifizierung, sind als fertiger Mastermix erhältlich. Im Rahmen dieser Studie wurde der „SibirRoxHot Master Mix, ROX 0.1 μ M“ der Firma Bioron GmbH verwendet. Eine Liste der verwendeten Primer findet sich in Tabelle 10 im tabellarischen Anhang (Seite 117).

Bei der Planung der Experimente ist zu beachten, dass pro Durchlauf 96 einzelne Messungen durchgeführt werden können. Um Fehler beim Pipettieren zu detektieren, werden mit jedem biologischen Replikat (also mit jeder cDNA-Probe) immer zwei identische Versuche in einem Lauf durchgeführt. Dies wird als technisches Replikat bezeichnet und erhöht die interne Validität der Messung durch Mittelwertbildung. Es können also 48 verschiedene Proben analysiert werden. Im Rahmen dieser Studie wurden zu fünf verschiedenen Zeitpunkten des Differenzierungsprotokolls (d0, d10, d20, d25, d35) Zellmaterial einer Passage asserviert. Es sollen nun verschiedene Gen-spezifische Primer zugegeben werden, um Rückschlüsse auf die Expression des jeweiligen Gens zu erhalten. Zusätzlich zu den fünf cDNA-Proben muss für jeden dieser Primer auch eine Negativ-Kontrolle („no template control“, „NTC“) durchgeführt werden. Dabei wird dem Mastermix statt cDNA eine gleiche Menge an Wasser hinzugefügt. Pro Primer werden also 6 einzelne Messungen (bzw. 12 unter Berücksichtigung der technischen Replikate) notwendig. Zur Normierung der Datensätze im Anschluss an die eigentliche Messung wird von jeder cDNA-Probe auch eine Messung des Housekeeping-Gens GAPDH benötigt. Die Normierung mittels GAPDH ist in jedem PCR-Durchlauf durchzuführen, da sich einzelne Durchläufe voneinander unterscheiden können (z.B. aufgrund der Qualität des Mastermixes).

Insgesamt können somit pro PCR-Durchlauf sieben verschiedene Primer und GAPDH für alle fünf untersuchten Zeitpunkte des Differenzierungsprotokolls von einer Passage analysiert werden (vgl. Abbildung 23).

Benötigtes Material pro Probe/Messansatz:

- 12,5 µl SibirRoxHot Master Mix, ROX 0,1 µM
- 10,5 µl steriles H₂O
- 1 µl des entsprechenden Primers (10 pmol/µl, entspricht 400 nM Endkonzentration)
- PCR-Platte oder PCR-Stripes, Mikropipetten, Eppendorf-Pipettiergefäße

Vorbereitung:

Die benötigten Reagenzien und die cDNA-Probe auf Eis auftauen (Dauer ca. 15 Minuten). In der Zwischenzeit das PCR-Gerät (Mx3005P™, Stratagene®), den PC und die Software (MXPro 4.10, Agilent Technologies) starten. Als „project type“ wird „SYBR® Green (with Dissociation Curve)“ ausgewählt, außerdem darauf achten, dass „Turn lamp on for warm-up?“ aktiviert ist, um die UV-Lampe aufzuwärmen (Dauer 20-40 min). Anschließend pro Messansatz je 12,5 µl SibirRoxHot Master Mix, 10,5 µl steriles H₂O und 1 µl des Primers in ein Eppendorf-Pipettiergefäß zusammenführen und durch Schwenken mischen.

Durchführung:

In jede Vertiefung der PCR-Platte bzw. in jedes PCR-Tube werden zuerst 24 µl des zuvor vorbereiteten Mastermixes gegeben und dann je 1 µl der entsprechenden cDNA (bzw. H₂O bei der NTC) hinzugefügt. Abbildung 23 zeigt exemplarisch die Planung eines PCR-Durchlaufs mit 96 Messungen und die optimale Verteilung der Primer und Proben (hinsichtlich des Material- und Zeitaufwandes). Bei Zugabe der cDNA zweimal auf- und abpipettieren. Anschließend die Platte mit einer durchsichtigen Spezialfolie abdecken. Die gesamte PCR-Platte für 30 Sekunden bei 2000 rpm zentrifugieren und in das PCR-Gerät stellen.

In der Software müssen im „Plate Setup“ und im „Thermal Profile Setup“ noch die jeweiligen Parameter der Messung festgelegt werden. Die Einstellungen können in der Software aus vorherigen Messungen importiert werden. Abbildung 24 zeigt die im Rahmen dieser Studie verwendete Programmierung. Anschließend den Lauf starten und „Turn Lamp off at the end?“ markieren, sollte kein weiterer Durchlauf im Anschluss geplant sein.

20.10.16 Test qPCR: GEORG - Connexin-43, Desmoglein-2, KCNK3, SCN5A, SCN10A, SCN3B, SCN1B (d0-d35)

Probe/Passage: "GEORG D1 p52" (3 Wells gepoolt in 500 µl)

ID	cDNA-Probe	Zelllyse	RNA-Präp	Rev. Tran.
1	G0 A	19.07.2016 (d0)	02.10.2016 0,672	14.10.2016
2	G10 A	29.07.2016 (d10)	02.10.2016 0,626	14.10.2016
3	G20 A	08.08.2016 (d20)	02.10.2016 0,233	14.10.2016
4	G25 A	13.08.2016 (d25)	02.10.2016 0,311	14.10.2016
5	G35 A	23.08.2016 (d35)	02.10.2016 0,202	14.10.2016

Primer dieser Messung:

Connexin-43 (CONN.)
Desmoglein-2 (DSG2)
KCNK3
GAPDH
SCN5A
SCN10A
SCN3B
SCN1B

Pipettierhilfe:

Reminder Mastermix:
n = 13 (5x2 Proben + 1x2 NTC + 1 Reserve)

13x12,5 µl = 162,5 µl Mastermix
13x10,5 µl = 136,5 µl PCR-Wasser
13x 1 µl = 13 µl Primer

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

A	1 CONN.	1 CONN.	2 CONN.	2 CONN.	3 CONN.	3 CONN.	4 CONN.	4 CONN.	5 CONN.	5 CONN.	H2O CONN.	H2O CONN.
B	1 DSG2	1 DSG2	2 DSG2	2 DSG2	3 DSG2	3 DSG2	4 DSG2	4 DSG2	5 DSG2	5 DSG2	H2O DSG2	H2O DSG2
C	1 KCNK3	1 KCNK3	2 KCNK3	2 KCNK3	3 KCNK3	3 KCNK3	4 KCNK3	4 KCNK3	5 KCNK3	5 KCNK3	H2O KCNK3	H2O KCNK3
D	1 GAPDH	1 GAPDH	2 GAPDH	2 GAPDH	3 GAPDH	3 GAPDH	4 GAPDH	4 GAPDH	5 GAPDH	5 GAPDH	H2O GAPDH	H2O GAPDH
E	1 SCN5A	1 SCN5A	2 SCN5A	2 SCN5A	3 SCN5A	3 SCN5A	4 SCN5A	4 SCN5A	5 SCN5A	5 SCN5A	H2O SCN5A	H2O SCN5A
F	1 SCN10A	1 SCN10A	2 SCN10A	2 SCN10A	3 SCN10A	3 SCN10A	4 SCN10A	4 SCN10A	5 SCN10A	5 SCN10A	H2O SCN10A	H2O SCN10A
G	1 SCN3B	1 SCN3B	2 SCN3B	2 SCN3B	3 SCN3B	3 SCN3B	4 SCN3B	4 SCN3B	5 SCN3B	5 SCN3B	H2O SCN3B	H2O SCN3B
H	1 SCN1B	1 SCN1B	2 SCN1B	2 SCN1B	3 SCN1B	3 SCN1B	4 SCN1B	4 SCN1B	5 SCN1B	5 SCN1B	H2O SCN1B	H2O SCN1B

Abbildung 23 – exemplarische Versuchsplanung eines PCR-Durchlaufs: (7x Primer + 1x GAPDH) x 6 Proben (5x cDNA + 1x NTC) x 2 (technische Replikate) = 96 Messungen.

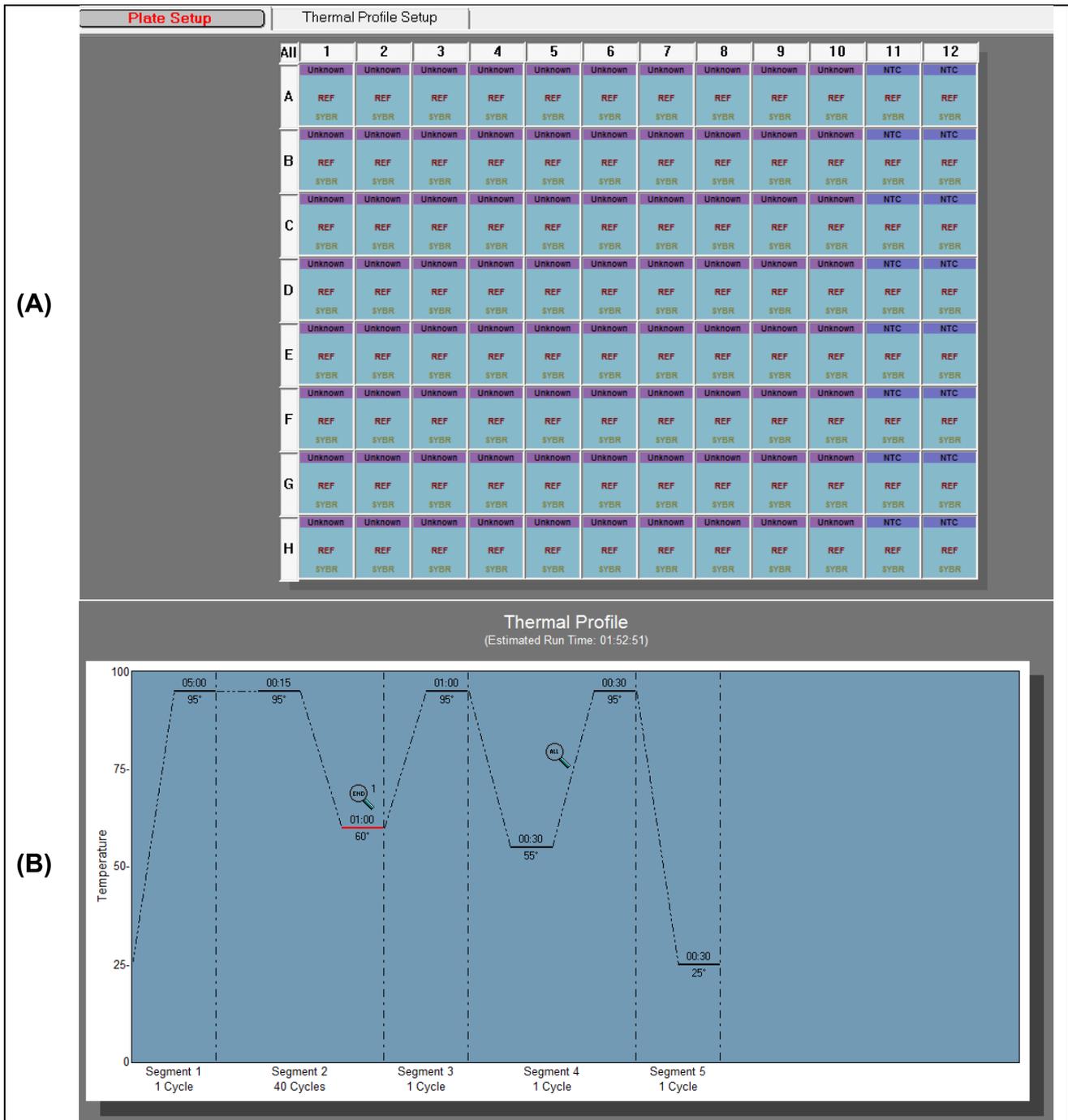


Abbildung 24 – Programmierung der Versuchsparameter in der PCR-Software (MXPro 4.10, Agilent Technologies) (A) Plate Setup; (B) Thermal Profile Setup.

7.3.5 Auswertung der Datensätze

Im Anschluss eines PCR-Laufs stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, um die gesammelten Datensätze auszuwerten. Ausgangspunkt ist dabei immer der c(T)-Wert der einzelnen Messungen (vgl. Kapitel 2.4 Polymerase-Kettenreaktion; zur Darstellung der Rohdaten siehe Abbildung 25). Im Rahmen dieser Studie sollte eine Aussage über die Zu- oder Abnahme der Expression bestimmter Gene/Proteine im zeitlichen Verlauf

ermöglicht werden. Daher wurde unter Verwendung der $\Delta\Delta c(T)$ -Methode die relative Genexpression ermittelt⁵². Relativiert wurde das Ausmaß der Genexpression dabei auf Tag 0 (d0) der Differenzierung. Dieser Wert erhielt einen relativen Expressionswert von 1. In Abbildung 26 wird die Berechnung der relativen Expression anhand der $c(T)$ -Werte von einem einzelnen PCR-Lauf demonstriert. Die statistische Auswertung mehrerer Durchläufe, sowie der anschließende Vergleich der Ergebnisse von ARVC-Zellen und D1-Zellen, erfolgte analog der in Kapitel 2.9 („Statistische Auswertung“) beschriebenen Prinzipien.

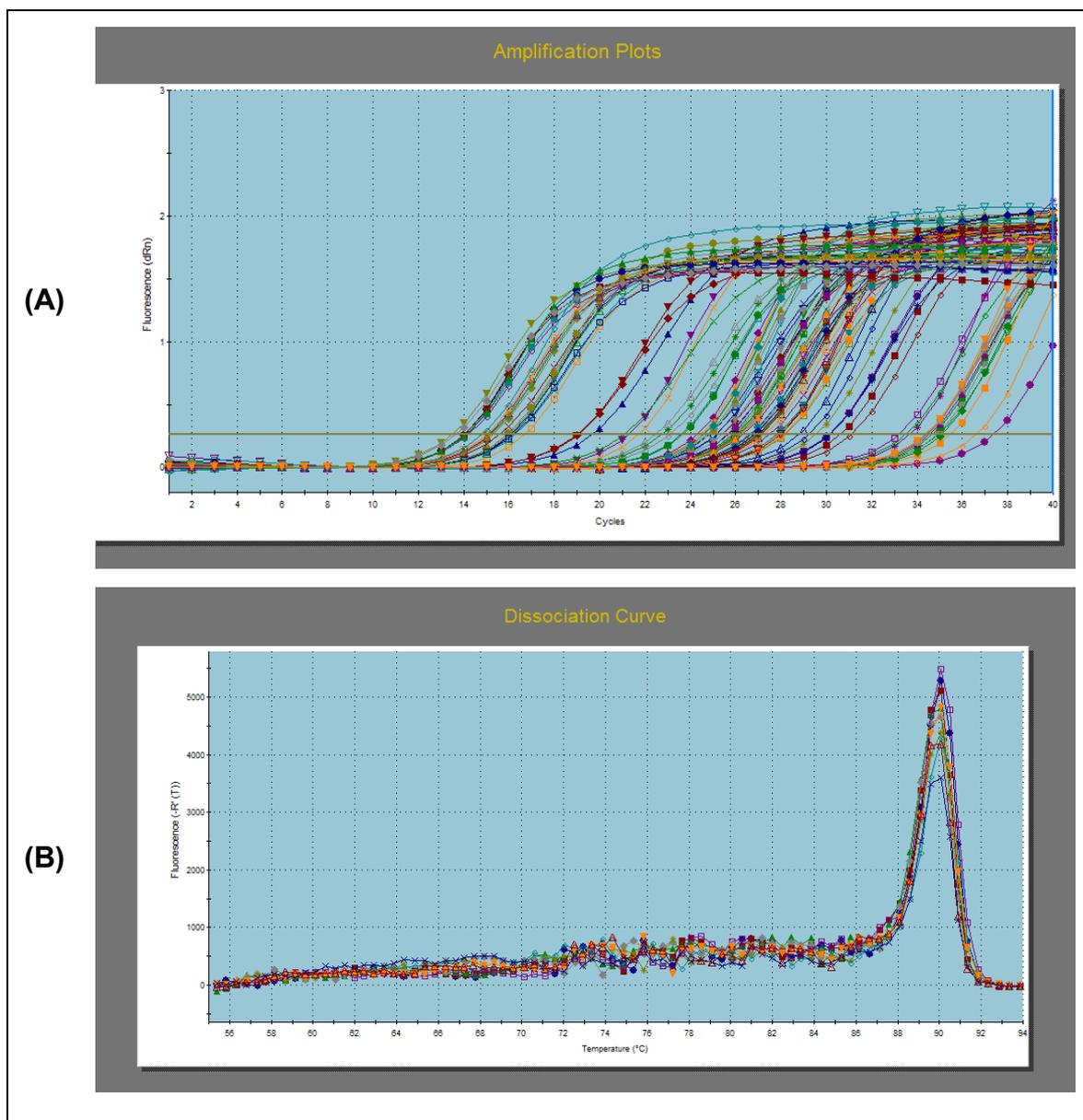


Abbildung 25 – exemplarische Darstellung der graphischen Ergebnisübersicht am Ende eines PCR-Durchlaufs in der PCR-Software (MXPro 4.10, Agilent Technologies); **(A)** Amplification Plots aller 96 Messungen; die olivgrüne Linie (Parallele zur Abszisse) markiert den von der Software errechneten Schwellenwert; der Schnittpunkt eines Amplification Plot mit dieser Linie entspricht dem $c(T)$ Wert; **(B)** Dissociation Curve aller Proben eines Primers (hier: GAPDH); die Lage des Peaks variiert von Primer zu Primer und dient der Qualitätskontrolle einer spezifischen Amplifikation.

ct-values:	ct d0	ct d10	ct d20	ct d25	ct d35	Calculation
TNNI3	3,27E+01	3,04E+01	2,34E+01	2,51E+01	2,51E+01	ct(unknown)1
TNNI3	3,26E+01	3,13E+01	2,42E+01	2,57E+01	2,47E+01	ct(unknown)2
	d0	d10	d20	d25	d35	
GAPDH (Housekeeping gene)	1,76E+01	1,76E+01	1,85E+01	1,94E+01	1,73E+01	ct(GAPDH)1
GAPDH (Housekeeping gene)	1,84E+01	1,80E+01	1,88E+01	1,88E+01	1,78E+01	ct(GAPDH)2
Mean GAPDH	1,80E+01	1,78E+01	1,86E+01	1,91E+01	1,75E+01	mean ct(GAPDH) = [ct(GAPDH)1+ct(GAPDH)2] / 2
	delta ct d0	delta ct d10	delta ct d20	delta ct d25	delta ct d35	
TNNI3 (normalized with GAPDH)	1,47E+01	1,26E+01	4,75E+00	6,02E+00	7,52E+00	delta ct 1 = ct(unknown)1/mean ct(GAPDH)
TNNI3 (normalized with GAPDH)	1,46E+01	1,35E+01	5,60E+00	6,65E+00	7,13E+00	delta ct 2 = ct(unknown)2/mean ct(GAPDH)
	2^Δ-delta ct					
TNNI3 2^Δ-delta ct	3,72E-05	1,58E-04	3,73E-02	1,55E-02	5,47E-03	2 ^Δ - delta ct 1
TNNI3 2^Δ-delta ct	3,96E-05	8,81E-05	2,07E-02	9,99E-03	7,16E-03	2 ^Δ - delta ct 2
Mean of single samples	3,84E-05	1,23E-04	2,90E-02	1,27E-02	6,32E-03	mean delta ct = [2 ^Δ - delta ct 1 + 2 ^Δ - delta ct 2] / 2
Mean delta ct(d0)	3,84E-05					mean delta ct(d0)
	delta delta ct d0	delta delta ct d10	delta delta ct d20	delta delta ct d25	delta delta ct d35	
Fold Change (Relative Expression Level)	9,69E-01	4,11E+00	9,72E+02	4,03E+02	1,42E+02	delta delta ct 1 = 2 ^Δ - delta ct 1 / mean delta ct(d0)
Fold Change (Relative Expression Level)	1,03E+00	2,30E+00	5,39E+02	2,60E+02	1,87E+02	delta delta ct 2 = 2 ^Δ - delta ct 2 / mean delta ct(d0)
	d0	d10	d20	d25	d35	
Mean Fold Change	1,00E+00	3,20E+00	7,55E+02	3,32E+02	1,65E+02	mean fold change ct = (delta delta ct 1 + delta delta ct 2) / 2
SD Fold Change	4,41E-02	1,28E+00	3,06E+02	1,01E+02	3,13E+01	
SEM Fold Change	3,12E-02	9,07E-01	2,16E+02	7,13E+01	2,21E+01	

Abbildung 26 – exemplarische Auswertung der relativen Expression („Mean Fold Change“) von TNNI3 zu den Zeitpunkten d0, d10, d20, d25 und d35 des Differenzierungsprotokolls unter Verwendung der $\Delta\Delta c(T)$ -Methode und GAPDH als Housekeeping-Gen; enthalten sind Daten von einem einzelnen PCR-Lauf einer D1-Probe; die rechte Spalte zeigt die allgemeingültigen Formeln zur Berechnung der relativen Expression mit allen Zwischenschritten.

7.4 Versuchsprotokoll – Immunfluoreszenz

Als Ausgangsmaterial dienen IHC-Chamber-Slides (im Folgenden als Objektträger bezeichnet) mit darauf befindlichen vereinzelt hiPSC-CMs (vgl. Kapitel 7.2.6). Um identische Versuchsbedingungen bei den zu vergleichenden Zellreihen sicherzustellen, wurde je ein Objektträger mit ARVC-hiPSC-CMs und ein Objektträger mit Zellen der Kontrollgruppe gemeinsam behandelt.

Benötigtes Material (für zwei Objektträger):

- 500 ml PBS (w/o Ca²⁺, Mg²⁺; RT)
- 50 ml Formaldehyd 4% (RT)
- 0,25 g Triton
- 0,5 g Bovines Serum Albumin (BSA)
- Primär- und Sekundär Antikörper + PBS (w/o Ca²⁺, Mg²⁺; 4°C) => siehe unten
- Deckgläser, Objektträger, DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)
- 50 ml Falcon® Tubes, Pipetten, Mikropipetten, Eppendorf-Pipettiergefäße

Vorbereitung:

Aufgrund der gesundheitsschädigenden Wirkung von Triton und Formaldehyd unter dem Abzug arbeiten! Handschuhe und Kittel mit langen Ärmeln tragen!

Das PBS auf zehn 50 ml-Falcon®-Tubes aufteilen, davon acht mit „PBS“ beschriftet und beiseitestellen. Ein 50 ml-Falcon®-Tube mit Formaldehyd 4% befüllen und ebenfalls beschriftet beiseitestellen. 0,25 g Triton abwiegen, in eines der verbleibenden PBS-Tubes überführen (ergibt eine 0,5%ige (w/v) Lösung) und durch Umrühren mit einer Glaspipette mischen. 0,5 g BSA abwiegen und in das letzte verbleibende PBS-Tube überführen, um eine 1%ige (w/v) Lösung zu erhalten. Mit einem Magnetrührer für fünf Minuten mischen.

Antikörper (Berechnung und Vorbereitung):

Da bei der hier beschriebenen Methode vereinzelte Kardiomyozyten als Probenmaterial auf dem Objektträger vorliegen, ist die Dichte der Epitope generell als vergleichsweise niedrig einzustufen (im Vergleich zu der sonst etablierten IF von Gewebeschnitten). Um ein detektierbares Signal zu erhalten sind die Wirkkonzentrationen der eingesetzten Antikörper dementsprechend anzupassen. Die Tatsache, dass sich die Zellen nicht in einem Gewebe sondern auf einer künstlichen Extrazellulärmatrix (Matrigel) befinden, ist hinsichtlich der Gefahr einer etwaigen Anfärbung des Bildhintergrundes jedoch als Vorteil zu werten.

Ein IHC-Chamber-Slide enthält vier voneinander getrennte Kammern – pro Objektträger können also vier verschiedene Antigen-Antikörper-Reaktionen durchgeführt werden. Es ist darüber hinaus möglich, in einer Kammer zeitgleich verschiedene Epitope sichtbar zu machen. Dafür ist bei der Wahl der konjugierten Fluoreszenzfarbstoffe darauf zu achten, dass keine Interferenz der Emissionswellenlängen auftreten kann.

Für jede Kammer des Objektträgers werden 120 µl der verdünnten Antikörperlösung benötigt, bei indirekter IF sind die Primär- und Sekundär-AK getrennt voneinander vorzubereiten. Die Antikörper entsprechend der in Tabelle 3 angegebenen Verdünnungen mit PBS (w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} ; 4°C) in ein Eppendorf-Pipettiergefäß überführen. Direkter Lichteinfall auf die konjugierten AK ist möglichst zu minimieren. Die Eppendorf-Pipettiergefäße können mit Alufolie umwickelt und im Kühlschrank bei 4°C beiseitegestellt werden.

Primärantikörper	Typ	Konjugat	Verdünnung
SSEA-3	monoclonal Rat anti-Human	/	1:50
TRA-1-60	monoclonal Mouse anti-Human	/	1:75
α -Actinin (α A)	monoclonal Mouse anti-Human	/	1:100
Cardiac Troponin T (cTnT)	polyclonal Rabbit anti-Human	FITC	1:100
Myosin Light Chain 2 (MYL2)	monoclonal Mouse anti-Human	/	1:100
Myosin Light Chain 4 (MYL4)	polyclonal Rabbit anti-Human	/	1:100
Sekundärantikörper			
Mouse IgG	polyclonal Goat anti-Mouse	AF 568	1:50 - 1:100
Rat IgG	polyclonal Goat anti-Rat	AF 488	1:50
Rabbit IgG	polyclonal Goat anti-Rabbit	AF 488	1:100

Tabelle 3 – verwendete Antikörper der Immunfluoreszenz mit den angewendeten Verdünnungen; FITC = Fluorescein isothiocyanate, AF = Alexa Fluor.

Durchführung:

Das enthaltene Medium von den IHC-Chamber-Slides absaugen und die Trennwände der Zellkultur-Wells mithilfe des im Lieferumfang enthaltenen Removal Tools entfernen. Zu Beginn die Objektträger einmalig für fünf Minuten in einen der vorbereiteten PBS-Tubes stellen. Bei diesem initialen Waschschrift und bei allen folgenden Arbeitsschritten können je zwei Objektträger gemeinsam in einem Falcon®-Tube behandelt werden. Nach jedem Waschschrift ist das verwendete PBS-Tube zu verwerfen. Zur Fixation der Zellen werden die Objektträger für zehn Minuten in Formaldehyd 4% überführt. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgt die zehnminütige Permeabilisierung der Zellmembran in einer 0,5%igen (w/v) Triton-Lösung. Dann die Objektträger erneut in PBS waschen und anschließend für dreißig Minuten in eine 1%ige (w/v) BSA-Lösung stellen. Dieser Schritt dient der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und reduziert damit die Hintergrundfärbung durch die später zugegebenen konjugierten Antikörper. Die Objektträger für fünf Minuten in PBS waschen, gründlich abtropfen lassen und die Ränder der Glasplatte mit Zellstoff trocken tupfen. Als nächstes folgt das Aufbringen der Antikörper auf die Objektträger. Für die Inkubationszeit der Antigen-Antikörper-Reaktion werden die Objektträger auf einen Schüttler gelegt und zum Schutz vor Lichteinfall abgedeckt. Bei Primär-AK (bzw. bei der direkten IF) beträgt die Inkubationszeit acht Stunden. Die Reaktion findet bei Raumtemperatur statt. Im Anschluss werden die Objektträger zweimal für je fünf Minuten in PBS gewaschen. Bei der indirekten IF erfolgt das Aufbringen der Sekundär-AK analog zum Vorgehen bei den Primär-AK. Die Inkubationszeit beträgt hier drei Stunden. Danach erneut zwei PBS-Waschschrift durchzuführen. Sowohl bei der

direkten als auch bei der indirekten IF werden die Objektträger abschließend auf den Schüttler gelegt und je ein Tropfen DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) pro Kammerfläche aufgebracht. Die Inkubationszeit beträgt hier zehn Minuten (bei Raumtemperatur und lichtgeschützt). DAPI dient der Anfärbung der Zellkerne. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Objektträger mit einem Deckglas versehen, wobei darauf zu achten ist, dass keine Luftblasen eingeschlossen werden. Um die Stabilität der Antikörper und der Immunfluoreszenzfarbstoffe zu gewährleisten erfolgt die Lagerung der Objektträger lichtgeschützt bei 4°C.

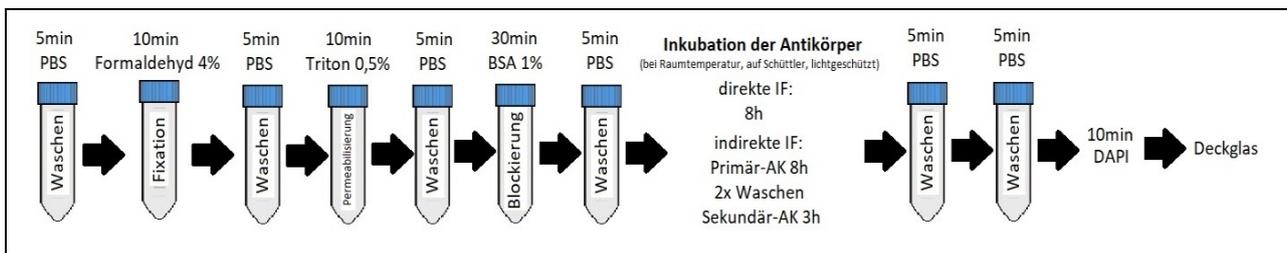


Abbildung 27 - Übersicht zum Ablauf der Immunfluoreszenz.

7.5 Versuchsprotokolle – Western-Blot

Die Methode des Western-Blots ermöglicht eine quantitative Analyse von Proteinen. Zunächst müssen die hiPSC-CMs dafür lysiert werden, ohne die Proteine zu beschädigen. Gleichzeitig muss eine Inaktivierung von zellulären Proteasen und Phosphatasen erfolgen, da sonst ein Ab- oder Umbau von Proteinen stattfinden würde. Durch anschließende Zentrifugation der asservierten Probe wird das proteinhaltige Zelllysat von Zellmembrantrümmern getrennt (vgl. Kapitel 7.5.1). Im Lysat befindet sich eine Mischung aus allen Proteinen der lysierten Kardiomyozyten, weshalb eine differenzierte Mengenanalyse von einzelnen Proteinen zu diesem Zeitpunkt nicht möglich ist. Um später eine einheitliche Proteinmenge zu untersuchen, muss zunächst eine Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration des Lysats erfolgen (vgl. Kapitel 7.5.2). Als nächstes sind die Proteine mittels Elektrophorese auf ein Gel zu übertragen. Abhängig von ihrer atomaren Masse wandern die negativ geladenen Proteine unterschiedlich schnell in Richtung der Anode, wodurch sie aufgetrennt werden. Auf einem Gel können bis zu acht verschiedene Lysatproben analysiert werden. Zusätzlich sind zwei Standardproben aufzubringen, deren Zusammensetzung bekannt ist und anhand deren Banden eine Einordnung der Kettenlänge ermöglicht wird (vgl. Kapitel 7.5.3). Um die auf dem Gel befindlichen und nach Masse aufgetrennten Proteinbanden

für die Bindung eines Immunkonjugats zugänglich zu machen, werden sie im nächsten Schritt durch einen Elektrotransfer mit einem Tank-Blot-System auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt (vgl. Kapitel 7.5.4).

Die spezifische Immundetektion einzelner Proteine bildet den letzten Schritt der quantitativen Analyse von hiPSC-CM-Proteinen. Das Prinzip beruht auf der im Kapitel 2.5 („Immunfluoreszenz“) beschriebenen Antigen-Antikörper-Reaktion. Dazu wird die Membran zuerst mit einem antigenspezifischen Primär- und anschließend mit einem konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Schließlich erfolgt die Detektion der optischen Signale des Konjugats in einer Fotokammer. Zur Normalisierung der Daten muss immer auch eine Messung des Housekeeping-Proteins GAPDH erfolgen (vgl. Kapitel 7.5.5).

7.5.1 Zelllyse für Western-Blot

Benötigtes Material (für vier Wells):

- 2 ml PBS (w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)
- 291 μl RIPA-Puffer
- 3 μl Protease-Inhibitor-1-Cocktail
- 3 μl Phosphatase-Inhibitor-2-Cocktail
- 3 μl Protease-Inhibitor-3-Cocktail
- 50 ml Falcon® Tubes, Pipetten, Mikropipetten, Eppendorf-Pipettiergefäße

Vorbereitung:

Bei den im Rahmen dieser Studie verwendeten hiPSC-CMs kann die Menge des benötigten Lysepuffers mit 75 μl pro Well berechnet werden. Angesetzt wird der Lysepuffer in einer 1:100 Verdünnung der Inhibitoren in RIPA-Puffer. Bei vier Wells werden also 3 μl Protease-Inhibitor-1-Cocktails, 3 μl Phosphatase-Inhibitor-2-Cocktails, 3 μl Protease-Inhibitor-3-Cocktail und 291 μl RIPA-Puffer in ein Eppendorf-Pipettiergefäß überführt und durch Schwenken gemischt. Den Lysepuffer sowie 500 ml PBS (w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) pro Well auf Eis stellen.

Durchführung:

Zunächst das Medium aus den Wells absaugen und verwerfen. Dann werden die Wells mit jeweils 500 ml eiskaltem PBS (w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) befüllt und für eine Minute inkubiert,

bevor das PBS erneut abgesaugt und verworfen wird. Dieser Schritt soll die Zellen „schocken“ und die Proteintätigkeit stoppen.

Nun 75 µl des vorbereiteten Lysepuffers auf den Zellrasen der Wells geben. Mithilfe einer umgeknickten 200 µl-Mikropipettenspitze werden die Zellen von der Matrigel-Schicht der Wells abgeschabt. Das Material in den Wells vollständig in ein Eppendorf-Pipettiergefäß überführen und mehrmals durch Auf- und Abpipettieren resuspendieren. Dieser Schritt dient dem Zerstören der Zellstruktur und dem Proteinaufschluss (eine ausgeprägte Schaumbildung ist zu erwarten).

Anschließend wird das Lysat für mindestens 10 Minuten auf Eis gelagert, danach für 10 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand beinhaltet das proteinhaltige Lysat und wird auf ein neues Eppendorf-Pipettiergefäß überführt. Die Lagerung erfolgt bei -20°C. Das am Boden befindliche Pellet beinhaltet Zellmembrantrümmer, welche verworfen oder für andere Experimente asserviert werden können.

7.5.2 Bestimmung des Gesamtproteingehalts im Lysat

Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Lysats erfolgt mit dem Pierce BCA-Kit von Thermo Scientific. Um den Geltungsbereich der Standardkurve für niedrigere Proteinkonzentrationen zu erweitern, wurde das Pipettierschema um die Vials H-M erweitert (siehe Tabelle 4). Als Stock Solution dient dabei die im Kit mitgelieferte 1 ml-Ampulle Bovines Serum Albumin (BSA) mit einer Konzentration von 2 mg/ml. Als Verdünnungsmittel (Diluent) ist das gleiche Material zu verwenden, welches auch beim Lysieren der hiPSC-CMs zum Einsatz kam (RIPA-Puffer incl. Protease- und Phosphatase-Inhibitoren, vgl. Kapitel 7.5.1).

Das weitere Vorgehen entspricht dem Versuchsprotokoll des im Lieferumfang des Pierce BCA-Kits enthaltenen Handbuchs (siehe dort: Seite 3, „microplate procedure“), und bedarf an dieser Stelle keiner weiteren Ausführung.

Die Messung erfolgte mit dem Microplate-Reader „VERSAmax™ tunable microplate reader“ und der Software VersaMaxPLUS ROM v1.23 (jeweils vom Hersteller „Molecular Devices LLC“).

Vial	Diluent-Volumen [µl]	BSA-Volumen (BSA-Quelle) [µl]	BSA-Konzentration [µg/ml]
A	0	300 (Stock)	2000
B	125	375 (Stock)	1500
C	325	325 (Stock)	1000
D	175	175 (Vial B dilution)	750
E	325	325 (Vial C dilution)	500
F	325	325 (Vial E dilution)	250
G	325	325 (Vial F dilution)	125
H	325	325 (Vial G dilution)	62,5
I	325	325 (Vial H dilution)	31,25
J	325	325 (Vial I dilution)	15,63
K	325	325 (Vial J dilution)	7,81
L	325	325 (Vial K dilution)	3,9
M	325	325 (Vial L dilution)	1,95
Blank	400	0	0

Tabelle 4 – erweitertes Pipettierschema zur Vorbereitung der Standard-Vials.

7.5.3 Gel-Elektrophorese

7.5.3.1 Gießen der Gele

Zunächst müssen die Gele gegossen werden. Dafür wird das „casting stand“ von Bio-Rad Laboratories verwendet und nach den Anweisungen des Herstellers vorgegangen. Alternativ können auch fertige 10%ige Bis-Tris-Gele im Handel erworben werden.

Benötigtes Material (zum Gießen von vier Gelen):

- Obergel: 5,6 ml steriles H₂O (a.d.), 2,5 ml Tris (0,5 M; pH = 6,8), 0,1 ml 10% SDS, 0,1 ml 10% APS, 1,7 ml Acrylamid, 0,01 ml TEMED
- Trenngel: 8,0 ml steriles H₂O (a.d.), 5,0 ml Tris (1,5 M; pH = 8,8), 0,2 ml 10% SDS, 0,2 ml 10% APS, 6,6 ml Acrylamid, 0,016 ml TEMED
- Isopropanol und steriles H₂O (zum Reinigen)
- Bio-Rad casting stand mit Zubehör
- 15 ml Falcon® Tubes, Pipetten, Mikropipetten, Eppendorf-Pipettiergefäße

Durchführung:

Die Glasplatten und Kämmen des Bio-Rad casting stands werden mit Isopropanol gereinigt und mit Zellstoff trocken getupft. Anschließend werden die oben aufgelisteten Chemikalien des Trenngels in ein 15 ml Falcon®-Tube gegeben und durch Schwenken

gemischt. Entsprechend der Herstellerangaben des Bio-Rad casting stands die Trenngele gießen und mit Isopropanol überschichten, um ein Austrocknen an der Luft zu vermeiden. Nach 15-minütiger Polymerisation sind die Gele mit sterilem H₂O zu spülen. Die Chemikalien des Obergels analog zum Trenngel zusammenführen und unter Verwendung des Kammes nach dem Protokoll des Herstellers vorgehen um die Obergele zu gießen. Die Polymerisationszeit des Obergels beträgt 45 Minuten. Schließlich die fertigen Gele gründlich mit sterilem H₂O reinigen.

7.5.3.2 Vorbereitung der Protein-Proben

Benötigtes Material:

- hiPSC-CMs-Lysate mit bekannter Gesamtprotein-Konzentration (Kapitel 7.5.2)
- 6x Laemmlipuffer
- TBS (Tris-buffered saline)
- Mikropipetten, Eppendorf-Pipettiergefäße

Durchführung:

Da jede Tasche des Gels mit einem gleich großen Volumen und einer einheitlichen Protein-Konzentration zu beladen ist, müssen die Proben zunächst verdünnt werden. Bei der Beladung der Taschen ist eine Proteinmenge kleiner 30 µg zu vermeiden. Im Rahmen dieser Studie konnten Gesamtprotein-Konzentration zwischen 3,0 und 7,0 µg/µl gemessen werden, sodass eine Taschenbeladung von 30 µg Protein auf 20 µl Volumen gewählt wurde. Dem Gesamtvolumen ist im Verhältnis 1:6 der 6x Laemmlipuffer hinzuzufügen, das noch fehlende Volumen wird durch TBS aufgefüllt (vgl. Tabelle 5). Nach dem Zusammenpipettieren werden die Proben für 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, dann für 10 Minuten im Thermoblock (Eppendorf Thermomixer 5436) kochen, um die gefalteten Proteine zu denaturieren und dadurch zu linearisieren. Nach dem Abkühlen werden die Proben für wenige Sekunden bei 1200 rpm zentrifugiert. Die Proben können nun für das Beladen der Gel-Taschen verwendet werden.

Gesamtprotein-Konzentration [µg/µl]	30µg Protein entspricht [µl]	6x Laemmli-puffer [µl]	TBS als Diluent [µl]
3,00	10,00	3,33	6,67
3,50	8,57	3,33	8,10
4,00	7,50	3,33	9,17
4,50	6,67	3,33	10,00
5,00	6,00	3,33	10,67
5,50	5,45	3,33	11,21
6,00	5,00	3,33	11,67
6,50	4,62	3,33	12,05
7,00	4,29	3,33	12,38
X	30/X	3,33	20-(3,33+30/X)

Tabelle 5 - exemplarische Pipettiertabelle für hiPSC-CMs-Lysate mit einer Gesamtprotein-Konzentration zwischen 3,0 und 7,0 µg/µl; die unterste Tabellenspalte beinhaltet die allgemeingültigen Formeln zur Berechnung anderer Konzentrationen (X).

7.5.3.3 Gel-Elektrophorese

Benötigtes Material:

- Bio-Rad MiniPROTEAN® Tetra System mit Zubehör
- Bio-Rad Power Pac™ HC Power Supply
- für 1 Liter Elektrophorese-Puffer:
 - 15,1 g Tris (Endkonzentration = 125 mM)
 - 72 g Glycin (Endkonzentration = 960 mM)
 - 5 g SDS (Endkonzentration = 0,5% w/v)
 - 1000 ml sterilfiltriertes Wasser (a.d.)
- Elektrophorese-Gel (Kapitel 7.5.3.1)
- vorbereitete Protein-Proben (Kapitel 7.5.3.2)
- Precision Plus Protein™ WesternC™ Standard
- Low Molecular Weight Standard
- 50 ml Falcon® Tubes, Pipetten, Mikropipetten, Eppendorf-Pipettiergefäße

Vorbereitung:

Die Gel-Elektrophorese erfolgt mit dem Bio-Rad MiniPROTEAN® Tetra System und dem Bio-Rad Power Pac™ HC Power Supply. Die Gele werden dafür in den Halterungen des Bio-Rad MiniPROTEAN® Tetra Systems eingespannt und die Laufkammer mit der benötigten Menge an Elektrophorese-Puffer befüllt. Die benötigte Menge richtet sich dabei nach der Anzahl der eingebrachten Gele und ist durch entsprechende Markierungen an der Wand der Laufkammer abzulesen.

Durchführung:

Die Taschen der Gele werden zunächst mit 40 µl des Elektrophorese-Puffers gespült und anschließend mit den vorbereiteten Lysatproben beladen (vgl. Kapitel 7.5.3.2).

Die jeweils äußeren Taschen sind dabei nicht mit hiPSC-CMs-Lysaten, sondern mit Standard-Protein-Proben zu befüllen. Da die Zusammensetzung dieser Proben bekannt ist, kann die Elektrophorese-Spur und deren charakteristische Banden als Schablone für die Einordnung der atomaren Masse der Banden der Lysatproben dienen. Eingesetzt wurde der Precision Plus Protein™ WesternC™ Standard der Firma Bio-Rad Laboratories sowie ein Low Molecular Weight („LMW“) Standard der Firma Amersham Pharmacia Biotech.

Schließlich wird das Bio-Rad Power Pac™ HC Power Supply gemäß den Instruktionen des mitgelieferten Handbuchs angeschlossen. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes beginnt die Gel-Elektrophorese. Im ersten Schritt wird für 15 Minuten eine Spannung von 80 Volt und im zweiten Schritt für 90 Minuten eine Spannung von 125 Volt angelegt.

Das im Gel enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die Aminosäuren der Proteine und überdeckt somit deren Eigenladung. Die Proteine weisen dadurch eine konstante negative Ladungsverteilung auf. Dies ermöglicht gemeinsam mit der Linearisierung durch das Aufkochen der Lysatproben eine Auftrennung nach der Protein-Kettenlänge. Die negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld zur Anode, wobei längere Proteine im Gel stärker zurückgehalten werden als kürzere.

7.5.4 Elektrotransfer auf die Membran

Beim Übertragen der nach Kettenlänge aufgetrennten Proteinbanden vom Gel auf die Membran mittels Elektrotransfer wird, wie zuvor bei der Gel-Elektrophorese, das Bio-Rad MiniPROTEAN® Tetra System und der Bio-Rad Power Pac™ HC Power Supply verwendet. Im Rahmen dieser Studie wurde eine Nitrocellulose-Membran der Firma PeqLab verwendet. Die Laufkammer ist in Abhängigkeit von der Anzahl der eingebrachten Gele/Membrane mit einem Puffer zu beladen. Dieser wird beim Elektrotransfer als Blotpuffer bezeichnet und besteht aus 3,025 g Tris Base (Endkonzentration = 25 mM), 14,4 g Glycin (Endkonzentration = 192 mM) und 200 ml Methanol (Endkonzentration = 20%) in einem Liter sterilfiltrierten Wasser. Die Nitrocellulose-Membran wird initial für 5 Minuten in dem Blotpuffer äquilibriert, anschließend wird unter Zuhilfenahme der Montageschale („gel/cassette assembly

tray“) ein Gel-Membran-Sandwich in der folgenden Schichtung gebildet: Schwamm, 2x Filterpapier, Gel, Membran, 2x Filterpapier, Schwamm.

Dabei ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen dem Gel und der Membran eingeschlossen werden. Genauere Anweisungen und Abbildungen zum Zusammensetzen des Gel-Membran-Sandwiches können dem Handbuch des Bio-Rad MiniPROTEAN® Tetra Systems entnommen werden.

Der Elektrotransfer erfolgt durch das Anbringen eines elektrischen Feldes mit dem Bio-Rad Power Pac™ HC Power Supply (0,2 Ampere für 90 Minuten bei 4°C). Die Gele können anschließend verworfen werden, da sich die Proteine nun auf der Membran befinden. Um die Banden der Proben mit dem bloßen Auge sehen zu können, erfolgt im Anschluss eine Ponceaufärbung, indem die Membran für 5 Minuten in einem Behälter mit einer Ponceau S Lösung gelegt wird.

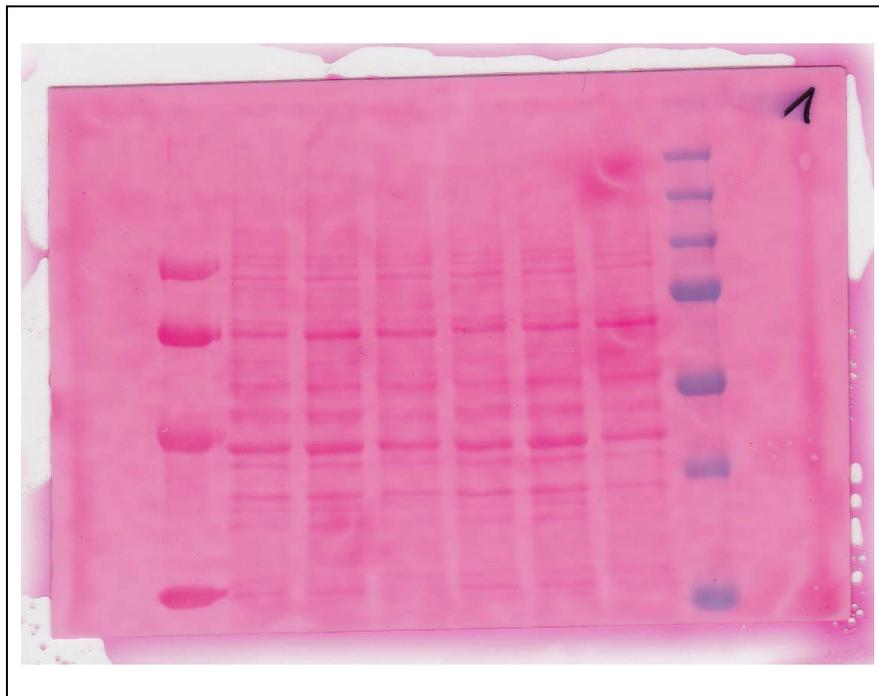


Abbildung 28 – Membran eines Western-Blots nach der Ponceaufärbung; insgesamt sind 8 Elektrophorese-Spuren sichtbar (von links nach rechts): LMW-Standard, 6 verschiedene hiPSC-CMs-Lysatproben, Precision Plus Standard (mit blauen Banden).

7.5.5 Immundetektion der Proteine

Bevor eine quantitative Analyse von einzelnen Proteinen auf der Membran möglich ist, müssen diese zunächst mit spezifischen Antikörpern markiert werden. Um zu verhindern, dass die Antikörper dabei an noch freie Proteinbindungsstellen der Membran haften, erfolgt zunächst eine Blockierung der Membran. Dafür wird eine 5%ige Milchpulver-Lösung in 0,1% TBST („Tris-buffered saline with Tween20“) verwendet. Anschließend wird die Membran so geschnitten, dass sich jeweils die Banden von Proteinen mit gleicher Kettenlänge auf einem Abschnitt befinden. Dies ermöglicht eine Analyse von mehreren verschiedenen Proteinen. Als Orientierung dienen hierfür die Banden der Standard-Proben mit bekannter Kettenlänge. Die atomare Masse von GAPDH beträgt circa 37 Kilodalton und Desmoglein-2 besitzt eine atomare Masse von circa 125 Kilodalton. Beim Schneiden ist ein Sicherheitsabstand von einem Zentimeter einzuhalten.

Benötigtes Material:

- 0,1% TBST (100 ml TBS10x, 1 ml Tween20, 1000 ml a.d.)
- 10 g Milchpulver (MP)
- Antikörper (siehe unten)
- SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate („Femto-Substrat“)
- 50 ml Falcon® Tubes, Pipetten, Mikropipetten, Eppendorf-Pipettiergefäße

Vorbereitung:

Die 0,1%ige TBST-Lösung durch Zusammenführen der oben aufgelisteten Reagenzien herstellen. Davon 200 ml in ein separates Gefäß überführen und darin 10 g MP mit einem Magnetrührer lösen (ergibt eine 5%ige MP-Lösung in 0,1% TBST). Die Antikörper gemäß der in Tabelle 6 aufgeführten Verdünnungen in UV-Lichtundurchlässigen Eppendorf-Pipettiergefäßen (2 ml) zusammenführen.

	Primärantikörper	Typ	Konjugat	Verdünnung (in 5% MP; 0,1% TBST)
p1	Desmoglein-2	monoclonal Mouse anti-Human	/	1:166
p2	GAPDH	monoclonal Mouse anti-Rabbit	/	1:100.000
Sekundärantikörper				
s1	Mouse IgG	polyclonal Goat anti-Mouse	HRP	1:5.000
s2	Mouse IgG	polyclonal Goat anti-Mouse	HRP	1:50.000

Tabelle 6 – verwendete Antikörper des Western-Blots mit den eingesetzten Verdünnungen; HRP = horseradish peroxidase; p1+s1 und p2+s2 bilden jeweils Antikörper-Paare.

Durchführung:

Zunächst werden die Membran-Ausschnitte gemeinsam in eine mit 0,1% TBST gefüllte Schale gelegt und dort für 5 Minuten belassen. Dieser TBST-Waschschritt wird ein zweites Mal mit frischem TBST (0,1%) durchgeführt. Danach erfolgt das einstündige Blocken der freien Proteinbindungsstellen der Membran in einer Schale mit 5% MP in 0,1% TBST. Im Anschluss daran werden erneut zwei TBST-Waschschritte von jeweils 5 Minuten durchgeführt.

Die Inkubation der Membran mit den Primärantikörpern erfolgt über Nacht (ca. 12 Stunden) bei 4°C auf dem Schüttler. Außerdem ist während diesem Zeitraum eine UV-Licht-Exposition zu vermeiden. Danach werden zuerst drei kurze TBST-Waschschritte und anschließend drei TBST-Waschschritte von jeweils 5 Minuten durchgeführt. Bei den Waschschritten können alle Membran-Ausschnitte gemeinsam in eine Schale gelegt werden. Als nächstes folgt die Inkubationszeit der Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für 60 Minuten auf dem Schüttler. Nachdem erneut drei kurze und drei fünfminütige TBST-Waschschritte durchgeführt wurden, können die Membran-Ausschnitte in der Fotokammer (FujiFilm LAS1000) belichtet werden.

Die Membranabschnitte werden dafür in eine flache Schale gelegt und pro Blot werden 2 ml (Thermo Scientific SuperSignal West) Femto-Substrat in die Schale gegeben. Dabei handelt es sich um ein empfindliches Enhanced-Chemilumineszent-Substrat (ECL) für niedrige Detektionsgrenzen im Femtogrammbereich. Es fungiert bei der Reaktion, welche durch die Meerrettich-Peroxidase-Enzyme (HRP-Konjugat an Sekundärantikörpern) katalysiert wird, als Edukt. Nach einer Minute Einwirkzeit werden die Membran-Stücke aus der Schale genommen, wieder in der ursprünglichen Form zusammengelegt und mit einer Folie an drei Seiten an der Filmkassette festgeklebt. Schließlich wird die Membran mit einer zweiten WB-Folie abgedeckt und eventuell vorhandene Luftblasen, sowie Reste des Femto-Substrats ausgestrichen. Die Belichtung erfolgt gemäß des Handbuchs der FujiFilm LAS1000-Fotokammer.

7.6 Versuchsprotokolle – Patch-Clamp und Kalzium-Fluoreszenz

7.6.1 Patch-Clamp

Wie in Kapitel 2.7 („Patch-Clamp“) beschrieben, wurde zunächst die Whole-Cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik hergestellt. Verwendet wurden dazu Patchelektroden aus Borosilicat Glaskapillaren mit einem Pipettenwiderstand von 1-2 M Ω und der DMZ-Universal Puller. Die Zusammensetzungen der vorgefilterten Pipettenlösungen und der ektrazellulär befindlichen Badlösung variierte dabei in Abhängigkeit des zu messenden Ionenkanals (vgl. Kapitel 7.6.1.1 - 7.6.1.6).

Bevor die Attached-Cell-Konfiguration etabliert wurde, mussten zunächst die Offset-Potentiale der Patchelektrode genullt werden. Anschließend erfolgte eine Kompensation der fast-Kapazität bei vorhandenem Gigaseal. Durch Erhöhung des Unterdrucks wurde die Zellmembran aufgebrochen und die Whole-Cell-Konfiguration erreicht. Danach wurden die Membrankapazität (C_m) und der Serienwiderstand (R_s) zu 60 bis 80 Prozent kompensiert. Eine Korrektur der Diffusionspotentiale erfolgte nicht. Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur und erst nach Erreichen eines Steady-States der Ströme (üblicherweise nach drei bis fünf Minuten). Dadurch sollen die zeitabhängigen Änderungen der aufgezeichneten Ströme auf die Versuchsergebnisse minimiert werden. Die Aufnahme der Signale erfolgte bei 10kHz und wurden bei 2kHz mit dem Axopatch 200B Amplifier verstärkt. Zur Digitalisierung und Filterung wurde die Digidata 1440A Digitizer-Hardware und die Software pClamp 10.2 verwendet.

Bei der Messung der Ströme von I_{Na} , I_{to} und I_{CaL} wurden die hiPSC-CMs bei -80 mV gehalten, bei den Strömen von I_{Kr} , I_{Ks} , I_{KATP} , I_{SK} und I_{NCX} bei -40 mV. Die Auslösung der Ströme erfolgte unter Verwendung von Depolarisationsimpulsen auf unterschiedlichen Potentialen bei 0,5 Hz. Alle gemessenen Ströme wurden auf die Membrankapazität (C_m) normalisiert. Durch Auftragen der Stromdichte gegen die Spannungen wurden die Strom-Spannungs-Beziehungen (IV-Kurven) mathematisch ermittelt. Der Tetrodotoxin-sensitive (TTX-sensitive) late I_{Na} wurde als Integral der Stromkurve (area under the curve) von 50 bis 350 ms nach Beginn des Depolarisationsimpulses berechnet.

7.6.1.1 Messung der Ströme des Natriumkanals I_{Na} (Peak- I_{Na} und late- I_{Na})

- Zusammensetzung der **Pipettenlösung** zur Messung des **Peak- I_{Na}** und des **late- I_{Na}** Stromes (in mmol/L): 10 NaCl, 135 CsCl, 2 CaCl₂, 3 MgATP, 2 TEA-Cl (Tetraethylammonium-Chlorid), 5 EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure), 10 HEPES, pH = 7,2 (CsOH).
- Zusammensetzung der **Badlösung** zur Messung des **Peak- I_{Na}** Stromes (in mmol/L): 20 NaCl, 110 CsCl, 1,8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 Glukose, 0,001 Nifedipin, pH = 7,4 (CsOH).
- Zusammensetzung der **Badlösung** zur Messung des **late- I_{Na}** Stromes (in mmol/L): 135 NaCl, 20 CsCl, 1,8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 Glukose, 0,001 Nifedipin, pH = 7,4 (CsOH).

7.6.1.2 Messung der Ströme des L-Typ Kalziumkanals I_{CaL}

- Zusammensetzung der **Pipettenlösung** zur Messung des **I_{CaL}** Stromes (in mmol/L): 10 NaCl, 135 CsCl, 2 CaCl₂, 3 MgATP, 2 TEA-Cl, 5 EGTA, 10 HEPES, pH = 7,2 (CsOH).
- Zusammensetzung der **Badlösung** zur Messung des **I_{CaL}** Stromes (in mmol/L): 140 TEA-Cl, 5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 0,01 TTX, 2 4-AP, pH = 7,4 (CsOH).

7.6.1.3 Aufnahme von Aktionspotentialen (APs)

- Zusammensetzung der **Pipettenlösung** zur Aufnahme von **APs** (in mmol/L): 6 NaCl, 126 KCl, 1,2 MgCl₂, 10 HEPES, 5 EGTA, 11 Glukose, 1 MgATP, pH = 7,4 (KOH).
- Zusammensetzung der **Badlösung** zur Aufnahme von **APs** (in mmol/L): 130 NaCl, 5,9 KCl, 2,4 CaCl₂, 1,2 MgCl₂, 11 Glukose, 10 HEPES, pH = 7,4 (NaOH). Diese Lösung wird im Folgenden als „**PSS**“ (standard patch solution) bezeichnet.

7.6.1.4 Messung der Ionenkanalströme von I_{to} , I_{Ks} , I_{Sk} und I_{KATP}

- Zusammensetzung der **Pipettenlösung** zur Messung der Ionenkanalströme von **I_{to}** , **I_{Ks}** und **I_{Sk}** (in mmol/L): 6 NaCl, 126 KCl, 1,2 MgCl₂, 10 HEPES, 5 EGTA, 11 Glukose, 1 MgATP, pH = 7,4 (KOH).

- Zusammensetzung der **Pipettenlösung** zur Messung des I_{KATP} Stromes (in mmol/L): 6 NaCl, 126 KCl, 1,2 MgCl₂, 10 HEPES, 5 EGTA, 11 Glukose, pH = 7,4 (KOH). Diese Pipettenlösung ist frei von ATP, sonst analog zur Vorherigen.
- Zusammensetzung der **Badlösung** zur Messung des I_{to} Stromes: Analog zur oben beschriebenen PSS-Lösung, zusätzlich 10 µM Nifedipin, 10 µM TTX und 1 µM E-4031 zur Blockade von I_{CaL} , I_{Na} und I_{Kr} .
- Zusammensetzung der **Badlösung** zur Messung des I_{Ks} Stromes: Analog zur oben beschriebenen PSS-Lösung, zusätzlich 1 µM E-4031 zur Blockade von I_{Kr} .
- Zusammensetzung der **Badlösung** zur Messung des I_{sk} Stromes: Analog zur oben beschriebenen PSS-Lösung, zusätzlich wurde durch die Hinzugabe von CaCl₂ eine 0,5 µM Konzentration des freien Ca²⁺ erreicht. Zur Berechnung diente die Software MAXCHELATOR (<http://maxchelator.stanford.edu/>).
- Die Zusammensetzung der **Badlösung** zur Messung des I_{KATP} Stromes entspricht der PSS-Lösung.

7.6.1.5 Messung der Ströme des spannungsabhängigen Kaliumkanals I_{Kr}

- Zusammensetzung der **Pipettenlösung** zur Messung des I_{Kr} Stromes (in mmol/L): 140 CsCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 10 EGTA, pH = 7,2 (CsOH).
- Zusammensetzung der **Badlösung** zur Messung des I_{Kr} Stromes (in mmol/L): 140 CsCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 10 Glukose, pH = 7,4 (CsOH).
- Zur Verbesserung der I_{Kr} Messung wurde der Cs²⁺-Strom der KCNH2 Kanäle gemessen.
- Zusammensetzung der **Pipettenlösung** zur Messung des I_{Kr} Stromes (in mmol/L): 140 CsCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 10 EGTA, pH = 7,2 (CsOH).

7.6.1.6 Messung der Ströme des Natrium-Kalzium-Austauscher I_{Ncx}

- Zusammensetzung der **Pipettenlösung** zur Messung des I_{Ncx} Stromes (in mmol/L): 10 NaOH, 150 CsOH, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 75 Asparaginsäure, 5 EGTA, pH = 7,2 (CsOH).
- Zusammensetzung der **Badlösung** zur Messung des I_{Ncx} Stromes (in mmol/L): 135 NaCl, 10 CsCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 Glukose, 0,01 Nifedipin, 0,1 Niflumsäure, 0,05 Lidocain, 0,02 Dihydroouabain, pH = 7,4 (CsOH).

7.6.2 Kalzium-Fluoreszenz

Der Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten wird vor allem durch folgende Kanäle beeinflusst:

- (i) den spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanal (auch Dihydropyridin-Rezeptor genannt), welcher bei Depolarisation Kalzium aus dem T-Tubulus und damit dem Extrazellularraum in die Zelle fließen lässt; sein Gegenspieler bildet ein $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher.
- (ii) den Ryanodinrezeptor, welcher Kalziumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ins Zytosol gelangen lässt; sein Gegenspieler bildet das Protein Phospholamban, welches im phosphorylierten Zustand die Aufnahme von Kalziumionen in das sarkoplasmatische Retikulum fördert.

Die Anlagerung von Ca^{2+} an Troponin gibt schließlich die Aktin-Myosin-Reaktion frei und der Kardiomyozyt kontrahiert. Somit kann die intrazelluläre Kalziumkonzentration als Indikator für die wichtigste funktionelle Eigenschaft eines Kardiomyozyten, die regelmäßige und suffiziente Kontraktion, herangezogen werden ^{53, 86}.

Benötigtes Material:

- 11 ml PSS (vgl. Kapitel 7.6.1.3)
- 50 µg des membranpermeablen Acetoxymethylester-Derivats von Fluo-3 AM
- 44 µL Pluronic F-127-Stammlösung (20% w/v in DMSO)
- 15 ml Falcon® Tubes, Pipetten, Mikropipetten, Eppendorf-Pipettiergefäße

Vorbereitung:

Als Ausgangsmaterial dienen vereinzelte hiPSC-Kardiomyozyten in Patch-Clamp-Dish (vgl. Kapitel 7.2.6). Vor Beginn der Messung wurden die Zellen mit 1,5 ml PSS für zwei bis vier Tage im Zellkultur-Inkubator kultiviert.

Der Fluo-3 AM Farbstoff muss vor Gebrauch folgendermaßen vorbereitet werden:

Es werden 50 µg des membranpermeablen Acetoxymethylesterderivats von Fluo-3 in 44 µl der Pluronic F-127-Stammlösung (20% w/v. in DMSO) gelöst, um eine 1 mM Fluo-3 AM-Stammlösung zu erhalten. Die Lagerung kann bei -20°C für eine Woche erfolgen. Bei der Zubereitung und Lagerung der Stammlösung ist die Lichtempfindlichkeit des Farbstoffs zu berücksichtigen.

Durchführung:

Von der 1 mM Fluo-3 AM-Stammlösung werden 15 µl zu den 1,5 ml PSS in dem Patch-Clamp-Dish gegeben und vorsichtig mit der Pipettenspitze durch Rühren verteilt, um eine Arbeitskonzentration von 10 µM Fluo-3 zu erhalten. Bei Raumtemperatur werden die Zellen nun für 10 Minuten unter einer optisch undurchsichtigen Box inkubiert.

Im Anschluss das PSS mit dem enthaltenen Farbstoff aus der Zellkulturschale absaugen und durch 1,5 ml PSS ersetzen. Diesen Waschschrift viermal wiederholen.

Schließlich werden die hiPSC-Kardiomyozyten erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit PSS inkubiert, was der Entesterung vor der Messung dient. Nach der Entesterung wurde die Fluoreszenz der Zellen unter Verwendung des Kalzium-Imaging-Systems Optoscan gemessen. Die Fluoreszenz wird bei 488 nm angeregt und emittiert bei 520 nm.

7.7 Tabellarischer Anhang

7.7.1 Verwendetes Material: allgemeiner Laborbedarf und Zellkultur

“Kurzform”	Produktname	Firma	Produktnr.
5ml Pipette	Falcon® 5ml Serological Pipet, Polystyrene, 0.1 Increments, Individually Packed, Sterile, 50/Bag, 200/Case	Falcon®	357543
10ml Pipette	Falcon® 10ml Serological Pipet, Polystyrene, 0.1 Increments, Individually Packed, Sterile, 50/Bag, 200/Case	Falcon®	357551
25 ml Pipette	Falcon® 25ml Serological Pipet, Polystyrene, Space Saver, 0.25 Increments, Sterile, 50/Pack, 200/Case	Falcon®	357525
0,5ml Eppi	Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0.5 ml, Eppendorf Biopur®, farblos, 50 Stück, einzeln verpackt	Eppendorf	30121570
1,5ml Eppi	Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1.5 ml, Eppendorf Biopur®, farblos, 100 Stück, einzeln verpackt	Eppendorf	30121589
2,0ml Eppi	Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2.0 ml, Eppendorf Biopur®, farblos, 100 Stück, einzeln verpackt	Eppendorf	30121597
15ml Tube	Falcon® 15ml High Clarity PP Centrifuge Tube, Conical Bottom, with Dome Seal Screw Cap, Sterile, 50/Bag, 500/Case (Product #352096)	Falcon®	352096
50ml Tube	Falcon® 50ml High Clarity PP Centrifuge Tube, Conical Bottom, Sterile, 25/Bag, 500/Case (Product #352070)	Falcon®	352070
graue TIPS	ep Dualfilter T.I.P.S.® volume × L 0.1-10 µL × 34 mm (dark grey)	Eppendorf	30077806
gelbe TIPS	ep Dualfilter T.I.P.S.® volume × L 2-200 µL × 55 mm (yellow)	Eppendorf	30077547
blaue TIPS	ep Dualfilter T.I.P.S.® volume × L 50-1,000 µL × 76 mm (blue)	Eppendorf	30077541
Pasteurpipette	Pasteurpipetten, lange Form, aus Glas, ISO 7712	Hirschmann	9260101
Cell Scraper	Corning™ Falcon™ Cell Scrapers	Falcon®	353085
Vac-Filter	EMD Millipore Stericup™ Sterile Vacuum Filter Units 250 ml	EMD Millipore	SCGPU02R E
Parafilm	Parafilm M Verschlussfolie 10 cm x 38 m - 4 In. x 125 Ft	Merz Pharma GmbH & Co. KGaA	701605
Flächen-Desinfektionsmittel	antifect® N liquid 1 l Flasche	Schülke+	113940
Autoklavierband	Sterilisations-Klebeband, Autoklavierband, mit Indikator, Dampf	P+W Medizintechnik	13662

Tabelle 7 – Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

“Kurzform”	Produktname	Firma	Produktnr.
AA	Recombinant Human/Mouse/Rat Activin A Protein	R&D Systems	338-AC-010
ALB	Albumin Human	Sigma-Aldrich	A9731
Aqua dest.	AMPUWA für Spülzwecke Plastipur	Fresenius Kabi	4801694
ASC	L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate	Sigma-Aldrich	A8960-5G
B-27	B-27® Supplement (50X), serum free	Gibco®	17504001
BMP-4	Recombinant Human BMP-4 Protein	R&D Systems	314-BP-010
BSA	Albumin, Rind, Fraktion V, pH 7,0	SERVA Electrophoresis GmbH	11930.03
CHIR	StemMACS CHIR99021	Miltenyi Biotec GmbH	130-103-926
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco®	41966029
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich	D8418
E8-Medium	TeSR™-E8™	StemCell Technologies	05990
EDTA	0,5 M EDTA Stock Solution (pH 8.0)	AppliChem GmbH	A4892.0500
Ethanol	Ethanol 70%	VWR	APPCA0913.1000
FBS	Fetal Bovine Serum, qualified, EU approved, South America origin	ThermoFisher Scientific	10270106
FGF-2	Human FGF-2, premium grade	Miltenyi Biotec GmbH	130-093-841
HEPES	HEPES (1M)	ThermoFisher Scientific	15630080
IWP-4	IWP-4	StemCell Technologies	72552
Laminin	Laminin from mouse Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) sarcoma	Roche	11243217001
Matrigel	Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR)	Corning Inc.	#354230
MCE	2-Mercaptoethanol (50 mM)	Gibco®	31350010
NaCl	Sodium chloride ReagentPlus®, ≥99%	Sigma-Aldrich	S9625
NaPyr	Sodium Pyruvate (100 mM)	Gibco®	11360039
PBS	DPBS, no calcium, no magnesium	Gibco®	14190144
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml)	Gibco®	15140122
ROCK-Inhibitor	StemMACS Y27632	Miltenyi Biotec GmbH	130-103-922
RPMI	RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement	ThermoFisher Scientific	61870
RPMI-glutamax	RPMI 1640 Medium, no glutamine	Biological Industries	01-101-1A
SLS	Sodium DL-lactate solution	Sigma Aldrich	71723-1L
Trypsin	Trypsin-EDTyA (0.25%), phenol red	Gibco®	25200056

Tabelle 8 – Übersicht der verwendeten Supplemente und Medien; in alphabetischer Reihenfolge.

“Kurzform”	Produktname	Firma	Produktnr.
24-Wellplatte	Falcon® 24 Well Clear Flat Bottom TC-Treated Multiwell Cell Culture Plate, with Lid, Sterile, 50/Case (Product #353047)	Falcon®	353047
Chamber Slide	4 Well Culture Slide	Falcon®	354104
FLAT Patch-Clamp-Dish	CELL CULTURE DISH, PS, 35/10 MM	Greiner Bio-One GmbH	627160
IBIDI Patch-Clamp-Dish	µ-Dish 35 mm, high, Uncoated: Ø 35 mm, high wall (2 ml volume), #1.5 polymer coverslip, hydrophobic, sterilized	ibidi	81151
T-75 Flasche	Falcon® 75cm ² Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Vented Cap	Falcon®	353136

Tabelle 9 – Übersicht der verwendeten Zellkultursysteme; in alphabetischer Reihenfolge.

7.7.2 Verwendetes Material: spezielle Anwendungsbereiche

Primer	Protein des kodierten Genabschnitts	Firma	Produktnr.
CACNA1C	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C	Qiagen	PPH01378G
DSG2	Desmoglein-2	Qiagen	PPH00654E
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Qiagen	PPH00150F
GJA1	Gap-Junction Alpha-1 Protein	Qiagen	PPH02781E
KCND3	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member 3	Qiagen	PPH06923A
KCNH2	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 2	Qiagen	PPH01660A
KCNIP2	Potassium Voltage-Gated Channel Interacting Protein 2	Qiagen	PPH10611A
KCNJ2	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 2	Qiagen	PPH01681E
KCNK3	Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 3	Qiagen	PPH08513A
KCNQ1	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1	Qiagen	PPH01419A
POU5F1	POU class 5 homeobox 1	Qiagen	PPH02394E
SCN10A	Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit X	Qiagen	PPH15064A
SCN1B	Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit I	Qiagen	PPH01429E
SCN3B	Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit III	Qiagen	PPH07274A
SCN5A	Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit V	Qiagen	PPH01671F
TNNI3	Cardiac muscle troponin I	Qiagen	PPH02622G
TNNT2	Cardiac muscle troponin T	Qiagen	PPH02619A

Tabelle 10 – Übersicht der eingesetzten Primer im Rahmen der PCR-Analysen; in alphabetischer Reihenfolge.

“Kurzform”	Produktname	Firma	Produktnr.
Collection Tubes	Collection Tubes (2 ml)	Qiagen	19201
dNTP Mix	dNTP Mix (10 mM ea)	Invitrogen	18427013
Mastermix	SibirRoxHot Master Mix, ROX 0.1µM	Bioron GmbH	119 405
p(dt)15	Primer for cDNA Synthesis, oligo-p(dt)15	Roche	10814270001
PCR-Folie	Real Time PCR Klebefolie 135x80 mm	Axon Labortechnik	26979
PCR-Platte	50x96er PCR-Platten fest, rahmenlos	Axon Labortechnik	27678
QIAshredder	QIAshredder (250)	Qiagen	79656
RLT-Lysepuffer	Buffer RLT Lysis buffer	Qiagen	79216
RNase freie DNase	RNase-Free DNase Set	Qiagen	79254
RNase-Out	RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen	10777019
RNeasy Mini Kit	RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen	74106
RT-AMV	Reverse Transcriptase AMV	Roche	10109118001

Table 11 – Übersicht der verwendeten Materialien im Anwendungsbereich PCR; in alphabetischer Reihenfolge.

Primärantikörper	Typ	Firma	Produktnr.
Desmoglein-2	monoclonal Mouse anti-Human	Abcam	AB14415
GAPDH	monoclonal Mouse anti-Rabbit	HyTest Ltd	5G4
Sekundärantikörper			
Mouse IgG	polyclonal Goat anti-Mouse	Sigma-Aldrich	A3682

Table 12 – Übersicht der eingesetzten Antikörper im Rahmen der Western-Blot-Analysen.

“Kurzform”	Produktname	Firma	Produktnr.
Laemmlipuffer	6x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories, Inc.	1610747
MP	Milchpulver, Blotting grade, pulv, fettarm	Carl Roth GmbH + Co. KG	T145.3
Protein-Assay-Kit	Pierce BCA Protein Assay Kit	ThermoFisherScientific	23227
ECL-Substrat	Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	ThermoFisherScientific	32209
WB-Standard	Precision Plus Protein™ WesternC™ Blotting Standards	Bio-Rad Laboratories, Inc.	1610376
WB-Standard	SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	ThermoFisherScientific	34095
Nitrocellulose-Membran	Blotting membrane. Nitrocellulose. 0.20 µm. 0.30 x 3.0 m Roll.	PeqLab Biotechnologie GmbH	39-1010
Ponceau S Lösung	Ponceau S solution BioReagent, suitable for electrophoresis, 0.1% (w/v) in 5% acetic acid	Sigma-Aldrich	P7170

Table 13 – Übersicht der verwendeten Materialien im Anwendungsbereich Western-Blot; in alphabetischer Reihenfolge.

“Kurzform”	Produktname	Firma	Produktnr.
4-AP	4-Aminopyridine	Sigma-Aldrich	275875
Asparaginsäure	L-Aspartic acid potassium salt	Fluka	11240
Borosilicat Glaskapillaren	Standard Glass Capillaries	world Precision Instruments, Inc.	MTW 150F
CaCl ₂	Calcium chloride dihydrate	Sigma-Aldrich	C-3881
CsCl	Cesium Chloride, Molecular Biology Grade	Merck KGaA	219650
CsOH	Fluka Cesium hydroxide monohydrate	Fluka	21000-10G-F
Dihydroouabain	Dihydroouabain	Sigma-Aldrich	D9267
EGTA	Ethylene glycol-bis(2- aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid	Sigma-Aldrich	E-4378
Flo-3	Fluo-3 Calcium Indicator	Invitrogen	F1242
Glukose	D(+)-Glucose monohydrate	Merck KGaA	1.04074.1000
HEPES	HEPES (1 M)	Gibco®	15630-080
Iso	Isoprenaline hydrochloride	Sigma-Aldrich	I5627-5G
KCl	Potassium chloride	Sigma-Aldrich	P-4504
KOH	Kaliumhydroxid	Merck KGaA	105033
Lidocain	Lidocaine hydrochloride monohydrate	Sigma-Aldrich	L5647
MgCl ₂	Magnesium chloride hexahydrate	Sigma-Aldrich	M0250
NaCl	Sodium chloride	Sigma-Aldrich	S9625
NaOH	Sodium hydroxide	Sigma-Aldrich	S5881
Nifedipin	Nifedipine	Sigma-Aldrich	N7634
TEA-Cl	Tetraethylammonium chloride	Sigma-Aldrich	T2265
TTX	Tetrodotoxin	Carl Roth GmbH + Co. KG	6973.1

Tabelle 14 – Übersicht der verwendeten Materialien im Anwendungsbereich Patch-Clamp und Kalziumfluoreszenz; in alphabetischer Reihenfolge.

“Kurzform”	Produktname	Firma	Produktnr.
DAPI	VECTASHIELD with DAPI 10 ml	Vector	VEC-H-1200
Deckgläser	Thermo Scientific™ Nunc™ Lab-Tek™ Kammerdeckgläser	ThermoFisherScientific	10384221
Formaldehyd	Roti®-Histofix 4%	Carl Roth GmbH + Co. KG	P087.5
Triton	Triton X-100	Sigma-Aldrich	X100-100ML

Tabelle 15 – Übersicht der verwendeten Materialien im Anwendungsbereich Immunfluoreszenz; in alphabetischer Reihenfolge.

Primärantikörper	Typ	Firma	Produktnr.
SSEA-3	monoclonal Rat anti-Human	StemGent	09-0014
TRA-1-60	monoclonal Mouse anti-Human	StemGent	09-0010
α -Actinin	monoclonal Mouse anti-Human	Sigma-Aldrich	A7811
Cardiac Troponin T	polyclonal Rabbit anti-Human	Byorbyt	orb187249
Myosin Light Chain 2	monoclonal Mouse anti-Human	Novus Biologicals	NBP1-30249
Myosin Light Chain 4	polyclonal Rabbit anti-Human	Antibodies online	ABIN1859942
Sekundärantikörper			
Mouse IgG	polyclonal Goat anti-Mouse	ThermoFisherScientific	A-11004
Rat IgG	polyclonal Goat anti-Rat	ThermoFisherScientific	A-11006
Rabbit IgG	polyclonal Goat anti-Rabbit	ThermoFisherScientific	A-21070

Tabelle 16 – Übersicht der eingesetzten Antikörper im Rahmen der Immunfluoreszenz.

7.7.3 Verwendetes Material: Software und Hardware

Software	Version	Entwickler	Anwendungsgebiet
Aida Image Analyzer	4.25	Aida Imaging	WB-Auswertung
Excel	Office 365	Microsoft	Tabellenkalkulation
EZ-SCSI	4.0.2	Fujifilm	WB-Aufnahme
InStat ©	2018	GraphPad Software Inc.	Statistikprogramm
Leica Application Suite	4.4	Leica	IF-Aufnahme
MAXCHELATOR	8	Chris Patton	Patch-Clamp
MXPro	4.10	Agilent Technologies	PCR
pClamp/ClampFit	10.2	Molecular Devices LLC	Patch-Clamp Auswertung
SigmaPlot	11.0	Systat GmbH	Statistikprogramm
VersaMaxPLUS ROM	1.23	Molecular Devices LLC	WB-Proteinmessung
Windows	XP, 7 & 10	Microsoft	Betriebssystem
Word	Office 365	Microsoft	Textbearbeitung

Tabelle 17 – Übersicht der verwendeten Software; in alphabetischer Reihenfolge.

“Kurzform”	Produktname	Firma
-80°C-Eisschrank	HERAfreeze	Heraeus
Abzug	D1 1200 SZ Niederraum Abzug	Laborbau Grittmann
Autoklaviergerät	Systemc DX-65	Systemc
Digitizer-Hardware	Digidata 1440A	Axon CNS Molecular Devices
DMZ-Puller	DMZ-Universal Puller	Zeitz-Instrumente Vertriebs GmbH

Elektrophorese Power Supply	Bio-Rad PowerPac HC 250V 3.0A 300W	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Elektrophorese-Gerät	Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Feinwaage	BP221S	Sartorius
Heat Block	Thermomixer 5436	Eppendorf
Heat Block	Thermomixer comfort	Eppendorf
IF-Kamera	Leica DFC 450C	Leica
IF-Mikroskop	Leica DMRBE	Leica
IF-Shutter (Power Supply)	KüblerCODIX	Leica
Kalzium-Imaging-System	Optoscan	CAIRN Research
Kalzium-Imaging-System (Power Supply)	high intensity arc lamp power supply	CAIRN Research
Kühlschrank (KS1)	comfort no frost	Robert Bosch GmbH
Kühlschrank (KS6)	computer control cooler	Robert Bosch GmbH
Kühlschrank (KS7)	LIEBHERR profi line	Gebr. Buddeberg GmbH
Kühlschrank (KS9)	economic super	Robert Bosch GmbH
Magnetrührer	KMO2 electronic	Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik
Medien-Inkubator	BE500 Brutschrank	Memmert GmbH + Co. KG
Microplate Reader	VERSAmax™ tunable microplate reader	Molecular Devices LLC
Mikroelektrodenverstärker	Axopatch 200B	Axon CNS Molecular Devices
Mikro-Pipetten (verschiedene Größen)	Reference® 2	eppendorf
Mikroskop (Zellkulturlabor)	LEICA DMIL	Leica
Patch-Clamp-Feldstimulator	MyoPacer Field Stimulator	ION Optix
Patch-Clamp-Headstage	CV 203BU	Axon CNS Molecular Devices
Patch-Clamp-Kamera	Myo-Cam-S	ION Optix
Patch-Clamp-Mikroskop	Olympus IX71	Olympus
PCR-Gerät	Mx3005P™	Stratagene®
Photometer	Bio Photometer	eppendorf
Pipetus	PIPETUS®	Hirschmann
RT-Gerät	peqstar	Peqlab Biotechnologie GmbH
Sterilbank	HERAsafe	Heraeus
Vakuumsauger	ZUA-8146 Miniatur Vakuum System	Föhr Medical Instruments GmbH
WB-Fotokammer	Intelligent Dark Box	Fujifilm
WB-Kamera	LAS1000	Fujifilm
Zellkultur-Inkubator	HERAcell 240	Heraeus
Zentrifuge (für Eppis)	Spectrafuge 24D	Labnet International, Inc.
Zentrifuge (für Eppis)	BIOFUGE pico	Heraeus
Zentrifuge (für Eppis)	Mikro20	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
Zentrifuge (für Falcon®-Tubes)	EBA 12R	M&S Laborgeräte GmbH
Zentrifuge (für PCR-Platten)	Minifuge GL	Heraeus

Tabelle 18 – Übersicht der verwendeten Hardware; in alphabetischer Reihenfolge.

7.7.4 Übersicht der Hersteller und Lieferanten

Firma	Staat	Firmensitz
Abcam	Vereinigtes Königreich	Cambridge
Agilent Technologies	Kalifornien, USA	Santa Clara
Aida Imaging	Kalifornien, USA	West Covina
Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Deutschland	Tuttlingen
Antibodies online	Deutschland	Aachen
AppliChem GmbH	Deutschland	Darmstadt
Axon CNS Molecular Devices	Kalifornien, USA	San Jose
Axon Labortechnik	Deutschland	Kaiserslautern
Biological Industries	Israel	Beit HaEmek
Bio-Rad Laboratories, Inc.	Kalifornien, USA	Hercules
Bioron GmbH	Deutschland	Ludwigshafen am Rhein
Byorbyt	Vereinigtes Königreich	Cambridge
CAIRN Research	Vereinigtes Königreich	Faversham
Carl Roth GmbH + Co. KG	Deutschland	Karlsruhe
Chris Patton	Kalifornien, USA	Stanford
Corning Inc.	New York, USA	Corning
EMD Millipore	Massachusetts, USA	Burlington
Eppendorf	Deutschland	Hamburg
Falcon®	New York, USA	Corning
Fluka	Missouri, USA	St. Louis
Föhr Medical Instruments GmbH	Deutschland	Seeheim-Jugenheim
Fresenius Kabi	Deutschland	Bad Homburg
Fujifilm	Japan	Minato
Gebr. Buddeberg GmbH	Deutschland	Mannheim
Gibco®	Massachusetts, USA	Waltham
GraphPad Software Inc.	Kalifornien, USA	San Diego
Greiner Bio-One GmbH	Deutschland	Frickenhausen
Heraeus	Deutschland	Hanau
Hirschmann	Deutschland	Neckartenzlingen
HyTest Ltd	Finnland	Turku
ibidi GmbH	Deutschland	Planegg
Invitrogen	Kalifornien, USA	Carlsbad
ION Optix	Massachusetts, USA	Westwood
Janke&Kunkel IKA®-Labortechnik	Deutschland	Köln
Labnet International, Inc.	New Jersey, USA	Edison

Laborbau Grittmann	Deutschland	Heidelberg
Leica	Deutschland	Wetzlar
M&S Laborgeräte GmbH	Deutschland	Wiesloch
Memmert GmbH + Co. KG	Deutschland	Schwabach
Merck KGaA	Deutschland	Darmstadt
Merz Pharma GmbH & Co. KGaA	Deutschland	Reinheim
Microsoft	Washington, USA	Redmond
Miltenyi Biotec GmbH	Deutschland	Bergisch Gladbach
Molecular Devices LLC	Kalifornien, USA	Sunnyvale
Novus Biologicals	Colorado, USA	Centennial
Olympus	Japan	Shinjuku
P+W Medizintechnik	Deutschland	Berlin
PeqLab Biotechnologie GmbH	Deutschland	Erlangen
Qiagen	Deutschland	Hilden
R&D Systems	Minnesota, USA	Minneapolis
Robert Bosch GmbH	Deutschland	Gerlingen
Roche	Schweiz	Basel
Sartorius	Deutschland	Göttingen
SERVA Electrophoresis GmbH	Deutschland	Heidelberg
Sigma-Aldrich	Missouri, USA	St. Louis
StemCell Technologies	Kanada	Vancouver
StemGent	Massachusetts, USA	Cambridge
Stericlin	Deutschland	Feuchtwangen
Stratagene®	Kalifornien, USA	San Diego
Systat GmbH	Kalifornien, USA	San Diego
Systemc	Deutschland	Linden
ThermoFisherScientific	Massachusetts, USA	Waltham
Vector	Kalifornien, USA	Burlingame
VWR	Pennsylvania, USA	Radnor
world Precision Instruments, Inc.	Florida, USA	Sarasota
Zeitz-Instrumente Vertriebs GmbH	Deutschland	Martinsried

Tabelle 19 – Übersicht der Hersteller und Lieferanten aller zuvor genannten Materialien; in alphabetischer Reihenfolge.

7.8 Votum der Ethikkommission

Die Medizinische Ethikkommission II der Medizinischen Fakultät Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg erteilte der Studie „Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen“ ihr positives Votum am 05.01.2010 (Aktenzeichen 2009-

350N-MA). Am 14.04.2012 wurden Änderungen in Übereinstimmung mit dem Votum akzeptiert, infolgedessen der Studientitel zu „Erforschung von Stammzellen bei Patienten mit Herz- und Kreislauferkrankungen“ angepasst wurde. Die Ethikkommission des Medizinischen Zentrums Göttingen erteilte ebenfalls die entsprechenden Zustimmungen unter dem Aktenzeichen 10/9/15.

Die Hautproben von zwei gesunden Spendern und einem ARVC-Patienten wurden unter schriftlicher Einverständniserklärung entnommen. Die gesamte Arbeit wurde in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Deklaration von Helsinki zu den „Ethische[n] Grundsätze[n] für die medizinische Forschung am Menschen“ durchgeführt (Version von 1975, revidiert im Jahr 1983).

7.9 Ergänzende Ergebnisse der Polymerase Kettenreaktion

7.9.1 Untereinheit kardialer Kalziumkanäle

Bei der **CACNA1C**-Untereinheit (Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C) fiel eine signifikante Zunahme der Genexpression im zeitlichen Verlauf auf [$p < 0,001$; $d_0(D1) = 1,00 \pm 1,19$; $d_{35}(D1) = 34,41 \pm 28,56$; $n(D1) = 5$; $d_0(ARVC) = 0,67 \pm 0,47$; $d_{35}(ARVC) = 169,55 \pm 114,60$; $n(ARVC) = 4$]. Darüber hinaus konnte beim Faktor Zellreihe eine signifikant höhere Genexpressionsrate bei den ARVC-Zellen nachgewiesen werden ($p = 0,008$; vgl. Abbildung 29).

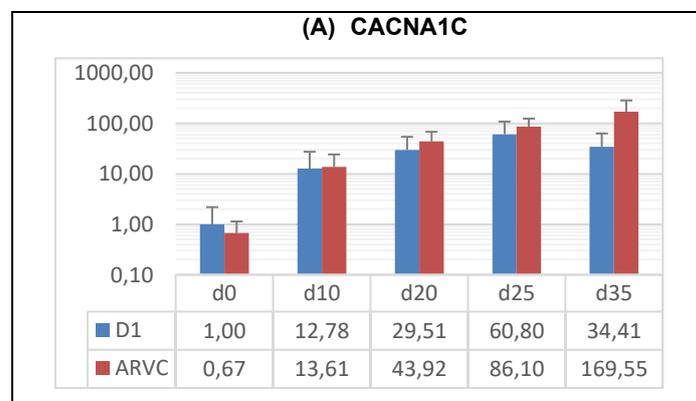


Abbildung 29 – Relative Genexpressionsraten im zeitlichen Verlauf (d0, d10, d20, d25, d35) für die Untereinheit eines kardialen Kalziumkanals; Zellreihen: ARVC (rot) und D1 (blau); Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM; p-Wert-Berechnung erfolgte mittels 2-Way-Anova mit t = Faktor Zeit und c = Faktor Zellreihe; n = Anzahl biologischer Replikate. **(A) CACNA1C**; $p(t) < 0,001$; $p(c) = 0,008$; $n(D1) = 5$; $n(ARVC) = 4$.

7.9.2 Untereinheiten kardialer Natriumkanäle

Von den untersuchten Untereinheiten der kardialen Natriumkanäle zeigte ausschließlich die **SCN5A**-Untereinheit (Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit V) einen signifikanten Anstieg der Genexpression während des gewählten Beobachtungszeitraums [**p=0,049**; $d_0(D1) = 1,00 \pm 0,50$; $d_{35}(D1) = 32,40 \pm 11,71$; $n(D1) = 11$; $d_0(ARVC) = 0,66 \pm 0,15$; $d_{35}(ARVC) = 6,20 \pm 2,84$; $n(ARVC) = 4$]. Hier lieferte auch der Vergleich der beiden Zellreihen einen signifikanten Unterschied in Form einer verminderten Genexpressionsrate bei der ARVC-Zelllinie (**p=0,037**; vgl. Abbildung 30 A).

Bei der **SCN10A**-Untereinheit (Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit X) konnte weder für den Faktor Zeit noch für den Faktor Zellreihe ein signifikanter Unterschied im Niveau der Genexpression nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 30 B).

Unter Berücksichtigung des gesamten Beobachtungszeitraums von d_0 bis d_{35} konnte sowohl für die **SCN1B**- als auch für die **SCN3B**-Untereinheit (Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit I bzw. III) eine signifikant niedrigere Genexpressionsrate bei der ARVC-Zelllinie gemessen werden [**SCN1B: p=0,02**; $d_0(D1) = 1,00 \pm 0,60$; $d_{35}(D1) = 1,63 \pm 2,51$; $n(D1) = 6$; $d_0(ARVC) = 0,52 \pm 0,22$; $d_{35}(ARVC) = 0,35 \pm 0,09$; $n(ARVC) = 4$; **SCN3B: p<0,001**; $d_0(D1) = 1,00 \pm 0,50$; $d_{35}(D1) = 4,90 \pm 3,83$; $n(D1) = 7$; $d_0(ARVC) = 0,42 \pm 0,18$; $d_{35}(ARVC) = 1,68 \pm 0,91$; $n(ARVC) = 4$]. Wie bereits erwähnt, konnte für beide Untereinheiten hinsichtlich des Faktors Zeit keine Signifikanz nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 30 C+D).

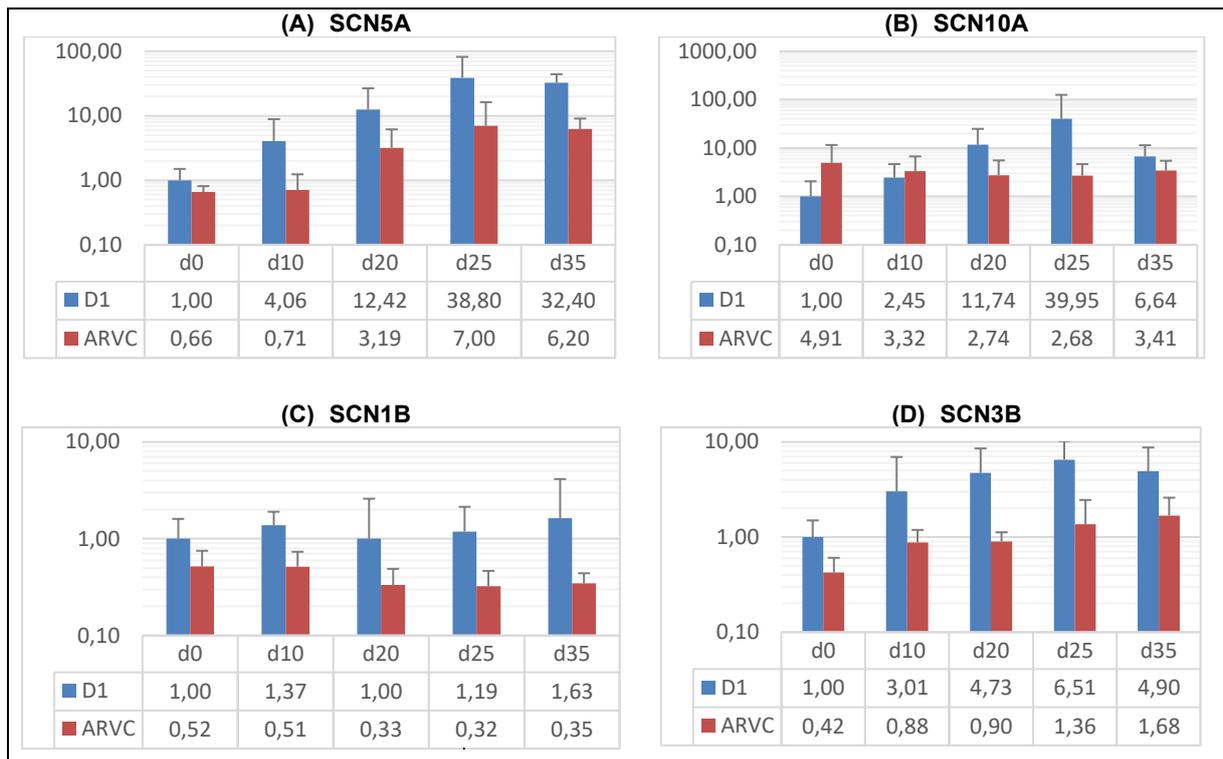


Abbildung 30 – Relative Genexpressionsraten im zeitlichen Verlauf (d0, d10, d20, d25, d35) für die Untereinheiten der kardialen Natriumkanäle; Zellreihen: ARVC (rot) und D1 (blau); Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM; p-Wert-Berechnung erfolgte mittels 2-Way-Anova mit t = Faktor Zeit und c = Faktor Zellreihe; n = Anzahl biologischer Replikate. **(A) SCN5A**; $p(t)=0,049$; $p(c)=0,037$; $n(D1)=11$; $n(ARVC)=4$. **(B) SCN10A**; $p(t)=0,44$; $p(c)=0,17$; $n(D1)=8$; $n(ARVC)=4$. **(C) SCN1B**; $p(t)=0,97$; $p(c)=0,02$; $n(D1)=6$; $n(ARVC)=4$. **(D) SCN3B**; $p(t)=0,11$; $p(c)<0,001$; $n(D1)=7$; $n(ARVC)=4$.

7.9.3 Untereinheiten kardialer Kaliumkanäle

Hinsichtlich des Faktors Zeit konnte kein signifikanter Unterschied bei der **KCNK3**-Untereinheit (Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K) der kardialen Kaliumkanäle nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung des gesamten Beobachtungszeitraums lieferte ein Vergleich der beiden Zellreihen ein signifikant reduziertes Niveau der Genexpression bei den ARVC-Zellen ($p=0,032$; vgl. Abbildung 31 A).

Für die **KCNH2**-Untereinheit (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 2) der kardialen Kaliumkanäle war ein signifikanter Anstieg der Genexpressionsraten von d0 bis d35 dokumentierbar [$p=0,004$; $d0(D1) = 1,00 \pm 0,46$; $d35(D1) = 36,93 \pm 35,14$; $n(D1) = 5$; $d0(ARVC) = 0,93 \pm 0,36$; $d35(ARVC) = 59,03 \pm 45,79$; $n(ARVC) = 4$]. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zellreihen bestand dabei nicht (vgl. Abbildung 31 F).

Bei den übrigen vier untersuchten Untereinheiten der kardialen Kaliumkanäle (**KCNK3** bzw. Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member 3, **KCNIP2** bzw. Potassium Voltage-Gated Channel Interacting Protein 2, **KCNJ2** bzw. Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 2 und **KCNQ1** bzw. Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1) gelang weder für den Faktor Zeit noch für den Faktor Zellreihe ein Nachweis signifikanter Unterschiede (vgl. Abbildung 31 B-E).



Abbildung 31 – Relative Genexpressionsraten im zeitlichen Verlauf (d0, d10, d20, d25, d35) für die Untereinheiten der kardialen Kaliumkanäle; Zellreihen: ARVC (rot) und D1 (blau); Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM; p-Wert-Berechnung erfolgte mittels 2-Way-Anova mit t = Faktor Zeit und c = Faktor Zellreihe; n = Anzahl biologischer Replikate. **(A) KCNK3**; $p(t)=0,47$; $p(c)=0,032$; $n(D1)=6$; $n(ARVC)=4$. **(B) KCND3**; $p(t)=0,55$; $p(c)=0,30$; $n(D1)=4$; $n(ARVC)=3$. **(C) KCNIP2**; $p(t)=0,29$; $p(c)=0,17$; $n(D1)=5$; $n(ARVC)=4$. **(D) KCNJ2**; $p(t)=0,70$; $p(c)=0,11$; $n(D1)=4$; $n(ARVC)=4$. **(E) KCNQ1**; $p(t)=0,29$; $p(c)=0,065$; $n(D1)=4$; $n(ARVC)=4$. **(F) KCNH2**; $p(t)=0,004$; $p(c)=0,89$; $n(D1)=5$; $n(ARVC)=4$.

7.9.4 Datentabelle der relativen Genexpressionsrate an d35

PRIMER	D1			ARVC		
	mean Fold Change	SEM	n	mean Fold Change	SEM	n
POU5F1	1	0,74	5	0,96	0,71	4
GJA1	1	0,86	7	0,69	0,58	4
KCNJ2	1	1,54	4	0,38	0,20	4
SCN1B	1	1,54	6	0,21	0,06	4
DSG2	1	0,59	5	0,38	0,16	4
KCNK3	1	0,94	6	0,41	0,38	4
KCND3	1	1,02	4	0,24	0,21	3
SCN3B	1	0,78	7	0,34	0,19	4
KCNQ1	1	0,77	5	0,56	0,20	4
SCN10A	1	0,72	8	0,51	0,31	4
SCN5A	1	0,36	11	0,19	0,09	4
CACNA1C	1	0,68	5	4,93	3,33	4
KCNH2	1	0,95	5	1,60	1,24	4
KCNIP2	1	1,61	5	0,12	0,08	4
TNNI3	1	0,06	4	0,40	0,11	4
TNNT2	1	0,72	5	0,73	0,50	4

Tabelle 20 - Relative Genexpressionsraten zum Zeitpunkt d35 für alle untersuchten Genabschnitte (**POU5F1** = POU class 5 homeobox 1, **GJA1** = Gap-Junction Alpha-1 protein, **KCNJ2** = Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 2, **SCN1B** = Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit I, **DSG2** = Desmoglein-2, **KCNK3** = Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 3, **KCND3** = Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily D Member 3, **SCN3B** = Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit III, **KCNQ1** = Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1, **SCN10A** = Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit X, **SCN5A** = Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit V, **CACNA1C** = Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C, **KCNH2** = Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily H Member 2, **KCNIP2** = Potassium Voltage-Gated Channel Interacting Protein 2, **TNNI3** = Cardiac muscle troponin I, **TNNT2** = Cardiac muscle troponin T); Datentabelle zu Abbildung 8, Seite 27; Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM; n = Anzahl biologischer Replikate.

7.10 Limitationen und Interpretierbarkeit der PCR-Daten

Die Daten, welche aus den PCR-Experimenten gewonnen werden konnten, wurden in den Kapiteln 3.3 und 7.9 dieser Arbeit bereits ausführlich dargestellt. Zusammenfassend soll an dieser Stelle wiederholt werden, dass sich nur für eine geringe Anzahl der analysierten Genexpressionsraten Unterschiede zwischen der ARVC-Zelllinie und der gesunden Zelllinie finden ließen. Unter Berücksichtigung des gesamten Beobachtungszeitraums (von d0 bis d35) war bei den ARVC-hiPSC-CMs eine signifikante Verminderung der Genexpressionsraten für die Untereinheiten SCN5A, SCN1B und SCN3B des spannungsabhängigen Natriumkanals zu

dokumentieren. Diese Ergebnisse können als Erklärung für die Erniedrigung des I_{Na} -Stroms herangezogen werden.

Darüber hinaus lieferte die Analyse der Genexpressionsraten weitere Unterschiede zwischen der ARVC-Zelllinie und der D1-Zelllinie. Für die KCNK3-Untereinheit war eine Verminderung und für die CACNA1C-Untereinheit eine Vergrößerung der Messwerte bei den ARVC-Zellen nachweisbar. Diese beiden Veränderungen ließen sich jedoch in keinen logischen Zusammenhang mit den funktionellen Untersuchungen der Ionenkanäle mittels Patch-Clamp-Technik einordnen (vgl. Kapitel 3.4).

Bei der Interpretation der hier genannten PCR-Ergebnisse ist generell zu berücksichtigen, dass die mRNA-Konzentration bzw. die Genexpressionsrate nur eines von vielen Stellgliedern während der Bildung eines membranständigen Proteins darstellt. Zwar erlauben diese gewonnenen Daten Rückschlüsse auf das Ausmaß der Transkription und daher indirekt auf die weitere Proteinbiosynthese; hinsichtlich der korrekten Translation, der weiteren posttranslationalen Modifikationen und dem Transport zur Zellmembran kann mit dieser Methode jedoch weder eine qualitative noch eine quantitative Aussage getroffen werden. Ebenso sind die Funktionalität und die Lebensdauer der gebildeten Proteine mittels PCR nicht zu bestimmen.

Im Allgemeinen besitzt die Lebensdauer synthetisierter Proteine eine Bandbreite von wenigen Sekunden bis zu mehreren Jahren und ist ebenso wie die Proteinbiosynthese durch verschiedene Mechanismen, wie z.B. der Ubiquitinierung, reguliert^{87, 88}. Dabei lassen sich aktuell trotz ausgiebiger Literaturrecherche keine Daten finden, anhand derer die Lebensdauer der kardialen Ionenkanäle in adulten Kardiomyozyten oder hiPSC abgeschätzt werden kann⁸⁷⁻⁹⁰.

Um diese genannten Einschränkungen bei der Interpretierbarkeit der PCR-Daten weitestgehend vernachlässigen zu können, erfolgte eine zweite statistische Analyse der relativen Genexpressionsraten im Sinne einer Querschnittsmessung an Tag 35 nach Beginn der Differenzierung. Es wurde dabei davon ausgegangen, dass sich die hiPSC-CMs zu diesem Zeitpunkt in einem Steady-State des Protein-Lebenszyklus befinden, also die Neu-Synthese und der Abbau der kardialen Ionenkanäle in etwa gleich stark ausgeprägt sind. Hier zeigte sich bei den ARVC-hiPSC-CMs einzig für die SCN5A-Untereinheit noch eine signifikant reduzierte Genexpressionsrate.

Letztlich lassen sich jedoch auch für diese Art der Interpretation Limitationen aufführen. Eine Studie, in der mittels einer modifizierten E3-Ligase, also einem wichtigen Regulator der Ubiquitinierung, der Abbau von kardialen Ionenkanälen (KCNQ1) in Kardiomyozyten von Ratten gesteigert wurde, deckte auf, dass sich zwar die Ionenkanaldichte und der dazugehörige Ionenstrom über die Membran reduzierte, die Genexpressionsrate jedoch unbeeinflusst blieb ⁹¹. Ein zu erwartender reflektorischer Anstieg der Genexpressionsrate bei gesteigertem Abbau blieb also aus und lässt daher Zweifel an der zuvor genannten Steady-State-Hypothese zu.

Zusammenfassend kann hinsichtlich der quantitativen Analyse der Genexpressionsraten von Untereinheiten der kardialen Ionenkanäle mittels PCR gesagt werden, dass ihre alleinige Aussagekraft durch einige Limitationen geschmälert wird. Zur Verbesserung der Aussagekraft sollten sie daher, wie im Rahmen der Studie dieser Dissertation geschehen, auf jeden Fall durch funktionelle Messungen der korrespondierenden Ionenkanalströme ergänzt werden. Zusätzlich sollten Analysen der Ionenkanaldichte auf der Zellmembran mittels Immunfluoreszenz und/oder Western-Blot erfolgen. Dies gelang innerhalb der hier präsentierten Studie noch nicht und sollte daher Gegenstand zukünftiger Studien werden.

8 LITERATURVERZEICHNIS DES ANHANGS

70. Kato, M, Koike, Y, Suzuki, S, Kimata, K: Basement membrane proteoglycan in various tissues: characterization using monoclonal antibodies to the Engelbreth-Holm-Swarm mouse tumor low density heparan sulfate proteoglycan. *J Cell Biol*, 106: 2203-2210, 1988.
71. Neal, RA, Lenz, SM, Wang, T, Abebayehu, D, Brooks, BP, Ogle, RC, Botchwey, EA: Laminin- and basement membrane-polycaprolactone blend nanofibers as a scaffold for regenerative medicine. *Nanomater Environ*, 2: 1-12, 2014.
72. Li, X, Krawetz, R, Liu, S, Meng, G, Rancourt, DE: ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells. *Hum Reprod*, 24: 580-589, 2009.
73. Watanabe, K, Ueno, M, Kamiya, D, Nishiyama, A, Matsumura, M, Wataya, T, Takahashi, JB, Nishikawa, S, Nishikawa, S, Muguruma, K, Sasai, Y: A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*, 25: 681-686, 2007.
74. Chen, YG, Wang, Q, Lin, SL, Chang, CD, Chuang, J, Ying, SY: Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*, 231: 534-544, 2006.
75. Maeshima, A, Miya, M, Mishima, K, Yamashita, S, Kojima, I, Nojima, Y: Activin A: autocrine regulator of kidney development and repair. *Endocr J*, 55: 1-9, 2008.
76. Gambaro, K, Aberdam, E, Virolle, T, Aberdam, D, Rouleau, M: BMP-4 induces a Smad-dependent apoptotic cell death of mouse embryonic stem cell-derived neural precursors. *Cell death and differentiation*, 13: 1075-1087, 2006.
77. Zhang, P, Li, J, Tan, Z, Wang, C, Liu, T, Chen, L, Yong, J, Jiang, W, Sun, X, Du, L, Ding, M, Deng, H: Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. *Blood*, 111: 1933-1941, 2008.
78. Chen, D, Zhao, M, Mundy, GR: Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 22: 233-241, 2004.
79. Sa, S, McCloskey, K: Activin A and BMP4 Signaling for Efficient Cardiac Differentiation of H7 and H9 Human Embryonic Stem Cells. *J Stem Cells Regen Med*, 8: 198-202, 2012.
80. Margariti, A, Winkler, B, Karamariti, E, Zampetaki, A, Tsai, TN, Baban, D, Ragoussis, J, Huang, Y, Han, JD, Zeng, L, Hu, Y, Xu, Q: Direct reprogramming of fibroblasts into endothelial cells capable of angiogenesis and reendothelialization in tissue-engineered vessels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 13793-13798, 2012.
81. Robinson, CJ, Gaines-Das, R: The international standard for basic fibroblast growth factor (FGF-2); comparison of candidate preparations by in vitro bioassays and immunoassays. *Growth Factors*, 11: 9-16, 1994.
82. Lian, X, Hsiao, C, Wilson, G, Zhu, K, Hazeltine, LB, Azarin, SM, Raval, KK, Zhang, J, Kamp, TJ, Palecek, SP: Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: E1848-1857, 2012.
83. Chen, B, Dodge, ME, Tang, W, Lu, J, Ma, Z, Fan, CW, Wei, S, Hao, W, Kilgore, J, Williams, NS, Roth, MG, Amatruda, JF, Chen, C, Lum, L: Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol*, 5: 100-107, 2009.

84. Gafni, O, Weinberger, L, Mansour, AA, Manor, YS, Chomsky, E, Ben-Yosef, D, Kalma, Y, Viukov, S, Maza, I, Zviran, A, Rais, Y, Shipony, Z, Mukamel, Z, Krupalnik, V, Zerbib, M, Geula, S, Caspi, I, Schneir, D, Shwartz, T, Gilad, S, Amann-Zalcenstein, D, Benjamin, S, Amit, I, Tanay, A, Massarwa, R, Novershtern, N, Hanna, JH: Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature*, 504: 282-286, 2013.
85. Ying, QL, Wray, J, Nichols, J, Batlle-Morera, L, Doble, B, Woodgett, J, Cohen, P, Smith, A: The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 453: 519-523, 2008.
86. Cannell, MB, Cheng, H, Lederer, WJ: The control of calcium release in heart muscle. *Science*, 268: 1045-1049, 1995.
87. MacGurn, JA, Hsu, PC, Emr, SD: Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave. *Annu Rev Biochem*, 81: 231-259, 2012.
88. van Bemmelen, MX, Rougier, JS, Gavillet, B, Apotheloz, F, Daidie, D, Tateyama, M, Rivolta, I, Thomas, MA, Kass, RS, Staub, O, Abriel, H: Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circulation research*, 95: 284-291, 2004.
89. Abriel, H, Staub, O: Ubiquitylation of ion channels. *Physiology (Bethesda)*, 20: 398-407, 2005.
90. Shipston, MJ: Ion channel regulation by protein palmitoylation. *The Journal of biological chemistry*, 286: 8709-8716, 2011.
91. Kanner, SA, Morgenstern, T, Colecraft, HM: Sculpting ion channel functional expression with engineered ubiquitin ligases. *Elife*, 6, 2017.

9 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Christoph Alexander Tombers
Geburtsdatum: 20.07.1991
Geburtsort: Trier
Familienstand: verheiratet
Vater: Dr. rer. nat. Johannes Tombers
Mutter: Birgit Tombers

SCHULISCHER WERDEGANG

2002 - 2011 Gymnasium Saarburg
23.03.2011 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2012/13 Beginn des Studiums Humanmedizin an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim
01.09.2014 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11.10.2017 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
21.11.2018 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.04.2019 Beginn der Facharztweiterbildung „Anästhesiologie“ im Theresienkrankenhaus Mannheim

10 VERÖFFENTLICHUNG

Europace. 2018 Jun 1;20(F11):f46-f56. doi: 10.1093/europace/euy042.

Electrical dysfunctions in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with an arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.

El-Battrawy I^{1,2}, Zhao Z^{1,2}, Lan H^{1,2,3}, Cyganek L^{2,4}, Tombers C¹, Li X¹, Buljubasic F^{1,2}, Lang S^{1,2}, Tiburcy M^{2,5}, Zimmermann WH^{2,5}, Utikal J^{2,6,7}, Wieland T^{2,8}, Borggreffe M^{1,2}, Zhou XB^{1,2,3}, Akin I^{1,2}.

Author information

- 1 First Department of Medicine, Faculty of Medicine, University Medical Centre Mannheim (UMM), University of Heidelberg, Theodor-Kutzer-Ufer 1-3, 68167 Mannheim, Germany.
- 2 DZHK (German Center for Cardiovascular Research), Partner Site, Heidelberg-Mannheim and Göttingen, Mannheim, Germany.
- 3 Key Laboratory of Medical Electrophysiology of Ministry of Education, Institute of Cardiovascular Research, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, China.
- 4 Stem Cell Unit, Heart Research Center Göttingen, Göttingen, Germany.
- 5 Institute of Pharmacology and Toxicology, University of Göttingen, Göttingen, Germany.
- 6 Skin Cancer Unit, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg.
- 7 Department of Dermatology, Venereology and Allergology, University Medical Center Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany.
- 8 Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany.

Abbildung 32 – Screenshot von „PubMed.gov“, Abgerufen am 16.12.2019 um 11:00 Uhr;
Quelle: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=29566126>

11 DANKSAGUNG

Herrn Dr. Ibrahim El-Batrawy danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten. Darüber hinaus danke ich ihm für die stetige Verfügbarkeit bei Fragen und Problemen, für den wertschätzenden und kollegialen Umgang im Team sowie für die hervorragende Begleitung „in die Welt der medizinischen und experimentellen Forschung“.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. Siegfried Lang, der mir bei der Einarbeitung der Labor-Methodik half, mir stets wichtige sachliche Hinweise gab und mich in der statistischen Auswertung unterstützte. Auch danke ich Frau Claudia Liebetrau für ihre Arbeit als MTA in unserem Labor und ihre organisatorische Kompetenz.

Ebenso danke ich meinen Eltern Birgit und Johannes Tombers sowie Gisela Vollrath für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise, die zur Vollendung derselben notwendig waren.