

# Zusammenfassung

Xijian Ke  
Dr. med.

## **Modulation of electrical signal propagation in stem cell-derived cardiomyocytes as a novel model for arrhythmogenic cardiomyopathies**

Fach/Einrichtung: Physiologie

Doktorvater: Prof. Dr. Markus Hecker

Arrhythmogene Kardiomyopathien umfassen eine Familie potenziell lebensbedrohlicher Krankheiten, die strukturelle Myokardanomalien und ventrikuläre Arrhythmien aufweisen. Die Entstehung von Arrhythmien bei diesen Erkrankungen steht höchstwahrscheinlich in Zusammenhang mit einer Lateralisierung und Reduktion von Connexin-43 (Cx43) und dem spannungsabhängigen schnellen Natriumkanal 1.5 (Nav1.5), zwei Hauptakteuren in der Regulation der elektrischen Aktivität und Signalausbreitung nach der Source-Sink-Theorie. Niedrige Cx43- und Nav1.5-Expressionen führen zu einer geringen interzellulären Kopplung, einer verringerten Erregbarkeit der Zellmembran und einer langsamen Impulsausbreitung in aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten (iPSC-CM). Eine schwache Kopplung ist auch ursächlich für die erhöhte Neigung, unkoordinierte Erregungsmuster und Leitungsbarrieren zu entwickeln, die ursächlich an der Entstehung von arrhythmogenen Erkrankungen beteiligt sind. Frühere Untersuchungen aus unserem Labor kamen zu dem Schluss, dass die Regulation und Kontrolle der Cx43-Expression ein molekulares Ziel zur Verbesserung der elektrischen Eigenschaften von iPSC-CMs darstellen könnte. Jüngste Studien haben gezeigt, dass die muskelspezifische microRNA-1 (miR-1) einen regulatorischen Effekt auf die Cx43-Expression haben könnte.

Dieses Projekt wurde entwickelt, um neue molekulare Ansatzpunkte zu identifizieren, die die Cx43-Expression in iPSC-CMs steuern und zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien für arrhythmogene Erkrankungen verwendet werden können. Wir stellten die Hypothese auf, dass eine molekulare Kontrolle der Cx43-Expression durch miR-1 die Bildung von Gap Junctions in iPSC-CMs begrenzt; eine reduzierte Kontrolle kann somit die Bildung von Gap Junctions fördern, die elektrische Aktivität der Signalausbreitung steigern und indirekt die Erregbarkeit der Zellmembran erhöhen, indem vermehrt Nav1.5-Ionenkanäle im Sarkolemm exprimiert werden.

Wir untersuchten zuerst den Effekt von miR-1 auf Monolayer und Zellstränge sowohl von HL-1-Zellen als auch von iPSC-CMs mittels Immunzytochemie und fanden heraus, dass die Behandlung mit einem Antisense-Oligonukleotid gegen miR-1 (Anti-miR-1) die sarkolemmale Cx43-Expression signifikant steigerte. Wir haben daraus ein neues

Zellmodell für arrhythmogene Erkrankungen etabliert, um die Ausbreitung elektrischer Signale durch eine Kombination der direkten Mikrokontakt-Stempeltechnik und Tachypacing zu untersuchen. Dabei haben wir festgestellt, dass die Cx43-Expression nach erhöhter Dauerstimulation merklich reduziert war, während sie durch Anti-miR-1-Transfektion wiederhergestellt wurde. Unsere Daten legen nahe, dass miR-1 zu einer geringen Zellkopplung und einer langsamen elektrischen Signalausbreitung in iPSC-CMs beitragen kann, während eine Hemmung von miR-1 die Cx43-Expression und die interzelluläre Kommunikation verbessert.

Mittels der Standard-Patch-Clamp-Technik fanden wir heraus, dass sowohl der Natriumstrom als auch die maximale Anstiegsgeschwindigkeit der Aktionspotentiale nach einer miR-1-Hemmung in iPSC-CMs signifikant erhöht waren. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Erregbarkeit dieser Zellen deutlich gesteigert wird, höchstwahrscheinlich aufgrund einer vermehrten Expression und Verfügbarkeit funktioneller Natriumkanäle in der Membran. Darüber hinaus deutet die räumliche Nähe der Na<sub>v</sub>1.5- und Cx43-Expression auf funktionelle Wechselwirkungen zwischen beiden Proteinen hin. Unsere Ergebnisse zeigen, dass miR-1 indirekt die Verteilung von Na<sub>v</sub>1.5 in der Zellmembran durch Cx43 als Mediator mitbeeinflusst.

Um die Wirkung von miR-1 auf die elektrische Aktivität von iPSC-CMs in einem Zellrasen zu untersuchen, haben wir mit Hilfe von Mikroelektroden-Arrays spontane Summenaktionspotentiale aufgezeichnet und daraus die Schlagfrequenz, die Intervallzeiten zwischen den Aktionspotentialen und die Variabilität dieser Werte analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass Anti-miR-1-Behandlung das Intervall zwischen einzelnen Aktionspotentialen und auch die Variabilität erheblich reduzierte während die Frequenz und Regelmäßigkeit von spontanen Aktionspotentialen signifikant erhöht wurden. Eine Analyse der Rhythmicität von Calciumtransienten zeigte auch, dass mit Anti-miR-1 transfizierte iPSC-CMs viel schnellere und regelmäßige Calciumtransienten aufwiesen. Diese Ergebnisse deuten auf eine signifikante funktionelle Verbesserung der elektrischen Aktivität von iPSC-CMs in multizellulären Präparaten durch Hemmung der miR-1, was über eine verbesserte Zell-Zellkopplung und höhere Erregbarkeit erklärt werden kann.

Schließlich haben wir eine neue Analysetechnik entwickelt, bei der mittels Line-Scans die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Calciumtransienten berechnet werden konnte. Wir haben eine extrem niedrige Weiterleitungsgeschwindigkeit der Calciumtransienten in einem HL-1-Zell-Monolayer gemessen, die auf das niedrige Expressionsniveau von Cx43 zurückzuführen ist und daher auch innerhalb unseres erwarteten Bereichs liegt. In Bezug auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Calciumtransienten in iPSC-CMs zeigen unsere Experimente, dass mit Anti-miR-1 transfizierte Zellen eine signifikant schnellere Leitungsgeschwindigkeit als Kontrollzellen aufweisen, was darauf hindeutet, dass die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Calciumtransienten durch eine Hemmung der miR-1 signifikant beschleunigt wird. Das erklärt sich über eine vermehrte Ausbildung von Gap Junctions aufgrund einer Hemmung der miR-1-Aktivität, wodurch der interzelluläre Austausch kleiner Moleküle wie Calciumionen erleichtert wird. Unsere Daten zeigen, dass die Modulation von miR-1 als neuartige Methode zur

Verbesserung der elektrischen Eigenschaften von iPSC-CMs führt und somit die Signalweiterleitung positiv beeinflussen kann.

Zusammenfassend kann eine miR-1-Hemmung die Cx43-Expression erhöhen und die elektrophysiologischen Eigenschaften von iPSC-CMs funktionell verbessern. Somit könnte die Modulation von miR-1 als neues Zeilmolekül für eine verbesserte Cx43-Expression einen wichtigen neuen Ansatz für die Behandlung von arrhythmogenen Erkrankungen liefern.