

Aus der 1. Medizinischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Dürschmied)

Das Brugada Syndrom mit CACNB2-Genvariante als zelluläres Modell mit
Kardiomyozyten (hiPSC-CMs), die differenziert wurden aus patientenspezifischen
pluripotenten Stammzellen

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

vorgelegt von
Theresa Schimanski

aus
Viersen
2022

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: PD Dr. med. Ibrahim El-Battrawy

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	4
1.1 Brugada Syndrom	4
1.1.1 Brugada Syndrom-assoziierte Mutationen	5
1.2 Zelluläres Modell mit Kardiomyozyten, differenziert aus patientenspezifischen humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC-CMs).....	6
1.3 Kardiale Ionenkanäle und -ströme	6
1.3.1 Der kardiale spannungsabhängige L-Typ Calciumkanal.....	7
1.4 Zielsetzung.....	8
2 MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 Ethikvotum	10
2.2 Klinische Daten	10
2.3 Molekulargenetische Untersuchung.....	11
2.4 „Bed to Bench“ – Generierung humaner iPSC-Zellen	12
2.5 Mutationskorrektur	12
2.6 Kultivierung und Differenzierung.....	13
2.6.1 Nachweis der Differenzierung	14
2.7 Charakterisierung der BrS-, Healthy- und Corrected-hiPSC-CMs	15
2.7.1 Zelluläre Charakterisierung	15
2.7.2 Prinzip der Immunfluoreszenz.....	15
2.7.3 Durchführung der Immunfluoreszenz.....	16
2.7.4 Fluoreszenzmikroskopie und -fotografie	18
2.7.5 Messung der Zellfluoreszenz und Datenanalyse	18
2.8 Quantifizierung der relativen mRNA-Expression	19
2.8.1 Prinzip der Durchführung	19
2.8.2 Datenanalyse	21
2.9 Western Blot.....	21
2.9.1 Prinzip des Western Blots	21

2.9.2	Densitometrische Auswertung und Datenanalyse	22
2.10	Elektrophysiologische Charakterisierung	23
2.10.1	Zellvorbereitung für Patch-Clamp-Messungen	23
2.10.2	Zellvereinzelung für Patch-Clamp-Messungen	23
2.10.3	Allgemeines zu den Patch-Clamp-Messungen	23
2.10.4	Messtechnik des Aktionspotentials	24
2.10.5	Messtechnik des I_{Ca-L}	24
2.10.6	Auswertung der Patch-Clamp-Messergebnisse	25
2.10.7	Messtechnik des Calcium-Transienten	25
2.10.8	Statistische Auswertung der Patch-Clamp-Messungen	26
3	ERGEBNISSE	28
3.1	Charakterisierung von patientenspezifischen hiPSCs und hiPSC-CMs	28
3.1.1	Pluripotenz-Nachweis der hiPSCs	28
3.1.2	Nachweis der erfolgreichen Differenzierung zu Kardiomyozyten	30
3.1.3	mRNA-Expressionslevel der Ionenkanäle in den hiPSC-CMs	35
3.1.4	Proteinexpression in den BrS-hiPSC-CMs	36
3.2	Elektrophysiologische Charakterisierung	36
3.2.1	Eigenschaften des Aktionspotentials in den hiPSC-CMs	37
3.2.2	Strom und Kinetik des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals in den hiPSC-CMs	38
3.2.3	Ergebnisse der Calcium-Transient-Messungen	39
4	DISKUSSION	46
4.1	Diskussion der Ergebnisse	46
4.1.1	Pluripotenz der BrS-hiPSC und erfolgreiche Differenzierung zu Kardiomyozyten (BrS-hiPSC-CMs)	46
4.1.2	Genotyp-Phänotyp-Korrelation der CACNB2-Genvariante	46
4.1.3	Eine Reduktion der Proteinexpression im CACNB2-Gen	47
4.1.4	Funktionelle Konsequenz der CACNB2-Genvariante auf den Calciumstrom - eine Reduktion des „Peak“ L-Typ Calciumstroms	48
4.1.5	Abnormes Aktionspotential in den BrS-hiPSC-CMs	50
4.1.6	Gesteigertes Auftreten von Arrhythmie-ähnlichen Ereignissen in BrS-hiPSC-CMs und Zunahme unter Stimulation durch Carbachol	50
4.1.7	Das BrS-Zellmodell als Plattform für Medikamententestung	51

4.2	Limitation der Methoden	52
4.3	„from bench to bedside“ – klinische Relevanz der Arbeit.....	53
4.4	Schlussfolgerung	53
5	ZUSAMMENFASSUNG	54
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	56
6.1	Abbildungsverzeichnis	61
7	ANHANG	62
7.1	Ausführliche Methodenbeschreibung.....	62
7.1.1	Immunfluoreszenz.....	62
7.1.2	Quantifizierung der relativen mRNA-Expression.....	63
7.1.3	Versuchsprotokoll des Western Blots	66
7.2	Tabellarischer Anhang	71
7.2.1	Zusammensetzung der Patch-Clamp Ionenlösungen	71
7.2.2	Verwendete Materialien in den verschiedenen Methoden	72
8	PUBLIKATIONEN	80
9	LEBENS LAUF	81
10	DANKSAGUNG	82

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AC	Arrhythmogene Kardiomyopathie
AID	Alpha Subunit-Interaktions-Domäne
Ajm	Ajmalin
AP	Aktionspotential
APA	Amplitude des Aktionspotentials
APD	Aktionspotentialdauer
APD50	APD bei 50% der Repolarisation
APD90	APD bei 90% der Repolarisation
ATP	Adenosintriphosphat
BID	Beta Subunit-Interaktions-Domäne
Biso	Bisoprolol
BMP-4	Bone morphogenetic protein 4
BrS	Brugada Syndrom
BrS-hiPSC-CMs	Differenzierte Kardiomyozyten aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen eines Brugada Syndrom Patienten
CACNA1C	alpha-1C-Untereinheit, Calcium-Kanal, Cav 1.2
CACNB2	beta-2-Untereinheit, Calcium-Kanal, Cav 1.2
CCH	Carbachol
cDNA	Complementary DNA / komplementäre DNA
CHIR99021	Eigenname des Proteins
ClinVar	Open Datenbank zu genetischen Variationen und zugehörigem Phänotyp (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar)
CMs	Cardiomyocytes/ Kardiomyozyten
Corrected-hiPSC-CMs	Differenzierte Kardiomyozyten aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen nach Korrektur der Genvariante des BrS Patienten
CRISPR/ Cas9	clustered-regularly-interspaced short palindromic repeats und crispr-associated protein 9; Verfahren zur Genkorrektur
CTCF	corrected total cell fluorescence/ korrigierte totale Zellfluoreszenz
cTNT	Cardiac Troponin T
DAD-ähnliche	„delayed after depolarization“-ähnliche
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	Dilatative Kardiomyopathie

EAD-	„early after depolarization“-ähnliche
EMBL-	European Molecular Biology Laboratory
ERS	early repolarization syndrome
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GPD1L	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase
Healthy-hiPSC-CMs	Differenzierte Kardiomyozyten aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen gesunder Spender
HGMD	Human Gene Mutation Database
hiPSC	humane induzierte pluripotente Stammzellen
hiPSC-CMs	Kardiomyozyten, differenziert aus patientenspezifischen humanen induzierten pluripotenten Stammzellen
I_{Ca-L}	Ionenstrom des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals
ICD	implantierbarer Kardioverter Defibrillator
I_{Kr}	gering verzögerter gleichrichtender Kaliumkanal
I_{Na}	Ionenstrom des spannungsabhängigen Natriumkanals
IPW4	Inhibitor of WNT Production-4
I_{to}	transienter Kaliumausstrom
IV-Kurve	Strom-Spannungsbeziehung
KCND3	Spannungsabhängiger Kaliumkanal, Subfamilie D, Member 3
KCNH2	Spannungsabhängiger Kaliumkanal, Subfamilie H, 2
KCNIP2	Spannungsabhängiger Kaliumkanal - Protein P 2
KCNJ2	Spannungsabhängiger Kaliumkanal, Subfamilie J, 2
KCNQ1	Spannungsabhängiger Kaliumkanal, Subfamilie Q, Member 1
LQTS	Long QT-Syndrom
LTCC	L-Typ Calciumkanal
MDC	Max Delbrück Center
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
n	Anzahl der Proben
NANOG	Homöoboxprotein
OCT4	Octamer-binding Transcription Factor 4
PCCD	Familiäre progressive kardiale Reizleitungsstörung
PCR	Polymerase Kettenreaktion

POUF1	Pituitary-specific positive transcription factor 1
q-RT-PCR	Quantitative Reverse Transkription - Polymerase Kettenreaktion
RP	Resting potential/ Ruhemembranpotential
SCD	Sudden cardiac death/ Plötzlicher Herztod
SCN10A	Untereinheit alpha 10 des spannungsabhängigen Natriumkanals, Nav 1.5
SCN1B	Untereinheit beta 1 des spannungsabhängigen Natriumkanals, Nav 1.5
SCN3B	Untereinheit beta 3 des spannungsabhängigen Natriumkanals, Nav 1.5
SCN5A	Untereinheit alpha 5 des spannungsabhängigen Natriumkanals, Nav 1.5
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SQTS	Short QT-Syndrom
ssODN	single-stranded oligonucleotide template/ spenderspezifische Einzelstrang-Oligonukleotid Vorlage
SSS	Sick Sinus-Syndrom
TNNI3	Kardiales Troponin I
TNNT2	Kardiales Troponin T
V1-V3	Vorderwandableitungen
Vmax	maximal depolarization velocity/ Maximale Depolarisationsgeschwindigkeit des Aktionspotentials
WB	Western Blot

1 EINLEITUNG

1.1 Brugada Syndrom

Das Brugada Syndrom (BrS) gehört zu einer Gruppe seltener, angeborener Herzrhythmusstörungen, die durch genetische Veränderungen myokardialer Ionenkanäle verursacht werden. Hierdurch verändern sich die elektrophysiologischen Eigenschaften des Herzmuskels, so dass ventrikuläre Tachyarrhythmien gehäuft auftreten. Zu der Gruppe der Ionenkanalerkrankungen zählen neben dem BrS, die Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie, das Long QT- und das Short QT-Syndrom.

Das BrS wurde im Jahre 1992 zum ersten Mal beschrieben und ist charakterisiert durch typische Erregungsrückbildungsveränderungen im Elektrokardiogramm (EKG), welche diagnostisch in Typ 1 und Typ 2 eingeteilt wurden. Aktuell wird die Diagnose des BrS gestellt bei Vorliegen von konkaven ST-Hebungen mit Typ 1 Morphologie: (konkave) ST-Hebungen ≥ 2 mm in ≥ 1 Vorderwandableitung (V1-V2; positioniert im zweiten, dritten oder vierten Interkostalraum) gefolgt von einer negativen T-Welle, welche spontan oder mittels Provokation (intravenöser Natriumkanalblockade) auftreten (Brugada et al., 1993, Priori et al., 2013, Priori et al., 2015). Dahingegen liegt beim Typ 2 (saddle-back type) eine konvexe ST-Hebung ($\geq 0,5$ mm, im Allgemeinen jedoch ≥ 2 mm) in ≥ 1 Vorderwandableitung (V1-V3) vor und wird von einer positiven T-Welle gefolgt (Priori et al. 2013). Diagnostisch verwertbar ist eine spontane Typ 2-Morphologie nur, wenn es sich durch Provokation in eine Typ 1-Morphologie umwandeln lässt.

Beide EKG-Typen des BrS liegen jedoch ohne strukturelle kardiale Erkrankung vor (Brugada et al., 1993), (Brugada et al., 2018). Die Prävalenz des BrS liegt weltweit bei 0.05% (Vutthikraivit et al., 2018). In Südostasien ist sie mit 1:1000 deutlich höher, als in westlichen Ländern (1:10.000) (Fowler and Priori, 2009). In Thailand ist die Prävalenz mit Abstand die höchste mit 6,8:1000 und ist damit ungefähr 14-fach höher als der weltweite Durchschnitt (Vutthikraivit et al., 2018).

Die Erstdiagnose findet meist im jungen Erwachsenenalter statt, wobei Männer deutlich häufiger betroffen sind als Frauen (8:1). Komplikationen wie das Kammerflimmern treten durchschnittlich bereits in einem Alter von 41 ± 15 Jahren auf; der plötzliche Herztod um das 40. Lebensjahr. Die Herzrhythmusstörungen des BrS treten meist in Ruhe oder im Schlaf auf. Ebenso können große Mahlzeiten, exzessiver Alkoholenuss, Kokain, Fieber, Parasympathomimetika, adrenerge Betarezeptorblocker, zyklische Antidepressiva sowie Hyper- und Hypokaliämie das charakteristische EKG-Bild bei BrS triggern und die Neigung zu Kammerflimmern erhöhen (Hedley et al., 2009), (Priori et al., 2015).

Der Nachweis oben genannter EKG-Veränderungen in Ruhe oder im Provokationstest per intravenöser Natriumkanalblockade ist diagnostisches Kriterium. Zuvor erfolgt ein Ausschluss von Krankheitsbildern, welche BrS-Phänokopien verursachen können, wie beispielsweise Myokarditis, Herzinfarkt, Lungenarterienembolie aber auch Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathien (Fink et al., 2015), (Priori et al., 2013).

Die leitliniengerechte Therapie beinhaltet die Vermeidung von Natriumkanalblockern sowie die Vermeidung provozierender Faktoren und Infektionen und eine sofortige medikamentöse antipyretische Behandlung bei Fieber. Die ICD-Implantation wird für BrS-Patienten bei überlebtem plötzlichem Herztod, bei spontan dokumentierten EKG

1.2 Zelluläres Modell mit Kardiomyozyten, differenziert aus patientenspezifischen humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC-CMs)

Trotz eines bestehenden Behandlungsansatzes -die Implantation von Defibrillatoren- für BrS-Patienten fehlt aktuell das Verständnis für die pathophysiologische Rolle der verschiedenen seltenen genetischen Abweichungen zum klinisch präsentierten Krankheitsbild. Die meisten funktionellen Studien legen den Fokus auf Genvarianten im spannungsabhängigen Natriumkanal, insbesondere im SCN5A-Gen. Zudem stellt die niedrige Prävalenz sowie die Beschaffungsschwierigkeit menschlicher Herzmuskelzellen eine große Hürde für sowohl die klinische als auch für die Grundlagenforschung dar.

Ein Ansatz zur Aufklärung der funktionellen Effekte der genetischen Varianten liegt in der Entwicklung zellulärer Modelle mit Kardiomyozyten (CMs) aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) (Brugada et al., 2018), (El-Battrawy et al., 2018), (Zwi et al., 2009). Zahlreiche Studien nutzten hiPSC-CMs zur Erforschung angeborener Herzrhythmusstörungen, wie beispielweise dem LQTS, CPVT und dem Brugada Syndrom (Liang et al., 2016), (Novak et al., 2012), (Moretti et al., 2010), (Itzhaki et al., 2011). Alternative experimentelle Versuchsmodelle mit heterologen Expressionssystemen wie *Xenopus* Oozyten, menschliche embryonale Nierenzellen (HEK) oder Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen können als Erklärungsansatz dienen, besitzen jedoch nicht die spezifischen molekularen, strukturellen und funktionellen kardialen Eigenschaften der aus hiPSC differenzierten Kardiomyozyten (Zwi et al., 2009).

Patientenspezifische-hiPSC-CMs, welche die genotypischen Eigenschaften des Patienten enthalten, eröffnen Möglichkeiten, das Syndrom *in vitro* auf seine phänotypischen Merkmale zu untersuchen. Von Interesse sind hierbei sowohl die elektrophysiologischen Eigenschaften als auch die Protein- und mRNA-Expression der CMs.

Die Etablierung eines zellulären Modells aus hiPSC-CMs für BrS-Patienten mit SCN5A Mutationen wurde bereits in mehreren Arbeiten gezeigt (Veerman et al., 2016), (Liang et al., 2016). Ein zelluläres Modell des Phänotyps der weitaus selteneren Genvariante des Calciumkanals im CACNB2-Gen bei BrS-Patienten (BrS 4) mittels hiPSC-CMs fehlt bisher in der Literatur.

1.3 Kardiale Ionenkanäle und -ströme

Das Aktionspotenzial der Kardiomyozyten ist ein komplexes Zusammenspiel von vielen verschiedenen zeit- und spannungsabhängigen Ionenströmen. Die Ionen können zum einen transmembranös passiv transportiert werden, entsprechend des elektrochemischen Gradienten durch selektive Ionenkanäle und zum anderen können die Ionen aktiv gegen einen elektrochemischen Gradienten durch Pumpen und Transporter transportiert werden aber auch elektrogen durch Austausch von speziellen Ionen.

Physiologischerweise zeigen sich im Herzen regional, vor allem atrial und ventrikulär, deutliche Unterschiede der Aktionspotenziale basierend auf der unterschiedlichen Expression der Ionenkanalproteine.

Abbildung 2 zeigt schematisch ein atriales und ein ventrikuläres Aktionspotential in den Phasen 0-4: den schnellen Aufstrich (0), die frühe Repolarisation (1), das Plateau (2), die späte Repolarisation (3) und die Diastole (4). Zudem stellt die Abbildung die depolarisierenden und repolarisierenden Ionenströme mit den jeweiligen Genen der Ionenkanalproteine dar. Wie in der Abbildung 2 sichtbar, tragen die spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanäle überwiegend zum depolarisierenden Strom bei. Nach deren Inaktivierung und der Aktivierung der Kaliumkanäle kommt es zur Re- und Hyperpolarisation. In der Plateauphase können relativ geringfügige Änderungen der zu diesem Zeitpunkt nur wenig fließenden Ionenströme bedeutende Aktionspotentialänderungen in Dauer und Form nach sich ziehen. Diese Änderungen können durch Genvarianten in den Genen der Ionenkanäle hervorgerufen werden und zu arrhythmogenen Aktionspotentialveränderungen führen.

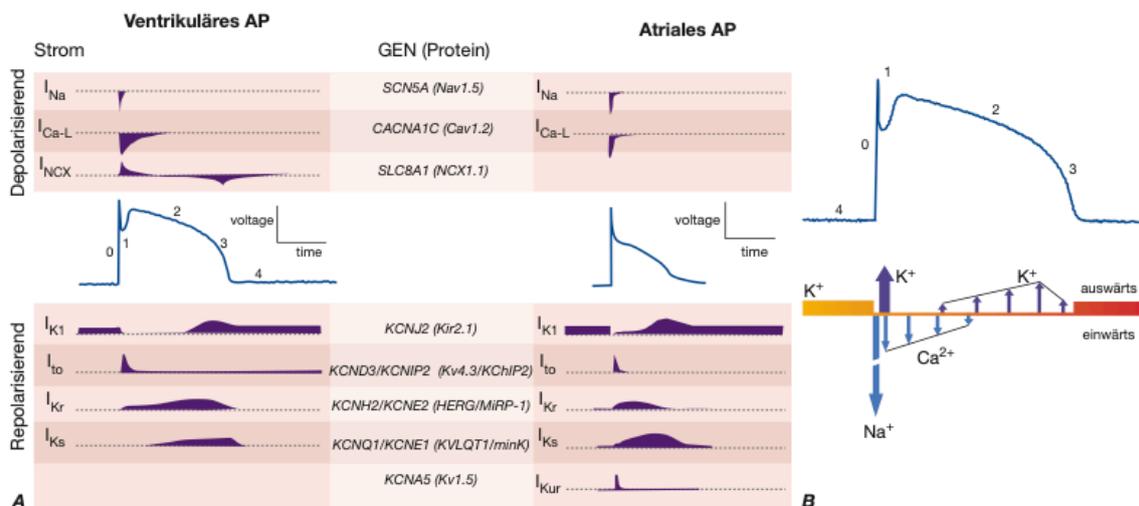


Abbildung 2: (nach Suttrop et al., Harrison Innere Medizin (ISBN:978-3-940615-50-3) ©2016 ABW Wissenschaftsverlag) **Ventrikuläres und Atriales Aktionspotential.**

(A) Atriale und ventrikuläre zelluläre Aktionspotenziale. Die Phasen 0 bis 4 entsprechen dem schnellen Aufstrich, der frühen Repolarisation und der späten Repolarisation und der Diastole. Die verantwortlichen Gene sind schematisch oberhalb und unterhalb der Aktionspotenziale dargestellt. Die Ionenströme die das Aktionspotential verursachen, sind in Vorhof- und Ventrikelmiozyten unterschiedlich.

(B) Ein ventrikuläres Aktionspotential mit einer schematischen Darstellung der Ionenströme.

1.3.1 Der kardiale spannungsabhängige L-Typ Calciumkanal

Der kardiale spannungsabhängige L-Typ Calciumkanal (I_{Ca-L}) wird gebildet aus einem Proteinkomplex bestehend aus 3 Untereinheiten: $\alpha 1$, β , und $\alpha 2 \delta$. Dieser ist schematisch dargestellt in Abbildung 3. Die Ionenkanalformende Cav1.2 alpha 1-Untereinheit, kodiert vom CACNA1C-Gen, trägt außerdem den Spannungssensor und Sensitivitätsfilter sowie Bindungsstellen für Toxine und Medikamente (Felix et al., 1997). Sie hat die dominierende funktionelle Rolle in der Funktionsweise des I_{Ca-L} . Die beta 2- oder so genannte $Ca_v\beta 2b$ -Untereinheit, kodiert durch das CACNB2-Gen, hat regulatorische Eigenschaften, welche möglicherweise die Kanalöffnungsfunktion (gating kinetics) des Calciumkanals beeinflussen und modifizieren kann (Felix et al., 1997). Die alpha 2-delta Untereinheit, kodiert vom CACNA2D1-Gen, bildet nach posttranslationaler Spaltung zwei Untereinheiten: Die alpha 2-Subuntereinheit, welche Einfluss auf die Expressionsstärke der Zellmembran hat und die delta-Subuntereinheit,

mit modulierenden Einfluss auf die Kanalöffnungsfunktion (gating kinetics) (Felix et al., 1997).

Eine Mutation in der alpha- oder beta-Untereinheit des Calciumkanals kann eine Prädisposition am BrS zu erkranken auslösen (Antzelevitch et al., 2007), (Risgaard et al., 2013). Die pathogenetische Bedeutung einer Missense-Genvariante im CACNB2-Gen bei BrS-Patienten ist bisher unklar.

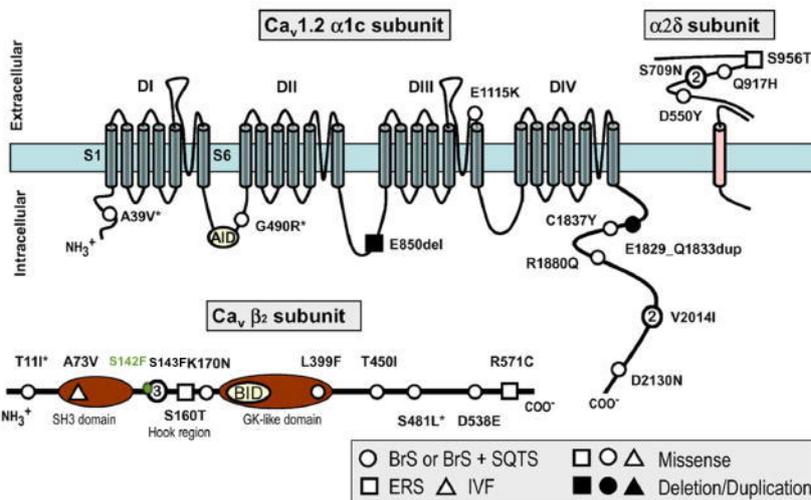


Abbildung 3: modifiziert nach Burashnikov et al., 2010. **Schematische Zeichnung des kardialen spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanal (Cav1.2) bestehend aus den 3 Untereinheiten α 1c, β 2, und α 2 δ**. Die Lage der einzelnen Untereinheiten wird unterteilt in intra- und extrazellulär. Die topologische Lage der mit dem BrS assoziierten Mutationen sowie mit dem BrS und SQTS als auch mit dem ERS und IVF sind auf den Untereinheiten dargestellt. Die Genvariante des in dieser Arbeit beschriebenen BrS-Patienten ist grün markiert. AID und BID bildet die Interaktionsposition der α 1c mit der β 2 Untereinheit ab. AID = alpha Subunit-Interaktions-Domäne; BID = beta Subunit-Interaktions-Domäne; GK = Guanylat Kinase-like domain; SH3 = Src homology domain; Größere Symbole mit Nummern weisen auf multiple Probandenzahl mit derselben Mutation hin. Die Sternchen weisen auf bereits bekannte Genvarianten des BrS hin.

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung des zellulären Phänotyps und die Etablierung eines zellulären Modells für BrS-Patienten mit CACNB2-Genvariante. Hierzu werden hiPSC-CMs eines BrS-Patienten mit einer Missense-Genvariante unklarer Bedeutung (c.425C>T/ p.S142F) im CACNB2-Gen verwendet. Die pathogenetischen Eigenschaften der Mutation sollen mittels phänotypischen Vergleichs zu hiPSC-CMs gesunder Personen und mutationskorrigierten BrS-hiPSC-CMs geklärt werden.

Hierbei steht zunächst die Kultivierung der Zellen und der Nachweis einer erfolgreichen Differenzierung der patientenspezifischen hiPSC zu kontrahierenden Kardiomyozyten im Vordergrund. Es soll eine immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung gesunder Donor-Kardiomyozyten (Healthy-hiPSC-CMs), der Kardiomyozyten eines BrS-Patienten (BrS-hiPSC-CMs), sowie mutationskorrigierter BrS-hiPSC-CMs (Corrected-hiPSC-CMs) stattfinden. Dieser Nachweis schafft die Voraussetzung für eine weitere Bestätigung der erfolgreichen Differenzierung, welche mithilfe des im Verlauf der Differenzierung (bis Tag 35) abnehmenden Pluripotenzmarkers und dem Anstieg der kardiomyozytenspezifischen Marker erfolgen

soll. Außerdem ist die mRNA-Expression von weiteren kardialen Ionenkanälen und Rezeptoren, die Analyse der Proteinexpression des Calciumkanals (CACNB2 und CACA1C) und des Natriumkanals (SCN5A) mittels Western Blot von Interesse. Elektrophysiologisch ist die Analyse der Eigenschaften des Aktionspotentials, die Ionenkanalströme und Kanalöffnungskinetik des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals I_{Ca-L} sowie die spontanen Calcium-Transienten von Belang.

Die Analyse der einzelnen Ionenströme bei BrS-hiPSC-CMs ist besonders interessant, da es in der klinischen Präsentation keinen Unterschied zwischen Patienten mit einer Natrium- bzw. Calciumkanalmutation zu geben scheint. Es gibt jedoch Auffälligkeiten im therapeutischen Ansatz bei den dieser Arbeit zugrundeliegenden Daten eines BrS-Patienten. In Form eines zellulären Modells soll daher dieser BrS-Patient mit einer CACNB2-Genvariante für ein medikamentöses Screening dienen, in dem pro- und anti-arrhythmische Substanzen getestet werden sollen.

Abschließend soll geklärt werden, ob patientenspezifische hiPSC-CMs eines BrS-Patienten als zelluläres Modell herangezogen werden können und die phänotypischen Eigenschaften des Patienten widerspiegeln. Des Weiteren soll diese Arbeit Aufschluss über die pathophysiologische Wirkung der Genvariante auf den L-Typ Calciumkanal geben.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Ethikvotum

Die Hautbiopsien von drei gesunden Spendern und einem Patienten mit Brugada Syndrom wurden mit schriftlicher Einverständniserklärung der Personen vorgenommen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Mannheim, der Universität Heidelberg (Zulassungsnummer: 2018-565N-MA) und der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen (Zulassungsnummer: 10/9/15) genehmigt und gemäß den Vorgaben der Helsinki-Deklaration von 1975 in der revidierten Fassung von 1983 durchgeführt.

2.2 Klinische Daten

Der am Brugada Syndrom erkrankte 55-jährige männliche Patient erlitt mehrfach (vor Diagnosestellung) in Ruhephasen einen plötzlichen Herztod (SCD), welche er allesamt überlebte. In seiner Familie (Abbildung 4A) ist kein weiterer BrS-Fall bekannt, einzig seine Tochter leidet unter rezidivierenden Synkopen, deren Abklärung sie bisher ablehnte.

Diagnostisch zeigte sich ein unauffälliges Ruhe-EKG. Unter einer Stimulation mit 40mg Ajmalin (1mg/kg) demaskierte sich die für das Brugada Syndrom typische ST-Hebung (Typ I), dargestellt in Abbildung 4B. Das Vorliegen von strukturellen oder ischämischen Veränderungen des Herzens wurden anhand eines Echokardiogramms, eines Belastungs-EKGs und eines MRT des Herzens ausgeschlossen. Im Rahmen einer elektrophysiologischen Untersuchung wurde, durch eine kontrolliert programmierte ventrikuläre Stimulation, Kammerflimmern ausgelöst. Dieses Vorgehen stellte, neben den wiederholt aufgetretenen SCDs, die Indikation zur Implantation eines ICDs dar. Zwei Jahre nach Implantation und Beendigung der initial begonnenen Betablockertherapie wurden mindestens 6 Defibrillationen des ICDs (Abbildung 4C) bei dokumentiertem Kammerflimmern ausgelöst. Daher wurde die möglicherweise antiarrhythmisch wirkende Betablockertherapie (Bisoprolol) wieder angesetzt. In einem Beobachtungszeitraum von 5 Jahren wurden weder weiteres Kammerflimmern, noch Defibrillationen des ICDs dokumentiert.

Anzumerken ist, dass Betablocker bei BrS-Patienten kontraindiziert sind (Postema et al., 2009).

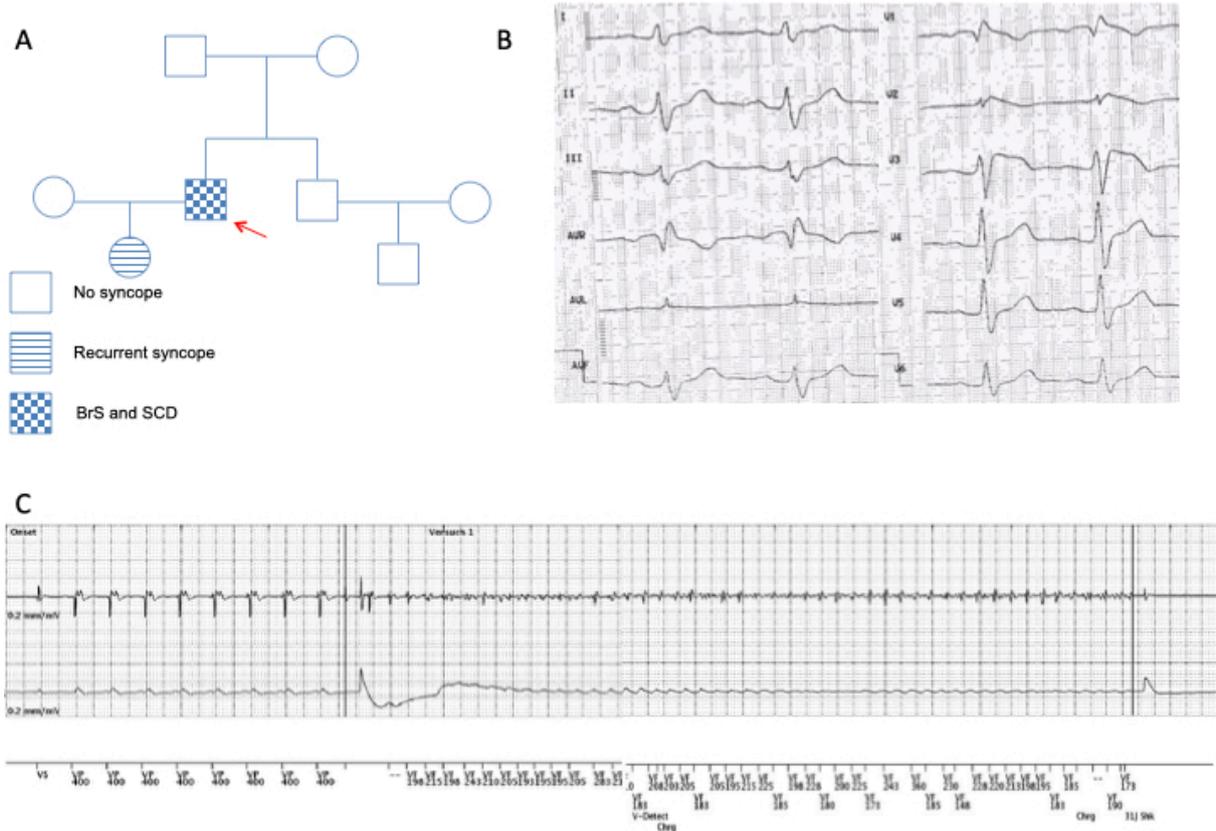


Abbildung 4: **Klinische Daten des BrS-Patienten** (Zhong et al., 2022).

(A) Stammbaum des Patienten. Der rote Pfeil kennzeichnet den Patienten.

(B) EKG des BrS-Patienten unter 40mg Ajmalin-Stimulation (1mg/kg).

(C) EKG-Ausschnitt des vom ICD aufgezeichneten Kammerflimmerns des BrS-Patienten, nach Beendigung der Bisoprolol-Therapie. Es zeigt eine adäquate Schockabgabe des ICDs zur Beendigung des Kammerflimmerns.

2.3 Molekulargenetische Untersuchung

Die molekulargenetische Untersuchung wurde in einem externen Labor durchgeführt. Die DNA-Sequenz-Analyse erfolgte aus Lymphozyten des Patienten. Hierzu wurden 89 von 107 codierenden Exons und angrenzenden Introns der nachfolgend aufgelisteten Gene inklusive der Spleißstellen mittels PCR amplifiziert und doppelsträngig sequenziert:

- GPD1L (Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase)
- CACNA1C (alpha-1C-Untereinheit, Calcium-Kanal, Cav 1.2)
- CACNB2 (beta-2-Untereinheit, Calcium-Kanal, Cav 1.2)
- SCN1B (beta-Untereinheit, Nav 1.5)
- SCN3B (beta-3-Untereinheit, Nav 1.5)
- KCNE3 (beta-Untereinheit, Kalium-Kanal, MiRP2)

Das Ergebnis der Untersuchung wurde mittels einer zweiten unabhängigen DNA-Extraktion bestätigt. Der Sequenzabgleich erfolgte mithilfe der EMBL- und GenBank-Datenbanken hg 19 (NM_015141.3, NM_000719.5, NM_201590.2, NM_001037.4,

NM_005472.4, NM_018400.3 und NM_198056.2) und die Identifikation bekannter Mutationen mit Hilfe der professionellen Version der HGMD.

Diese molekulargenetische Untersuchung lieferte als Ergebnis eine Missense-Punktmutation im CACNB2-Gen, der beta-2-Untereinheit des Calcium-Kanals (Cav 1.2) (dbSNP rs150528041; NM_000724.4: c.425C>T/ p.S142F) in heterozygoter Form und unbekannter Signifikanz.

Nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung des Patienten zur Entnahme einer Hautbiopsie und Verwendung dieser zu Forschungszwecken, wurde diese von Herrn PD Dr. med. El-Battrawy durchgeführt.

2.4 „Bed to Bench“ – Generierung humaner iPSC-Zellen

Die Generierung von patientenspezifischen humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) erfolgte durch die Kooperationspartner des Projekts in der Stammzelleinheit der Universität Göttingen. Nach Hautbiopsie am Oberarm des BrS-Patienten und Herstellung von Fibroblasten in Zellkultur, erfolgte die Reprogrammierung der Fibroblasten zu hiPSCs in Zellkultur (ohne Feeder-Zellen). Die Reprogrammierung erfolgte mit dem „integration-free CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit“ (Thermo Fisher Scientific, #A16517) mit den Reprogrammierungsfaktoren OCT4, KLF4, SOX2, c-MYC, welche gemäß den Herstellerangaben und mit den bereits in Hanses et al. (2020) beschriebenen Abweichungen angewendet wurde. Die für dieses Projekt generierten hiPSCs (isBrSb2.1/ UMGi119-A.1 und isBrSb2.2/ UMGi119-A.2) wurden auf Pluripotenz getestet. Die drei von gesunden Spendern stammenden hiPSCs (D1, UMGi014-B und UMGi124-A) wurden auf gleiche Weise gewonnen, reprogrammiert und bereits charakterisiert und beschrieben (El-Battrawy et al., 2018), (El-Battrawy et al., 2019). Das Ethikvotum befindet sich unter 2.1.

2.5 Mutationskorrektur

Eine Korrektur der als krankheitsauslösend angenommenen Mutation im CACNB2-Gen (c425T>C), wurde extern von Kooperationspartnern des Projekts (MDC in Berlin) durchgeführt. Hierfür wurden mittels des CRISPR/ Cas9-Verfahrens zwei isogenetische, mutationskorrigierte Stammzellklone generiert (isBrSb2-corr.6/ UMGi119-A-1.6/ BIHi259-A-1 und isBrSb2-corr.23/ UMGi119-A-1.23/ BIHi259-A2). Die Generierung der isogenetischen, mutationskorrigierten Stammzellklone wurde anhand des Protokolls von Richardson et al. (2016) durchgeführt.

Das CRISPR/ Cas9-Verfahren („clustered-regularly-interspaced short palindromic repeats und crispr-associated protein 9“) ist eine Technologie im Bereich der Genomeditierung, welche aus der bakteriellen Immunabwehr gegen virale DNA abgeleitet ist und präzises Schneiden von Zielsequenzen im Genom ermöglicht. Mithilfe einer „small guide“ RNA (sgRNA), welche komplementär zu einem Bereich des Ziel-DNA/ Gens ist und einer daran gebundene Endonuklease (Cas9) wird ein Doppelstrangbruch der DNA erreicht. Hiernach kommen zelleigene DNA-Reparatursysteme zum Einsatz, welche den durchtrennten DNA-Strang reparieren. Diese Reparatur kann unterschiedlich ablaufen: Gezielt-homolog oder zufällig-nicht-

homolog. Bei der homologen Reparatur kann gezielt ein neuer Genabschnitt eingefügt werden, der eine Genmutation korrigiert oder eine Genmutation verursacht. Bei der nicht-homologen Reparatur werden an der Bruchstelle einzelne DNA-Basen entfernt oder falsch zusammengesetzt. Hierdurch kann das betreffende Gen nicht mehr korrekt abgelesen werden und ist dadurch nicht mehr aktiv (Transparenz Gentechnik 2020), (Oppel et al., 2019).

Die im Rahmen dieses Projektes generierten genmutations-korrigierten Stammzellen wurden von unseren Kooperationspartnern in Berlin generiert:

Hergestellt wurden zwei sgRNAs: 1. Eine sgRNA wurde synthetisiert (siehe <http://crispor.tefor.net/>) (Concordet and Haeussler, 2018), welche das CACNB2-Gen nahe der zu korrigierenden Mutationslokalisierung anvisiert. 2. Eine sgRNA, hergestellt von „Integrated DNA technologies“ (<https://eu.idtdna.com>), welche wie folgt aufgebaut ist: 5`-AGCAAGGGAAATTCTACTTC-3`.

Zur homologen-gezielten Korrektur der krankheitsauslösenden Mutation (c425T>C) wurde eine spenderspezifische Einzelstrang-Oligonukleotid Vorlage (single-stranded oligonucleotide template, ssODN) als Ultramar DNA oligo ebenfalls von „Integrated DNA technologies“ (<https://eu.idtdna.com>) (5`-GCTGCAGCATGAACAGAGAGCCAAGCAAGGGAAATTCTACTCCAGGTATGAGACAGATGTCAAGTGTTCATATAAACTTAGATTATACTAGCTGTGTACTGTTGTCTGCTGTATTCTGTATCC-3`) synthetisiert.

Die Korrektur der spezifischen Mutation generierte eine für das Restriktionsenzym „Alu1“ erkennbare Sequenz, welche zur Identifikation und zum Screening der erfolgreich korrigierten Klone genutzt wurde.

Die Ribonukleoproteinkomplexe (RNP) wurden wie folgt vorbereitet: 1.5 µg Cas-9-Protein und 360 ng gRNA wurden gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Erstellung von RNPs und ssODN Vorlagen (template) wurde 10 µL Zellsuspension, welche Cas9 RNPs, ssODN und 1×10^5 Zellen beinhaltete, unter Anwendung des Neon transfection System 10 µL Kit (ThermoFisher Scientific, Cat. No. MPK1025) elektroporiert und folgendes Protokoll befolgt: 1200 oV, 30 ms Puls, 1 Puls. Die elektroporierten Zellen wurden in einem Well einer 6-Wellplatte überführt, welche StemFlex Medium (ThermoFisher Scientific, Cat. No. A3349401) supplementiert mit CloneR™ (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada, Cat. No. 05888) beinhaltete. Drei Tage nach der Transfektion wurde die Populationsmasse mithilfe des Amplicon Sequencing Service von Genewiz (Amplicon-EZ) zur Bestimmung der Editierungseffizienz (<https://www.genewiz.com>) analysiert. Im Anschluss wurde das automatisierte „single cell cloning“ des geneditierten Zellpools, wie im Protokoll von Vallone et al. (2020) beschrieben, durchgeführt. Darauf folgend wurden die Klone mithilfe eines Analyseprogrammes auf das Vorhandensein des Restriktionsenzym „Alu1 restriction digestion analysis“ gescreent und die hierauf positiv selektierten Klone auf Pluripotenz und Karyostabilität DNA-sequenz analysiert (nach SANGER) und charakterisiert. Die Klone der mutationskorrigierten hiPSCs werden fortan „CRISPR-corrected-hiPSCs“ oder „corrected“ genannt.

2.6 Kultivierung und Differenzierung

Die Kultivierung der hiPSC sowie die Differenzierung dieser zu Kardiomyozyten (hiPSC-CMs) erfolgte gemäß dem veröffentlichten Protokoll von Tiburcy et al. (2017) und dem modifizierten Protokoll Cyganek et al. (2018). Neben der Kultivierung der

hiPSCs des BrS-Patienten (BrS-hiPSCs) und der mutationskorrigierten hiPSCs (CRISPR-corrected-hiPSCs) fand zeitgleich die Kultivierung der von drei gesunden Spendern stammenden hiPSCs statt (D1, UMGi014-B und UMGi124-A, Healthy-hiPSCs). Fortan werden die CMs der drei Gruppen wie folgt bezeichnet bzw. in den Graphiken des Ergebnisteils abgekürzt genannt:

1. „BrS-hiPSC-CMs“ als „BrS“
2. „Healthy-hiPSC-CMs“ als „Healthy“
3. „Corrected-hiPSC-CMs“ als „Corrected“ oder „Isogenic“

Die Inkulturnahme der hiPSC setzt sich zusammen aus dem Auftauen gefrorener Kryotubes (-170°C) und die Überführung in eine Zellkulturflasche. Nach ungefähr 10 Tagen sind sichtbare Stammzellkolonien gewachsen, die in eine neue Zellkulturflasche passagierbar sind. Nach mindestens 10 Passagen kann eine Überführung der hiPSC in 24-Wellplatten stattfinden und die Differenzierung eingeleitet werden. Diese lässt sich unterteilen, in erstens: Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs und Differenzierung zu mesodermalen Stammzellen durch die Gabe der Faktoren Activin A, BMP-4, FGF-2 und CHIR99021 zusätzlich zum Nährmedium für 3 Tage. Zweitens: Die Inhibierung des Wnt-Signalwegs und Fortsetzung der Differenzierung zu CMs durch die Gabe des Faktors IPW-4 (Inhibitor of WNT Production-4) für 10 Tage. Drittens: Die Metabolische Selektion der differenzierten CMs (um Fibroblasten zu eliminieren) durch die Gabe von laktathaltigem Nährmedium ohne Glukose bis Tag 17. Viertens: Fortsetzung der Kultivierung der CMs mit serumfreiem Nährmedium bei sichtbarer Kontraktion bis mindestens Tag 50 nach Beginn der Differenzierung. Die CMs können dann von den 24-Wellplatten gelöst werden und entweder direkt für weitere Experimente verwendet oder zuvor auf Matrigel beschichtete 3,5cm große Glasschälchen übertragen werden. Den zur Charakterisierung der hiPSC-CMs dienenden Analysen liegen minimal 3 Differenzierungen aus 3 verschiedenen Passagen zugrunde.

Das serumfreie Differenzierungsprotokoll induziert die Entwicklung von atrialen und ventrikulären CMs. Analysen zeigten, dass die Induktion des WNT-Signalwegs 90% cTNT-positive CMs mit 89% MLC2V+/ MLC2A- oder MLC2V+/ MLC2A+ bewirkt. Das spricht für einen ventrikulären Subtyp (Cyganek et al. 2018).

Die zur Stammzellkultivierung und Differenzierung verwendeten Materialien sind im Anhang tabellarisch (7.5.1) aufgelistet.

2.6.1 Nachweis der Differenzierung

Der Nachweis der Differenzierung erfolgte gemäß einem Stufenplan:

1. Nachweis kontrahierender Kolonie unter mikroskopischer Kontrolle
2. Darstellung kardiomyozytenspezifischer Proteine mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie
3. Nachweis des im Verlauf der Differenzierung abnehmenden Pluripotenzmarkers und zunehmenden kardiomyozytenspezifischen Markers unter Zuhilfenahme der relativen mRNA Expression, gemessen mittels q-RT-PCR

2.7 Charakterisierung der BrS-, Healthy- und Corrected-hiPSC-CMs

Die Charakterisierung der BrS-, Corrected-hiPSC-CMs und Healthy-hiPSC-CMs erfolgte auf zwei Ebenen, erstens zellulär und zweitens elektrophysiologisch.

2.7.1 Zelluläre Charakterisierung

Die zelluläre Charakterisierung soll zum einem durch den Nachweis der relativen mRNA-Expression kardialer Gene von Ionenkanälen und Rezeptoren, gemessen mittels q-RT-PCR, und zum anderen durch die Analyse der Proteinexpression des CACNB2-Gens und SCN5A-Gens mittels Western-Blot und Immunfluoreszenz-Mikroskopie (siehe 2.8) stattfinden.

Im Detail bedeutet dies die Messung der relativen mRNA-Expression ab Tag 50 der Differenzierung der BrS-hiPSC-CMs und die Betrachtung im Vergleich zu den Healthy- und Corrected-hiPSC-CMs. Von Interesse sind hierbei die untenstehend aufgelisteten Gene, welche den spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanal, sowie den spannungsabhängigen Natriumkanal und den spannungsabhängigen Kaliumkanal kodieren:

- CACNA1C - *spannungsabhängiger L-Typ Calciumkanal, Untereinheit alpha 1*
- CACNB2 - *spannungsabhängiger L-Typ Calciumkanal, Untereinheit beta 2*
- SCN5A - *spannungsabhängiger Natriumkanal, Untereinheit alpha 5*
- KCND3 - *spannungsabhängiger Kaliumkanal, Subfamilie D, Member 3*
- KCNIP2 - *spannungsabhängiger Kaliumkanal - Protein P 2*
- KCNJ2 - *spannungsabhängiger Kaliumkanal, Subfamilie J, 2*
- KCNH2 - *spannungsabhängiger Kaliumkanal, Subfamilie H, 2*
- KCNQ1 - *spannungsabhängiger Kaliumkanal, Subfamilie Q, Member 1*
- SCN10A - *spannungsabhängiger Natriumkanal, Untereinheit, alpha 10*
- SCN1B - *spannungsabhängiger Natriumkanal, Untereinheit, beta 1*
- SCN3B - *spannungsabhängiger Natriumkanal, Untereinheit, beta 3*

Das angewendete Verfahren zur Gewinnung der mRNA, der q-RT-PCR und der Auswertung der relativen mRNA-Expression ist im Abschnitt 2.9 und im Anhang (Quantifizierung der relativen mRNA-Expression) im Detail erläutert.

Die Analyse der hiPSC-CMs bezüglich der Proteinexpression der beta-2-Untereinheit des LTCC (CACNB2) und der alpha-5-Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals (SCN5A) erfolgte mittels Western-Blot und Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Hierbei wurden die BrS-hiPSC-CMs sowie die Healthy- und Corrected-hiPSC-CMs ab Tag 50 der Differenzierung unter Anwendung der beschriebenen Protokolle der verschiedenen Analysemethoden behandelt.

Hierbei stammen die CMs aus jeweils aus 4 unterschiedlichen Zellkulturpassagen.

2.7.2 Prinzip der Immunfluoreszenz

In der Immunfluoreszenz nutzt man die spezifische Bindungsfähigkeit von Antikörpern, um die Verteilung von Antigenen in Zellen sichtbar zu machen. Die Antikörper sind mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt (direkte Immunfluoreszenz) oder werden

sekundär durch einen zweiten Antikörper mit Farbstoff markiert (indirekte Immunfluoreszenz).

2.7.3 Durchführung der Immunfluoreszenz

Die Durchführung der Immunfluoreszenz erstreckte sich über zwei Tage. Außerdem fanden zusätzlich die Fluoreszenzmikroskopie und -fotografie statt. Eine ausführliche Auflistung der verwendeten Materialien, die Methodenbeschreibung der Zellvorbereitung und -vereinzelnung sowie die Schilderung der 2-tägigen Durchführung ist im Anhang 7.1.1 zu finden. Die zur Charakterisierung genutzten Antikörper sind in der untenstehenden Tabelle 2.1 dargestellt. Die Immunfluoreszenz wurde mehrfach durchgeführt.

Tabelle 2-1: Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper in der Immunfluoreszenz mit Angaben zu Typ, Verdünnung, Hersteller und Produktnummer.

Primärer Antikörper 200µl/ Kammer	Typ	Verdünnung	Hersteller, Produktnummer
α-Actinin	monoclonal mouse IgG1	1:400	Sigma-Aldrich, A7811
TnT	monoclonal mouse IgG1	1:200	Abcam, ab8295
SCN5A	monoclonal mouse IgM	1:200	Abcam, ab62388
CACNB2	polyclonal rabbit IgG	1:200	ATLAS, HPA035326
Sekundärer Antikörper	Typ	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor 568	polyclonal goat anti-rabbit IgG	1:1000	Thermo Fisher Scientific, A-11036
Alexa Fluor 488	polyclonal goat anti-mouse IgG	1:1000	Thermo Fisher Scientific, A32723

Der immunhistochemische Nachweis der Pluripotenz der hiPSC erfolgte mittels der in der Tabelle 2.2 angegebenen Antikörper und Verdünnungen. Die Durchführung des Nachweises erfolgte durch einen Kooperationspartner des Projekts (Stammzelleinheit Universität Göttingen).

Tabelle 2-2: Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper in der Immunfluoreszenz, sowie der Flow Cytometrie zum Nachweis der Pluripotenz der hiPSC mit Angaben zur Verdünnung und Nennung des Herstellers sowie der Produktnummer.

Primärer Antikörper	Typ	Verdünnung	Hersteller, Produktnummer
hOCT3/4	polyclonal goat IgG	1:40	R&D Systems, Nr.: AF1759
hSOX2	monoclonal mouse IgG1	1:200	Thermo Fisher Scientific, Nr.: MA1-014
hNANOG	polyclonal rabbit IgG	1:100	Thermo Fisher Scientific, Nr.: PA1-097
hLIN28	polyclonal goat IgG	1:300	R&D Systems, Nr.: AF3757
hSSEA4	monoclonal mouse IgG3	1:100	Thermo Fisher Scientific, Nr.: MA1-021
hTRA-1-60	monoclonal mouse IgM	1:200	Abcam, Nr.: ab16288
hAFP	polyclonal rabbit IgG	1:100	DAKO, Nr.: A0008
α-SMA	monoclonal mouse IgG2a	1:3000	Sigma-Aldrich, Nr.: A2547
β-III-Tubulin	monoclonal mouse IgG2A	1:2000	Covance, Nr.: MMS-435P
Sekundärer Antikörper	Typ	Verdünnung	Hersteller, Produktnummer
Alexa Fluor 488	polyclonal donkey α-mouse IgG	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Nr.: A21202
Alexa Fluor 555	polyclonal donkey α-goat IgG	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Nr.: A21432
Alexa Fluor 555	polyclonal donkey α-mouse IgG	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Nr.: A31570
Alexa Fluor 555	polyclonal donkey α-rabbit IgG	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Nr.: A31572
FITC	polyclonal goat α-mouse IgM	1:200	Jackson Immuno, Nr.: 115-097-020
Flow Cytometry		Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor 488 mouse anti-human TRA-1-60		1:50	BD Biosciences, Nr.: 560173
Alexa Fluor 647 mouse anti-OCT3/4		1:50	BD Biosciences, Nr.: 560329

2.7.4 Fluoreszenzmikroskopie und -fotografie

Die Objektträger wurden mithilfe des Fluoreszenzmikroskops Leica DFC 3000G betrachtet und Bilder mittels der Software LAS V4.4 und der Kamera Leica DFC 450C aufgenommen und im TIF-Format abgespeichert.

2.7.5 Messung der Zellfluoreszenz und Datenanalyse

Die Messung der Zellfluoreszenz erfolgte gemäß dem Protokoll „Measuring Cell Fluorescence using Image J“ und mithilfe der kostenfreien Software ImageJ (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) (Scheider et al., 2012). Im Anschluss wurde die gemessene Zellfluoreszenz der nachgewiesenen Proteine korrigiert relativ zur totalen gemessenen Zellfluoreszenz (corrected total cell fluorescence, CTCF) und mithilfe eines t-Tests, ausgeführt in SigmaPlot, auf signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellreihen geprüft. Außerdem wurden aus den CTCF-Werten der Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwertes mit SigmaPlot berechnet sowie zur Veranschaulichung Graphen erstellt.

2.8 Quantifizierung der relativen mRNA-Expression

2.8.1 Prinzip der Durchführung

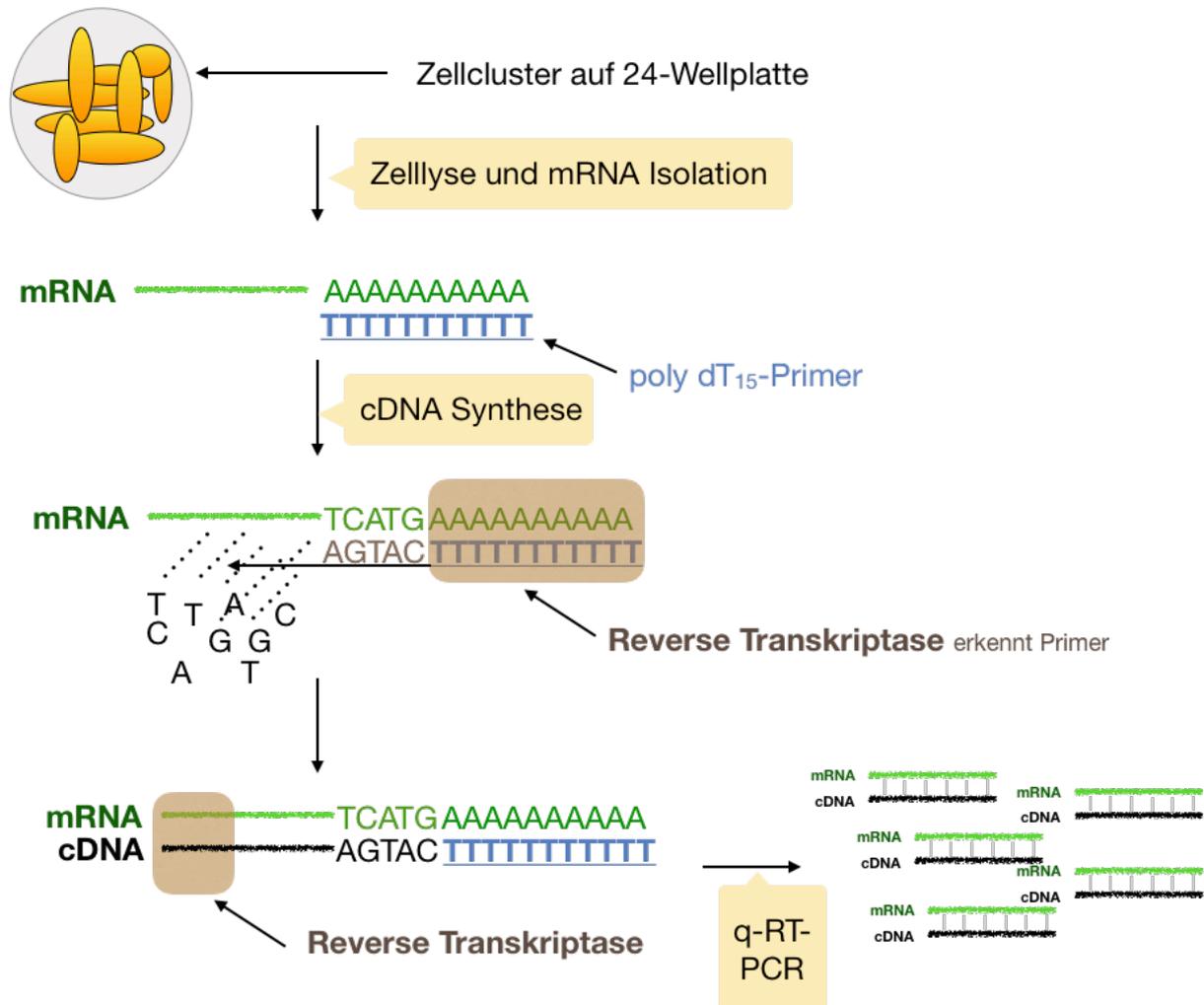


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Ablaufs zur Quantifizierung der mRNA-Expression.

Zur quantitativen Analyse der stetigen mRNA-Expression in den Kulturen der hiPSC-CMs fand ein mehrstufiges Verfahren statt (Abbildung 5): Zelllyse und mRNA-Isolierung, cDNA-Synthese durch reverse Transkription, Amplifikation der cDNA mithilfe der q-RT-PCR und Quantifizierung der relativen mRNA-Expression berechnet mittels der $\Delta\Delta CT$ -Methode.

Das genaue Versuchsprotokoll befindet sich im Anhang unter 7.1.2.

Die zum Nachweis der Gene genutzten Primer sind in der Tabelle 2.3 aufgeführt. Vollständigkeitshalber werden ebenfalls die Primer gelistet (Tabelle 2.4), die in der Pluripotenz-Charakterisierung genutzt wurden. Deren Durchführung fand durch die Stammzelleinheit der Universität Göttingen, einem Kooperationspartner des Projekts statt.

Tabelle 2-3: Auflistung der verwendeten Primer in der q-RT-PCR zum Nachweis der relativen Expressionsstärke der Ionenkanaluntereinheiten mit Angabe der Reference Sequence Nummer (RefSeq Nr.) der GenBank NCBI Reference Sequences, Herstellerangaben sowie der Produktnummern der Primer.

Primernamen im Text	RefSeq Nr.	Produktname, Hersteller, Produktnummer
CACNA1C	NM_000719	RT ² qPCR Primer Assay for Human CACNA1C Quiagen, Nr.: PPH01378G
CACNB2	NM_000724	RT ² qPCR Primer Assay for Human CACNB2 Quiagen, Nr.: QT00011256
GAPDH	NM_002046	RT ² qPCR Primer Assay for Human GAPDH, Quiagen, Nr.: PPH00150F
KCNH2	NM_000238	RT ² qPCR Primer Assay for Human KCNH2, Quiagen, Nr.: PPH01660A
KCNIP2	NM_014591	RT ² qPCR Primer Assay for Human KCNIP2, Quiagen, Nr.: QT00016254
KCNJ2	NM_000891	RT ² qPCR Primer Assay for Human KCNJ2, Quiagen, Nr.: PPH01618E
KCNQ1	NM_000218	RT ² qPCR Primer Assay for Human KCNQ1, Quiagen, Nr.: PPH01419A
POUF1	NM_002701.5	RT ² qPCR Primer Assay for Human POU5F1, Quiagen, Nr.: PPH02394E
SCN10A	NM_006514	RT ² qPCR Primer Assay for Human SCN10A, Quiagen, Nr.: PPH15064A
SCN1B	NM_001037	RT ² qPCR Primer Assay for Human SCN1B, Quiagen, Nr.: QT00066080
SCN3B	NM_018400	RT ² qPCR Primer Assay for Human SCN3B, Quiagen, Nr.: PPH07274A
SCN5A	NM_000335	RT ² qPCR Primer Assay for Human SCN5A, Quiagen, Nr.: PPH01671F
TNNI3	NM_001112808	RT ² qPCR Primer Assay for Human TNNI3, Quiagen, Nr.: PPH02622G
TNNT2	NM_000364	RT ² qPCR Primer Assay for Human TNNT2, Quiagen, Nr.: PPH02619A

Tabelle 2-4: Auflistung der verwendeten Primer, der Primersequenzen, der Anzahl der Basenpaare, Annealing-Temperaturen und der Anzahl der Zyklen.

Primer	Primer for	Primer rev	Anzahl der Basenpaare	Temperatur / Zyklen
OCT4	GACAACAATGAAAATCTTCAGGAGA	TTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA	218	58°C/ 36 Zyklen
SOX2	ATGCACCGCTACGACGTGA	CTTTTGCACCCCTCCATT	437	58°C/ 30 Zyklen
NANOG	AGTCCCAAAGGCAAACAACCCACTTC	ATCTGCTGGAGGCTGAGGTATTTCTGTCTC	164	64°C/ 36 Zyklen

LIN28	AGTAAGCTGCACATGGAAGG	ATTGTGGCTCAATTCTGTGC	410	58°C/ 36 Zyklen
FOXD3	GTGAAGCCGCCTTACTCGTAC	CCGAAGCTCTGCATCATGAG	353	58°C/ 38 Zyklen
GDF3	TTCGCTTTCTCCCAGACCAAGGTTTC	TACATCCAGCAGGTTGAAGTGAACAGCACC	311	58°C/ 32 Zyklen
GAPDH	AGAGGCAGGGATGATGTTCT	TCTGCTGATGCCCCCATGTT	258	58°C/ 30 Zyklen

2.8.2 Datenanalyse

Die Analyse der in der q-RT-PCR gewonnenen C_T -Werte wird gemäß dem Protokoll von Schmittgen and Livak (2008) durchgeführt. Bei der „comparative C_T -method“, auch als „ $2^{-\Delta\Delta CT}$ method“ beschrieben, wird die Genexpression nicht in absoluten Werten dargestellt, sondern als relative Genexpression. Dabei werden die C_T -Werte im Verhältnis zu einem internen Kontrollgen gesetzt („normalisiert“) (Schmittgen and Livak, 2008). In dieser Arbeit wird das Housekeeping-Gen „GAPDH“ zu diesem Zweck benutzt. Dieses Gen aus dem Glycolysetoffwechsel bildet in allen Zellen gleichmäßig mRNA und empfiehlt sich deshalb als konstante Bezugsgröße.

Neben den jeweils zwei technischen Replikaten werden die Daten von 3 biologischen Replikaten je Probe und Gen analysiert. Aus den mit der „comparative C_T -method“ gewonnenen Daten werden mithilfe von Excel für jedes Gen der Mittelwert, Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwertes berechnet. Der Vergleich der Daten der spezifischen relativen Genexpression zwischen mehreren Zellreihen erfolgte mithilfe von SigmaPlot. Hierbei wurden die „ $2^{-\Delta CT}$ - Werte“ mittels Anwendung des t-Tests auf signifikante Unterschiede zwischen den Zellreihen untersucht und in Graphen veranschaulicht.

2.9 Western Blot

2.9.1 Prinzip des Western Blots

Der Western-Blot dient dem Nachweis von spezifischen Proteinen in einem Proteingemisch. Die Durchführung gliedert sich in eine bedeutsame Anzahl an Schritten.

Im ersten Schritt wird das Proteingemisch mithilfe einer Gelelektrophorese in einer Trägermatrix entsprechend der Proteingröße in einzelne Proteinbanden aufgetrennt. Danach folgt die Übertragung der zuvor getrennten Proteinbanden aus dem Gel auf eine Trägermembran. Die Methode wird „Blotting“ genannt. Die Proteine bleiben aufgrund der Ladungswechselwirkungen an der Membranoberfläche im Muster der elektrophoretischen Auftrennung haften. Durch die Zugabe von gefärbten Proteingrößenmarkern lässt sich die ungefähre Lokalisation des Proteins feststellen und die Banden können nach gesuchter Größe zugeschnitten werden.

In einem weiteren Schritt folgt die Zugabe von sogenannten primären Antikörpern (mono- oder polyklonal), welche sich spezifisch am gesuchten Protein binden.

Unspezifisch gebundene Antikörper können durch Waschen mit Pufferlösungen entfernt werden. Der primäre Antikörper wird mithilfe eines Farbstoff-, Enzym- oder radioaktivmarkierten sekundären Antikörpers sichtbar gemacht (in der vorliegenden Arbeit waren die Antikörper mit Peroxidase konjugiert). Der Nachweis und die Auswertung des jeweiligen Proteins erfolgt mittels einer der Markierung des sekundären Antikörpers geeigneten Imaging Systems (Lumineszenz, Farbreaktion, Autoradiographie, usw.) (Antikörper-online, 2021).

Verwendet wurden die in der Tabelle 2.5 aufgelisteten primären und sekundären Antikörper. Es wurden mindestens 3 Western Blots durchgeführt, wobei die Proben der Zellysate jeweils aus unterschiedlichen Zellkulturpassagen stammten (biologische Replikate).

Tabelle 2-5: Übersicht der eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper im Rahmen des Western Blots mit Angabe des Typs, Verdünnung, Herstellerangaben und Produktnummer.

Primärer Antikörper	Typ	Verdünnung	Hersteller, Produktnr.
SCN5A	monoclonal mouse IgM	1:500 (WB)	Abcam, Nr.: ab62388
CACNB2	monoclonal mouse IgG1	1:500 (WB)	Abcam, Nr.: ab54920
GAPDH	monoclonal mouse IgG	1:100000 (WB)	HyTest, Nr.: 5G4
Sekundärer Antikörper	Typ	Verdünnung	Hersteller
Anti-mouse IgG	polyclonal goat anti mouse IgG- peroxidase	1:2000 (WB)	Sino Biological, Nr. SSA007
Anti-mouse IgG	polyclonal goat anti mouse IgG- peroxidase	1:2000 (WB)	Sigma-Aldrich, Nr.: A3682

Das genauere Versuchsprotokoll befindet sich im Anhang unter 7.1.3.

2.9.2 Densitometrische Auswertung und Datenanalyse

Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden erfolgte mittels ImageJ-Software (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Es wurde hierbei jeweils die Intensität der Proteinbanden von SCN5A und CACNB2 mit der Intensität von GAPDH normalisiert. Die Berechnung wurde mit Excel durchgeführt. Im Anschluss wurden die normalisierten Intensitätswerte der gesuchten Proteine mithilfe des t-Tests in SigmaPlot ausgewertet und auf signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellreihen geprüft. Außerdem wurde von den normalisierten Werten der Mittelwert, die Standardabweichung sowie der Standardfehler des Mittelwertes mit SigmaPlot berechnet und zur Veranschaulichung Graphen erstellt.

2.10 Elektrophysiologische Charakterisierung

Die elektrophysiologische Charakterisierung der BrS-hiPSC-CMs und die vergleichende Betrachtung der Healthy- und Corrected-hiPSC-CMs soll mithilfe verschiedener standardisierter Protokolle der Patch-Clamp-Technik stattfinden.

Interessant sind hierbei die Eigenschaften des Aktionspotentials, die Ionenkanalströme und die Kinetik des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals I_{Ca-L} sowie die spontanen Calcium-Transienten.

Die genutzten Protokolle zur Aufzeichnung und Auswertung der jeweiligen Ströme finden sich in den Arbeiten von El-Battrawy et al. (2016), (2018) und (2018).

Vor Beginn der eigentlichen Patch-Clamp-Messungen steht die Zelldifferenzierung und -kultivierung (2.6), Zellvorbereitung (2.10.1) und Zellvereinzelung (2.10.2).

2.10.1 Zellvorbereitung für Patch-Clamp-Messungen

Vor der Durchführung einer Patch-Clamp-Messung steht eine Reihe von Vorbereitungen. Als erstes werden Glasschälchen mit Deckel mit 0,5ml Matrigel pro Kammer beschichtet und es wird der gleichen Methode wie bereits im Anhang unter 7.1.1.1 beschrieben gefolgt.

Für die Patch-Clamp-Messung in diesem Projekt wurden je nach Dichte des Wachstums der Kardiomyozyten auf den 24-Well-Platten 1-2 Wells für fünf Glasschälchen benötigt.

2.10.2 Zellvereinzelung für Patch-Clamp-Messungen

Die Zellvereinzelung für die Patch-Clamp-Messung wurde entsprechend der im Anhang unter Abschnitt 7.1.1.2 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. Die Glasschälchen wurden hierbei mit 1-2ml des zellreichen, serumfreien Mediums befüllt. Das erfolgreiche Vereinzeln wurde lichtmikroskopisch kontrolliert.

2.10.3 Allgemeines zu den Patch-Clamp-Messungen

Die Patch-Clamp-Messungen werden als „whole-cell“-Konfiguration unter standardisierten Bedingungen bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Patchelektroden werden aus Borosilicat-Glaskapillaren mittels „DMZ-Universal Puller“ hergestellt. Diese werden mit verschiedenen vorgefilterten Lösungen gefüllt, passend zu dem jeweiligen zu messenden Ionenstrom (siehe Abschnitt 7.2.1 Tabelle 7.5). Der Widerstand der Patchelektrode liegt bei 1-2 M Ω . Im Folgenden werden die „Offset“-Potentiale der Patchelektrode genullt und die gläserne Elektrodenspitze, die einer Pipettenspitze ähnelt, an die Zellmembran des Kardiomyozyten unter mikroskopischer Sicht genähert. Bei Kontakt mit der Membran saugt sich die Elektrodenspitze unter negativem Druck an die Zellmembran. Hierbei wird ein sogenannter Giga-Seal erzeugt, welches sich durch einen hohen (im Giga-Ohm Bereich befindliche)

Abdichtungswiderstand zwischen Elektrodenspitze und Zellmembran des Kardiomyozyten bildet. Der Giga-Seal dient der Verminderung des Hintergrundrauschens und macht die Aufzeichnungen der Ionenströme im piko-Ampere Bereich möglich. Danach wird unter mikroskopischer Sichtkontrolle und erneut angelegtem negativen Druck die Zellmembran durchstoßen und eine „whole-cell“-Konfiguration etabliert. Das Messgerät kalkuliert automatisch die Membrankapazität (CM).

Die Aufzeichnung der Signale findet bei 10kHz statt und wird gezielt bei 2kHz gefiltert und mit einem Mikroelektrodenverstärker Axon 200B verstärkt. Die Hardware Digidata 1440A Digitizer-Hardware digitalisiert die Signale, die mithilfe der Software pClamp/ClampFit aufgezeichnet werden.

Bis zum Beginn der Signalaufzeichnungen wird 5 Minuten gewartet, was dazu dient, dass die Ionenströme nach Durchstechen der Zellmembran ein „steady-state“ erreicht haben und systematische Messfehler vermieden werden.

Die zuvor bereits erwähnte Ionenstrommessspezifische Lösung (Tabelle 7.5 im Anhang), mit der die Patchelektrode gefüllt ist, diffundiert über die durchstochene Zellmembran des Kardiomyozyten in das Zellinnere, hat zur Folge, dass sich die Ionenkonzentration des Zytoplasmas der Ionenkonzentration der jeweiligen Lösung anpasst. Gemeinsam mit einer bekannten Zusammensetzung der extrazellulären Lösung ist dies die Voraussetzung zur Messung spezifischer Ionenströme (Hamill et al., 1981).

2.10.4 Messtechnik des Aktionspotentials

Ausgehend von einem künstlich erzeugten Potential von -80mV werden, um Aktionspotentiale auszulösen, Stromimpulse von 2 ms und 1 nA bei verschiedenen Frequenzen abgegeben. Von Interesse ist hierbei die maximale Depolarisationsgeschwindigkeit (maximal depolarization velocity, V_{max}), die Aktionspotentialamplitude (APA), Aktionspotentialdauer bei 50% Repolarisation (APD 50) und Aktionspotentialdauer bei 90% Repolarisation (APD 90) sowie das Ruhepotential (RP).

2.10.5 Messtechnik des I_{Ca-L}

Der L-Typ Calciumkanalstrom I_{CaL} wird ausgehend von einem künstlich erzeugten Haltepotential von -80mV gemessen. Durch 500ms lange depolarisierende Stromimpulse von -80mV bis +40mV (aufsteigend in 5mV-Schritten) werden so genannte Messimpulse ausgelöst, welchen ein 1s lang dauernder, depolarisierender Konditionierungsimpuls von -40mV vorangeht. Dieser inaktiviert die spannungsabhängigen Natriumkanäle und macht damit ein selektives Messen des spannungsabhängigen Calciumkanalstroms möglich. Die aufgezeichneten Ströme werden zur Membrankapazität normalisiert.

Gemessen werden hierbei anhand unterschiedlicher standardisierter Protokolle die Strom-Spannungs-Kurven, die sogenannten IV-Kurven, die „Peak“ I_{Ca} -Kurven sowie die Kanalkinetik (Aktivierung, Inaktivierung und Recovery).

2.10.6 Auswertung der Patch-Clamp-Messergebnisse

Jede einzeln aufgezeichnete Ionenkanalstromkurve und die dazugehörigen Daten, gemessen an den verschiedenen hiPSC-CMs, werden zunächst mithilfe der Software ClampFit gespeichert und gesondert ausgewertet und danach mittels der Software SigmaPlot 11.0 weiterführend analysiert.

Die Analyse der Daten über SigmaPlot 11.0 ist ein mehrstufiger Arbeitsprozess. Zunächst werden die mittels ClampFit gewonnenen Daten auf die Membrankapazität normiert. Im Folgenden bezieht sich die Beschreibung des Prozesses auf die erhobenen Daten einzelner Zellen, welche erst im Anschluss gemeinsam betrachtet werden.

Zur Gewinnung der Strom-Spannungs-(IV)-Beziehung wird die Stromdichte gegen die Spannung aufgetragen.

Zur Analyse der Aktivierungskinetik der verschiedenen Ionenströme wird die Membranleitfähigkeit (G_m) gegen die Spannung aufgetragen. Die G_m wird mithilfe der Formel: $G_m = \frac{I}{E_m - E_{rey}}$ berechnet, wobei I den makroskopischen Strom angibt, E_m das Membranpotential bei dem gemessen wurde und E_{rey} das Umkehrpotential, welches aus der IV-Beziehung gewonnen wird. Die G_m -Spannungs-Beziehung ergibt graphisch einen sigmoidalen Kurvenverlauf.

Bei der Analyse der Inaktivierungskinetik wird der relative Strom (I_m/I_{max}) in Beziehung zur gemessenen Spannung gesetzt. Der relative Strom wird berechnet durch Identifizierung des größten Stromwertes (I_{max}) und die Normierung der übrigen Ströme (I_m) auf den größten Wert. Wie schon bei der Aktivierungskinetik sollte sich bei korrekt aufgezeichnetem Strom die relative Strom-Spannungs-Beziehung, auch Steady-State-Inaktivierungskurve genannt, grafisch dargestellt, einen sigmoidalen Kurvenverlauf ergeben.

Zur Ermittlung der Spannung ($V_{0.5}$), bei welcher die Hälfte (50%) der Kanäle geöffnet (aktiviert) bzw. geschlossen (inaktiviert) sind, wird die Boltzmann-Verteilung angewendet.

Zur Analyse der Erholung (Recovery) der Kanäle aus der Inaktivierung wurden die Daten aus den gewonnenen Kurven nach der Doppelpulsstimulation ermittelt. Hierbei wird der Peak der zweiten Depolarisation auf den Wert der ersten Depolarisation normiert und zum Zeitintervall t (in ms) in Beziehung gesetzt. Mithilfe der Monoexponentialfunktion 1. Ordnung kann daraus die Zeitkonstante τ (th) der Recovery (Erholung) berechnet werden.

2.10.7 Messtechnik des Calcium-Transienten

Zur Aufzeichnung der Schlagfrequenz der hiPSC-CMs und dem Nachweis des Auftretens von Arrhythmie-ähnlichen Ereignissen, wie DAD (delayed after depolarization) und EAD (early after depolarization) wird der transiente Calciumanstieg im Zytoplasma des Kardiomyozyten gemessen. Dieser entsteht, ausgelöst durch ein Aktionspotential durch eine Calcium-induzierte Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum bei jeder Kontraktion. Die Analyse wird mittels

Fluoreszenz- und Patch-Clamp-Technik durchgeführt und in ClampFit und SigmaPlot ausgewertet.

Interessant ist hierbei die Häufigkeit des Auftretens von arrhythmischen Ereignissen und die Intervallvariabilität sowie die Beeinflussung der arrhythmischen Ereignisse durch die Gabe von Medikamenten.

Die Darreichung verschiedener Medikamente (Ajmalin, Bisoprolol und Quinidin) zur Effektprüfung an hiPSC-CM wurde unter Zuhilfenahme einer Perfusionspipette durchgeführt. Die Auswahl der jeweiligen getesteten Konzentrationen beruht auf vorab durchgeführten Experimenten und Erfahrungen aus früheren Projekten in unserem Labor. Ajmalin (MP Biomedicals) wurde in DMSO gelöst und wurde als Stammlösungskonzentration von 30 mM verwendet. Bisoprolol wurde in sterilem Wasser als Stammlösungskonzentration von 3 mM gelöst. Quinidin (Sigma) wurde ebenfalls in sterilem Wasser als 10 mM Stammlösung gelöst.

Da erkrankte Brugada Syndrom Patienten bekanntermaßen vermehrt Arrhythmien in Ruhephasen und im Schlaf erleiden (Hedley et al., 2009) (Priori and Blomstrom-Lundqvist, 2015), wird eine Stimulation mit Carbachol, einem muskarinen Rezeptor-Agonisten, bei spontan rhythmisch kontrahierenden hiPSC-CMs durchgeführt. Carbachol wurde in sterilem Wasser als Stammlösungskonzentration von 10 mM gelöst und als Endkonzentration von 10 μ M verwendet.

Weil die Gabe von Ajmalin, einem Natriumkanalblocker, in der Diagnostik des BrS zur Demaskierung des für das BrS typischen Elektrokardiogramms genutzt wird, ist der Einfluss hiervon auf die hiPSC-CMs von hohem Interesse. Die Stimulation erfolgt bei spontan rhythmisch kontrahierenden hiPSC-CMs.

Des Weiteren werden die hiPSC-CMs mit dem Betablocker Bisoprolol in verschiedenen Dosierungen behandelt, da es bei unserem BrS-Patienten, wie bereits im Abschnitt 2.2 beschrieben, unter niedrig dosierter Bisoprolol-Therapie zu keinem weiteren Auftreten von Kammerflimmern kam. Die Gabe erfolgt bei spontan arrhythmisch kontrahierenden hiPSC-CMs.

Betont werden sollte, dass die Gabe von Betablockern bei BrS-Patienten kontraindiziert ist (Postema et al. 2009).

Außerdem soll eine Stimulation von spontan arrhythmisch kontrahierenden hiPSC-CMs mit Chinidin (im englischen Quinidin genannt) erfolgen. Bei Quinidin handelt es sich um ein Antiarrhythmikum der Klasse Ia, mit blockierender Wirkung auf I_{to} und I_{Kr} . Es wurde gezeigt, dass es die Induktion von Kammerflimmern unterbindet und spontane ventrikuläre Arrhythmien unterdrücken kann (Priori et al. 2013). Quinidin ist ein klinisch häufig eingesetztes Antiarrhythmikum und wird, obzwar Off-label, für Patienten mit BrS bei einem elektrischen Sturm, bei Kontraindikation zur Implantation des ICDs oder bei registrierten adäquaten Defibrillationen des ICDs empfohlen (Priori et al. 2013).

2.10.8 Statistische Auswertung der Patch-Clamp-Messungen

Die statistische Auswertung der durch Patch-Clamp-Technik erhobenen Daten findet mithilfe der Software InStat© und SigmaPlot 11.0 statt. Dabei wird, wenn nicht anders beschrieben, der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) berechnet. Die Normalverteilung

der Daten wird mittels des Shapiro-Wilk Tests überprüft. Die Analyse von normalverteilten Daten mit 2 oder mehr Gruppen wird mithilfe des one-way ANOVAs und Holm-Sidak Post-Test durchgeführt.

Für nicht normalverteilte Daten wird bei 2 Gruppen der Mann-Whitney-U-Test angewendet oder durch Zuhilfenahme des Kruskal-Wallis-Tests im Rahmen einer Varianzanalyse die Rangplatzsummen ermittelt. Als Post-Test wurde der Dunn-Test (>2 Gruppen) durchgeführt.

Zum Vergleich der Daten vor und nach Medikamentenstimulation wird der abhängige *t*-Test (Paired *t*-test) angewendet. Der Vergleich zweier kategorischer Variablen wird mithilfe des exakten Tests nach Fisher durchgeführt. Dabei wird der Wert von $p < 0.05$ (two-tailed) als ein signifikanter Unterschied angesehen. Der Buchstabe „n“ oder „n=“ beschreibt die Zellzahl untersuchter hiPSC-CMs.

3 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in: Zhong, R., Schimanski, T., Zhang, F., Lan, H., Hohn, A., Xu, Q., Huang, M., Liao, Z., Qiao, L., Yang, Z., *et al.* (2022). A Preclinical Study on Brugada Syndrome with a CACNB2 Variant Using Human Cardiomyocytes from Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci* 23

3.1 Charakterisierung von patientenspezifischen hiPSCs und hiPSC-CMs

Die Charakterisierung der patientenspezifischen hiPSC und hiPSC-CMs ergab die in den folgenden Unterpunkten beschriebenen Ergebnisse.

Dabei wurden jeweils zwei der patientenspezifischen induzierten pluripotenten Stammzellklone (BrS-hiPSC) und zwei der CRISPR/ Cas9-korrigierten hiPSC (CRISPR-corrected-hiPSC) ausgewählt und wie in den folgenden Abschnitten beschrieben zunächst auf Pluripotenz, Reinheit, normalen Karyotyp geprüft, dann zu Kardiomyozyten differenziert und anschließend charakterisiert. Zeitgleich fand die Kultivierung der von drei gesunden Spendern stammenden hiPSCs (D1, UMGi014-B und UMGi124-A, Healthy-hiPSC) statt. Nach der Differenzierung zu Kardiomyozyten wurden die Ergebnisse als gesunde Kontrollgruppe (Healthy-hiPSC-CMs; Healthy) zusammengefasst.

Fortan werden die CMs der drei Gruppen im Text wie folgt bezeichnet und in den Graphiken des Ergebnisteils abgekürzt bezeichnet:

1. „BrS-hiPSC-CMs“ abgekürzt als „BrS“
2. „Healthy-hiPSC-CMs“ abgekürzt als „Healthy“
3. „Corrected-hiPSC-CMs“ abgekürzt als „Corrected“ oder „Isogenic“

3.1.1 Pluripotenz-Nachweis der hiPSCs

Der Charakterisierung vorangehend, wurden im Rahmen des Projektes hiPSC durch den Kooperationspartner (Stammzeleinheit der Universität Göttingen) generiert. Zur Generierung wurden zunächst Fibroblasten aus einer Hautbiopsie des BrS-Patienten mit der nachgewiesenen Variante im CACNB2-Gen (c.425C>T/ p.S142F) gewonnen. Davon ausgehend wurde mittels des CRISPR/ Cas9-basierten Verfahrens die Mutation im CACNB2 Gens korrigiert (Abbildung 6A-B). An jeweils zwei Klonen der generierten hiPSC (isBrSb2.1, isBrSb2.2; isBrSb2-corr.6, isBrSb2-corr.23) wurden zum Beweis der Pluripotenz (Abbildung 6D) die Markerproteine OCT4, NANOG und TRA1-60 angefärbt und mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie dargestellt. Die Reinheit der hiPSC-Zellklonkolonien (Abbildung 6E) und das den humanen Stammzellen ähnliche Wachstumsmuster (Abbildung 6C) der hiPSC-Zellklonkolonien konnte im Labor der Kooperationspartner ebenfalls gezeigt werden.

Der Nachweis eines normalen Karyotyps (Abbildung 7) der generierten hiPSC Zelllinien des BrS-Patienten wurde mittels Karyogramm erbracht.

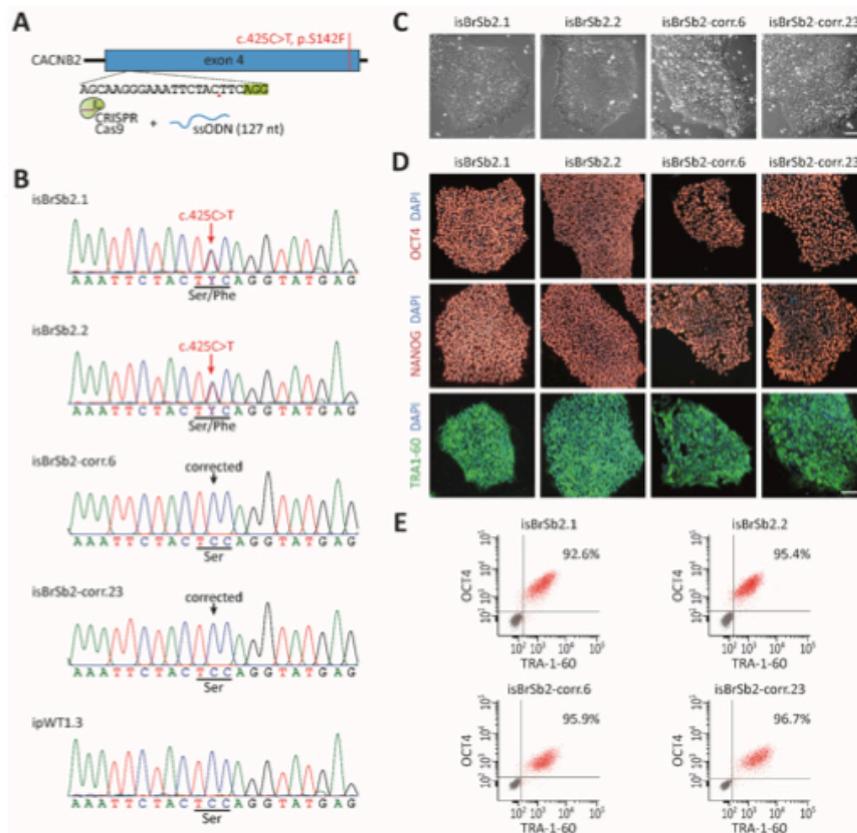
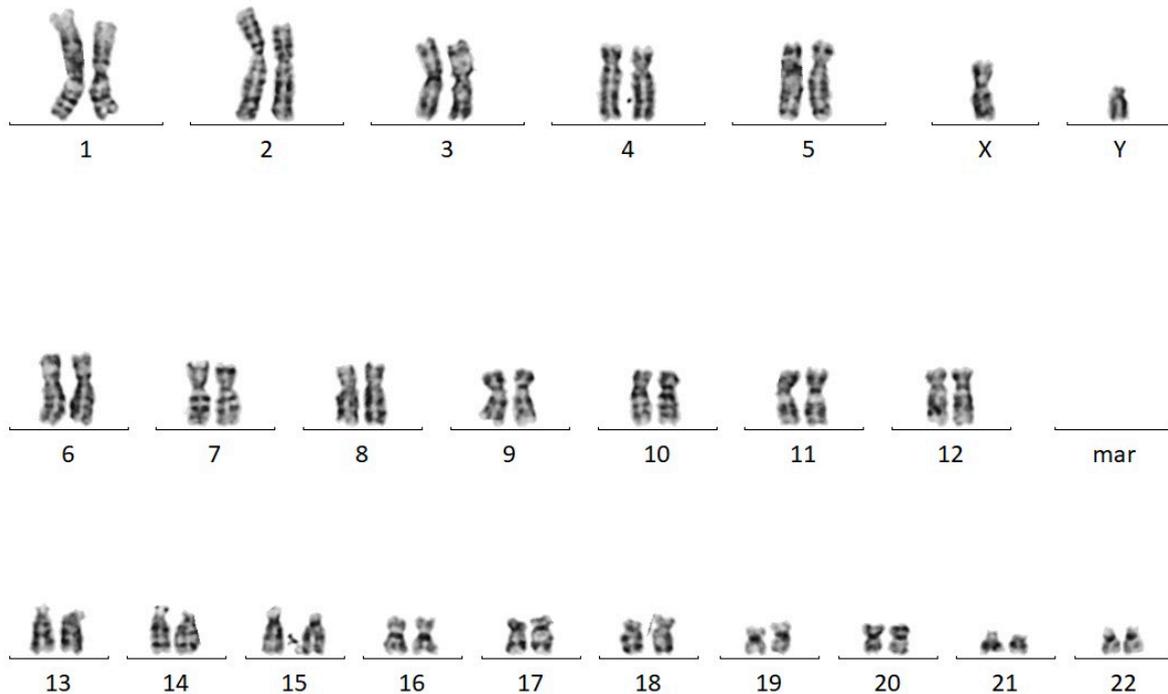


Abbildung 6: **CACNB2-Mutationskorrektur der BrS-hiPSCs durch CRISPR/ Cas9-Verfahren** (Zhong et al., 2022).

- (A) Schematische Darstellung der Mutationskorrektur am CACNB2-Gen mittels CRISPR guide-RNA, die das CACNB2-Exon 4 ansteuert und mittels Einzelstrang Oligonukleotid (single-stranded oligonucleotide, ssODN) homolog repariert wurde.
- (B) Bestätigung der Genkorrektur. Nachgewiesen mittels SANGER DNA-Gensequenzierung.
- (C) Darstellung der humanen Stammzellen ähnlichen Morphologie der Zelllinie der BrS-hiPSCs und der mutationskorrigierten-hiPSCs (CRISPR-corrected-hiPSCs, isogenic). Maßstabsanzeige entspricht 100µm.
- (D) Darstellung der mittels Immunfluoreszenz angefärbten Pluripotenzmarker OCT4, NANOG und TRA1-60 der BrS-hiPSCs und der CRISPR-corrected-hiPSCs. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mithilfe von DAPI. Maßstabsanzeige entspricht 100µm.
- (E) Die Graphik zeigt den Nachweis der Reinheit (Angabe in %) der Patienten-spezifischen- und der mutationskorrigierten hiPSC-Zelllinien. Der Nachweis wurde mittels Durchflusszytometrie der Pluripotenzmarker OCT4 und TRA1-60 erbracht. Die grauen Punkte stellen die Negativkontrollen dar.



KHBo N1 ◀ 002 ▶ ◀ A ▶ 46,XY 46

Abbildung 7: Darstellung des Karyotyps der generierten iPSC Zelllinien des BrS-Patienten.

3.1.2 Nachweis der erfolgreichen Differenzierung zu Kardiomyozyten

Nach 8-12 Tagen der Differenzierung der hiPSCs zu hiPSC-CMs konnten spontan kontrahierende Zellen mit bloßem Auge und unter dem Mikroskop gesehen werden. In den Experimenten zur Charakterisierung wurden hiPSC-CMs mit einem Alter von 50 Tagen nach Beginn der Differenzierung eingesetzt.

Der Erfolg der Differenzierung wurde anhand der Morphologie (3.2.1.1), der Expression kardiomyozytenspezifischer Marker (3.2.1.2) und im Verlauf der Differenzierung abnehmender Marker der Pluripotenz (3.2.1.3) bestätigt und im folgenden Abschnitt genauer beschrieben.

3.1.2.1 Morphologie

Die Abbildung 8 zeigt exemplarisch hiPSC-CMs, wie sie für die nachfolgenden Experimente verwendet wurden. Es wurden nur Zellen eingesetzt, die spontan kontrahierende Zellcluster vorwiesen.



Abbildung 8: **Blick durch das Lichtmikroskop auf spontan kontrahierende Zellcluster von hiPSC-CMs.** 10-fache Vergrößerung. Das Bild ist als Ausschnitt einer eigenen Videoaufnahme entstanden.

3.1.2.2 Immunzytochemischer Nachweis

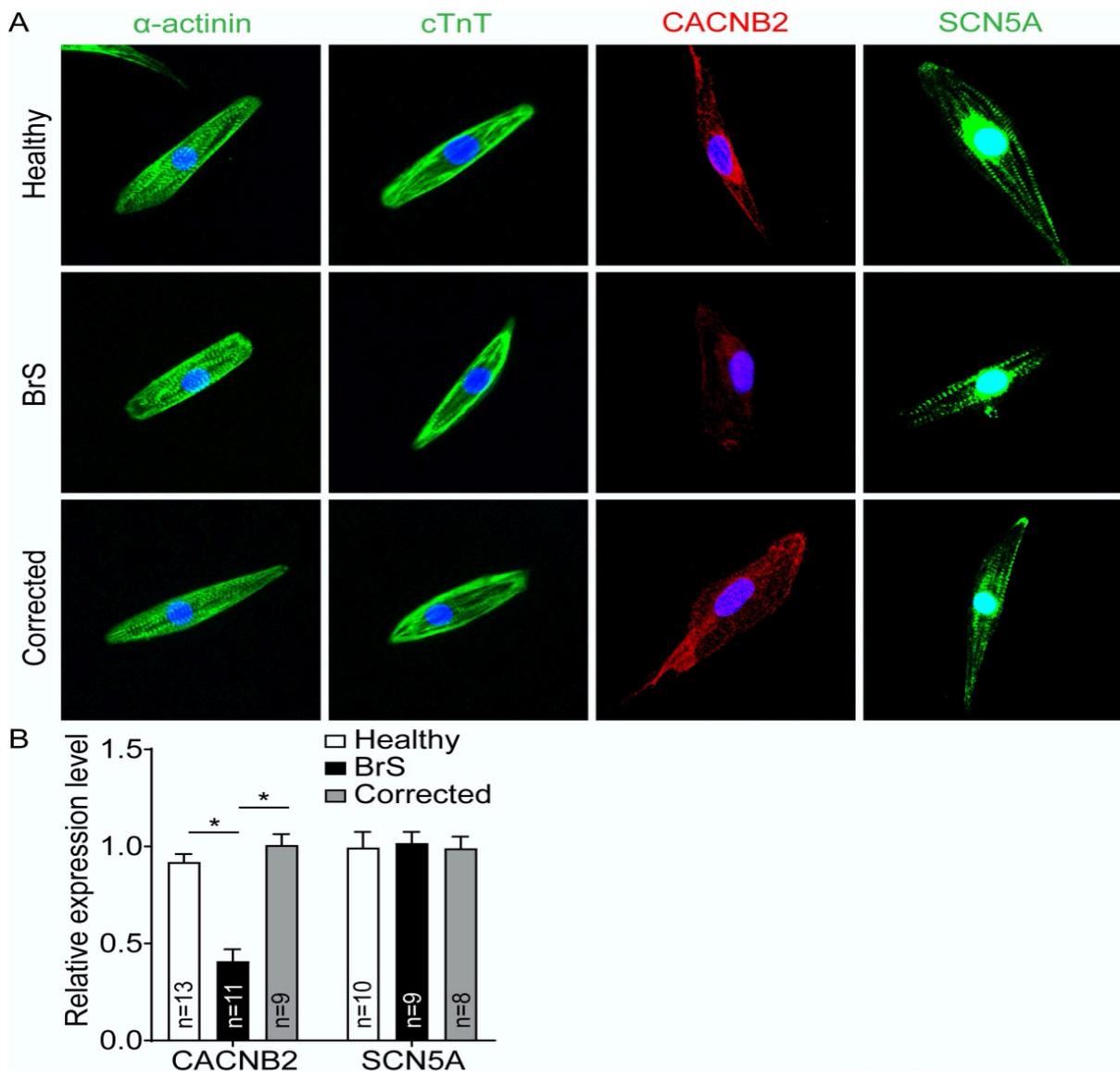


Abbildung 9: **Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz-Mikroskopie** (Zhong et al., 2022).

(A) Darstellung der angefärbten Proteine (CACNB2 und SCN5A), sowie der kardiomyozytenspezifischen Proteine (α -Actinin und kardialem Troponin T) in den hiPSC-CMs von gesunden Spendern (Healthy), dem BrS-Patienten (BrS) und den CRISPR/ Cas9-corrected-BrS Zellen (Corrected).

(B) Statistische Analyse der Fluoreszenzintensität der mittels Immunfluoreszenz gefärbten Proteinen (CACNB2 und SCN5A). Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die gezeigten n=Werte beschreiben die Anzahl untersuchter Zellen. Signifikante Unterschiede ($*p < 0.05$) wurden mittels one-way ANOVA mit Holm-Sidak Post-Test ermittelt und sind mit einem * markiert.

Die Abbildung 9A zeigt ein repräsentatives Bild der mittels Immunfluoreszenz angefärbten Kardiomyozyten (hiPSC-CM) an Tag 50 nach dem Start der Differenzierung. Es konnten in BrS-, in den Healthy-hiPSC-CMs, sowie in der korrigierten Zelllinie (Corrected) alle getesteten Proteine (kardiomyozytenspezifisch α -Actinin und cTnT, sowie CACNB2 und SCN5a) dargestellt werden. Die Zellen sind in 20-facher Vergrößerung fotografiert.

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde jeweils an verschiedenen Zellkulturpassagen wiederholt (n=3). Bei jeder Versuchsreihe befanden sich einige hundert vereinzelte hiPSC-CMs auf dem Objektträger. Die Abbildung 9A stellt lediglich repräsentative Bildausschnitte aus einem der Versuche dar. Des Weiteren stellte sich die Proteinexpression der beta-2-Untereinheit des LTCC „CACNB2“ der BrS-hiPSC-CMs in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie, berechnet über die korrigierte totale Zellfluoreszenz (corrected total cell fluorescence, CTCF) und dargestellt in der Abbildung 9B, als signifikant reduziert im Vergleich zu den Healthy-hiPSC-CMs (Healthy) und Corrected-hiPSC-CMs (Corrected) heraus. Die alpha-Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals „SCN5A“ zeigte sich nicht reduziert.

3.1.2.3 Kardiomyozytenspezifische mRNA-Expression im Verlauf der Differenzierung

Eine weitere Bestätigung der erfolgreichen Differenzierung wurde mithilfe des im Verlauf der Differenzierung (bis Tag 35) abnehmenden mRNA-Expressionslevels des Pluripotenzmarkers „Pituitary-specific positive transcription factor 1“ (POUF1), in Abbildung 10C gezeigt, und ansteigenden kardiomyozytenspezifischen Markern, Troponin T (TNNT2) und Troponin I (TNNI3) (in den Abbildungen 10A-B), erbracht. Die Bestimmung der mRNA-Expression erfolgte durch q-RT-PCR und die Analyse mittels „comparative C_T-method“. Die mRNA-Expressionslevel wurden an verschiedenen Tagen (days) im Verlauf der Differenzierung (day 0, 10, 20, 25, 35) bei den hiPSC-CMs des BrS-Patienten (BrS) und den hiPSC-CMs von gesunden Spendern (Healthy) gemessen. Die in der Abbildung gezeigten Ergebnisse berechnen sich aus der Anzahl n biologischer Replikate der Zellreihe (n=3); jedes der 3 biologischen Replikate wurde zweimal gemessen (=2 technische Replikate) und davon der Mittelwert genommen. Jedes biologische Replikat entsprach also einem Mittelwert aus 2 Messungen (=technische Replikate) derselben Probe. n(BrS) = 3 biologische Replikate; n(Healthy) = 3 biologische Replikate.

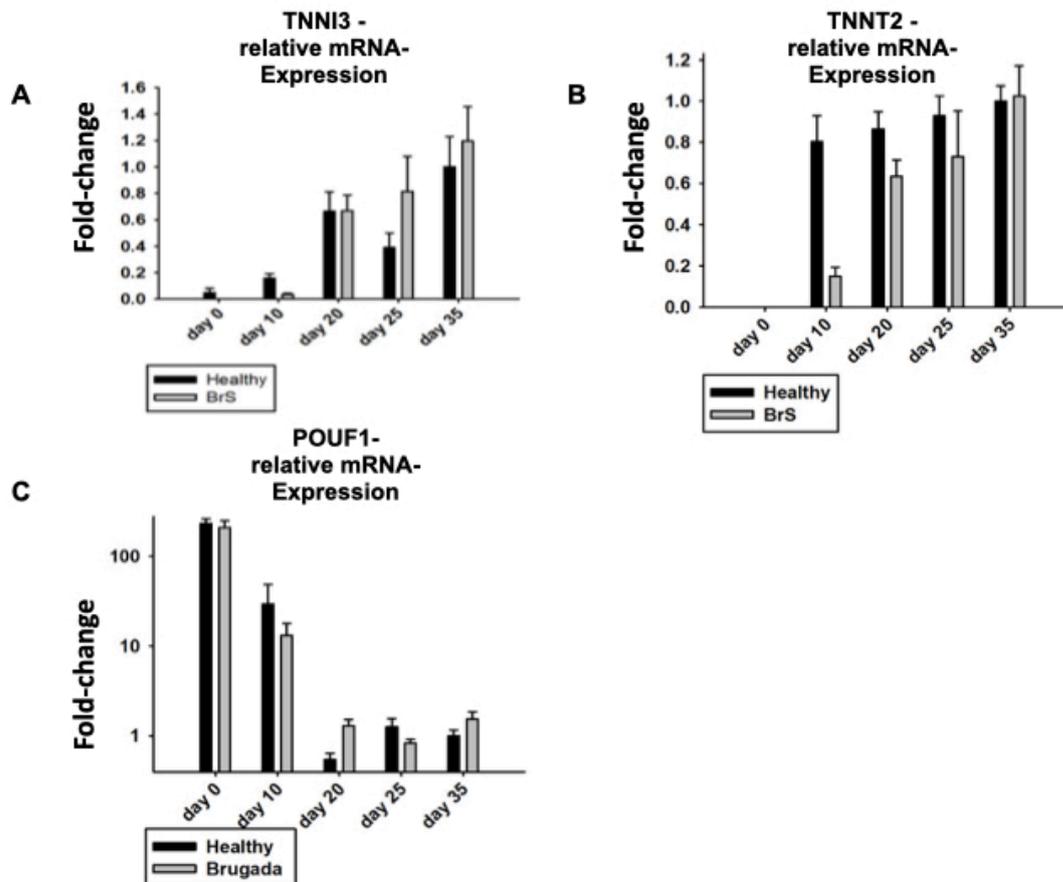


Abbildung 10: **Relative mRNA-Expression des Pluripotenzmarkers und der kardialen Marker in den hiPSC-CMs im Verlauf der Differenzierung** (Zhong et al., 2022). Die Bestimmung der relativen mRNA-Expression erfolgte mittels q-RT-PCR und die Analyse mittels „comparative C_T -method“ mit GAPDH als internes Kontrollgen. Ermittelt wurde hierbei die relative Genexpression der kardiomyozytenspezifischen Proteine Troponin T (TNNT2) und Troponin I (TNNI3) und dem Pluripotenzmarkerprotein „Pituitary-Specific Positive Transcription Factor 1“ (POUF1). Die mRNA-Expressionslevel wurden an verschiedenen Tagen (days) im Verlauf der Differenzierung (day 0, 10, 20, 25, 35) bei den BrS-hiPSC-CMs des BrS-Patienten (BrS) und den Healthy-hiPSC-CMs (Healthy) gemessen. Der „Fold-change“ beschreibt die relative Genexpression, wobei die mRNA Expression der Healthy-hiPSC-CMs am Tag 35 dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Angegeben ist der Mittelwert und die SD berechnet aus 3 biologischen Replikaten.

- (A) Darstellung der mRNA-Expressionslevel des kardiomyozytenspezifischen Proteins Troponin T (TNNT3).
- (B) Darstellung der mRNA-Expressionslevel des kardiomyozytenspezifischen Proteins Troponin I (TNNI2)
- (C) Darstellung der mRNA-Expressionslevel des Pluripotenzmarkerproteins POUF1.

3.1.3 mRNA-Expressionslevel der Ionenkanäle in den hiPSC-CMs

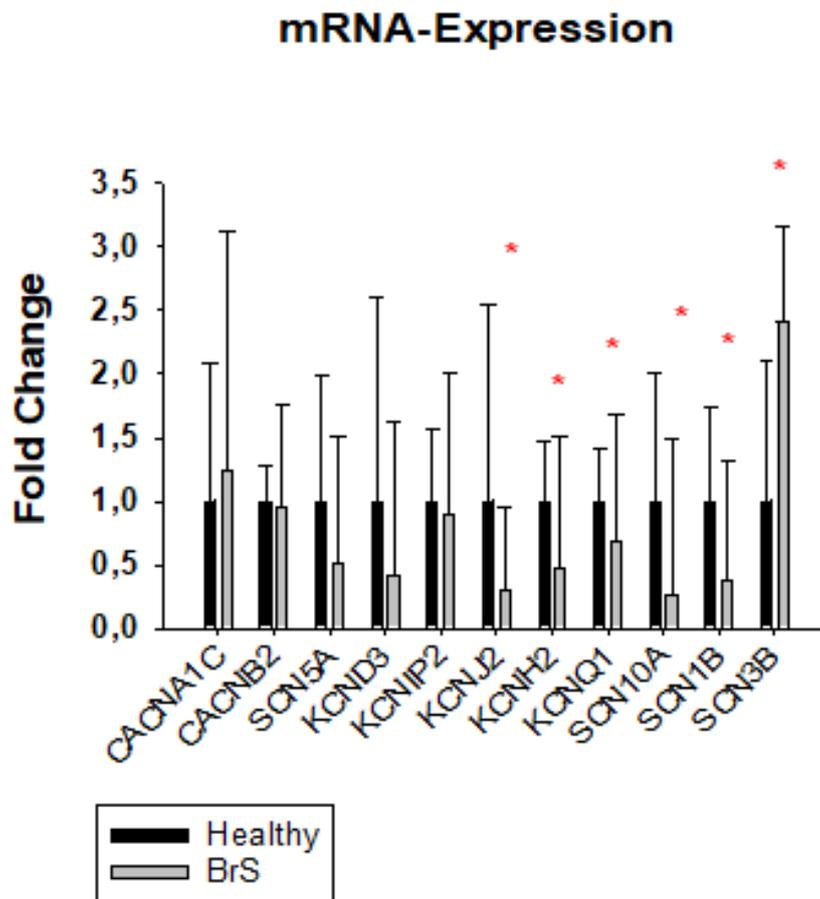


Abbildung 11: **Die relative mRNA-Expression der Gene der Ionenkanäle in den hiPSC-CMs** (Zhong et al., 2022). Die Bestimmung der mRNA-Expression erfolgte mittels q-RT-PCR und die Analyse mittels „comparative C_T-method“ mit GAPDH als internes Kontrollgen. Ermittelt wurde hierbei die relative Genexpression der Untereinheiten des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals (CACNA1C, CACNB2), des spannungsabhängigen Natriumkanals (SCN5A, SCN10A, SCN1B and SCN3B), sowie des Kaliumkanals (KCHIP2, KCNJ2, KCNH2 und KCNQ1). Die mRNA-Expressionslevel wurden verglichen zwischen den BrS-hiPSC-CMs, den Corrected-hiPSC-CMs (Isogenic) und den Healthy-hiPSC-CMs (Healthy) in einem Alter von 35 Tagen. Der „Fold-change“ beschreibt die relative Genexpression, wobei die mRNA Expression der Healthy-hiPSC-CMs jeweils mit dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. Signifikante Unterschiede (* $p < 0.05$) wurden im Vergleich zu den Healthy-hiPSC-CMs (Healthy) im t-Test für zwei Gruppen ermittelt und sind mit einem * markiert.

In den BrS-hiPSC-CMs zeigte sich die mRNA-Expression der Gene KCNJ2, KCNH2 und KCNQ1 sowie SCN10A und SCN1B signifikant reduziert. Die mRNA-Expression des Gens SCN3B war signifikant erhöht (Abbildung 11). Die mRNA-Expression wird als relative mRNA-Expression dargestellt und ist normalisiert mit der Expression des Proteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase „GAPDH“ als konstante Bezugsgröße („Housekeeping-Gen“). Es wurde die mRNA-Expression an Tag 50 der Differenzierung zwischen den BrS-hiPSC-CMs (BrS), den Healthy-hiPSC-CMs (Healthy) und Corrected-hiPSC-CMs (Isogenic) verglichen. Die y-Achse des Graphen beschreibt die „Fold Change“, welche die relative Expression der mRNA der BrS-hiPSC-CMs und Corrected-hiPSC-CMs im Vergleich zu den Healthy-hiPSC-CMs anzeigt. Die mRNA-Expression der Healthy-hiPSC-CMs wurde hierfür auf den Wert 1 gesetzt. Die in der Abbildung gezeigten Ergebnisse basieren auf der Anzahl n

biologischer Replikate der Zellreihe (jedes der 3 biologischen Replikate basiert auf dem Mittelwert von 2 technischen Replikaten).

3.1.4 Proteinexpression in den BrS-hiPSC-CMs

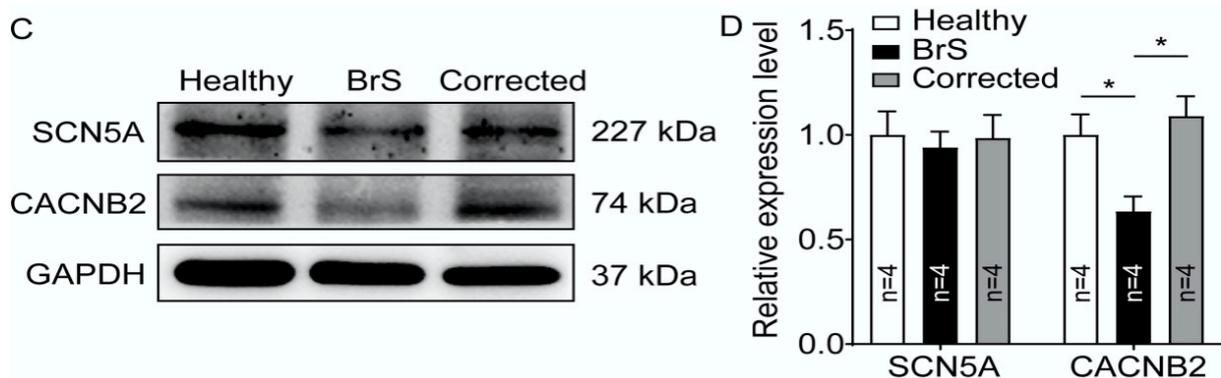


Abbildung 12: **Reduzierte CACNB2-Proteinexpression in den BrS-hiPSC-CMs** (Zhong et al., 2022). Die Analyse des Proteinexpressionlevels des CACNB2-Proteins, des SCN5A-Proteins sowie des „Housekeeping“-Proteins GAPDH erfolgte in den Healthy-hiPSC-CMs (Healthy), BrS-hiPSC-CMs (BrS) und den Corrected-hiPSC-CMs (Corrected) mittels Western Blot.

(C) Repräsentative Beispielbilder der Proteinbanden im Western Blot der Zelllysate der hiPSC-CMs mit Darstellung der Proteine CACNB2 und SCN5a, sowie dem kardiomyozytenspezifischen Kontrollprotein GAPDH. Die Größe des jeweiligen Proteins ist in Kilodalton „kDa“ angegeben.

(D) Statistische Analyse des relativen Expressionslevels der Proteine CACNB2 und SC5a der Western Blot-Untersuchungen. Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die gezeigten n=Werte beschreiben die Anzahl der Experimente. Signifikante Unterschiede ($*p < 0.05$) wurden mittels one-way ANOVA mit Holm-Sidak Post-Test ermittelt und sind mit einem * markiert.

Die Abbildung 12C zeigt exemplarisch die nachgewiesene Proteinexpression im Western Blot der alpha-Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals SCN5A, der beta-2-Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals CACNB2 sowie des „Housekeeping“-Proteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase GAPDH. Abgebildet sind exemplarisch die Proteinbanden der Zelllysate der Healthy-hiPSC-CMs (Healthy), der BrS-hiPSC-CMs (BrS) sowie von den Corrected-hiPSC-CMs (Corrected). Hierbei zeigt sich optisch (Abbildung 12C) sowie nach densitometrischer Auswertung der relativen Expression mithilfe der Software ImageJ (Abbildung 12D) eine signifikante Reduktion der CACNB2-Proteinexpression der BrS-hiPSC-CMs im Vergleich zu den Healthy-hiPSC-CMs und Corrected-hiPSC-CMs. Die gezeigten n=Werte in Abbildung 12D, beschreiben die Anzahl der durchgeführten Western Blots, wobei die Proben der Zelllysate jeweils aus unterschiedlichen Zellkulturpassagen stammen.

3.2 Elektrophysiologische Charakterisierung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen beschrieben. Eingeleitet wird dies mit dem Vergleich der Eigenschaften des Aktionspotentials zwischen den hiPSC-CMs, gefolgt von den Eigenschaften der Ströme des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals.

Zuletzt werden die Ergebnisse der Messung des spontanen Calcium-Transients ohne und mit pharmakologischer Stimulation vorgestellt.

3.2.1 Eigenschaften des Aktionspotentials in den hiPSC-CMs

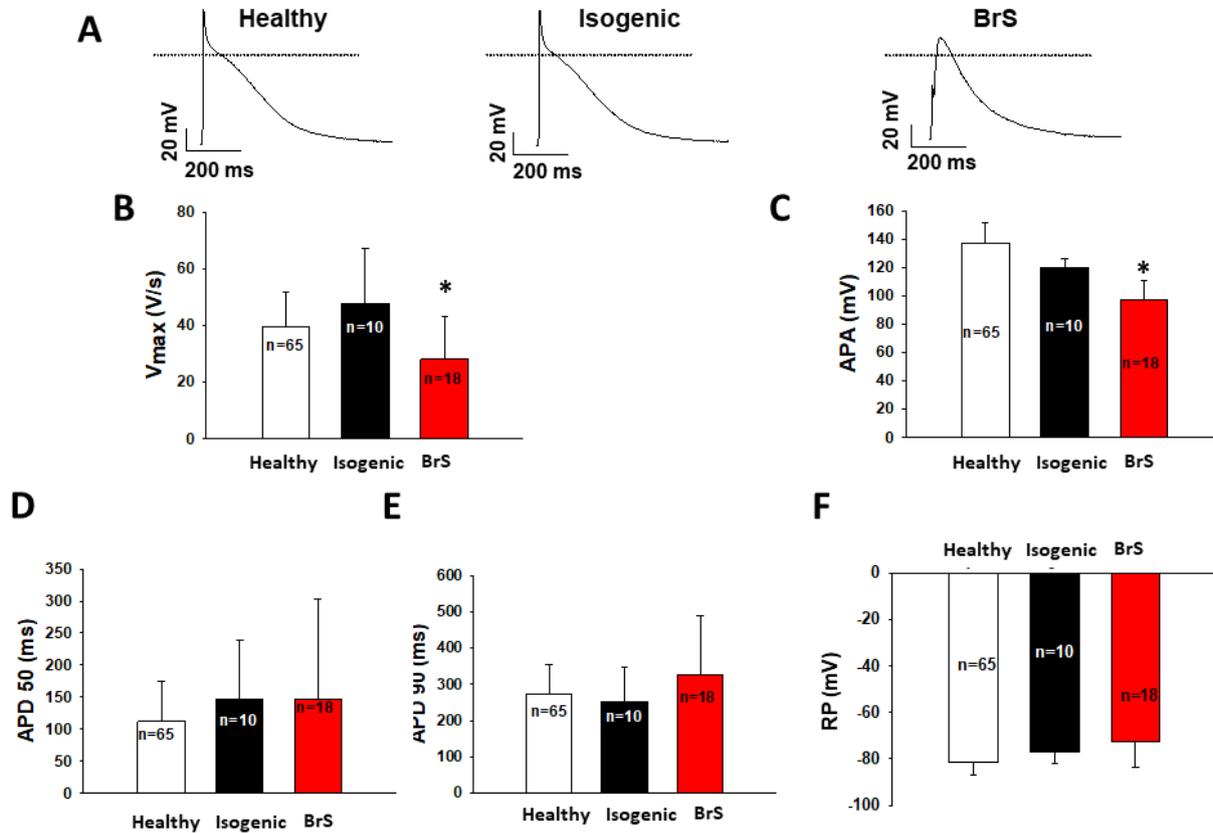


Abbildung 13: **Abnormes Aktionspotential in den BrS-hiPSC-CMs** (Zhong et al., 2022). Die Aktionspotentiale (AP), stimuliert mit 1 Hz, wurden mittels standardisierter Patch-Clamp-Technik in den BrS-hiPSC-CMs (BrS), den Healthy-hiPSC-CMs (Healthy) sowie den Corrected-hiPSC-CMs (Isogenic) gemessen. Die in (B) gezeigten n=Werte beschreiben die Anzahl untersuchter Zellen. Dies gilt ebenso für Abbildung (C-F). Signifikante Unterschiede (* $p < 0.05$) im Vergleich zu den Healthy-hiPSC-CMs wurden mittels one-way ANOVA mit Holm-Sidak Post-Test ermittelt und sind mit einem * markiert. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

- (A) Darstellung repräsentativer Aktionspotentiale in den verschiedenen Zelllinien der hiPSC-CMs bei einer Aufnahme­geschwindigkeit von 1 Hz. Die gepunktete Linie markiert die Baseline bei 0 mV.
- (B) Mittelwerte der maximalen Depolarisationsgeschwindigkeit (maximal depolarization velocity, Vmax) in den verschiedenen Zelllinien der hiPSC-CMs, angegeben in Volt pro Sekunde (V/ s).
- (C) Mittelwerte der Aktionspotentialamplitude (APA) in den verschiedenen Zelllinien der hiPSC-CMs, angegeben in mV.
- (D) Mittelwerte der Aktionspotentialdauer bei 50% Repolarisation (APD 50) in den verschiedenen Zelllinien der hiPSC-CMs, Angaben in ms bei einer Aufnahme­geschwindigkeit von 1 Hz.
- (E) Mittelwerte der Aktionspotentialdauer bei 90% Repolarisation (APD 90) in den verschiedenen Zelllinien der hiPSC-CMs bei einer Aufnahme­geschwindigkeit von 1 Hz.
- (F) Mittelwerte des Ruhepotentials (RP) in den verschiedenen Zelllinien der hiPSC-CMs, angegeben in mV bei einer Aufnahme­geschwindigkeit von 1 Hz.

Die Eigenschaften des Aktionspotentials (APs) finden sich zusammengefasst in der Abbildung 13.

Repräsentative Aktionspotentialverläufe der verschiedenen hiPSC-CMs werden in Abbildung 13A gezeigt. Hierbei zeigt sich die Amplitude des APs (APA), in mV dargestellt, in den BrS hiPSC-CMs (BrS $96.7\text{mV}\pm 3.4$, Healthy $137.4\text{mV}\pm 1.7$, Isogenic 120.2 ± 1.8) im Vergleich zur gesunden und der korrigierten Zelllinie als signifikant vermindert (Abbildung 13C). Ebenfalls als wesentlich geringer zeigt sich bei den BrS-hiPSC-CMs die durchschnittliche maximale Depolarisationsgeschwindigkeit des Aktionspotentials (V_{max}) (BrS $28.3\text{mV}\pm 1.5$, Healthy $39.3\text{mV}\pm 1.5$, Isogenic $47.6\text{mV}\pm 6.2$).

Bei den weiteren Merkmalen des APs, wie dem Ruhepotential (RP), der Aktionspotentialdauer bei 50% Repolarisation (APD50) und 90% Repolarisation (APD90), dargestellt in Abbildung 13D-F, ergeben sich keine signifikanten Veränderungen.

3.2.2 Strom und Kinetik des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals in den hiPSC-CMs

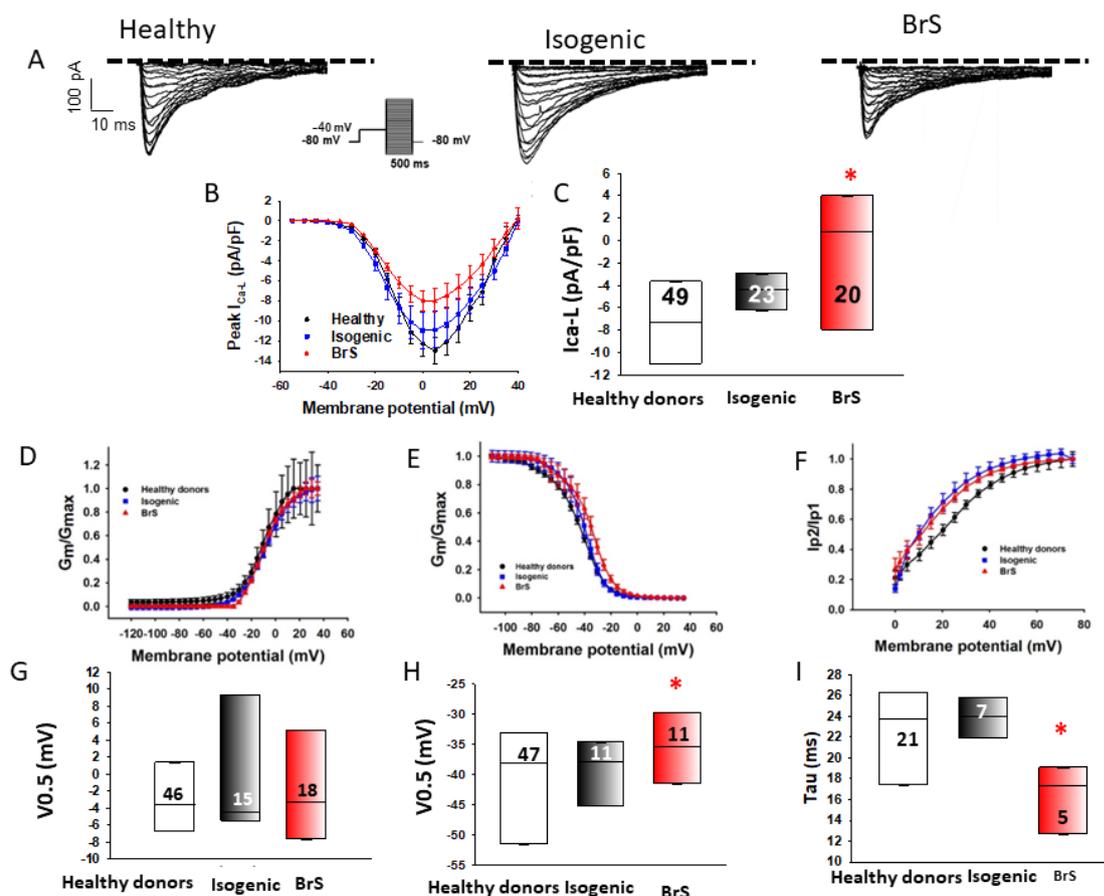


Abbildung 14: **Reduzierte Ströme des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanal in den BrS-hiPSC-CMs** (Zhong et al., 2022). Der „Peak“ Strom des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals („Peak“ $I_{\text{Ca-L}}$) wurden jeweils in den BrS-hiPSC-CMs (BrS), den Healthy-hiPSC-CMs (Healthy) sowie den Corrected-hiPSC-CMs (Isogenic) analysiert. Die in (C) gezeigten n-Werte beschreiben die Anzahl untersuchter Zellen in (B), (C) und (D). Die in (G)-(I) genannten Werte beschreiben die Anzahl der untersuchten Zellen in (E) und (F). Signifikante

Unterschiede (* $p < 0.05$) im Vergleich zu den Healthy-hiPSC-CMs wurden mittels one-way ANOVA mit Holm-Sidak Post-Test ermittelt und sind mit einem * markiert. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM)

- (A) Darstellung repräsentativer I_{Ca-L} in den verschiedenen Zelllinien der hiPSC-CMs in pA/ ms. Die kleine Graphik im linken Abbildungsbereich bildet das Messprotokoll ab: Ausgehend von einem Haltepotential von -80mV werden Messimpulse von 500ms mit -80mV bis 50mV induziert. Vor dem Messimpuls depolarisiert ein Konditionierungsimpuls die Zellen auf -40mV.
- (B) Darstellung der Strom-Spannungs-Kurven (I-V curves) des I_{Ca-L} in den verschiedenen Zelllinien der hiPSC-CMs in pA/ pF gegen das Membranpotential in mV.
- (C) Mittelwerte des „Peak“ I_{Ca-L} bei -10mV in den verschiedenen Zelllinien der hiPSC-CMs, angegeben in pA/ pF.
- (D) Darstellung der Aktivierungs-Stromkurven des I_{Ca-L} in den hiPSC-CMs der untersuchten Zelllinien. Die normierte Membranleitfähigkeit (in Gm/ Gmax) ist gegen das Membranpotential (in mV) aufgetragen.
- (E) Darstellung der Inaktivierungs-Stromkurven des I_{Ca-L} in den hiPSC-CMs der untersuchten Zelllinien. Der relative Strom (in Im/ Imax) ist gegen das Membranpotential (in mV) aufgetragen.
- (F) Darstellung der Erholungskurven aus der Inaktivierung des I_{Ca-L} (recovery curves) in den hiPSC-CMs der untersuchten Zelllinien.
- (G) Darstellung der Mittelwerte der Potentiale (in mV) bei 50% Aktivierung des I_{Ca-L} (V0.5) in den hiPSC-CMs der untersuchten Zelllinien.
- (H) Darstellung der Mittelwerte der Potentiale (in mV) bei 50% Inaktivierung des I_{Ca-L} (V0.5) in den hiPSC-CMs der untersuchten Zelllinien.
- (I) Darstellung der Mittelwerte der Zeitkonstante (Tau) (in ms) bis zur Erholung des I_{Ca-L} in den hiPSC-CMs der untersuchten Zelllinien aus der Inaktivierung des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals.

Die Graphiken (Abbildung 14) stellen die funktionellen Charakteristiken des Calciumstroms am L-Typ Calciumkanal (I_{Ca-L}) dar, gemessen an Healthy-hiPSC-CMs (Healthy), den des BrS-Patienten (BrS) sowie der korrigierten Zelllinie (Isogenic).

Der Mittelwert des Peak I_{Ca-L} zeigte sich bei den BrS-hiPSC-CMs signifikant reduziert (BrS -4.6 ± 0.5 pA/ pF) im Vergleich zu den Healthy-hiPSC-CMs (-8.6 ± 0.9 pA/ pF) und der Corrected-hiPSC-CMs (-8.7 ± 1.4 pA/ pF), dargestellt in Abbildung 14B-C.

Der Aktivierungs-Strom (Abbildung 14A, D und G) von I_{Ca-L} zeigte bei den BrS- hiPSC-CMs einen im Vergleich zu den Healthy-hiPSC-CMs (Healthy) und den Corrected-hiPSC-CMs (Isogenic) sehr ähnlichen Kurvenverlauf ohne wesentliche Unterschiede. Der Inaktivierungs-Strom (Abbildung 14E und H) jedoch zeigte sich in den Messungen der BrS-hiPSC-CMs signifikant in ein positiveres Potential verschoben und die Erholung (Recovery) aus der Inaktivierung (Abbildung 14F und I) war bei den BrS-hiPSC-CMs signifikant beschleunigt. Die Zeitkonstante Tau (in ms) ist die Zeit, bei der die Hälfte der L-Typ Calciumkanäle sich aus der Inaktivierung erholt haben.

3.2.3 Ergebnisse der Calcium-Transient-Messungen

Mittels Messung des Calcium-Transienten in der Calcium Imaging Technik an spontan kontrahierenden Kardiomyozyten hiPSC-CMs konnten die Aufzeichnung und die Analyse von arrhythmogenen Ereignissen, wozu irreguläre, getriggerte Schläge oder EAD- oder DAD-ähnliche Ereignisse zählen, erfolgen.

Die Messungen wurden an spontan schlagenden hiPSC-CMs von gesunden Spendern (Healthy), dem BrS-Patienten (BrS) und den korrigierten-BrS Zellen (Isogenic) mit und ohne Stimulation durch einzelne Pro- und Antiarrhythmika innerhalb der drei Gruppen durchgeführt und verglichen.

3.2.3.1 Aufzeichnung des spontanen Calcium-Transienten ohne Stimulation

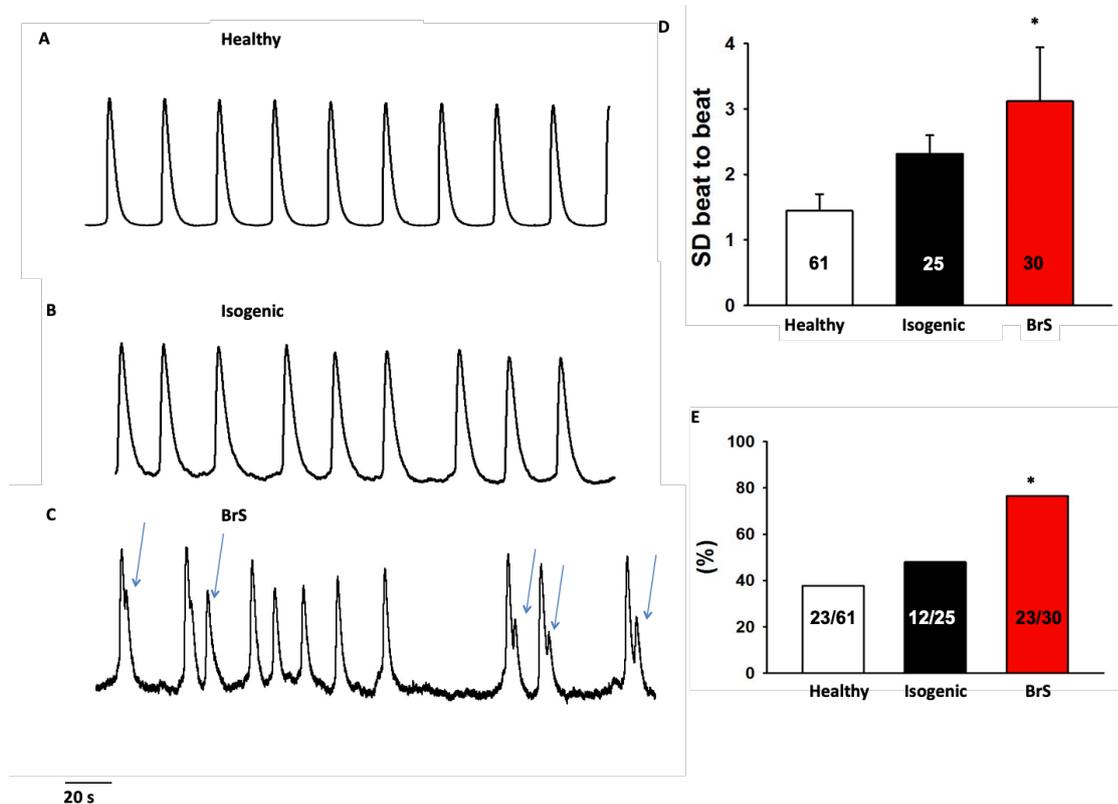


Abbildung 15: **Erhöhte Frequenz/ Schlagvariabilität und arrhythmische Events in den BrS-hiPSC-CMs** (Zhong et al., 2022).

Die spontanen Calcium-Transienten wurden in spontan kontrahierenden BrS-hiPSC-CMs (BrS), den Healthy-hiPSC-CMs (Healthy) sowie den Corrected-hiPSC-CMs (Isogenic) aufgezeichnet.

Die Schlagvariabilität, dargestellt als Standardabweichung (SD) des Zellkontraktionsintervalls und das Auftreten von arrhythmischen Ereignissen, wozu irreguläre, getriggerte Schläge, oder EAD- oder DAD-ähnliche Ereignisse zählen, wurde innerhalb der drei Gruppen verglichen. Signifikante Unterschiede ($*p < 0.05$) im Vergleich zu den Healthy-hiPSC-CMs wurden mittels one-way ANOVA (D) und mit dem exakten Test nach Fisher (E) ermittelt und mit einem * markiert.

(A-C) Repräsentative Aufzeichnungen des Calcium-Transienten von je einer Zelle der verschiedenen Zelllinien der hiPSC-CMs. Arrhythmische Ereignisse sind durch Pfeile markiert.

(D) Mittelwerte der Standardabweichung (SD) zur Bestimmung der Intervallvariabilität. Die gezeigten Werte beschreiben die Anzahl der untersuchten Zellen.

(E) Darstellung des prozentualen Anteils der Zellen, die arrhythmische Ereignisse aufweisen. Die gezeigten Werte beschreiben die Anzahl der untersuchten Zellen mit arrhythmischen Ereignissen bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Zellzahl in der jeweiligen Gruppe.

Die Aufzeichnungen des Calcium-Transienten bei den BrS-hiPSC-CMs (Abbildung 15C) wiesen in unregelmäßiger Frequenz DAD- (delayed after depolarization) und EAD- (early after depolarization) ähnliche arrhythmische Ereignisse auf. Diese zeigten sich mit einer Signifikanz von $p < 0.05$ deutlich häufiger mit 76% in 23 von 30

untersuchten BrS-hiPSC-CMs, als in den Healthy-hiPSC-CMs (37%, 23 von 61) und den Corrected-hiPSC-CMs (48%, 12 von 25). Dargestellt ist dies in der Abbildung 15E. Zudem präsentierten die BrS-hiPSC-CMs eine größere zeitliche Varianz des Kontraktionsintervalls (beat-to-beat interval time) im Vergleich zu den Kontrollgruppen, welche als Standardabweichung des zeitlichen Intervalls zwischen den Zellkontraktionen in der Abbildung 15D dargestellt ist.

3.2.3.2 Aufzeichnung des spontanen Calcium-Transienten unter pharmakologischer Stimulation

Die Stimulation mit 10 μ M Carbachol (CCh), einem muskarinergen Rezeptoragonisten, bei spontan rhythmisch kontrahierenden hiPSC-CMs ließ die arrhythmischen Ereignisse in den Kardiomyozyten des BrS-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant ansteigen (Abbildung 16A-B). Hierbei zeigten sich, dargestellt in der Abbildung 16C, die arrhythmischen Ereignisse in den BrS-hiPSC-CMs durch die CCh-Stimulation in 57% der Fälle und bei den Healthy-hiPSC-CMs in nur 14% der Fälle. Zudem erhöhte die Stimulation der Zellen mit CCh die Intervallvariabilität signifikant mehr in den BrS-hiPSC-CMs als in den Healthy-hiPSC-CMs (Abbildung 16D).

Zum besseren klinischen Verständnis der Wirkung von Pro- und Antiarrhythmika wurde der Einfluss einzelner Medikamente auf die BrS-hiPSC-CMs untersucht. Hierbei wurden Ajmalin, Bisoprolol und Quinidin ausgewählt.

Die Stimulation mit 30 μ M Ajmalin, einem Natriumkanalblocker, zeigte keinen signifikanten Anstieg arrhythmischer Ereignisse oder signifikante Unterschiede in der Varianz des Kontraktionsintervalls (Abbildung 17) im Vergleich zu den Healthy-hiPSC-CMs und den Corrected-hiPSC-CMs.

Bei den Calcium-Transient-Messungen zeigte sich in der Stimulation mit Bisoprolol (Abbildung 18) eine wesentliche prozentuale Reduktion der Auftretenswahrscheinlichkeit von arrhythmischen Ereignissen (Abbildung 18C) bei niedrigster Stimulationsdosis mit 30nM Bisoprolol. Bei höheren Dosen konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den nicht-stimulierten BrS-hiPSC-CMs gefunden werden. Zudem zeigte sich bei den BrS-hiPSC-CMs unter niedrigster Stimulationsdosis eine signifikante Reduktion der zeitlichen Varianz des Kontraktionsintervalls (Abbildung 18B) verglichen mit den BrS-hiPSC-CMs ohne Stimulation. Die Corrected-hiPSC-CMs zeigten keine signifikanten Unterschiede in der zeitlichen Varianz des Kontraktionsintervalls ohne und mit Bisoprolol-Stimulation.

Die Stimulation von spontan arrhythmisch kontrahierenden BrS-hiPSC-CMs mit 10 μ M Quinidin (Abbildung 19) zeigte bei den Messungen einen signifikanten prozentualen Rückgang der arrhythmischen Ereignisse, jedoch keine Unterschiede in der zeitlichen Varianz des Kontraktionsintervalls ohne und unter Quinidin-Stimulation (Abbildung 19C).

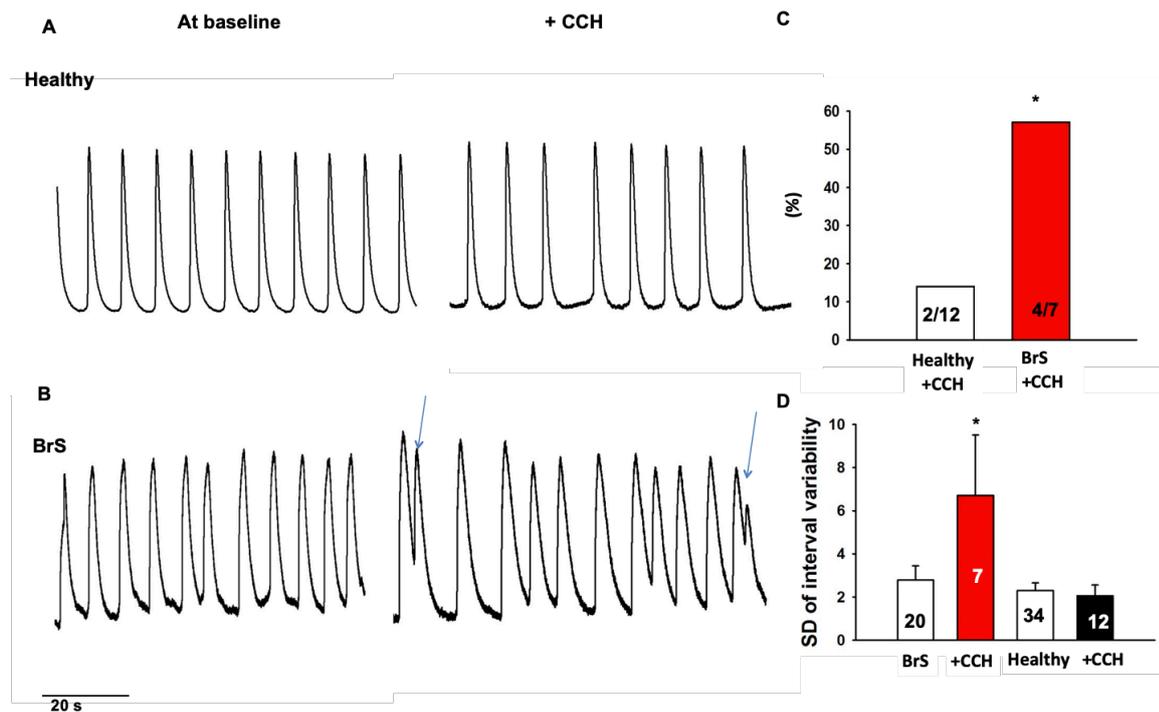


Abbildung 16: **Die Stimulation des muskarinergen Rezeptors erhöht das Zellkontraktionsintervall (beat to beat) in den BrS-hiPSC-CMs** (Zhong et al., 2022).

(A-B) Repräsentative Aufnahmen des Calcium-Transienten von je einer Zelle der hiPSC-CMs von (A) gesunden Spendern (Healthy) und (B) BrS-hiPSC-CMs (BrS) ohne (at baseline) und mit einer Gabe von 10 μ M Carbachol (+CCH). Pfeile markieren arrhythmische Ereignisse.

(C) Darstellung des prozentualen Anteils der Zellen, die unter Carbacholgabe arrhythmische Ereignisse aufweisen. Die gezeigten Werte beschreiben die Anzahl der untersuchten Zellen mit arrhythmischen Ereignissen bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Zellen in der jeweiligen Gruppe. Signifikante Unterschiede ($*p < 0.05$) im Vergleich zu den Healthy-hiPSC-CMs wurden mittels exakten Test nach Fishers ermittelt und sind mit einem * markiert.

(D) Mittelwerte der Standardabweichung des Zellkontraktionsintervalls (SD of interval variability; in Sekunden) der beiden Gruppen ohne (BrS; Healthy) und mit einer Gabe von Carbachol (+CCH). Die gezeigten Werte beschreiben die Anzahl der untersuchten Zellen. Signifikante Unterschiede ($*p < 0.05$) im Vergleich zum Ausgangswert ohne Gabe von Carbachol wurden mittels t-Test ermittelt und sind mit einem * markiert.

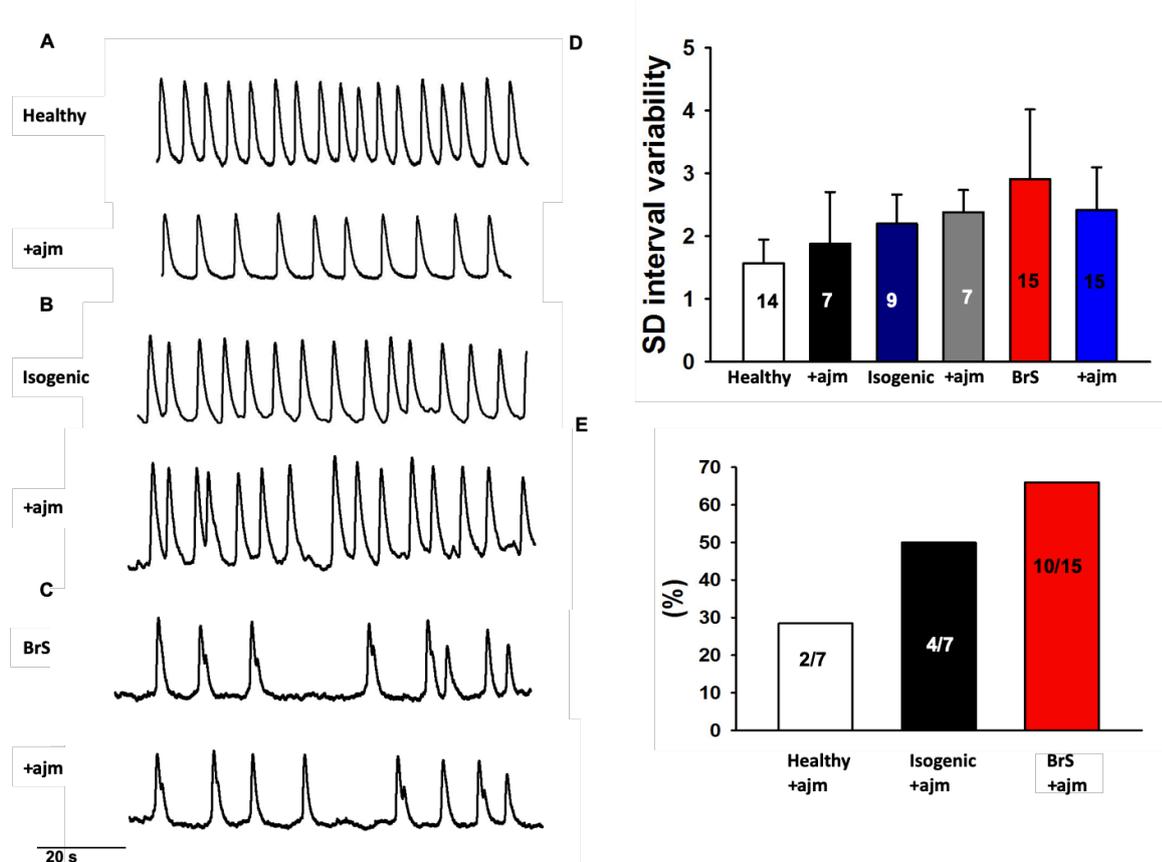


Abbildung 17: **Die Effekte der Ajmalin-Stimulation in den BrS-hiPSC-CMs** (Zhong et al., 2022). Die spontanen Calcium-Transienten wurden aufgezeichnet in spontan und regelmäßig kontrahierenden BrS-hiPSC-CMs (BrS), den Healthy-hiPSC-CMs (Healthy) sowie den Corrected-hiPSC-CMs (Isogenic) ohne und unter der Gabe von 30 μ M Ajmalin (+ajm).

(A-C) Repräsentative Aufzeichnung des Calcium-Transienten (in s) einer CM der Gruppe der BrS-hiPSC-CMs (BrS), der Healthy-hiPSC-CMs (Healthy) sowie der Corrected-hiPSC-CMs (Isogenic) ohne und unter Gabe von Ajmalin (+ajm).

(D) Mittelwerte der Standardabweichung des Zellkontraktionsintervalls (SD of interval variability; in Sekunden) der drei Gruppen ohne (Healthy; Isogenic; BrS) und mit Gabe von Ajmalin (+ajm). Die gezeigten Werte beschreiben die Anzahl der untersuchten Zellen. Signifikante Unterschiede ($*p < 0.05$) im Vergleich zum Ausgangswert ohne Gabe von Ajmalin wurden mittels t-Test ermittelt, wurden aber nicht festgestellt.

(E) Darstellung des prozentualen Anteils der Zellen, die unter Ajmalingabe arrhythmische Ereignisse aufweisen. Die n-Werte beschreiben die Anzahl der untersuchten Zellen mit arrhythmischen Ereignissen bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Zellzahl in der jeweiligen Gruppe. Signifikante Unterschiede ($*p < 0.05$) im Vergleich zu den Healthy-hiPSC-CMs wurden mittels exakten Test nach Fisher ermittelt, wurden aber nicht festgestellt.

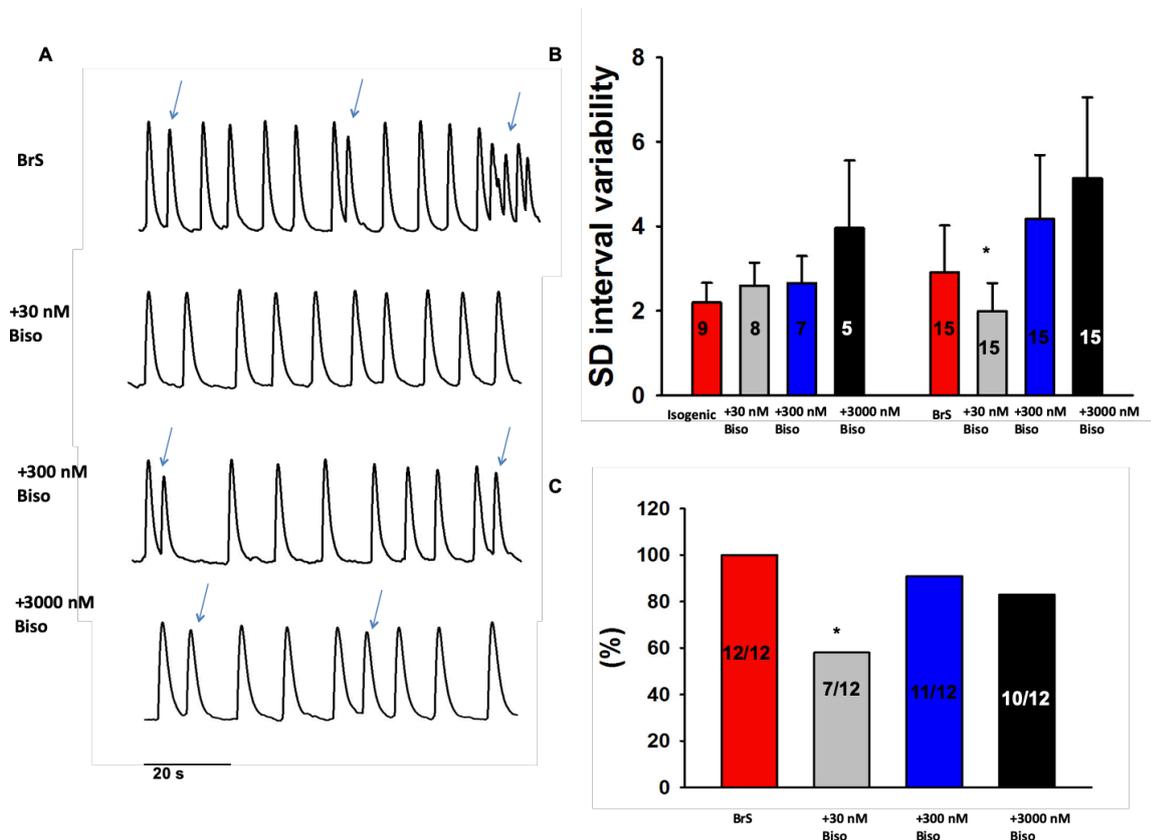


Abbildung 18: Die Effekte der Bisoprolol-Stimulation bzgl. Schlagvariabilität und arrhythmischen Ereignissen in den BrS-hiPSC-CMs (Zhong et al., 2022).

(A) Repräsentative Aufnahmen des Calcium-Transients (in s) von einer spontan und regelmäßig kontrahierenden BrS-hiPSC-CM (BrS)) ohne und nach einer Gabe aufsteigender Konzentrationen von Bisoprolol (Biso).

(B) Mittelwerte der Standardabweichung des Zellkontraktionsintervalls (SD of interval variability; in Sekunden) der zwei Gruppen ohne (Isogenic; BrS) und mit einer Gabe von Bisoprolol (Biso). Die n-Werte beschreiben die Anzahl der untersuchten Zellen. Signifikante Unterschiede (* $p < 0.05$) im Vergleich zum Ausgangswert ohne Gabe von Bisoprolol wurden mittels t-Test ermittelt und sind mit einem * markiert.

(C) Darstellung des prozentualen Anteils der BrS-hiPSC-CMs Zellen, welche unter Bisoprololgabe arrhythmische Ereignisse aufweisen. Die gezeigten Werte beschreiben die Anzahl der untersuchten Zellen mit arrhythmischen Ereignissen bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Zellzahl in der jeweiligen Gruppe. Signifikante Unterschiede (* $p < 0.05$) im Vergleich zu den BrS-hiPSC-CMs ohne Bisoprololgabe wurden mittels exakten Test nach Fisher ermittelt und sind mit einem * markiert.

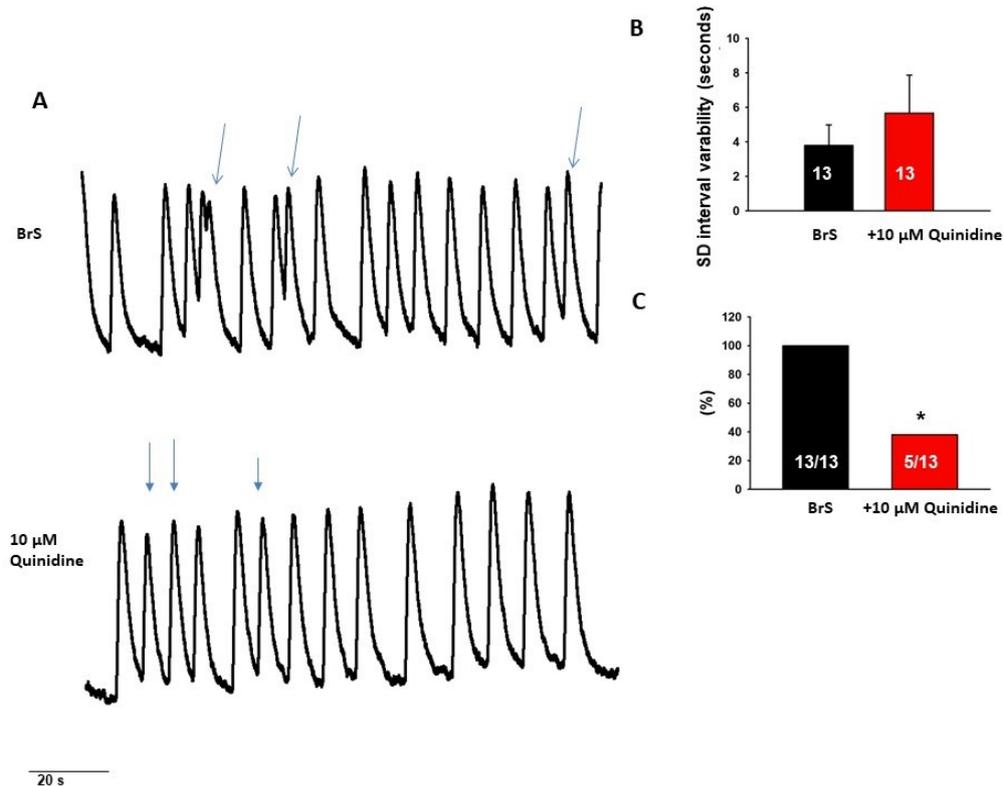


Abbildung 19: Die Effekte der Quinidin-Stimulation bzgl. Schlagvariabilität und arrhythmischen Ereignissen in den BrS-hiPSC-CMs (Zhong et al., 2022).

(A) Repräsentative Aufnahmen des Calcium-Transienten (in s) eines spontan und unregelmäßig kontrahierenden BrS-hiPSC-CM (BrS) ohne und nach Quinidingabe (10 µM Quinidine). Arrhythmische Ereignisse sind durch Pfeile markiert.

(B) Mittelwerte der Standardabweichung des Zellkontraktionsintervalls (SD of interval variability; in Sekunden). Die gezeigten Werte beschreiben die Anzahl der untersuchten Zellen. Signifikante Unterschiede (* $p < 0.05$) im Vergleich zum Ausgangswert ohne Gabe von Quinidin wurden mittels t-Test ermittelt, jedoch wurden keine festgestellt.

(C) Darstellung des prozentualen Anteils der BrS-hiPSC-CMs, welche unter Quinidingabe arrhythmische Ereignisse aufweisen. Die gezeigten Werte beschreiben die Anzahl der untersuchten Zellen mit arrhythmischen Ereignissen bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Zellzahl in der jeweiligen Gruppe. Signifikante Unterschiede (* $p < 0.05$) im Vergleich zu den BrS-hiPSC-CMs ohne Quinidingabe wurden mittels exakten Test nach Fisher ermittelt und sind mit einem * markiert.

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, hiPSC-CMs eines BrS-Patienten mit wiederholtem plötzlichem Herztod, welcher eine Missense-Genvariante unklarer Bedeutung (c.425C>T/ p.S142F) im CACNB2-Gen trägt, zu kultivieren und deren zelluläre, elektrophysiologische und pharmakologischen Eigenschaften zu prüfen und mit gesunden und mutationskorrigierten hiPSC-CMs zu vergleichen. Folgende Ergebnisse konnten hinsichtlich der BrS-hiPSC-CMs gezeigt werden:

1. Pluripotenz der BrS-hiPSC und erfolgreiche Differenzierung zu Kardiomyozyten (BrS-hiPSC-CMs)
2. Genotyp-Phänotyp-Korrelation der CACNB2-Genvariante
3. Eine Reduktion der Proteinexpression im CACNB2-Gen
4. Eine Reduktion des „Peak“ L-Typ Calciumstromes
5. Abnormes Aktionspotential in den BrS-hiPSC-CMs
6. Ein gesteigertes Auftreten von Arrhythmie-ähnlichen Ereignissen in BrS-hiPSC-CMs und Zunahme unter Stimulation durch Carbachol
7. Die Suppressierbarkeit von Arrhythmie-ähnlichen Ereignissen in BrS-hiPSC-CMs unter Stimulation durch Quinidin und Bisoprolol

4.1.1 Pluripotenz der BrS-hiPSC und erfolgreiche Differenzierung zu Kardiomyozyten (BrS-hiPSC-CMs)

Die im Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Ergebnisse zeigen zunächst den Nachweis der Pluripotenz der BrS-hiPSCs. Dies ist die wesentliche Voraussetzung, um die Differenzierung zu Kardiomyozyten zu starten. Die erfolgreiche Differenzierung zu Kardiomyozyten wurde mithilfe q-RT-PCR und der im Verlauf der Differenzierung bis Tag 35 abnehmenden mRNA des Pluripotenzmarkers POUF1 und dem Anstieg der mRNA der kardiomyozytenspezifischen Marker TNNT2 und TTN13 nachgewiesen.

Außerdem wurde die erfolgreiche Differenzierung mit den kardiomyozytenspezifischen Markern (TNT, α -Actinin) mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf Proteinebene bestätigt. Zusammen mit der lichtmikroskopisch sichtbaren Zellkontraktion deutet dies darauf hin, dass es sich bei den hiPSC-CMs um erfolgreich differenzierte Kardiomyozyten handelt. Eine Limitation dieser Methode ist, dass nur eine qualitative Bestimmung der Proteine erfolgt und nur eine Stichprobe der Kultur geprüft werden kann. Hierdurch bleibt eine Restunsicherheit über die Differenzierung der gesamten Kultur bestehen. Dieses Risiko habe ich durch mehrfache Wiederholung der Analysen versucht zu minimieren.

4.1.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelation der CACNB2-Genvariante

Bei BrS-Patienten ist in nahezu 30% der Fälle eine Mutation der alpha-Untereinheit des Natriumkanals (SCN5a) nachweisbar, welche eine Reduktion des „Peak“ Natriumstrom zur Folge hat (Brugada et al., 2018). Ein Ausschluss dieser Mutation

sowie weiterer Mutationen in den Untereinheiten des Natriumkanals (SCN1B, SCN3b, SCN10a) und in der alpha-Untereinheit des L-Typ Calciumkanals (CACNA1C) sowie weiterer bekannten mit dem BrS assoziierten Mutationen (GPD1L, KCNE3) erfolgte bei unserem BrS-Patienten (Abschnitt 2.3). Es erfolgte lediglich der Nachweis einer Missense-Mutation unbekannter Signifikanz im CACNB2-Gen (c.425C>T/ p.S142F). Andere Studien zeigten bereits, dass Mutationen in der alpha-Untereinheit (CACN1C) und beta-Untereinheit (CACNB2) des L-Typ Calciumkanals mit dem BrS und/ oder Short QT-Syndrom verknüpft sind (Burashnikov et al., 2010), (Antzelevitch et al., 2007). Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation von CACNB2-Varianten mit klinischem BrS wurde bisher in humanen Kardiomyozyten noch nicht nachgewiesen. Der Vergleich der Ergebnisse der BrS-hiPSC-CMs mit gesunden Spendern- und mutationskorrigierten-hiPSC-CMs konnte zeigen, dass die hier vorliegende CACNB2-Genvariante (c.425C>T/ p.S142F) ursächlich für den Phänotypen des BrS ist und somit Auslöser für den Funktionsverlust des Calciumkanals und dem vermehrten Auftreten von Herzrhythmusstörungen.

Das Gen der humanen $\beta 2$ Isoform des Calciumkanals wurde erstmalig als Antigen im Zusammenhang mit dem Lambert–Eaton Syndrom (LEMS) identifiziert und dem Chromosom 10p12 zugeordnet (Rosenfeld et al., 1993, Taviaux et al., 1997).

Die Ursache für die Immunantwort der LEMS-Patienten gegen die beta-Untereinheit ist unklar. Möglicherweise liegt der Locus 10p12 des CACNB2-Gens nahe einer Region, welche genetische Veränderungen im Rahmen der Erkrankung erfährt und die Expression des CACNB2 verändert und so zu einer Autoimmunreaktion führt (Rosenfeld et al., 1993, Taviaux et al., 1997). Inwiefern das BrS mit CACNB2 Mutation dem LEMS oder anderen autoimmunen Erkrankungen im Verhältnis steht, ist unklar und bedarf weiterer Forschung. LEMS zeichnet sich durch Muskelschwäche der Extremitäten aus.

4.1.3 Eine Reduktion der Proteinexpression im CACNB2-Gen

Die Proteinexpression der mutierten beta-2-Untereinheit des L-Typ Calciumkanals (CACNB2) zeigte im Western Blot eine signifikante Reduktion im Vergleich zu den von gesunden Spendern stammenden hiPSC-CMs. Diese Reduktion verhält sich kongruent mit dem signifikant reduzierten „Peak“ I_{Ca-L} (im nächsten Abschnitt näher erläutert). Dass diese Veränderungen auf die bekannte Mutation zurückzuführen sind, konnte anhand der unveränderten Expression nach Genkorrektur bestätigt werden. Ebenfalls konnte eine signifikante Reduktion der Fluoreszenzintensität des immunfluoreszenzgefärbten CACNB2-Proteins in den BrS-hiPSC-CMs im Vergleich zu den Kontroll-CMs nachgewiesen werden. SCN5A zeigte hierbei keine Veränderung.

Keine Veränderung zeigte sich in der relativen mRNA-Expression des CACNB2-Gens. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte die fehlerhafte Proteinfaltung oder beschleunigter Abbau des mutierten Proteins (Untereinheit) sein. Stimmig ist hierbei, dass die unveränderte alpha-Untereinheit des LTCC (CACNA1C) weder eine Veränderung in der Proteinexpression noch in der mRNA Expression zeigt.

4.1.4 Funktionelle Konsequenz der CACNB2-Genvariante auf den Calciumstrom - eine Reduktion des „Peak“ L-Typ Calciumstroms

Bisher weiß man wenig über das funktionelle Ausmaß der verschiedenen CACNB2-Genmutationen beim BrS. Nur bei einigen wenigen bekannten CACNB2-Varianten wurde an Zellen mit heterologer Expression, chinesischen Hamster-Ovarialzellen (CHO) und an TSA201-Zellen der funktionelle Effekt der Mutation experimentell erforscht.

Die Studie von Cordeiro et al. (2009) berichtet über eine Missense-Variante (T11I) im CACNB2-Gen eines BrS-Patienten, welche zu einer beschleunigten Inaktivierung des L-Typ Calciumkanals führt. Diese zeigte sich in einer Verschiebung der Inaktivierungskurve in negativere Potentiale. Die Autoren deuteten das als eine CACNB2-Funktionsverlust-Genvariante. Diese Tatsache wurde anhand von TSA201-Zellen nachgewiesen, die mit der CACNB2-Variante (T11I) und dem Wildtyp von CACNA1C co-transfiziert wurden.

Antzelevitch et al. (2007) konnten anhand der CHO-Zellen, bei denen das mutierte CACNB2-Gen (S481L) transfiziert und mit dem WT verglichen wurden, einen verminderten „Peak“ I_{Ca-L} zeigen und deutet dies als Loss-of-function Genvariante des L-Typ Calciumkanals (Antzelevitch et al., 2007).

Abweichend von den beiden zuvor genannten Studien konnte bei Patienten mit Erregungsleitungsstörungen, deren Ursache auf einer SCN5a Mutation liegt, ohne dass es sich hierbei um ein klinisches BrS handelt, ein zusätzlicher CACNB2-Gen Polymorphismus (D601E) nachgewiesen werden. Hierzu wurden TSA201-Zellen der Polymorphismus (D601E) im CACNB2-Gen, ein Wildtyp des CACNA1C-Gens und ein Wildtyp des CACNA1D-Gens transfiziert. Es zeigten sich eine verlangsamte Inaktivierung des L-Typ Calciumkanals und ein signifikant erhöhter Calciumstrom. Die Autoren schlossen daraus auf eine gain-of-function CACNB2-Genvariante (D601E) (Hu et al., 2010). Derselbe CACNB2-Gen-Polymorphismus (D601E) wurde im Rahmen einer LTCC-Genanalyse bei einem BrS-Patienten mit Mutation S143F im CACNB2-Gen identifiziert (Burashnikov et al., 2010).

Da diese Studien nicht an Kardiomyozyten durchgeführt wurden, sondern an Zellen mit heterologer Expression, welche nicht geeignet sind, um die Funktionsweise von Herzmuskelzellen nachzustellen, bleibt unklar, ob diese Genvariationen auch bei menschlichen Herzmuskelzellen dieselben Effekte haben und zu einem verminderten I_{Ca-L} führen, das Aktionspotential beeinflussen oder das Auftreten von Herzrhythmusstörungen fördern.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die funktionelle Bedeutung einer weiteren Mutation - der Missense-Variante c.425C>T/ p.S142F im CACNB2-Gen - für den Phänotypen des BrS anhand hiPSC-CMs geklärt werden. Auch wenn diese Variante bereits bei einigen am BrS erkrankten Patienten nachgewiesen werden konnte, wurde sie bisher vom American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology (ACMG/ AMP) und ClinVar als eine Variante mit unbekannter Signifikanz („VUS“, variants with unknown significance) eingestuft (Campuzano et al., 2019), (Richards et al., 2015). Weitere Einstufungsmöglichkeiten bei Veränderung der normalen Gensequenz bezüglich ihrer klinischen Signifikanz wären „pathogenic“, „likely pathogenic“, „likely benign“, „benign“ und „variant with unknown significance“. In vielen Fällen fehlen ausreichende Informationen um die

potenzielle Signifikanz einer „VUS“ einschätzen zu können. Funktionelle Studien sind daher wichtig, um die klinische Bedeutsamkeit einer „VUS“ aufklären zu können.

In dieser Arbeit wird der Fall eines BrS-Patienten behandelt, dessen phänotypische Eigenschaften mittels hiPSC-CMs untersucht wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen Phänotypus mit signifikant reduziertem „Peak“ I_{Ca-L} sowie signifikanten Veränderungen in der Protein- und mRNA-Expression des L-Typ Calciumkanals. Dass diese Veränderungen auf die bekannte Genvariante zurückzuführen sind, konnte anhand des unveränderten Stroms und Expression nach Genkorrektur bestätigt werden. Ausführliche Literaturrecherche konnte weder bei in-vitro noch bei in-vivo Studien bezüglich dieser Genvariante vergleichbare Ergebnisse aufzeigen.

In den bereits oben erwähnten Untersuchungen an den co-transfizierten Zellen wurde über zwei zelluläre Mechanismen mit dem Phänotypen des BrS mit CACNB2-Genvariante berichtet: 1. eine beschleunigte spannungsabhängige Inaktivierung des L-Typ Calciumstroms (Variante: p.T11I), welche das BrS präsentiert, und 2. eine Verminderung des „Peak“ Calciumstroms (Variante: p.S481L), welche das BrS mit einer Überlappung des Short QT-Syndroms präsentiert (Cordeiro et al., 2009, Antzelevitch et al. 2007).

Das Short QT-Syndrom (SQTS) wurde als klinische Entität erstmals im Jahr 2000 beschrieben (Gussak et al., 2000) und ist assoziiert mit dem Funktionsgewinn des Ionenkanals durch Mutationen in drei verschiedenen Kaliumkanälen (KCNH2, KCNQ1 und KCNJ2) als auch durch Mutationen in den Untereinheiten des Calciumkanals (CACNA1C und CACNB2), welche zu einer Verkürzung des QTc-Intervalls im EKG und zu der Entwicklung maligner Herzrhythmusstörungen führen. Das SQTS wird bei einem korrigierten QT-Intervall ($QTc \leq 340ms$) diagnostiziert (Priori et al., 2015).

In den BrS-hiPSC-CMs dieser Arbeit rief die Genvariante (p.S142F) ähnliche Effekte auf den L-Typ-Calciumkanal bezüglich der I_{Ca-L} Amplitude hervor wie bei CACNB2-T11I und CACNB2-S481L, unterschied sich jedoch bezüglich der Kanalöffnungskinetik. CACNB2-D601E zeigte hinsichtlich der I_{Ca-L} Amplitude und der Kanalöffnungskinetik andere Effekte als die in dieser Arbeit untersuchte Genvariante CACNB2-S142F.

Interessanterweise berichten Antzelevitch et al. in ihrer Studie von 2007 über einen männlichen BrS-Patienten mit der Mutation S481L im CACNB2-Gen mit zusätzlich klinischem „shorter-than-normal“-QTc-Intervall von 330ms. Im Gegensatz dazu zeigt der Fall des hier analysierten männlichen BrS-Patienten klinisch ein normwertiges QTc-Intervall ($QTc 400ms$) und die hiPSC-CMs des Mannes mit der Mutation S142F im CACNB2-Gen eine verkürzte Inaktivierungszeit und eine beschleunigte Wiederherstellung des L-Typ Calciumkanals aus der Inaktivierung. Auch der von Burashnikov et al. (2010) untersuchte Polymorphismus p.D601E im CACNB2-Gen eines BrS-Patienten zeigte ein normwertiges QTc-Intervall. Das BrS wird generell eher mit einer leichten Verlängerung des QTc-Intervalls assoziiert, vor allem in den rechten präkordialen Ableitungen. Zur Begründung wird angenommen, dass die Akzentuierung der Aktionspotential-Kerbe ohne Verlust der Kuppel das Aktionspotential im rechten epikardialen Ventrikel verlängert (Antzelevitch et al., 2007).

Zur Erklärung der Pathophysiologie der typischen ST-Hebungen in den präkordialen Ableitungen stehen, obwohl der Funktionsverlust des spannungsabhängigen Natriumkanals bei BrS-Patienten im Allgemeinen nicht kontrovers diskutiert wird, aktuell hauptsächlich zwei Hypothesen im Raum (Li et al., 2022). Die

Repolarisationshypothese impliziert, dass eine starke Expression der transienten auswärts gerichteten Kaliumkanäle (I_{to}) im Epikardium zu einer transmuralen Verteilung der Repolarisation im rechten Ventrikel führt, welche für die ST-Segment-Hebung in den rechten präkordialen Ableitungen verantwortlich ist. Bei der Depolarisationshypothese wird angenommen, dass die verzögerte Reizweiterleitung des rechten ventrikulären Ausflusstraktes zum einen für einen interzellulären Strom vom rechten Ventrikel zum rechten ventrikulären Ausflusstrakt ursächlich ist und zum anderen für einen Rückstrom vom rechten ventrikulären Ausflusstrakt zurück zum rechten Ventrikel, welcher für die ST-Segment-Hebung in den rechten präkordialen Ableitungen verantwortlich ist (Li et al., 2022).

In einer Zusammenschau aller bereits bekannten Studienergebnisse und der aus dieser Arbeit resultierenden Schlüsse, kann ein reduzierter „Peak“ I_{Ca-L} , unabhängig vom auslösenden Faktor, zur Pathogenese des BrS beitragen.

4.1.5 Abnormes Aktionspotential in den BrS-hiPSC-CMs

Ein verminderter I_{Na} , I_{Ca-L} (Vatta et al., 2002, Antzelevitch, et al., 2007) oder verstärkter Kaliumauswärtsstrom begünstigen eine Verkürzung des Aktionspotentials, welches als pathophysiologische Ursache für das BrS diskutiert wird und zu heterogenen Aktionspotentialeigenschaften führen kann. Die damit einhergehende zeitlich versetzte Repolarisation als Entstehungsursache der polymorphen ventrikulären Tachyarrhythmie gesehen werden kann.

Nichtsdestotrotz zeigt der Fall des hier analysierten BrS-Patienten klinisch eine normwertige QTc Zeit und die APD der BrS-hiPSC-CMs ist nicht verkürzt; sie ist im Gegenteil sogar etwas verlängert. Dies lässt vermuten, dass die Arrhythmien des Patienten weder durch eine Verkürzung der QTc Zeit noch durch eine Verkürzung der APD hervorgerufen werden. Vermutlich wirken die Ionenströme anderer Kanäle der APD-Verkürzung entgegen. Lediglich die Amplitude des Aktionspotentials der BrS-hiPSC-CMs ist wesentlich niedriger.

4.1.6 Gesteigertes Auftreten von Arrhythmie-ähnlichen Ereignissen in BrS-hiPSC-CMs und Zunahme unter Stimulation durch Carbachol

In der Mehrzahl von BrS-Patienten wird über einen wiederholt aufgetretenen plötzlichen Herztod (SCD) aus Ruhephasen, bei Parasympathikus-dominierten System, berichtet (Mazzanti et al., 2014), was sich mit unseren Ergebnissen deckt. Auch unser BrS-Patient erlitt mehrere SCD in Ruhesituationen.

Der spontane Calcium-Transient, welcher die Kontraktionen einzelner Zellen graphisch sichtbar macht, zeigte bei den BrS-hiPSC-CMs ohne Stimulation bereits Arrhythmie-ähnliche Ereignisse. Diese traten bei den BrS-hiPSC-CMs signifikant häufiger auf als in den beiden Kontrollgruppen. In der Nachstellung eines Parasympathikus-dominierten Systems konnte mithilfe der Gabe von Carbachol, einem muskarinergen Rezeptoragonisten, das Auftreten von „Arrhythmia-like events“ in den hiPSC-CMs des BrS-Patienten provoziert werden. Diese Zunahme der Arrhythmie-ähnlichen Ereignisse ist konsistent mit dem Auftreten von lebensgefährlichen Arrhythmien des BrS-Patienten in Ruhe. Dies indiziert, dass die

BrS-hiPSC-CMs die klinischen/ phänotypischen Eigenschaften des Patienten widerspiegeln.

4.1.7 Das BrS-Zellmodell als Plattform für Medikamententestung - die Suppressierbarkeit von Arrhythmie-ähnlichen Ereignissen in BrS-hiPSC-CMs unter Stimulation durch Quinidin und Bisoprolol

Die vorliegende Reduktion des I_{Ca-L} könnte zur Entstehung der Arrhythmien beitragen und könnte das Ansprechen von BrS-Patienten mit CACNB2-Varianten auf Natriumkanalblocker, wie es bei unserem BrS-Patienten aufgefallen ist, bestätigen. Die typischen EKG-Veränderungen des BrS sind häufig dynamisch oder maskiert. Demaskiert oder moduliert werden sie häufig durch Natriumkanalblocker wie Ajmalin, aber auch durch Fieber, vagotonisierende Substanzen, alpha-adrenerge Agonisten, beta-adrenerge Blocker, trizyklische/ tetrazyklische Antidepressiva, eine Kombinationstherapie aus Insulin und Glukose, Hypo- und Hyperkaliämie, sowie -kalziämie, wie auch durch Alkohol und Kokain. Daher wird bis auf den diagnostischen Einsatz vom therapeutischen Einsatz von Natriumkanalblockern bei Patienten mit BrS abgeraten (Antzelevitch et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Verhalten der BrS-hiPSC-CMs auf die Applikation verschiedener, klinisch häufig genutzter Medikamente untersucht. Interessanterweise hatte Ajmalin, ein Natriumkanalblocker, der üblicherweise zur Diagnostik und Demaskierung des BrS genutzt wird, (so auch bei unserem Patienten bei einer Stimulation mit 40mg Ajmalin (1mg/ kg)), keine arrhythmietriggernde Wirkung auf die BrS-hiPSC-CMs. Bis zu 1,8% der BrS-Patienten entwickeln unter Gabe von Ajmalin Kammertachyarrhythmien (Conte et al., 2013). In dieser Studie hatten mindestens 80% der Patienten eine Mutation im SCN5A Gen. Bis heute fehlen jedoch Daten in der Literatur bzgl. der Assoziation zwischen Mutationen in den CACNA1C- oder CACNB2-Genen und dem Auftreten von Kammertachyarrhythmien bei BrS-Patienten unter diagnostischer Stimulation mit Ajmalin. Der in dieser Arbeit beschriebene BrS-Patient erlitt keine Kammertachyarrhythmien unter der diagnostischen Stimulation mit Ajmalin.

Quinidin, ein multipler Kanalblocker, fand bereits therapeutische Anwendung mit dem Effekt, die Auftretenswahrscheinlichkeit von Arrhythmien zu vermindern. Es verleitet zur Annahme, dass es ebenfalls ein effektives Medikament zur Behandlung von BrS-Patienten mit einer CACNB2-Genvariante sei.

Durch Zugabe von 10 μ M Quinidin verringerte sich die Auftretenswahrscheinlichkeit von Arrhythmie-ähnlichen Ereignissen signifikant.

Als Medikament wird Quinidin, wenn auch Off-label, für Patienten mit BrS beim elektrischen Sturm, bei Kontraindikation zur Implantation des ICDs oder bei registrierten adäquaten Defibrillationen des ICDs empfohlen (Brugada et al., 2018, Priori et al., 2015). Die Wirkung des Quinidins als antiarrhythmisches Mittel blockiert teils den Strom des I_{to} und I_{Kr} . Quinidin konnte das Reentry in der Phase II sowie Kammerflimmern in den BrS-Studien verhindern (Shentar et al., 2018, Rai et al., 2017).

Erwähnenswert ist zudem, dass unser BrS-Patient unter einer niedrigdosierten Bisoprolol-Therapie mit 2,5mg pro Tag in den Aufzeichnungen des ICD weder Kammerflimmern noch Defibrillationen zeigte, nachdem er zuvor ohne Betablockereinnahme sechsmalig zu Defibrillation des ICD gekommen war. Von der Verwendung von Betablockern, so auch Bisoprolol, wird bei BrS-Patienten abgeraten

(Postema et al, 2009). Diese Empfehlungen basieren zum einen auf älteren Daten und auch auf Fallberichten. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die anti-arrhythmischen Effekte von Bisoprolol auf die BrS-hiPSC-CMs untersucht. Tatsächlich konnte Bisoprolol in einer niedrigen Konzentration (30nM) die Arrhythmien unterbinden und zeigte somit ein konsistentes Verhalten der BrS-hiPSC-CMs zu den klinischen Daten des Patienten. Dies indiziert erneut, dass die hiPSC-CMs des BrS-Patienten die therapeutische Wirkung der Medikamente widerspiegeln kann. Kürzlich publizierte Daten zeigten, dass bei Patienten, die mit Betablockern und/ oder Calciumkanalblockern in niedrigen oder normalen Dosen behandelt wurden, keine lebensbedrohlichen Arrhythmien auftraten (Kamakura et al., 2018). Die Frage, die hierbei aufkommt ist, ob die Medikamente, die in der Therapie von BrS-Patienten vermieden werden sollten, unterschiedliche Effekte hinsichtlich unterschiedlicher Genvarianten und hinsichtlich der Dosierung haben. Diese Fragestellung kann hoffentlich in zukünftigen, präklinischen zellulären Modellen, wie zum Beispiel hiPSC-CMs, mit unterschiedlichen Genvarianten geklärt werden.

4.2 Limitation der Methoden

Trotz der vielen Gemeinsamkeiten zeigen hiPSC-CMs einige Unterschiede zu humanen Kardiomyozyten und dienen nur mit Einschränkungen als humanes Kardiomyozyten-in-vitro-Modell. Zudem können viele Faktoren wie Zell-Zell-Interaktion, Nervale- und Hormonregulation, welche eine besondere Rolle im BrS spielen könnten, bei elektrophysiologischen Einzel-Zell-Studien nicht berücksichtigt werden. Außerdem sollte die relative Unreife der hiPSC-CMs im Vergleich zu frisch isolierten adulten Kardiomyozyten des menschlichen Herzens berücksichtigt werden. Adulte CMs unterscheiden sich hinsichtlich der Form, der Zellgröße und des Metabolismus, da sie größer und stabförmig sind sowie große, Sarkomere enthaltende Areale, ein ausgedehntes T-tubuläres Netzwerk und eine große Anzahl an Mitochondrien besitzen (Yang et al., 2014).

80-120 Tage alte hiPSC-CMs zeigten morphologisch und funktionell deutlich reifere CMs (Lundy et al., 2002). Eine solch lange Inkulturnahme der für die Anzahl der Versuche benötigten Zellen ist schwer umsetzbar. Möglichkeiten, die Reifung zu beschleunigen, werden untersucht, jedoch ist es unwahrscheinlich, dass es nur den einen entscheidenden „master pathway“ zur Reifung gibt (Yang et al., 2014).

Ein großer Vorteil der hiPSC ist, dass funktionelle CMs von Patienten mit Keimbahnmutationen und angeborenen kardialen Erkrankungen differenziert und so als humanes „disease-in-a-dish“-Modell erforscht werden können (Yang et al., 2014).

Aufgrund der relativ geringen Prävalenz der BrS Erkrankung und der Schwierigkeit, Patienten mit identischen Genvarianten zu finden, wurde nur ein einziger Patient für diese Arbeit rekrutiert. Individuelle Variabilität kann nicht ausgeschlossen werden; jedoch bieten patientenspezifische Studien neue Chancen, insbesondere für individualisierte Medizin.

4.3 „from bench to bedside“ – klinische Relevanz der Arbeit

Das Brugada Syndrom (BrS) ist eine seltene angeborene Ionenkanalerkrankung. Die Beschaffung von menschlichen Kardiomyozyten von BrS-Patienten für experimentelle und therapeutische Studien ist äußerst schwierig.

Diese Arbeit zeigt den zellulären Phänotypus des BrS mithilfe von zu Kardiomyozyten differenzierten induzierter pluripotenter Stammzellen eines BrS-Patienten mit CACNB2-Genvariante (Form 4) unklarer Signifikanz.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass patientenspezifische hiPSC-CMs als Forschungsgrundlage dienen können und den Erkenntnisgewinn über zelluläre Mechanismen des BrS 4 sowie dessen Therapie voranbringen sowie in Zukunft Möglichkeiten für personalisierte Medizin eröffnen können.

4.4 Schlussfolgerung

Die phänotypischen Eigenschaften eines BrS-Patienten mit CACNB2-Genvariante konnten erfolgreich mithilfe von hiPSC-CMs dargestellt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass die Missense-Genvariante (c.425C>T/p.S142F) im CACNB2-Gen einen Funktionsverlust des L-Typ Calciumkanals sowie arrhythmische Ereignisse in BrS-hiPSC-CMs hervorrufen kann.

Bisoprolol und Quinidin können möglicherweise effektive Medikamente für BrS-Patienten mit CACNB2-Genvarianten sein und können in weiteren Untersuchungen getestet werden. Diese Arbeit unterstützt die Verwendung von hiPSC-CMs als zelluläres Modell für weitere Untersuchungen des BrS einschließlich dessen Triggerfaktoren und die Wirkung von Medikamenten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Brugada Syndrom (BrS) gehört zu einer Gruppe seltener angeborener Herzrhythmusstörungen. Es ist charakterisiert durch ST-Hebungen in den Vorderwandableitungen des Elektrokardiogramms V1–V3 ohne Vorliegen einer strukturellen kardialen Erkrankung. Charakteristisch ist außerdem eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für lebensbedrohliche ventrikuläre Rhythmusstörungen, Synkopen und der plötzliche Herztod. Die Erstdiagnose findet meist im jungen Erwachsenenalter statt, wobei Männer deutlich häufiger betroffen sind als Frauen. Für den Phänotyp des BrS werden vor allem Mutationen im SCN5A-Gen, das Gen, das die alpha-Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals codiert, verantwortlich gemacht. Seltener finden sich Mutationen in der alpha- und beta-Untereinheit des kardialen L-Typ Calciumkanals (CACNA1C und CACNB2), welche bisher auch weniger untersucht wurden. Ein humanes zelluläres Modell, in welchem patientenspezifische induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) zu Kardiomyozyten (hiPSC-CMs) differenziert werden, kann zum Verständnis der Erkrankung beitragen und helfen, neue Therapieansätze zu entwickeln.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung des zellulären Phänotyps und die Etablierung eines zellulären Modells des BrS mit einer Punktmutation unklarer Signifikanz im L-Typ Calciumkanal im CACNB2-Gen (c.425C>T/ p.S142F) anhand von Kardiomyozyten, die aus patientenspezifischen induzierten pluripotenten Stammzellen hergestellt wurden (hiPSC-CMs). Zudem soll dieses zelluläre Modell die Effekte gängiger Antiarrhythmika untersuchen.

Im Rahmen des Projektes wurden sowohl Zellen eines BrS-Patienten mit wiederkehrendem Kammerflimmern und einer Missense-Mutation im CACNB2-Gen hergestellt, als auch Zellen von drei unabhängigen gesunden Personen. Die Zellen wurden als Fibroblasten im Rahmen einer Hautbiopsie gewonnen und zu hiPSC differenziert. Zudem wurde die Mutation im CACNB2-Gen in den hiPSCs des BrS-Patienten mittels des CRISPR/ Cas9-Verfahrens korrigiert.

Es folgte die Kultivierung der hiPSC und Differenzierung der hiPSC zu kontrahierenden CMs gemäß dem publizierten Protokoll aus Göttingen (Tiburcy et al., 2017). Mithilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnten in den 50 Tage alten CMs kardiomyozytenspezifische Proteine (Troponin T und α -Actinin) sowohl bei den von gesunden Spendern stammenden Kardiomyozyten (Healthy-hiPSC-CMs), bei den mutationskorrigierten CMs (Corrected-hiPSC-CMs) als auch bei denen des BrS-Patienten (BrS-hiPSC-CMs) nachgewiesen werden. Dadurch konnte, neben den sichtbaren Kontraktionen, die Differenzierung von patientenspezifischen hiPSC zu Kardiomyozyten (hiPSC-CMs) bestätigt werden.

Eine weitere Bestätigung der Differenzierung der hiPSC zu hiPSC-CMs lieferte der Nachweis der abnehmenden Pluripotenzmarker (Pituitary-Specific Positive Transcription Factor 1 (POUF1)) und Zunahme der kardiomyozytenspezifischen Proteine (Troponin T (TNNT2) und Troponin I (TNNI3)), die im Verlauf der Differenzierung (Tag 0, 10, 20, 25, 35) beobachtet und mittels q-RT-PCR der mRNA festgestellt wurden.

Die erbrachten Nachweise der erfolgreichen Differenzierung waren die Voraussetzung für weitere zelluläre und elektrophysiologische Charakterisierung der BrS-hiPSC-CMs

und der Etablierung eines zellulären Modells des BrS mit einer L-Typ Calciumkanal Genvariante.

Die Proteinexpression der beta-Untereinheit des LTCC (CACNB2) wies im Western Blot eine signifikante Reduktion auf, nicht jedoch die Expression der alpha-Untereinheit des kardialen L-Typ Calciumkanals (CACNA1C), noch die der alpha-Untereinheit des kardialen spannungsabhängigen Natriumkanals (SCN5A).

Ebenfalls konnte eine signifikante Reduktion der Fluoreszenzintensität des immunfluoreszenzgefärbten CACNB2-Proteins in den BrS-hiPSC-CMs im Vergleich zu den Kontroll-CMs nachgewiesen werden. SCN5A zeigte hierbei keine Veränderung.

In der elektrophysiologischen Charakterisierung der CMs mittels Patch-Clamp-Technik zeigte sich der Calciumstrom (I_{Ca-L}) des spannungsabhängigen Calciumkanals in den BrS-hiPSC-CMs signifikant reduziert im Vergleich zu den Kontroll-CMs. Auch die Eigenschaften des spannungsabhängigen Calciumkanals waren verändert, in der Form, dass die Inaktivierungskurve des Kanals in positivere Potentiale verschoben und die Erholung aus der Inaktivierung beschleunigt war.

Ebenfalls wurde an vereinzelt CMs der spontane Calcium-Transient zur Detektion arrhythmischer Ereignisse/ Kontraktionen gemessen. Hierbei traten bei den BrS-hiPSC-CMs auffallend häufiger arrhythmische Ereignisse auf. Unter Stimulation durch Carbachol, einem Parasympathomimetikum, wurden auch bei zuvor rhythmisch kontrahierenden Zellen Arrhythmien ausgelöst. Dies konnte bei den BrS-hiPSC-CMs deutlich häufiger ausgelöst werden als bei den gesunden Zellen. Dies führt zur Annahme, dass der BrS-Patient eine Prädisposition zur Entwicklung von Arrhythmien hat. Dahingegen zeigten die BrS-hiPSC-CMs unter Stimulation mit Ajmalin, einem Natriumkanalblocker, keinen Anstieg der arrhythmischen Ereignisse. Zu einer Reduktion der arrhythmischen Ereignisse kam es unter niedrig dosiertem Bisoprolol, einem Betablocker, sowie unter Stimulation mit Quinidin. Letztere weisen daher auf einen möglichen therapeutischen Nutzen für BrS-Patienten mit Mutation im CACNB2-Gen hin. Da die (obengenannten) Veränderungen der BrS-hiPSC-CMs nicht mit den Ergebnissen der CACNB2-Mutationskorrigierten CMs übereinstimmen und letztere mit den Ergebnissen der Healthy-hiPSC-CMs deckungsgleich sind, kann geschlossen werden, dass die Veränderungen der BrS-hiPSC-CMs auf die Genvariante im CACNB2-Gen zurückzuführen sind. Die Daten implizieren zudem, dass die CACNB2-Genvariante (c.425C>T/ p.S142F) zu einem Funktionsverlust des kardialen L-Typ Calciumkanals führt, der ätiologisch für diesen Typ des Brugada Syndroms ist. Das Ziel dieser Arbeit, ein zelluläres Modell des BrS zu etablieren, konnte erreicht werden und lädt ein, Untersuchungen bezüglich Triggerfaktoren und Medikamentenwirkung fortzusetzen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Antikörper-online (2021): Immunblotting und Western Blotting. <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1224/western-blot-hintergrundinformationen>. Abgerufen am 09.09.2021

Antzelevitch, C., Brugada, P., Borggrefe, M., Brugada, J., Brugada, R., Corrado, D., Gussak, I., LeMarec, H., Nademanee, K., Perez Riera, A.R., *et al.* (2005). Brugada syndrome: report of the second consensus conference. *Heart rhythm* 2, 429-440.

Antzelevitch, C., Pollevick, G.D., Cordeiro, J.M., Casis, O., Sanguinetti, M.C., Aizawa, Y., Guerchicoff, A., Pfeiffer, R., Oliva, A., Wollnik, B., *et al.* (2007). Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* 115, 442-449.

Brugada, J., Brugada, R., and Brugada, P. (2003). Determinants of sudden cardiac death in individuals with the electrocardiographic pattern of Brugada syndrome and no previous cardiac arrest. *Circulation* 108, 3092-3096.

Brugada, R., Campuzano, O., Sarquella-Brugada, G., Brugada, P., Brugada, J., and Hong, K. (1993). Brugada Syndrome. In *GeneReviews*(^(R)), M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.).

Brugada, J., Campuzano, O., Arbelo, E., Sarquella-Brugada, G., and Brugada, R. (2018). Present Status of Brugada Syndrome: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology* 72, 1046-1059.

Burashnikov, E., Pfeiffer, R., Barajas-Martinez, H., Delpón, E., Hu, D., Desai, M., Borggrefe, M., Häissaguerre, M., Kanter, R., Pollevick, G.D., *et al.* (2010). Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart rhythm* 7, 1872-1882.

Campuzano, O., Sarquella-Brugada, G., Fernandez-Falgueras, A., Cesar, S., Coll, M., Mates, J., Arbelo, E., Perez-Serra, A., Del Olmo, B., Jordá, P., *et al.* (2019). Genetic interpretation and clinical translation of minor genes related to Brugada syndrome. *Human mutation* 40, 749-764.

Casado-Arroyo, R., Berne, P., Rao, J.Y., Rodriguez-Mañero, M., Levinstein, M., Conte, G., Sieira, J., Namdar, M., Ricciardi, D., Chierchia, G.B., *et al.* (2016). Long-Term Trends in Newly Diagnosed Brugada Syndrome: Implications for Risk Stratification. *Journal of the American College of Cardiology* 68, 614-623.

Concordet, J.P., and Haeussler, M. (2018). CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res* 46, W242-w245.

Conte, G., Sieira, J., Sarkozy, A., de Asmundis, C., Di Giovanni, G., Chierchia, G.B., Ciconte, G., Levinstein, M., Casado-Arroyo, R., Baltogiannis, G., *et al.* (2013). Life-threatening ventricular arrhythmias during ajmaline challenge in patients with Brugada syndrome: incidence, clinical features, and prognosis. *Heart rhythm* 10, 1869-1874.

Cordeiro, J.M., Marieb, M., Pfeiffer, R., Calloe, K., Burashnikov, E., and Antzelevitch, C. (2009). Accelerated inactivation of the L-type calcium current due to a mutation in CACNB2b underlies Brugada syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 46, 695-703.

Cyganek, L., Tiburcy, M., Sekeres, K., Gerstenberg, K., Bohnenberger, H., Lenz, C., Henze, S., Stauske, M., Salinas, G., Zimmermann, W.H., *et al.* (2018). Deep phenotyping of human induced pluripotent stem cell-derived atrial and ventricular cardiomyocytes. *JCI Insight* 3.

El-Battrawy, I., Lang, S., Zhao, Z., Akin, I., Yücel, G., Meister, S., Patocskai, B., Behnes, M., Rudic, B., Tülümen, E., *et al.* (2016). Hyperthermia Influences the Effects of Sodium Channel Blocking Drugs in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *PloS one* 11, e0166143.

El-Battrawy, I., Zhao, Z., Lan, H., Li, X., Yücel, G., Lang, S., Sattler, K., Schünemann, J.D., Zimmermann, W.H., Cyganek, L., *et al.* (2018). Ion Channel Dysfunctions in Dilated Cardiomyopathy in Limb-Girdle Muscular Dystrophy. *Circ Genom Precis Med* 11, e001893.

El-Battrawy, I., Lan, H., Cyganek, L., Zhao, Z., Li, X., Buljubasic, F., Lang, S., Yucel, G., Sattler, K., Zimmermann, W.H., *et al.* (2018). Modeling Short QT Syndrome Using Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Journal of the American Heart Association* 7.

Felix, R., Gurnett, C.A., De Waard, M., and Campbell, K.P. (1997). Dissection of Functional Domains of the Voltage-Dependent Ca²⁺ Channel $\alpha_2\delta$ Subunit. *The Journal of Neuroscience* 17, 6884-6891.

Fink, T., Kuck, K.H., and Metzner, A. (2015). [ESC guidelines 2015 for ventricular arrhythmias and prevention of sudden cardiac death. What is new?]. *Herz* 40, 1034-1042.

Fowler, S.J., and Priori, S.G. (2009). Clinical spectrum of patients with a Brugada ECG. *Current opinion in cardiology* 24, 74-81.

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

Hanes, U., Kleinsorge, M., Roos, L., Yigit, G., Li, Y., Barbarics, B., El-Battrawy, I., Lan, H., Tiburcy, M., Hindmarsh, R., *et al.* (2020). Intronic CRISPR Repair in a Preclinical Model of Noonan Syndrome-Associated Cardiomyopathy. *Circulation* 142, 1059-1076.

Hedley, P.L., Jorgensen, P., Schlamowitz, S., Moolman-Smook, J., Kanters, J.K., Corfield, V.A., and Christiansen, M. (2009). The genetic basis of Brugada syndrome: a mutation update. *Human mutation* 30, 1256-1266.

Hu, D., Barajas-Martinez, H., Nesterenko, V.V., Pfeiffer, R., Guerchicoff, A., Cordeiro, J.M., Curtis, A.B., Pollevick, G.D., Wu, Y., Burashnikov, E., *et al.* (2010). Dual variation in SCN5A and CACNB2b underlies the development of cardiac conduction disease without Brugada syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 33, 274-285.

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

Kamakura, T., Wada, M., Ishibashi, K., Inoue, Y.Y., Miyamoto, K., Okamura, H., Nagase, S., Noda, T., Aiba, T., Yasuda, S., *et al.* (2018). Feasibility evaluation of long-term use of beta-blockers and calcium antagonists in patients with Brugada syndrome. *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* 20, f72-f76.

Kinoshita, K., Takahashi, H., Hata, Y., Nishide, K., Kato, M., Fujita, H., Yoshida, S., Murai, K., Mizumaki, K., Nishida, K., *et al.* (2016). SCN5A(K817E), a novel Brugada syndrome-associated mutation that alters the activation gating of NaV1.5 channel. *Heart rhythm* 13, 1113-1120.

Li, Y., Lang, S., Akin, I., Zhou, X., and El-Battrawy, I. (2022). Brugada Syndrome: Different Experimental Models and the Role of Human Cardiomyocytes From Induced Pluripotent Stem Cells. *Journal of the American Heart Association* 11, e024410.

Liang, P., Sallam, K., Wu, H., Li, Y., Itzhaki, I., Garg, P., Zhang, Y., Vermglinchan, V., Lan, F., Gu, M., *et al.* (2016). Patient-Specific and Genome-Edited Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Elucidate Single-Cell Phenotype of Brugada Syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 68, 2086-2096.

Lundy, S.D., Zhu, W.Z., Regnier, M., and Laflamme, M.A. (2013). Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 22, 1991-2002.

Mazzanti, A., Kanthan, A., Monteforte, N., Memmi, M., Bloise, R., Novelli, V., Miceli, C., O'Rourke, S., Borio, G., Zienciuk-Krajka, A., *et al.* (2014). Novel insight into the natural history of short QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 63, 1300-1308.

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

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.

Novak, A., Barad, L., Zeevi-Levin, N., Shick, R., Shtrichman, R., Lorber, A., Itskovitz-Eldor, J., and Binah, O. (2012). Cardiomyocytes generated from CPVTD307H patients are arrhythmogenic in response to β -adrenergic stimulation. *J Cell Mol Med* 16, 468-482.

Postema, P.G., Wolpert, C., Amin, A.S., Probst, V., Borggrefe, M., Roden, D.M., Priori, S.G., Tan, H.L., Hiraoka, M., Brugada, J., *et al.* (2009). Drugs and Brugada syndrome patients: review of the literature, recommendations, and an up-to-date website (www.brugadadrugs.org). *Heart rhythm* 6, 1335-1341.

Priori, S.G., und Blomstrom-Lundqvist, C. (2015). 2015 European Society of Cardiology Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death summarized by co-chairs. *European heart journal* 36, 2757-2759.

Priori, S.G., Wilde, A.A., Horie, M., Cho, Y., Behr, E.R., Berul, C., Blom, N., Brugada, J., Chiang, C.E., Huikuri, H., *et al.* (2013). HRS/EHRA/APQRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: document endorsed by HRS, EHRA, and APQRS in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart rhythm* 10, 1932-1963.

Qiagen 2013-2022. RNeasy Mini Handbook - (EN) October 2019 <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>. Abgerufen am 10.06.2022

Rai, M.K., Prabhu, M.A., Shenthar, J., Kumaraswamy, U.N., Vekariya, R., Kamath, P., Pai, N., Kamath, R.L., and Pillai, V. (2017). Evaluation of baseline ECG in patients undergoing Oral Flecainide Challenge test for suspected Brugada Syndrome: An analysis of lead II. *Indian Pacing Electrophysiol J* 17, 102-107.

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., *et al.* (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17, 405-424.

Richardson, C.D., Ray, G.J., DeWitt, M.A., Curie, G.L., and Corn, J.E. (2016). Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat Biotechnol* 34, 339-344.

Risgaard, B., Jabbari, R., Refsgaard, L., Holst, A.G., Haunsø, S., Sadjadieh, A., Winkel, B.G., Olesen, M.S., and Tfelt-Hansen, J. (2013). High prevalence of genetic variants previously associated with Brugada syndrome in new exome data. *Clin Genet* 84, 489-495.

Rosenfeld, M.R., Wong, E., Dalmau, J., Manley, G., Posner, J.B., Sher, E., and Furneaux, H.M. (1993). Cloning and characterization of a Lambert-Eaton myasthenic syndrome antigen. *Ann Neurol* 33, 113-120.

Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* 3, 1101-1108.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671-675.

Shenthar, J., Chakali, S.S., Acharya, D., Parvez, J., and Banavalikar, B. (2017). Oral quinine sulfate for the treatment of electrical storm and prevention of recurrent shocks in Brugada syndrome after failed cilostazol therapy. *HeartRhythm case reports* 3, 470-474.

Suttrop et al., *Harrisons Innere Medizin* (ISBN 978-3-940615-50-3), © 2016 ABW Wissenschaftsverlag

Taviaux, S., Williams, M.E., Harpold, M.M., Nargeot, J., and Lory, P. (1997). Assignment of human genes for $\beta 2$ and $\beta 4$ subunits of voltage-dependent Ca^{2+} channels to chromosomes 10p12 and 2q22-q23. *Human Genetics* 100, 151-154.

Tiburcy, M., Hudson, J.E., Balfanz, P., Schlick, S., Meyer, T., Chang Liao, M.L., Levent, E., Raad, F., Zeidler, S., Wingender, E., *et al.* (2017). Defined Engineered Human Myocardium With Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modeling and Repair. *Circulation* 135, 1832-1847.

Thermo Fisher Scientific 2020. User Guide Pierce™ BCA Protein Assay Kit. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf. Abgerufen am 11.06.2022

Thermo Fisher Scientific 2022. Pierce™ BCA Protein Assay Kit <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23227>. Abgerufen am 11.06.2022

Transparenz Gentchnik (2020): CRISPR/CasSystem. <https://www.transgen.de/lexikon/1845.crispr-cas.html>. Abgerufen 22.03.2021.

Vatta, M., Dumaine, R., Varghese, G., Richard, T.A., Shimizu, W., Aihara, N., Nademanee, K., Brugada, R., Brugada, J., Veerakul, G., *et al.* (2002). Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome. *Hum Mol Genet* 11, 337-345.

Vutthikraivit, W., Rattanawong, P., Putthapiban, P., Sukhumthammarat, W., Vathesatogkit, P., Ngarmukos, T., and Thakkinstian, A. (2018). Worldwide Prevalence of Brugada Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Acta Cardiol Sin* 34, 267-277.

Yang, X., Pabon, L., and Murry, C.E. (2014). Engineering Adolescence. *Circulation research* 114, 511-523.

Zhao, Z., Lan, H., El-Battrawy, I., Li, X., Buljubasic, F., Sattler, K., Yucel, G., Lang, S., Tiburcy, M., Zimmermann, W.H., *et al.* (2018). Ion Channel Expression and Characterization in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem cells international* 2018, 6067096.

Zhong, R., Schimanski, T., Zhang, F., Lan, H., Hohn, A., Xu, Q., Huang, M., Liao, Z., Qiao, L., Yang, Z., *et al.* (2022). A Preclinical Study on Brugada Syndrome with a CACNB2 Variant Using Human Cardiomyocytes from Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci* 23

Zwi, L., Caspi, O., Arbel, G., Huber, I., Gepstein, A., Park, I.-H., and Gepstein, L. (2009). Cardiomyocyte Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Circulation* 120, 1513-1523.

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:

Reprinted from: Brugada, J., Campuzano, O., Arbelo, E., Sarquella-Brugada, G., and Brugada, R. (2018). Present Status of Brugada Syndrome: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology* 72, 1046-1059, with permission from Elsevier

Abbildung 3: Reprinted from: Burashnikov, E., Pfeiffer, R., Barajas-Martinez, H., Delpón, E., Hu, D., Desai, M., Borggrefe, M., Häissaguerre, M., Kanter, R., Pollevick, G.D., *et al.* (2010). Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart rhythm* 7, 1872-1882, with permission from Elsevier

Abbildung 4, 6 und 9 - 19 wurden bereits veröffentlicht in: Zhong, R., Schimanski, T., Zhang, F., Lan, H., Hohn, A., Xu, Q., Huang, M., Liao, Z., Qiao, L., Yang, Z., *et al.* (2022). A Preclinical Study on Brugada Syndrome with a CACNB2 Variant Using Human Cardiomyocytes from Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci* 23

7 ANHANG

7.1 Ausführliche Methodenbeschreibung

Die verwendeten Materialien sind im tabellarischen Anhang (7.2.2) aufgelistet.

7.1.1 Immunfluoreszenz

7.1.1.1 Zellvorbereitung für Immunfluoreszenz

Im ersten Schritt wurden Objektträger mit einem 4-Kammer-Aufsatz mit 0,5ml Matrigel (1:30 verdünnt in PBS) pro Kammer beschichtet. Abhängig von der mikroskopisch sichtbaren Dichte des Zellwachstums nutzten wir 0,5 bis 2 Wells einer 24-Well Platte pro Objektträger. Die Dichte wurde vorher mikroskopisch gemessen.

7.1.1.2 Zellvereinzelung für Immunfluoreszenz

Für die Zellvereinzelung wurde zunächst das Medium aus den ausgewählten Wells abgesaugt und je 300µl der zuvor bei 37°C inkubierten Collagenase I-Lösung auf das Well gegeben. Daraufhin wurde die gesamte 24-Well Platte für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Hiernach wurden mit einer sterilen 1000µl Pipette die Zellkolonien durch ca. zehnmalsiges Auf- und Abpipettieren von der Unterlage gelöst und vereinzelt. Mehrere Wells der gleichen Zellreihe wurden mit der Collagenase I-Lösung inkubiert, die Zell-Suspension dieser Wells gemeinsam in ein 1,5ml Eppendorfcup gegeben und bei 2000rpm (250 x g) für 1 Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nachfolgend wurde der Überstand vorsichtig aspiriert. Das Zellpellet wurde mit 1ml PBS gewaschen, durch ca. fünfmaliges langsames Auf- und Abpipettieren resuspendiert, erneut bei 2000rpm für 1 Minute zentrifugiert und der Überstand vorsichtig aspiriert. Im Anschluss wurden 300µl der zuvor bei 37°C inkubierten, trypsinhaltigen TRLE-Lösung auf den Zellpellet gegeben und ca. zehnmalsig vorsichtig auf- und abpipettiert. Das Eppendorfcup wurde sofort nach Zugabe der TRLE-Lösung für 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Beenden der Trypsinwirkung wurde nach Ablauf der 2 Minuten 300µl des zuvor bei 37°C inkubierten FBS-Lösung hinzugegeben und erneut ca. zehnmalsig vorsichtig auf- und abpipettiert. Erneut wurde das Eppendorfcup bei 2000rpm für 1 Minute zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet mit 1ml des auf 37°C erwärmten, serumfreien Mediums durch ca. fünfzehnmalsiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Anschluss in ein 50ml Falcon-Tube überführt, welches mit 37°C erwärmten, serumfreien Medium gefüllt war. Das Volumen des serumfreien Mediums war hierbei abhängig von der Zielmenge der zu beimpfenden Träger. Die Zellkonzentration wurde mittels Zählung in einer Neubauer-Kammer auf $1-3 \times 10^5$ Zellen/ 6 cm-Schälchen eingestellt.

Bei der Immunfluoreszenz wurde von einer Füllmenge einer Kammer von 0,5ml bzw. eines Objektträgers von 2ml des zellreichen, serumfreien Mediums ausgegangen. Bei insuffizienter Vereinzelung wurde erneut 10-15 Mal auf- und abpipettiert. Nach Vereinzelung wurden die Objektträger mindestens 48 Stunden bei 37°C inkubiert.

Folgte die Durchführung der Immunfluoreszenz nicht direkt nach Ablauf der 48 Stunden, wurde das Medium 48-stündlich gewechselt.

7.1.1.3 Durchführung der Immunfluoreszenz

1. Tag:

Zunächst wurden die einzelnen Kammern des Objektträgers mit PBS gewaschen (dreimalig für 5 Minuten). Hierbei sowie in den nachfolgenden Schritten, wenn nicht explizit erwähnt, erfolgt die Zugabe der jeweiligen Lösung mit unsterilen Plastikpipetten.

Im zweiten Schritt folgt die Fixierung der Zellen auf den Objektträger durch Zugabe von 4%igem Formaldehyd (10 Minuten). Hiernach werden die Kammern erneut mit PBS gewaschen. Im Anschluss werden die Zellwände mithilfe von 0,5%igem Triton (0,5g/ 100ml PBS) durch 10-minütiges Inkubieren permeabilisiert. Es folgt ein erneutes Auswaschen mit PBS. Im nächsten Schritt wird 1%iges BSA (1g/ 100ml PBS) auf die Kammern gegeben und diese dann mit PBS gewaschen. Abschließend werden je 200µl der zuvor vorbereiteten primären Antikörper in die jeweilige Kammer gegeben und über Nacht bei 4°C abgedeckt inkubiert. Die Antikörper werden, wie in der untenstehenden Tabelle (Abbildung 3) aufgelistet, nach vorheriger Verdünnung in 1%igen BSA in die verschiedenen Kammern gegeben. Die Immunfluoreszenz wird mehrfach durchgeführt.

2. Tag:

Es wird zunächst ungebundener primärer Antikörper aus den Kammern mit PBS herausgewaschen. Hiernach erfolgt die Zugabe der sekundären Antikörper und eine einstündige lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur. Die Antikörper werden wie in obenstehender Tabelle (2.2) aufgeführt vorbereitet. Darauf folgend werden die Kammern erneut mit PBS gewaschen. Im letzten Schritt wird die Plastikabtrennung der Kammern mithilfe des im Lieferumfang enthaltenen Trennschiebers entfernt. Zur Darstellung der Zellkerne wird auf jede Kammer ein Tropfen DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole Dihydrochlorid) gegeben, welches sich an die DNA bindet und bläulich fluoresziert. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird auf den Objektträger ein Deckglas gelegt, das sich dank der Adhäsionskräfte fest auf den Objektträger heftet.

7.1.2 Quantifizierung der relativen mRNA-Expression

7.1.2.1 mRNA-Isolierung

Der erste Schritt zur Gewinnung der mRNA aus den Zellclustern der Kardiomyozyten ist zunächst das Lösen der Zellen vom Boden der Well-Platten. Hierfür werden 350µl einer Lösung bestehend aus RLT und beta-Mercaptoethanol (1:1000) auf das Well gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber vorsichtig abgeschabt. Danach werden sie zum Vereinzeln auf- und abpipettiert, um Zellklumpen möglichst zu vermeiden. Zur Erhöhung der mRNA Konzentration werden die 350µl des ersten Wells (mit den Zellen) auf weitere Wells aufgetragen und genauso bearbeitet. Das Zelllysat wird im Anschluss in ein „Quiashredder spin column“ gegeben und für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchfluss wird im zweiten Schritt weiterverarbeitet.

Der zweite Schritt umfasst die eigentliche Präparation der mRNA. Diese wird mithilfe des RNeasy Kits Mini durchgeführt und gemäß dem Herstellerprotokoll für „purification of total RNA from animal cells using Spin Technology“ gearbeitet. Wie in diesem Protokoll unter Punkt 5 erwähnt, wird die DNA-Kontamination mithilfe einer DNase-Lösung beseitigt. Die DNase-Lösung wird aus 10µl DNase I (RNase free) und 70µl RDD vorbereitet. Pro Probe wird die Silica-Gel Membranoberfläche der Columns mit 80µl DNase-Lösung benetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Quiagen 2019).

Die RNA-Konzentration der gewonnenen Proben wird unter Zuhilfenahme des Tecan Spark 20® gemessen. Zunächst wird eine 16-Well Readerplatte mit je 1µl destilliertem Wasser kalibriert und im Folgenden je 1µl der Proben gemessen. Messergebnisse der Proben mit einer RNA-Konzentration weniger 0,05µg/ µl werden von weiterer cDNA-Synthese ausgeschlossen.

7.1.2.2 cDNA-Synthese

Die cDNA Synthese umfasst im Wesentlichen zwei Schritte: 1. die Vorbereitung des Puffers auf die 2. Enzymaktivität der Reversen Transkriptase.

Zunächst wird die in 2.4.2 gemessene RNA-Konzentration in die untenstehende Pipettiertabelle (Abbildung 20) übertragen, welche die benötigten Volumina der weiteren Lösungen berechnet. Beispielhaft wurden hier drei Proben eingetragen und eine weitere Beispielprobe eingefügt, bei der die Befehle zur Nachvollziehbarkeit entschlüsselt worden sind (Weglassen des Gleichheitszeichens).

Pipettiertabelle für Proben mit niedrigerer Konz als 0,5µg/µl:

Nr.	Probe	RNA Konz. (µg/µl)	RNA Konz. Chip (µg/µl)	3µg RNA entspricht µl	Wasser (µl)
1	Probe 1	0.22766		13.2	12.5
2	Probe 2	0.37834		7.9	17.8
3	Probe 3	0.39753		7.5	18.2
	Beispiel	0.45		3/RNA Konz ((µg/µl)	19.7-(3/RNA Konz. - 6)

Proben-Nr.	RNA (µl)	25µM p(dT)15 (µl)	Wasser (µl)	Master-Mix (µl)
Probe 1	13.2	6.0	RT-1 Programm	12.5
Probe 2	7.9	6.0	RT-1 Programm	17.8
Probe 3	7.5	6.0	RT-1 Programm	18.2
Beispiel	WENN(3/RNA Konz. >25.7;25.7;3/RNA Konz.)	6.0	RT-1 Programm	WENN(19.7-(3/RNA Konz. - 6)<0;19.7-(3/RNA Konz. - 6)

Mastermix für Proben mit niedrigerer Konz als 0,5µg/µl (+ 3 Proben Pipettierreserve)	
kein Wasser	
54	5x RT Puffer
6	dNTP Mix (10mM je Nucleotid, entspricht 220µM Endkonz.)
13.8	RNAse Out (92 units)
2.7	BSA (10mg/ml, 100ng/µl Endkonz.)

µl AMV kurz vorher zufügen: 3.6

Abbildung 20: Exemplarische Darstellung einer Pipettiertabelle für Proben mit niedrigerer Konzentration als 0,5µg/ µl in Vorbereitung auf die cDNA-Synthese.

In Vorbereitung auf die Durchführung der Pipettiertabelle werden die RNA-Proben sowie die Lösungen auf Eis aufgetaut. Des Weiteren wird der „Mastermix“ bis auf die AMV (Reverse Transkriptase), wie exemplarisch in der Abbildung 29 in der Tabelle im untenstehenden, gelbhinterlegten Kasten aufgeführt, zusammen pipettiert. Hierfür wird ein 1,5ml Eppendorfcup verwendet. In ein mit der Probennummer beschriftete 0,5ml Eppendorfcup wird, je nach Probe, das berechnete Volumen der RNA sowie jeweils

6µl 25µM p(dT)₁₅ gegeben. Hiernach werden die Proben gevortext und anzentrifugiert. Im Anschluss werden die Proben für 4 Minuten bei 72°C (Programm RT 1) im RT-Gerät belassen. Hierbei wird die Sekundärstruktur der RNA aufgeschmolzen und der Primer p(dT)₁₅ kann sich an die RNA anlagern. Nach Ablauf der 4 Minuten werden die Proben auf Eis gelagert. Vor Zugabe des „Mastermixes“ zu den einzelnen Proben wird je Probe 0,6µl AMV zum Mastermix hinzugeben. Außerdem wird zum Volumenausgleich das berechnete Volumen Wasser hinzugeben. Wiederholt werden die Proben gevortext und anzentrifugiert. Danach werden die Proben erneut in das RT-Gerät gestellt, diesmal für 90 Minuten bei 42°C (zur Transkription) und für 10 Minuten bei 94°C (zur Denaturierung) (Programm RT 2). Nach Ablauf des Programms werden die Proben bei -4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

7.1.2.3 Quantitative Reverse Transkriptase PCR

Die quantitative Reverse Transkription PCR (q-RT-PCR) ist der letzte experimentelle Schritt zur Analyse der Genexpression.

Sie ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der 1986 durch Kary B. Mullis entwickelten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basiert (Mullis et al., 1986). Eine sehr genaue Quantifizierung der gewonnenen cDNA (welche nach Reverser Transkription der Menge an mRNA entspricht) wird durch Fluoreszenzmessungen während PCR-Zyklen möglich. Hierbei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Ein PCR-Lauf besteht aus mehreren Zyklen (maximal 40). Man sieht schon während des Laufs über Fluoreszenzsignale (Farbstoff hängt sich an die entstehende cDNA) wie die cDNA amplifiziert wird. Das ergibt eine sigmoide (Amplifikations)Kurve. Sobald die Kurve im unteren Teil das Hintergrundrauschen des Fluoreszenzsignals signifikant übersteigt, wird diese Zyklenzahl als cT-Wert genommen (cycle Threshold). Z.B. cT=12: Das heißt, nach 12 Zyklen sieht man ein Signal. Wenn in der Probe viel mRNA (bzw. cDNA) war, dann hat man kleine cT-Werte. Wenn wenig drin war, große cT-Werte. Bei jedem Zyklus wird die cDNA verdoppelt aber die tatsächliche Effizienz ist geringer. Die qPCR ist wegen der kontinuierlichen Messung über die Zyklen eine genaue quantitative Methode Die Amplifikation der cDNA mit einem genspezifischen Primer lässt den Vergleich unterschiedlicher Proben zu. Zusätzlich wird die Genexpression jeder Probe mit einem gleichmäßig exprimierten Housekeeping-Gen (hier GAPDH) normiert.

In Vorbereitung auf die q-RT-PCR wurde folgendes festgelegt: zwei technische Replikate pro cDNA-Probe sowie zwei Proben mit destilliertem, sterilem Wasser als Negativkontrolle.

Die verwendeten Primer sind in der Tabelle 2.3 gelistet und die Materialien im tabellarischen Anhang.

Das verwendete Protokoll sieht eine Vorbereitung des Mastermixes für den jeweiligen Primer vor. Für jeden Ansatz werden je 12,5µl Mastermix, 1µl Primer und 10,5µl destilliertes Wasser in ein 1,5ml steriles Eppendorfcup pipettiert. Vor Gebrauch werden die vorbereiteten Mastermixe kurz gevortext und anzentrifugiert. In jedes PCR-Tube wird zuerst 24µl Mastermix pipettiert und dann 1µl der cDNA enthaltenden Probe. Bei Zugabe der cDNA wird zum Mischen zweimal auf- und abpipettiert. Nach vollständiger Vorbereitung der PCR-Tube bzw. Platte wird diese mit einer Verschlussfolie abgeklebt und ebenfalls kurz anzentrifugiert.

Die Durchführung der PCR findet mithilfe des PCR-Gerätes (Stratagene MX 3005P realtime cycler) statt. Hierbei werden folgende Einstellungen gewählt: Messung - SYBR, Reference Dye-ROX (die ROX-Menge adjustiert bei kleinen Pipettierfehlern oder Probenverdunstung), Wells mit cDNA Proben – unknown, Wells mit Wasser-Proben – NTC (No Template Control).

Das thermische Profil enthält das Temperaturprogramm mit 40 Zyklen und einer abschließenden Schmelzkurve zur Kontrolle des Produktes. Das Programm wird wie folgt (Tabelle 7.1) eingestellt:

Tabelle 7-1: Einstellungen der q-RT-PCR am Gerät.

Zyklusnummer		Hierbei erfolgt die:
1	5 min bei 95°C	<i>DNA-Denaturierung und Taq-Aktivierung</i>
40	15 sek bei 95°C	<i>Aufschmelzen der DNA-Stränge</i>
	1 min bei 60°C	<i>Annealing + Polymerization/ Extension. Bei diesem Schritt erfolgt die Signalaufnahme</i>
Schmelzkurve	1 min bei 95°C 30sek bei 55°C Lupe „All“ hier platzieren 30sek bei 55°C	<i>„All“ bedeutet kontinuierliches Messen, während die Temperatur von 55°C auf 95°C ansteigt.</i>

Nach Beendigung des Laufs werden durch das Anwählen des Buttons „SYBR“ und Abwählen des Buttons „ROX“ die Ergebnisse angezeigt. Im Folgenden werden die Wells markiert und die Ergebnisse durch das Wählen von „Results“ angezeigt. Die Y-Achse wird hierbei auf „dRn“ eingestellt, welches für die Fluoreszenz steht. Amplifikationskurven und Dissoziationskurven können getrennt voneinander angeschaut werden. Die Ergebnisse der Wasser-Proben geben Auskunft über die Reliabilität des Primers. Bei cT-Werten größer 30-35 sind die Ergebnisse der cDNA Proben fraglich bzw. nicht verwertbar, weil möglicherweise unspezifisch.

Die Ergebnisse des Laufs werden im Programm gespeichert. Die cT-Werte werden als Text File gespeichert und wie im nächsten Abschnitt beschrieben ausgewertet.

7.1.3 Versuchsprotokoll des Western Blots

7.1.3.1 Probenaufbereitung

Zur Herstellung eines Proteingemisches findet zunächst eine Probenaufbereitung aus den Zellclustern der Zellkultur statt. Hierbei werden die Zellen mithilfe eines Lysepuffers, dem Protease- und Phosphataseinhibitoren zugesetzt werden, lysiert.

In Vorbereitung auf die Zelllyse wird zunächst der RIPA-Puffer im Verhältnis 1:100 mit den drei Inhibitoren – 1. Protease Inhibitor Cocktail, 2. Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 und 3. Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 – angesetzt. Gelagert wird der Puffer bis zur Nutzung auf Eis oder bei 4°C. Bei gut wachsenden Zellen kann pro Well (einer 24 Well-Platte) 75µl RIPA-Puffer-Gemisch verwendet werden. Hiermit sollte eine zufriedenstellende Proteinkonzentration erhalten werden. Wird eine höhere Proteinkonzentration gewünscht, sollte das Volumen pro Well reduziert werden.

Im Folgenden wird als erstes das Nährmedium der Wells abgesaugt und mit eiskaltem PBS (-/ -) gespült. Dies dient der Entfernung des Mediums und Drosselung von

Abbauprozessung sowie weiterer Proteintätigkeit der Zellen. Der Zellrasen sollte nicht austrocknen, daher schließt sich die unmittelbare Zugabe des RIPA-Puffer-Gemisches an. Mithilfe einer umgeknickten 200µl Pipettenspitze lassen sich die Zellen gut abschaben. Mehrfaches Resuspendieren des Zell-Puffer-Gemisches führt zur Zerstörung und Homogenisierung des Zellclusters und zum Proteinaufschluss (ein stark schäumenden Suspensat). Diese Suspension wird überführt in 2ml Eppendorfcups und für mindestens 10 Minuten auf Eis gelagert. Zur Trennung des gewünschten Zelllysats von den Zelltrümmern wird das Eppendorfcup mit der Probe mit 12.000 RPM bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das proteinhaltige Zelllysats kann im Anschluss als Überstand abgenommen werden und bei -20°C eingefroren werden.

7.1.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgt mittels der BCA (Bicinchoninic acid)-Methode. Die Methode basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch die Anwesenheit von Protein in einem alkalischen Medium. Die reduzierten Kupferionen reagieren mit der Bicinchoninsäure, welches als violette Färbung sichtbar wird. Der BCA/ Kupfer-Komplex ist wasserlöslich und weist eine starke lineare Absorption bei 562nm bei steigender Proteinkonzentration auf. Zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration des unbekanntes Gemisches wird eine Verdünnungsreihe mit einem Protein, wie z.B. Albumin (BSA), mit bekannter Konzentration als Standards mitgemessen (Thermo Fisher Scientific, 2022).

Zur Durchführung der Proteinkonzentrationsmessung wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kits verwendet und mithilfe des Microplate readers und der Software SoftMaxPro (5.4.1) ausgewertet.

Die für die Messung vorzubereitende Detergenzien wurden nach Herstellerprotokoll ausgeführt (Tabelle 7-2). Die Verdünnungsreihe mit 2mg/ ml Albumin (BSA) als Ausgangskonzentration wurde abweichend zum Herstellerprotokoll fortführend verdünnt (Thermo Fisher Scientific 2020).

Tabelle 7-2: Verdünnungsreihe in Vorbereitung zur Proteinkonzentrationsbestimmung.

Probe	Volumen der Verdünnung (µl)	BSA-Volumen (µl)	Finale Albumin Konzentration (µg/ ml)
A	0	300 der Ausgangskonzentration	2000
B	125	375 der Ausgangskonzentration	1500
C	325	325 der Ausgangskonzentration	1000
D	175	175 von Probe B	750
E	325	325 von Probe C	500
F	325	325 von Probe E	250
G	325	325 von Probe F	125
H	325	325 von Probe G	62,5
I	325	325 von Probe H	31,25
J	325	325 von Probe I	15,625
K	325	325 von Probe J	7,81
L	325	325 von Probe K	3,9
M	325	325 von Probe L	1,95
N	400	0	0 = BLANK

Die Proben des Proteingemisches werden vor Zugabe in die Microplate-Wells 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Ein Volumen von 10 μ l des Standards sowie der Proben wird in zweifacher Ausführung in die Microplate-Wells pipettiert. Im Anschluss wird jeweils 200 μ l der Proben A-N jedem Well hinzugeben und auf einem Laborschüttler für 30 Sekunden gemischt. Die Platte wird danach abgedeckt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Vor der Messung der Absorption bei 562nm mit dem Plate-reader sollte die Platte auf die Raumtemperatur abkühlen. In der Software SoftMaxPro (5.4.1) werden vorangehend die Probenverdünnung und die Probennummern eingegeben, dann findet eine Berechnung der Proteinkonzentration der Proben statt.

7.1.3.3 Probenvorbereitung

Zur Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Proben im Western-Blot wird die Konzentration des Proteingemisches auf 25 μ g festgelegt. Das Volumen der einzelnen Proben wird mithilfe untenstehender, beispielhafter Tabelle 7.3 berechnet. Zum Auffüllen der Probe auf ein einheitliches Volumen von 20 μ l wurde PBS sowie Laemmlipuffer zur Anfärbung der Probe verwendet. Die Protein-Probe, das PBS und der Laemmlipuffer werden nach jeweiliger Berechnung in ein Eppendorfcup überführt und für 10min bei 97°C gekocht.

Tabelle 7-3: Beispiel zur Berechnung der Probenzusammensetzung.

Prob e	Konz. (μ g/ μ l)	1 μ g = x μ l	25 μ g = x μ l	Probenvolume n (μ l) x3	PBS (μ l)	Laemml i (μ l)	Gesamtvolume n (μ l)
A	2.072420	0.4825302	12.063255	36.1897676	13.810232	10	60
	9	3	9		4		

7.1.3.4 SDS-Gele

Die Gele für die Gelelektrophorese werden am Vortag des Versuches selbst gegossen. Es werden 10% Gele von 1mm Dicke nach dem untenstehenden, tabellarischen Protokoll vorbereitet. Das Protokoll (Tabelle 7.4) enthält die Angaben für ein Gel. Hierbei erfolgt zunächst die Vorbereitung des Trenngels und des Obergels. Wobei das TEMED erst kurz vor Verwendung hinzugegeben wird. Nach der Vorbereitung der Lösungen und der dem Gel formgebenden Glasplatten wird das Gießen der Gele in 2 Teilschritte unterteilt: 1. Einfüllen des Trenngels, Überschichten mit Isopropanol und das Polymerisieren für 15 Minuten, 2. Abgießen und Absaugen des Isopropanols mittels Filterpapier, Hinzugeben des Obergels, Einsetzen eines Kammes und das erneute Polymerisieren für 15 Minuten. Nach Ablauf der 15 Minuten werden die Glasplatten, samt Gel und Kamm in wassergetränkte Papiertücher gewickelt und bis zum nächsten Tag in einer luftdichtverschlossenen Plastiktüte im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 7-4: Zusammensetzung des Trenn- und Obergels in tabellarischer Auflistung.

Trenngel	Angaben in ml	Obergel	Angaben in ml
Aqua dest.	4,0	Aqua dest.	2,8
1,5 M Tris pH 8,8	2,5	0,5 M Tris pH 8,8	1,25
10% SDS	0,1	10% SDS	0,05
10% APS	0,1	10% APS	0,05
Acrylamid	3,3	Acrylamid	0,85
TEMED	0,008	TEMED	0,005

7.1.3.5 Durchführung des Western Blots

Zunächst wird das Gel durch Sichtkontrolle auf Nutzbarkeit geprüft, wobei darauf geachtet wird, dass das Gel und die vorgeformten Taschen nicht beschädigt sind. Das Gel wird dann in die Kammer des Elektrophorese-Geräts gespannt und die innere Kammer mit frischem Laufpuffer und die äußere mit bereits einmal gebrauchten Laufpuffer befüllt. Der Laufpuffer setzt sich zusammen aus: 125mM Tris, 960mM Glycin und 0,5% SDS. Mithilfe einer Pipettierhilfe und Mikropipetten werden die Gele mit den Proben und 2 verschiedenen Markern - LMW und PrecisionPlus - beladen. Bei Raumtemperatur, einer eingestellten Spannung des Elektrophorese-Power Supplys von 80V und variabler Stromstärke für 15 Minuten und darauffolgend bei 125V für 120 Minuten, wandern die Proteine durch das Gel zur Anode und werden durch den Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. In der Zwischenzeit wird die PVDF-Membran zugeschnitten und für 10 Sekunden in 100%iges Methanol getaucht, welches zur Öffnung der Poren dient. Anschließend wird die Membran 5 Minuten in destilliertem Wasser und für mind. 10 Minuten im Blotpuffer gespült. Der Blotpuffer setzt sich zusammen aus: 25mM Tris-Base, 192mM Glycin und 20%iges Methanol gelöst in destilliertem Wasser. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wird das Gel senkrecht zum Bandenverlauf zerschnitten. Der Grund hierfür liegt in den unterschiedlich schweren Proteinen (SCN5A - 227 kDa, CACNB2 - 74 kDa, und GAPDH - 37kDa). Hierbei verläuft der Schnitt bei ca. 100kDa. Die Gele werden auf jeweils eine Membran gelegt, die wiederum nach dem Sandwichprinzip von je 2 Filtern und Schwämmen umgeben in das Blotmodul geklemmt und in die Blotkammer eingehängt wird. Die Blotkammern werden mit einem Tiefkühlaggregat beladen und mit Blotpuffer befüllt. Der Transfer des Blots verläuft bei 4°C. Für das Sandwich mit dem gesuchten Protein bei 227kDa (SCN5A) wird bei variabler Spannung und einer Stromstärke von 0,2A für 6 Stunden transferiert. Der Transfer des anderen Sandwiches findet für 90 Minuten bei variabler Spannung und einer Stromstärke von 0,2A in einer separaten Blotkammer statt. Als Nachweis für die Übertragung der Proteine auf die Membran wird die Membran für 10 Minuten in Ponceaurot gefärbt, anschließend kurz mit destilliertem Wasser gespült und zwischen zwei Folien liegend eingescannt. Anschließend wird das Molekulargewicht der Marker LMW und Precision Plus mit einem Kugelschreiber auf die Membran übertragen. Die Membran wird bei ca. 45kDa zerschnitten. Danach folgt das Blocken (der freien Bindungsstellen) bei dem die Membran zunächst für 60 Minuten bei Raumtemperatur in 5%iges Milchpulver in 0,1% TBST (1x TBS, Tween 20 0,1%) gelegt wird und anschließend zweimalig gespült wird.

Schließlich werden die Membranstreifen getrennt voneinander über Nacht (ca. 12-18h) in die jeweiligen, gesuchten Primärantikörper (Tabelle 2-5) verdünnt in 5% Milchpulver in 0,1% TBST, gelegt.

Vor der Inkubation mit dem sekundären Antikörper werden die Membranstreifen dreimal kurz mit 0,1% TBST gespült und anschließend dreimal für 10 Minuten in 0,1% TBST gewaschen. Auch die sekundären Antikörper (Tabelle 2-5) werden in 5% Milchpulver in 0,1% TBST verdünnt. Die Membranstreifen verbleiben für 60 Minuten bei Raumtemperatur in den sekundären Antikörpern und werden daraufhin wie nach der ersten Antikörperinkubation gespült und gewaschen.

Zur Detektion der Proteinbanden der gesuchten Proteine CACNB2, SCN5A und GAPDH werden die Membranstreifen zunächst wieder als Ganzes auf einer durchsichtigen Folie zusammengesetzt. Als Entwicklerreagenz dient SuperSignal™, welches nach Herstellerangabe 1:1 gemischt und verwendet wird. Die Belichtung der Membran erfolgt durch Fusion Solo System (Vilber, France).

7.2 Tabellarischer Anhang

7.2.1 Zusammensetzung der Patch-Clamp Ionenlösungen

Tabelle 7-5: Zusammensetzung der extrazellulären und Pipettenlösung zur Messung der einzelnen Ionenströme mittels Patch-Clamp-Verfahren.

Gemessener Ionenstrom	Ionenstrommessspezifische Lösung
I_{Ca-L}	
- Extrazelluläre Lösung	140mmol/ L TEA-Cl 5mmol/ L CaCl ₂ 1mmol/ L MgCl ₂ 10mmol/ L HEPES 0.003mmol/ L E-4031 0.02mmol/ L TTX 3mmol/ L 4-AP (pH 7.4 (CsOH))
- Pipettenlösung	10mmol/ L NaCl 135mmol/ L CsCl 2mmol/ L CaCl ₂ 3mmol/ L MgATP 2mmol/ L TEA-Cl 5mmol/ L EGTA 10mmol/ L HEPES (pH 7.2 (CsOH))
Aktionspotentialmessungen	
- Extrazelluläre Lösung	130 mmol/ L NaCl 5.9 mmol/ L KCl 2.4 mmol/ L CaCl ₂ 1.2 mmol/ L MgCl ₂ , 11 mmol/ L Glukose 10 mmol/ L HEPES (pH 7.4 (NaOH)).
- Pipettenlösung	6 mM NaCl 126 mM KCl 1.2 mM MgCl ₂ 10 mM HEPES 5 mM EGTA 11 mM Glukose 1 mM MgATP (pH 7.4 (KOH))
Calcium Transient	
- Extrazelluläre Lösung	130 mmol/ L NaCl 5. mmol/ L KCl 2.4 mmol/ L CaCl ₂ 1.2 mmol/ L MgCl ₂ 11 mmol/ L Glukose 10 mmol/ L HEPES (pH 7.4 (NaOH))

7.2.2 Verwendete Materialien in den verschiedenen Methoden

Tabelle 7-6: Auflistung der verwendeten Materialien in der Stammzellkultivierung, Differenzierung und im allgemeinen Laborbedarf.

Produktname im Text	Produktname, Hersteller, Produktnummer
5 ml Pipette	Falcon® 5ml Serological Pipet, Nr.: 357543, Polystyrene, 5ml Pipette 0.1 Increments, Individually Packed, Sterile
10 ml Pipette	Falcon® 10ml Serological Pipet, Nr.: 357551, Polystyrene, 0.1 Increments, Individually Packed, Sterile
25 ml Pipette	Falcon® 25ml Serological Pipet, Nr.: 357525, Polystyrene, Space Saver, 0.25 Increments, Falcon® Sterile
0,5 ml Eppendorfcup	Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0.5 ml, Eppendorf Biopur®, Nr.: 30121570 farblos, 50 Stück, einzeln verpackt
1,5 ml Eppendorfcup	Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1,5ml Eppi Eppendorf Biopur®, Nr.: 30121589 farblos, 100 Stück, einzeln verpackt
2,0 ml Eppendorfcup	Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2.0 ml, Eppendorf Biopur®, Nr.: 30121597, farblos, 100 Stück, einzeln verpackt
15ml Tube	Falcon® 15ml High Clarity PP Centrifuge 15ml Tube Tube, Conical Bottom, with Dome Seal Falcon® Nr.: 352096 Screw Cap, Sterile
50ml Tube	Falcon® 50ml High Clarity PP Centrifuge Tube, Conical Bottom, Nr.: 352070, Sterile
10 µL Pipette	ep Dualfilter T.I.P.S.® volume × L 0.1-10 µL × 34 mm (dark grey), Nr.: 30077806
200 µL Pipette	ep Dualfilter T.I.P.S.® volume × L 2-200 µL × 55 mm (yellow), Nr.: 30077547
1000 µL Pipette	ep Dualfilter T.I.P.S.® volume × L 50-1,000 µL × 76 mm (blue), Nr.: 30077541
Pasteupipetten	Pasteurpipetten, lange Form, aus Glas, ISO 7712, Hirschmann Nr.: 9260101
Vac-Filter	EMD Millipore Stericup™ Sterile Vacuum Filter Units 250 ml, Nr.: SCGPU02R E
Parafilm	Parafilm M Verschlussfolie 10 cm x 38 m – 4 In. x 125 Ft, Merz Pharma GmbH & Co. KGaA, Nr.: 701605
Flächen-Desinfektionsmittel	antifect® N liquid 1 l Flasche, Schülke+, Nr.: 113940
Autoklavierband	Sterilisations-Klebeband, Autoklavierband, mit Indikator, Dampf, P+W Medizintechnik, Nr.: 13662
Activin A	Recombinant Human/ Mouse/ Rat Activin A Protein, R&D Systems, Nr.: 338-AC-010
ALB	Albumin Human, Sigma-Aldrich, Nr.: A9731

Aqua dest., destilliertes Wasser	AMPUWA für Spülzwecke Plastipur, Fresenius Kabi, Nr.: 4801694
ASC	L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate, Sigma-Aldrich, Nr. A8960-5G
B-27	B-27® Supplement (50X), serum free, Gibco®, Nr.: 17504001
BMP-4	Recombinant Human BMP-4 Protein, R&D Systems, Nr.: 314-BP-010
BSA	Albumin, Rind, Fraktion V, pH 7.0, SERVA Electrophoresis GmbH, Nr.: 11930.03
CHIR	StemMACS CHIR99021, Miltenyi Biotec GmbH, Nr.: 130-103-926
DNEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco®, Nr.: 41966029
DMSO	Dimethyl sulfoxide, Sigma-Aldrich, Nr.: D8418
E8-Medium	TeSRTM-E8TM, StemCell Technologies, Nr.: 05990
EDTA	0,5 M EDTA Stock Solution (pH 8.0), AppliChem GmbH, Nr.: A4892.0500
Ethanol	Ethanol 70%, VWR, Nr.: APPCA0913.1000
FBS	Fetal Bovine Serum, qualified, EU approved, South America origin, ThermoFisher Scientific, Nr.: 10270106
FGF-2	Human FGF-2, premium grade, Miltenyi Biotec GmbH, Nr.: 130-093-841
HEPES	HEPES (1M), ThermoFisher Scientific, Nr.: 15630080
IPW-4	IPW-4, StemCell Technologies, Nr.: 72552
Laminin	Laminin from mouse Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) sarcoma, Roche, Nr.: 11243217001
Matrigel	Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR), Corning Inc., Nr.: 354230
MCE	2-Mercaptoethanol (50 mM), Gibco®, Nr.: 31350010
NaCl	Sodium chloride, ReagentPlus®, ≥99%, Sigma-Aldrich, Nr.: S9625
NaPyr	SodiumPyruvate (100nM), Gibco®, Nr.: 11360039
PBS -/-	DPBS, no calcium, no magnesium, Gibco®, Nr.: 14190144
Pen/ Strep	Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml), Gibco®, Nr.: 15140122
ROCK- Inhibitor	StemMACS Y27632, Miltenyi Biotec GmbH, Nr.: 130-103-922

RPMI	RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement, ThermoFisher Scientific, Nr.: 61870
RPMI-glutamax	RPMI 1640 Medium, no glutamine, Biological Industries, Nr.: 01-101-1A
SLS	Sodium DL-lactate solution, Sigma Aldrich, Nr. 71723-1L
Trypsin	Trypsin-EDTyaA (0.25%), phenol red, Gibco®, Nr.:2520 0056
24-Wellplatte	24 Well Clear Flat Bottom TC-Treated 24-Wellplatte Multiwell Cell Culture Plate, with Lid, Sterile, Falcon®, Nr.: 353047
Glasschälchen	µ-Dish 35 mm, high, Uncoated: Ø 35 mm, high wall (2 ml volume), #1.5 plymer coverslip, hydrophobic, sterilized, ibidi, Nr. 81151
Zellkulturflasche/ T-75 Flasche	75cm ² Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Vented Cap, Falcon®, Nr.: 353136
Medieninkuabtor	BE500 Brutschrank, Memmert GmbH & Co. KG
Sterilbank	HERAsafe, Heraeus

Tabelle 7-7: Auflistung der verwendeten Materialien in der m-RNA- Isolierung.

Produktname im Text	Produktname, Hersteller, Produktnummer
Buffer RDD	Im Lieferumfang des „RNase-Free DNase Set“ enthalten
DNase I (RNase free)	RNase-Free DNase Set, Quiagen, Nr. 79254
Quiashredder spin column	QIAshredder(250), Quiagen, Nr. 79656
RLT	Im Lieferumfang des „RNeasy Kits Mini“ enthalten
RNase-Free Water	Im Lieferumfang des „RNase-Free DNase Set“ enthalten
RNeasy Kits Mini	RNeasy Mini Kit (250), Quiagen, Nr. 74106
Tecan Spark 20	Tecan SPARK 20M NanoDrop
Zellschaber	Corning™ Falcon™ Cell Scrapers, ThermoScientific, Nr. 353085

Tabelle 7-8: Auflistung der verwendeten Materialien in der cDNA- Synthese.

Produktname im Text	Produktname, Hersteller, Produktnummer
----------------------------	---

25µM p(dT)₁₅-Primer	25µM p(dT) ₁₅ -Primer for cDNA Synthesis (40µg, 8nmol), Roche, Nr. 814270,
5x RT-Puffer	Im Lieferumfang „AMV“ enthalten
AMV	Reverse Transcriptase AMV, Roche/ Sigma-Aldrich, Nr. 10109118001,
BSA	BSA 20mg/ ml, Roche/ Sigma-Aldrich, Nr. 10711454001
Collection Tubes	Collection Tubes (2 ml), Qiagen, Nr. 19201
dNTP Mix	dNTP Mix (10 mM each), Invitrogen, Nr. 18427013
RNaseOUT	RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40U/ µl), Invitrogen, Nr. 10777-019
RT-Gerät	Peqstar, Peqlab Biotechnologie GmbH

Tabelle 7-9: Auflistung der verwendeten Materialien in der q-RT-PCR.

Produktname im Text	Produktname, Hersteller, Produktnummer,
16-Well Readerplatte	
Mastermix	Sibir Rox Hot Mastermix(2x) mit ROX Hot Master Mix low ROX, Bioron, Nr. 1194505
PCR-Gerät	Mx3005PTM realtime cyclers, Stratagene®
PCR-Platten	50x96er PCR-Platten fest, rahmenlos, Axon Labortechnik, Nr.: 27678

Tabelle 7-10: Auflistung der verwendeten Primer in der q-RT-PCR zum Nachweis der relativen Expressionsstärke der Ionenkanaluntereinheiten mit Angabe der Reference Sequence Nummer (RefSeq Nr.) der GenBank NCBI Reference Sequences, Herstellerangaben sowie der Produktnummern der Primer.

Primernamen im Text	RefSeq Nr.	Produktname, Hersteller, Produktnummer
CACNA1C	NM_000719	RT ² qPCR Primer Assay for Human CACNA1C Quiagen, Nr.: PPH01378G
CACNB2	NM_000724	RT ² qPCR Primer Assay for Human CACNB2 Quiagen, Nr.: QT00011256
GAPDH	NM_002046	RT ² qPCR Primer Assay for Human GAPDH, Quiagen, Nr.: PPH00150F
KCNH2	NM_000238	RT ² qPCR Primer Assay for Human KCNH2, Quiagen, Nr.: PPH01660A
KCNIP2	NM_014591	RT ² qPCR Primer Assay for Human KCNIP2, Quiagen, Nr.: QT00016254
KCNJ2	NM_000891	RT ² qPCR Primer Assay for Human KCNJ2, Quiagen, Nr.: PPH01618E

KCNQ1	NM_000218	RT ² qPCR Primer Assay for Human KCNQ1, Quiagen, Nr.: PPH01419A
POUF1	NM_002701.5	RT ² qPCR Primer Assay for Human POU5F1, Quiagen, Nr.: PPH02394E
SCN10A	NM_006514	RT ² qPCR Primer Assay for Human SCN10A, Quiagen, Nr.: PPH15064A
SCN1B	NM_001037	RT ² qPCR Primer Assay for Human SCN1B, Quiagen, Nr.: QT00066080
SCN3B	NM_018400	RT ² qPCR Primer Assay for Human SCN3B, Quiagen, Nr.: PPH07274A
SCN5A	NM_000335	RT ² qPCR Primer Assay for Human SCN5A, Quiagen, Nr.: PPH01671F
TNNI3	NM_001112808	RT ² qPCR Primer Assay for Human TNNI3, Quiagen, Nr.: PPH02622G
TNNT2	NM_000364	RT ² qPCR Primer Assay for Human TNNT2, Quiagen, Nr.: PPH02619A

Tabelle 7-11: Auflistung der verwendeten Materialien im Rahmen der Western Blot-Versuche.

Produktname im Text	Produktname, Hersteller, Produktnummer
2ml Eppendorfcups	Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2.0 ml, Eppendorf Biopur®, Nr. 30121597, farblos, 100 Stück, einzeln verpackt
Acrylamid	Rotiphorese® Gel 30 (37, 5:1), Carl Roth GmbH, Nr.: 3029.1,
APS	Ammonium Persulfate, BIO-RAD, Nr.: 7727-54-0
destilliertem Wasser, Aqua dest.	AMPUWA für Spülzwecke Plastipur, Fresenius Kabi, Nr. 4801694
Laemmli	6x Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad Laboratories Inc. Nr.: 1610747
LMW	LMW-Protein Standard
Mikropipette	Reference® 2, eppendorf
Mikroplate reader	VERSAmax tunable microplate reader, Molecular Devices LCC
Milchpulver	Milchpulver Blotting grade, pulv., fettarm, Carl Roth GmbH, Nr.: T145.3,
PBS (-/ -)	DPBS, no calcium, no magnesium, Gibco™, Nr.: 14190144
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, Sigma-Aldrich, Nr.: P5726
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Phosphatase Inhibitor Cocktail 3, Sigma-Aldrich, Nr.: P0044
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Prodnr.: 23227, Lotnr.: QJ223183
Ponceau	Ponceau S Lösung BioReagent, suitable electrophoresis, 0.1% (w/v) in 5% acetic acid, Sigma-Aldrich, Nr.: P7170

PrecisionPlus	Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards, BioRad, Nr.: 161-0373
Protease-Inhibitor Cocktail	Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, Nr.: P8340
PVDF-Membran	Transfermembran Immobilon®-P PVDF, Merck Millipore, Nr.: T831.1
RIPA-Puffer	RIPA-Buffer, Sigma-Aldrich, Nr.: R0278
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Sigma Aldrich, Nr.: 436143
SuperSignal™	SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, ThermoFisher SCIENTIFIC, Prodnr.: 34096, Lotnr.: SB244813
TBS	Tris Buffered Saline, powder for 100 ml of 10X, Santa Cruz Biotechnology, Nr.: sc-362188
Temed	TEMED: tetramethylethylenediamine, BIO-RAD, Nr.: 110-18-9
Tris-HCl/ Tris Base	Tris-HCl: Tris(hydroxymethyl)aminomethan·Hydrochlorid, SERVA, Nr.: 39787.01
Tween 20	Tween® 20 (Polysorbat), Sigma-Adrich, Nr.: 9005-64-5
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.

Tabelle 7-12: Auflistung der verwendeten Materialien im Rahmen der Immunfluoreszenzmikroskopie-Versuche.

Produktname im Text	Produktname, Hersteller, Produktnummer
1,5 ml Eppendorfcup	Safe-Lock Tubes 1.5ml, Eppendorf AG, Nr.: 0030 121.589
1000µl-Pipette	Eppendorf® ep Dualfilter T.I.P.S.® volume × L 50-1,000 µL × 76 mm, Sigma Aldrich, Nr.: 30077541
24-Well-Platte	Falcon® 24 Well Clear Flat Bottom TC-Treated Multiwell Cell Culture Plate, with Lid, Sterile, Thermo Fisher Scientific, Nr.: 353047
50ml Falcon-Tube	Falcon™ 50ml Polypropylene Conical Tube 30x115mm style, Thermo Fisher Scientific, Nr.: 352070
BSA 1%(w/ v)	Bovine Serum Albumin heat shock fraction, pH 7, ≥98%, Sigma, Nr.: A7906
Collagenase I-Lösung	Collagenase, Type 1, CLS-1, Worthington Biochemical Corporation, Nr.: LS004196
DAPI	Mounting Medium for Fluorescence with DAPI, Vectashield® Maraval Lifescience, Nr.: H-1200
Deckgläser	Thermo Scientific™ Nunc™ Lab-Tek™ Kammerdeckgläser, ThermoFisherScientific, Nr.: 10384221
FBS-Lösung	FBS, Fetal Bovine Serum, Gibco™, Nr.: 10270106,
Formaldehyd 4%	Roti®-Histofix 4%, ROTH, Nr.: P087.4

IF-Kamera	LEICA DFC 450C, Leica
IF-Mikroskop	LEICA DFC 3000G, Leica
ImageJ Protokoll und Software	https://www.slu.se/contentassets/a454886b9b154b189ae2a7ded6baa4db/pacho-imagej-measuring-cell-fluorescence.pdf)
Matrigel	Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix, *LDEV-Free, 10mL, Corning, Nr.: 354230
Mikroskop (Zellkulturlabor)	LEICA DML, Leica
Objektträger mit einem 4-Kammer-Aufsatz	Falcon™ Chambered Cell Culture Slides, Thermo Fisher Scientific, Nr.: C354104
PBS (-/ -)	DPBS, no calcium, no magnesium, Gibco™, Nr.: 14190144
Plastikpipetten	Pasteur-Plast Pipetten 3ml Makro graduert, 150mm, unsteril, ratiolab®, Nr.: 2600111
Serumfreies Medium	Zusammensetzung siehe Tiburcy et al., 2017
Triton 0,5% (w/ v)	Triton™ X-100, Sigma Aldrich, Nr.: STBH4686
TRLE-Lösung	TrypLE™ Express Enzyme (1X), phenol red, Gibco™, Nr.: 12605010

Tabelle 7-13: Auflistung der verwendeten Materialien im Rahmen der Patch-Clamp-Versuche.

Produktname im Text	Produktname, Hersteller, Produktnummer
4-AP	4-Aminopyridine, Sigma-Aldrich, Nr.: 275875
Asparaginsäure	L-Aspartic acid potassium salt, Fluka, Nr.: 11240
Borosilicat Glaskapillaren	Standard Glass Capillaries, world Precision Instruments, Inc., Nr.: MTW 150F
CaCl₂	Calcium chloride dihydrate, Sigma-Aldrich, Nr.: C-3881
CsOH	Cesium hydroxide monohydrate, Fluka, Nr.: 21000-10G-F
Dihydroouabain	Dihydroouabain, Sigma-Aldrich, Nr.: D9267
DMZ-Puller	DMZ-Universal Puller, Zeitz-Instrumente Vertriebs GmbH
EGTA	Ethylene glycol-bis(2- aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid, Sigma-Aldrich, Nr.: E-4378
Glasschälchen (mit Deckel)	µ-Dish 35 mm, high, Ibidi®, Nr.: 81156
Glukose	D(+)-Glucose monohydrate, Merck KGaA, Nr.: 1.04074.1000
HEPES	HEPES (1M), Gibco®, Nr.: 15630-080

InStat©	GraphPad Software Inc., Version 2018
KCl	Potassium chloride, Sigma-Aldrich, Nr.: P-4504
KOH	Kaliumhydroxid, Merck KGaA, Nr.: 105033
MgCl₂	Magnesium chloride hexahydrate, Sigma-Aldrich, Nr.: M0250
Mikroelektrodenverstärker	KMO2 electronic, Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik
NaCl	Sodium chloride, Sigma-Aldrich, Nr.: S9625
NaOH	Sodium hydroxide, Sigma-Aldrich, Nr.: S5881
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
pClamp/ ClampFit	Molecular Devices LLC, Version 10.2
SigmaPlot 11.0	Systat GmbH, Version 11.0
TEA-CI	Tetraethylammonium chloride, Sigma-Aldrich, Nr. T2265

8 PUBLIKATIONEN

Zhong, R., Schimanski, T., Zhang, F., Lan, H., Hohn, A., Xu, Q., Huang, M., Liao, Z., Qiao, L., Yang, Z., *et al.* (2022). A Preclinical Study on Brugada Syndrome with a CACNB2 Variant Using Human Cardiomyocytes from Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci* 23.

El-Battrawy, I., Schimanski, T., Lan, H., Cyganek, L., Zhao, Z., Lang, S., Dieke, S., Zimmermann, W.H., Utikal, J., Wieland, T., Rudic, B., Borggrefe, M., Zhou, X.B., Akin, I. (2018) A cellular model of Brugada Syndrome with CACNB2-mutation of human-induced pluripotent stemcell-derived cardiomyocytes. Abstractnr.: 84113, rapid fire abstracts (Vortrag), ESC-Kongress, München

El-Battrawy, I., Schimanski, T., Xi, Y., Cyganek, L., Lan, H., Zhao, Z., Li, X., Lang, S., Zimmermann, W.H., Utikal, J., Wieland, T., Borggrefe, M., Zhou, X.B., Akin, I. (2018). Modelling Brugada syndrome by using hiPSC. Poster. Jahrestagung der DGK, Mannheim

El-Battrawy, I., Schimanski, T., Xi, Y., Cyganek, L., Lan, H., Zhao, Z., Li, X., Lang, S., Tiburcy, M., Zimmermann, W.H., Utikal, J., Wieland, T., Borggrefe, M., Zhou, X.B., Akin, I. (2017) Modelling Brugada syndrome by using hiPSC. Poster. DZHK Standortretreat, Bad Schönborn

9 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Schimanski, Theresa
Geburtsdatum: 12.04.1987
Geburtsort: Viersen

SCHULISCHER WERDEGANG

1997 – 2006 Gymnasium an der Gartenstraße, Mönchengladbach
10.06.2006 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2013/ 14 Beginn des Studiums (Humanmedizin)
 An der Medizinischen Fakultät Mannheim der Ruprecht-
 Karls-Universität zu Heidelberg
14.09.2015 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
2015 – 2019 Hauptstudium
11.04.2019 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
03.12.2020 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)

10 DANKSAGUNG

Herrn PD Dr. med. Ibrahim El-Battrawy danke ich für die Überlassung des hochinteressanten Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es unter seiner Leitung zu bearbeiten.

Herrn PD Dr. med. Ibrahim El-Battrawy danke ich zudem besonders für die Betreuung, seine ständige Erreichbarkeit und für die Durchsicht meiner Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors für den fachlichen Austausch, die Unterstützung und die wertvollen Anregungen.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. rer. nat. S. Lang, der Laborleitung der 1. Medizinischen Klinik, der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg, der mir zum Verständnis vieler Methoden verhalf, mir wichtige sachliche Hinweise gab und zuletzt für die Durchsicht meiner Arbeit.

Ebenso danke ich O. Dieser und R. Lücke für die Durchsicht meiner Arbeit. Ein herzliches Dankeschön geht auch an meine Familie und Freunde, die mich bei der Vollendung dieser Arbeit unterstützt haben.