

**Aus dem Deutschen Zentrum für Herzinsuffizienz der Medizinischen Fakultät  
der Universität Würzburg**

Sprecher: Professor Dr. med. Christoph Maack

**Auswirkungen eines Tandem-Peptids  
auf den intrazellulären Kalziumhaushalt und Arrhythmien  
von humanen iPS-Kardiomyozyten mit Mutationen in desmosomalen Proteinen**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Annika Hartleb**

aus Maroldsweisach

Würzburg, August 2022



**Referentin:** Prof. Dr. med. Brenda Gerull

**Korreferent:** Prof. Dr. med. Christoph Maack

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 18.04.2023

**Die Promovendin ist Ärztin.**

# Inhaltsverzeichnis

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Einleitung.....   | 1  |
| 1.1   | Arrhythmogene Kardiomyopathie.....  | 1  |
| 1.1.1 | Desmosomale Genmutationen .....   | 2  |
| 1.1.2 | Pathogenese .....   | 4  |
| 1.2   | Elektrische Aberrationen und Arrhythmien bei arrhythmogener Kardiomyopathie .....                 | 6  |
| 1.2.1 | Physiologische elektromechanische Kopplung, Kalziumhaushalt und Aktionspotential.....             | 6  |
| 1.2.2 | Elektromechanische Pathophysiologie bei arrhythmogener Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz ..... | 10 |
| 1.2.3 | Entstehung von Arrhythmien .....  | 12 |
| 1.3   | Tandem-Peptid als Therapie-Ansatz.....  | 16 |
| 1.3.1 | Aufbau des Tandem-Peptids und Theorie der Wirkweise .....   | 16 |
| 1.3.2 | Forschungsergebnisse zur Wirkung des Tandem-Peptids.....  | 19 |
| 1.4   | Stammzell-abgeleitete Kardiomyozyten.....   | 21 |
| 1.4.1 | Modellierung von Erkrankungen mit Kardiomyozyten aus hiPS.....                                    | 21 |
| 1.4.2 | Zellreifung der hiPS-Kardiomyozyten .....   | 22 |
| 1.5   | Fragestellungen und Hypothesen der Arbeit .....   | 25 |
| 2     | Material und Methoden.....  | 28 |
| 2.1   | Material.....   | 28 |
| 2.1.1 | Zellkultur.....   | 28 |
| 2.1.2 | IonOptix-Kalziummessungen.....  | 30 |
| 2.1.3 | Software .....  | 32 |
| 2.2   | Methoden .....  | 33 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.2.1 | Zelllinien und ihre Charakterisierung .....   | 33 |
| 2.2.2 | Zellkultur .....  | 34 |
| 2.2.3 | IonOptix-Kalziummessungen .....   | 39 |
| 2.2.4 | Messprotokoll der <i>Mattress</i> -Etablierung .....  | 48 |
| 2.2.5 | Messprotokoll des Versuchs der Tandem-Peptid-Anwendung .....  | 51 |
| 2.2.6 | Auswertung .....  | 53 |
| 2.2.7 | Statistische Analyse .....  | 59 |
| 3     | Ergebnisse .....  | 60 |
| 3.1   | Etablierung von Kultivierungsbedingungen, die zur Reifung von hiPS-Kardiomyozyten führen .....  | 60 |
| 3.1.1 | Anwendung von Matrigel-Linien, sogenannten <i>Mattresses</i> , zur beschleunigten Reifung .....   | 60 |
| 3.1.2 | Anwendung von Hormonen zur beschleunigten Reifung .....   | 61 |
| 3.1.3 | Einfluss der Kultivierungszeit auf die elektrische Stimulierbarkeit der PKP2-KO-Kardiomyozyten im Vergleich zu Kontrollen .....                 | 67 |
| 3.2   | Vergleichende phänotypische Analyse von PKP2-KO- und Kontroll-Kardiomyozyten bei unterschiedlichen extrazellulären Kalziumkonzentrationen ..... | 71 |
| 3.2.1 | Vergleich der Stimulierbarkeit von Kontroll- und PKP2-KO-Kardiomyozyten bei unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen .....                      | 71 |
| 3.2.2 | Kontraktionsfrequenz und der zugehörige relative Fehler als Maß für Arrhythmien im Vergleich der PKP2-KO-Zellen mit der Kontrolllinie .....     | 72 |
| 3.2.3 | Auswertung der Kalziumkonzentrationen und -amplituden im Vergleich der PKP2-KO- und Kontroll-Kardiomyozyten .....                               | 77 |
| 3.2.4 | Schlussfolgerungen aus der phänotypischen Charakterisierung der PKP2-KO-KM und der Anpassung des Versuchsprotokolls .....                       | 80 |
| 3.3   | Auswirkung eines Tandem-Peptids auf den Kalziumhaushalt von PKP2-KO- und DSG2-KO-Kardiomyozyten .....   | 81 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 3.3.1 | Diastolische und systolische intrazelluläre Kalziumkonzentrationen .....  | 82  |
| 3.3.2 | Amplituden der intrazellulären Kalziumkonzentrationen.....  | 86  |
| 3.3.3 | Relaxationszeiten als Maß der Geschwindigkeit des zytosolischen Kalziumausstroms .....                                    | 88  |
| 3.3.4 | Zeitkonstante $\tau$ zur Objektivierung der Kalzium-Ausstromgeschwindigkeit .....   | 91  |
| 3.3.5 | <i>Time to peak</i> als Maß der zytosolischen Kalzium-Einstromgeschwindigkeit aus dem sarkoplasmatischen Retikulum .....  | 92  |
| 3.3.6 | Zellkontraktion .....   | 94  |
| 3.4   | Analyse der Arrhythmien von PKP2-KO- und DSG2-KO-Kardiomyozyten .....   | 95  |
| 3.4.1 | Anteil arrhythmischer Kardiomyozyten und Auswirkungen des Tandem-Peptids auf die drei Zelllinien .....                    | 95  |
| 3.4.2 | Unterscheidung unterschiedlicher Arrhythmien anhand der Konfiguration der Kalziumtransienten.....                         | 97  |
| 3.4.3 | Quantifikation der Arrhythmien anhand von Beispiel-Zellen der PKP2-KO-Zelllinie .....                                     | 101 |
| 4     | Diskussion.....   | 103 |
| 4.1   | Vor- und Nachteile von verschiedenen Faktoren und Protokollen, die die Reifung von hiPS-Kardiomyozyten beeinflussen ..... | 103 |
| 4.1.1 | Wirksamkeit der <i>Mattress</i> -Kultivierung .....   | 103 |
| 4.1.2 | Wirksamkeit der Hormone zur beschleunigten Reifung .....  | 105 |
| 4.1.3 | Limitationen der Experimente bezüglich der Reife von hiPS-Kardiomyozyten .....  | 106 |
| 4.2   | Veränderte Kalziumhomöostase und Arrhythmien bei PKP2-KO- und DSG2-KO-Kardiomyozyten .....                                | 109 |
| 4.2.1 | Erhöhte diastolische Kalziumkonzentrationen und erniedrigte Amplituden der mutationstragenden Kardiomyozyten.....         | 109 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 4.2.2 | Beschleunigte Kalzium-Relaxation der mutationstragenden Kardiomyozyten .....                               | 111 |
| 4.2.3 | Vermehrte Arrhythmien bei PKP2-KO-KM und Verbesserung bei $\beta$ -adrenerger Stimulation .....            | 116 |
| 4.2.4 | Unterschiede der Arten von Arrhythmien zwischen den Zelllinien .....                                       | 119 |
| 4.3   | Wirkung des Tandem-Peptids auf die Kalziumhomöostase und Arrhythmien von PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM .....   | 122 |
| 4.3.1 | Senkung der diastolischen Kalziumkonzentrationen durch das Tandem-Peptid bei den Mutationszelllinien ..... | 122 |
| 4.3.2 | Limitierte Wirkung des Tandem-Peptids auf die Kalziumhomöostase ..   | 123 |
| 4.4   | Allgemeine Limitationen der Methodik.....  | 126 |
| 4.5   | Fazit und Ausblick .....   | 128 |
| 5     | Zusammenfassung.....   | 130 |
| 6     | Literaturverzeichnis.....  | 132 |
|       | Anhang.....  |     |
|       | I Zusätzliche Tabellen und Abbildungen.....  |     |
|       | II Abkürzungsverzeichnis .....   |     |
|       | III Abbildungsverzeichnis .....  |     |
|       | IV Tabellenverzeichnis .....   |     |
|       | V Danksagung .....   |     |
|       | VI Veröffentlichung.....   |     |

# 1 Einleitung

## 1.1 Arrhythmogene Kardiomyopathie

Die arrhythmogene Kardiomyopathie (ACM) ist eine genetisch bedingte Herzmuskelerkrankung (Pilichou et al. 2016), bei der Herzmuskelgewebe durch Bindegewebe und Fettgewebe ersetzt wird (Basso et al. 1996). In der Literatur wird die ACM durch die Atrophie des Myokards, vor allem im rechten Ventrikel, definiert. Ursprünglich noch als „arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)“ bezeichnet, wird heute zunehmend der umfassendere Begriff der ACM verwendet. Dies beruht auf der Beobachtung, dass vermehrt Fälle beschrieben wurden, die sich früh und dominant linksventrikulär manifestierten (Sen-Chowdhry et al. 2007). Zugrunde liegen bei ungefähr der Hälfte der Erkrankten Mutationen in desmosomalen Genen. Die Krankheit äußert sich häufig durch Arrhythmien, teilweise bis hin zum plötzlichen Herztod (Pilichou et al. 2016).

Die Prävalenz der ACM wird auf 1:1000 bis 1:5000 geschätzt, wobei die Differenzen auf häufige Fehldiagnosen zurückgehen können. Gleichzeitig ist ACM einer der häufigsten Gründe für den plötzlichen Herztod bei jungen Menschen. Dieser tritt gehäuft in der Altersspanne von ungefähr 13 bis 30 Jahren auf (Corrado, Basso, and Judge 2017). Die Betroffenen erkranken meist in der späten Jugend oder im frühen Erwachsenenalter an ACM (Nava et al. 2000).

Die klinischen Ausprägungen variieren mit dem Alter und dem Stadium der Erkrankung (Pilichou et al. 2016). Dabei beschreiben Basso et al. folgende Phasen der ACM. Zuerst besteht eine subklinische Phase, in der der pathologische Umbau beginnt. In dieser kann aufgrund von elektrischen Instabilitäten obgleich des frühen Krankheitsstadiums der plötzliche Herztod auftreten. Danach entwickeln Erkrankte Symptome wie Palpitationen, also spürbares Herzklopfen bzw. Herzstolpern, sowie Synkopen, also Ohnmacht bzw. kurzzeitiger Bewusstseinsverlust, und ventrikuläre Arrhythmien, also Herzrhythmusstörungen, die von den Herzventrikeln ausgehen. Anschließend folgt ein Stadium mit systolischer Insuffizienz, die durch Myokardverlust und Dilatation ausgelöst

wird und oft rechtsventrikulär beginnt. Die abschließende Phase mit biventrikulärer Herzinsuffizienz (HI) kann terminal eine Transplantation erfordern (Basso et al. 2009).

Die ventrikulären Arrhythmien, die ACM charakterisieren, können als ventrikuläre Extrasystolen, zeitlich begrenzte oder anhaltende ventrikuläre Tachykardien oder als Kammerflimmern auftreten (Basso et al. 2009). Die beiden letzteren können zum plötzlichen Herztod führen, der zum Teil ohne vorherige Symptome auftreten kann. Da die ventrikulären Arrhythmien häufiger bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation oder während bzw. direkt nach körperlicher Belastung auftreten, ist dies oft bei jungen Sportlern der Fall (Corrado, Basso, and Judge 2017).

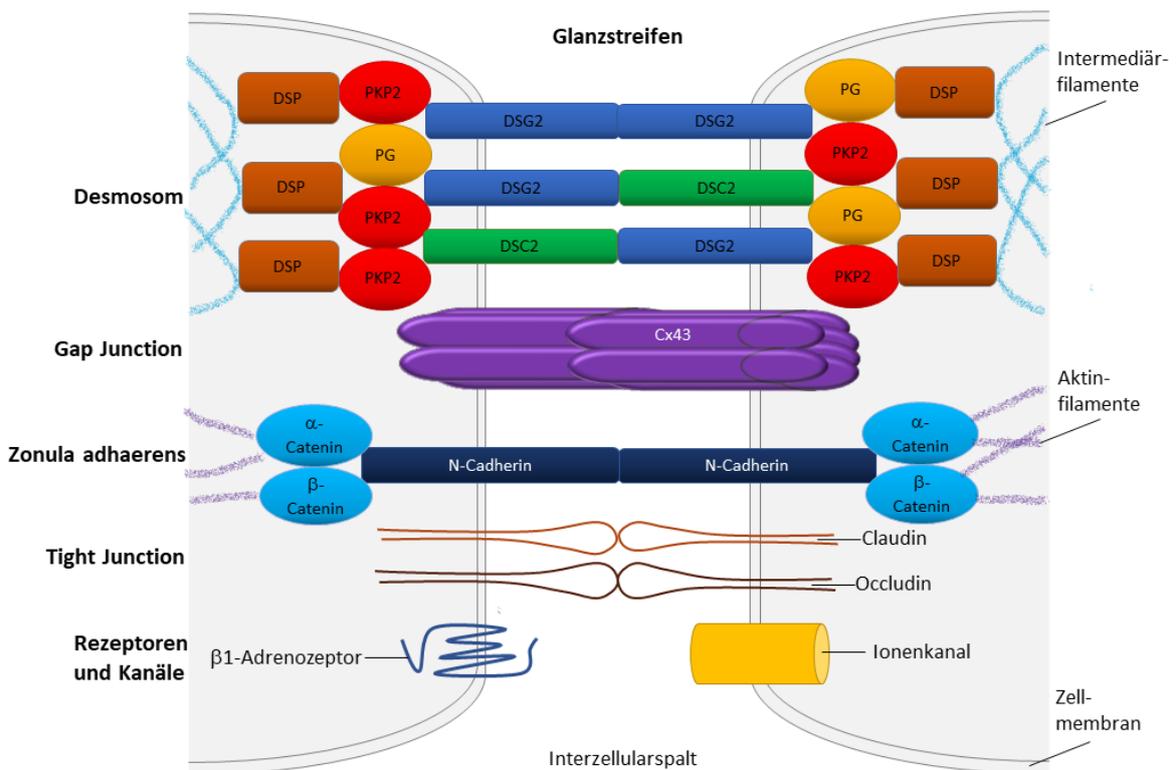
Die Therapie der ACM ist noch immer symptomatisch und besteht je nach Risiko aus der Vermeidung körperlicher Belastung, Medikamenten wie  $\beta$ -Blockern und Antiarrhythmika, Katheterablation, ICD-Implantation oder Herztransplantation, um die Prognose zu verbessern (Pilichou et al. 2016).

### 1.1.1 Desmosomale Genmutationen

ACM wird durch Mutationen in desmosomalen Genen ausgelöst. Desmosomen sind Bestandteil der Glanzstreifen, wie die funktionalen End-zu-End-Kontakte der Kardiomyozyten (KM) genannt werden. Weiterhin sind in den Glanzstreifen Adhäsionsverbindungen (*Zonula adhaerens* und *Tight Junctions*), *Gap Junctions*, Rezeptoren und Ionenkanäle enthalten, wie in Abbildung 1 dargestellt. Da diese Adhäsions- und Kommunikationskontakte untereinander zusammenarbeiten und auch durch übergreifende Proteine verknüpft sind, werden sie insgesamt auch Area Composita genannt (Vermij, Abriel, and van Veen 2017).

Eine der Hauptfunktionen der Desmosomen ist, die mechanische Stabilität zu gewährleisten, weshalb sie auch in anderen Epithelien, wie der Haut vorkommen (Green, Jaiganesh, and Broussard 2019). In Desmosomen wird die extrazelluläre Verbindung durch Cadherine, zu denen Desmoglein (DSG) und Desmocollin gehören, erzeugt, die intrazellulär in der sogenannten Plaque anknüpfen (Garrod and Chidgey

2008). Die Plaque besteht aus den beiden Armadillo-Proteinen, Plakoglobin (PG) und Plakophilin, die wiederum am Desmoplakin (DSP) anknüpfen, das sich mit dem Intermediärfilament-Zytoskelett verbindet (Garrod and Chidgey 2008). Die Isoformen der Proteine werden abhängig von der Gewebeart exprimiert (Delva, Tucker, and Kowalczyk 2009), wobei zum Beispiel im Herz hauptsächlich Plakophilin-2 (PKP2) und Desmoglein-2 (DSG2) vorkommen (Mertens, Kuhn, and Franke 1996). Abbildung 1 veranschaulicht kardiale Glanzstreifen mit Desmosomen.



**Abbildung 1: Aufbau des kardialen Glanzstreifens**

Die Area composita besteht aus den folgenden Komponenten (links beschriftet, von oben nach unten dargestellt):

Desmosomen, Gap Junctions, Zonula adhaerens, Tight Junctions,  $\beta_1$ -Adrenozeptoren und Ionenkanälen (z. B.  $\text{Na}^+$ -Kanäle). Die Anordnung von DSG2 und DSC2 untereinander bzw. PKP2 und PG wurde willkürlich gewählt.

Abkürzungen: Connexin 43 (Cx43), Desmocollin-2 (DSC2), Desmoglein-2 (DSG2), Desmoplakin (DSP), Plakoglobin (PG), Plakophilin-2 (PKP2)

(Eigene Abbildung erstellt in PowerPoint aus den Referenzen (Gerull and Brodehl 2021; Schlipp et al. 2014).)

Ungefähr bei der Hälfte der an ACM Erkrankten findet man Mutationen in Genen, die desmosomale Proteine kodieren (Gerull and Brodehl 2021). Mit 20 % bis 46 % ist PKP2 am häufigsten betroffen, gefolgt von DSG2 und DSP mit jeweils 3 % bis 20 %, Desmocollin-2 (DSC2) mit 1 % bis 15 % sowie PG mit 0 bis 1 % (James et al. 2020). Die Mutationen in PKP2 liegen heterozygot an verschiedenen Stellen des Gens mit verschiedenen Mutationstypen vor, aber meist als Insertion oder Deletion (Gerull et al. 2004). Von DSG2 hingegen sind in öffentlichen Datenbanken genetischer Erbkrankheiten mittlerweile über 130 verschiedene *Missense*-, *Nonsense*-, *Frameshift*- und Spleißstellen-Mutationen bekannt (Stenson et al. 2017; Debus et al. 2019). Grundsätzlich kann bei ACM von einem autosomal-dominanten Erbgang mit unvollständiger Penetranz ausgegangen werden (Austin et al. 2019). Dass die Genetik der ACM allerdings komplex ist, wird am Beispiel einer DSC2-Mutation deutlich, die homozygot das Vollbild der ACM hervorruft, heterozygot allerdings nicht die vollständigen Kriterien der Erkrankung erfüllt (Gerull et al. 2013).

### 1.1.2 Pathogenese

Histologisch beginnt die fibrös-fettige myokardiale Atrophie der ACM am Epikard und weitet sich mit der Zeit transmural aus, wobei in bis zu drei Viertel der Herzen Inflammation im Myokard zu finden ist (Pilichou et al. 2016). Wie aber die geschädigten Desmosomen zu Arrhythmien und strukturellen Veränderungen führen, bleibt unvollständig geklärt (James et al. 2020).

Es wurden verschiedene intrazelluläre Signalwege ermittelt, die bei der Pathogenese eine Rolle spielen. Durch die Störung der Desmosomen wird der mechanische Stress erhöht, welcher zugleich durch das Dissoziieren von PG verstärkt wird. Letzteres hemmt die WNT-abhängige Gentranskription. Die gleichzeitige Aktivierung des Hippo-Signalwegs wirkt proapoptotisch und adipogen. Wiederum wird durch Fehlen von Catenin- $\beta$  der kanonische WNT-Signalweg gehemmt und GSK3 $\beta$  (Glykogensynthase-Kinase 3 Beta) in die Plasmamembran lokalisiert, welches ebenso ein Inhibitor des WNT-Signalwegs ist. Die Fehlregulation des Kalziumhaushalts im sarkoplasmatischen

Retikulum (SR) trägt zur Arrhythmogenese bei (Austin et al. 2019). Ein Grund dafür könnten hochregulierte mRNA-Level von Phospholamban (PLN) sein (Akdis et al. 2016), welches die Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA) reguliert (Hoorntje et al. 2017). Dass PLN eine Rolle in der Pathophysiologie der ACM spielen könnte, wird dadurch bestätigt, dass Mutationen in PLN auch zum Phänotyp der ACM führen können (van der Zwaag et al. 2012).

Auf Grundlage dieser Pathomechanismen wurden Therapie-Ansätze mit Medikamenten erforscht, die GSK3 $\beta$  hemmen, somit WNT-Signale aktivieren und effektive Wirkung in ACM-Modellen zeigen (Corrado, Basso, and Judge 2017). An diese Erfolge anlehnd soll auch in dieser Arbeit ein Behandlungsansatz erprobt werden. Da bei ACM lebensgefährdende Arrhythmien schon vor dem strukturellen Myokardumbau stattfinden und auf die Störung des Kalziumhaushalts zurückgeführt werden (Austin et al. 2019), werden in dieser Arbeit vor allem Kalziummessungen (Ca<sup>2+</sup>-Messungen) durchgeführt.

## 1.2 Elektrische Aberrationen und Arrhythmien bei arrhythmogener Kardiomyopathie

### 1.2.1 Physiologische elektromechanische Kopplung, Kalziumhaushalt und Aktionspotential

Der Kalziumhaushalt ist zentraler Bestandteil der elektromechanischen Kopplung. Hierunter versteht man den Ablauf von der elektrischen Erregung einer KM bis zu ihrer mechanischen Kontraktion, wobei verschiedene Ionen-Kanäle in der Zellmembran und im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) beteiligt sind. Wenn das weitergeleitete Aktionspotential (AP) an der Zellmembran ankommt, öffnen spannungsabhängige Natrium-Kanäle (Abbildung 2: Na<sup>+</sup>-Kanal) und die Zellmembran depolarisiert. Dadurch öffnen sich L-Typ-Kalzium-Kanäle (LTCC) und Kalzium (Ca<sup>2+</sup>) strömt vom Extrazellulärraum ins Zytosol. Induziert durch diese leicht erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) öffnet der Ryanodinrezeptor-2 (RyR) in der SR-Membran und setzt größere Mengen an Ca<sup>2+</sup> aus dem SR ins Zytosol frei (Abbildung 2: hellblauer Pfeil SR-Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung). Dieser Vorgang wird durch die nahe Lokalisation von LTCC und RyR in der kardialen Diade aus T-Tubuli-Einstülpungen der Zellmembran und SR-Zisternen ermöglicht (Eisner et al. 2017). Das für die Kontraktion benötigte Ca<sup>2+</sup> stammt dabei hauptsächlich aus dem SR, weil die sarkolemmalen Kanäle (LTCC) bei leicht erhöhter Konzentration wieder schließen (Gambardella et al. 2018).

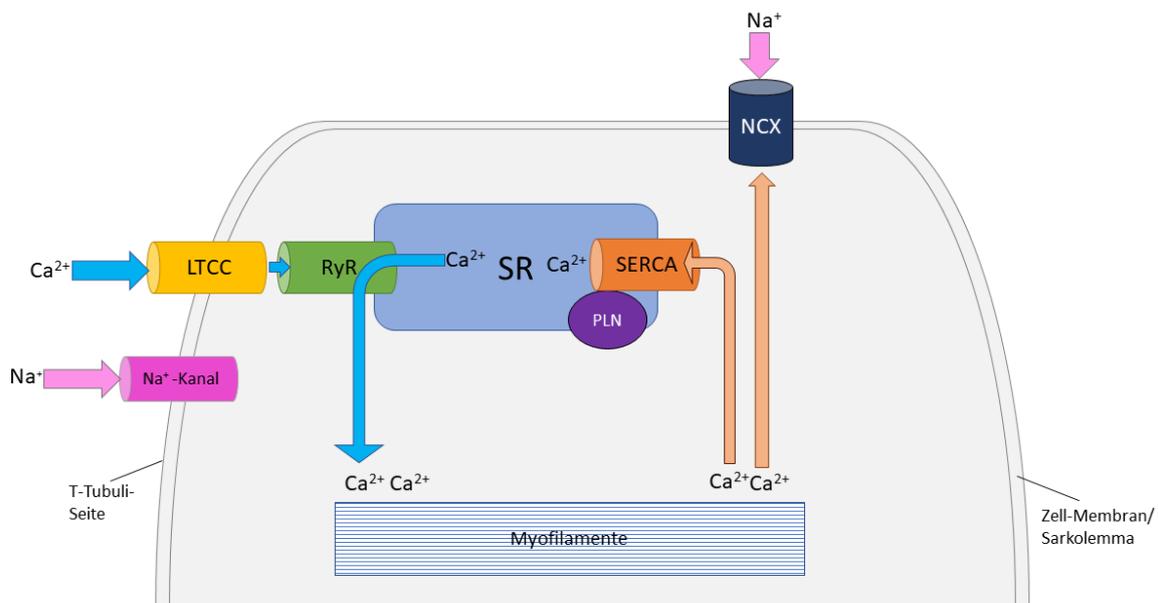
Das zytosolische Ca<sup>2+</sup> bindet dann an Troponin, wodurch die Myosin-Bindung an Aktin ermöglicht wird (Abbildung 2: Myofilamente). Dadurch gleiten die Myofilamente ineinander und die Zelle kontrahiert (Brunello et al. 2014). Dabei hängt die Kontraktionskraft von der Menge an gebundenem Ca<sup>2+</sup> ab, und somit vom Ausmaß und der Dauer der intrazellulären [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Erhöhung (Eisner et al. 2017).

Um zu relaxieren, wird das Ca<sup>2+</sup> einerseits durch die SERCA zurück ins SR gepumpt und andererseits durch den Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) in den Extrazellulärraum gepumpt (Abbildung 2: hellbraune Pfeile) (Eisner et al. 2017). Dabei transportiert die SERCA mehr als zwei Drittel, der NCX den Rest und ein zu vernachlässigender Teil wird durch sarkolemmale und mitochondriale Ca<sup>2+</sup>-ATPasen befördert (Bers 2002). Der

elektrische NCX-Strom kann entweder einwärtsgerichtet sein, wobei er  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle herauspumpt, oder auswärtsgerichtet, wobei er  $\text{Ca}^{2+}$  hineinlässt. Dies wird durch  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$  reguliert und dadurch pumpt der NCX physiologisch fast immer einwärtsgerichtet, außer zu Beginn des APs sehr kurz auswärts (Bers and Weber 2002).

Die  $\beta$ -adrenerge Stimulation moduliert diese Vorgänge, indem durch Signalkaskaden verschiedene Proteine, wie LTCC, PLN und RyR, phosphoryliert werden. Durch LTCC fließt dann ein größerer  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom und trägt zum inotropen Effekt bei. Wenn PLN phosphoryliert wird, wird seine hemmende Wirkung auf die SERCA aufgehoben. Durch die SERCA fließt dann schneller und mehr  $\text{Ca}^{2+}$  ins SR zurück und führt zum lusitropen Effekt mit schnellerer Relaxation und erniedrigter diastolischer  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Gleichzeitig wird der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt erhöht, der zur Freisetzung bereitsteht und dann zum inotropen Effekt beiträgt und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten-Amplitude erhöht (Bers 2002).

Insgesamt wird deutlich, dass der Kalziumhaushalt eine wichtige Rolle in der elektromechanischen Kopplung spielt. Deshalb soll auch in dieser Arbeit der Fokus auf  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen gelegt werden und die zuvor erwähnten Parameter der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten dargestellt werden. Ein solcher Transient ist definiert als ein Signal, das von einer Grundlinie abweicht und dann wieder zu dieser zurückkehrt.



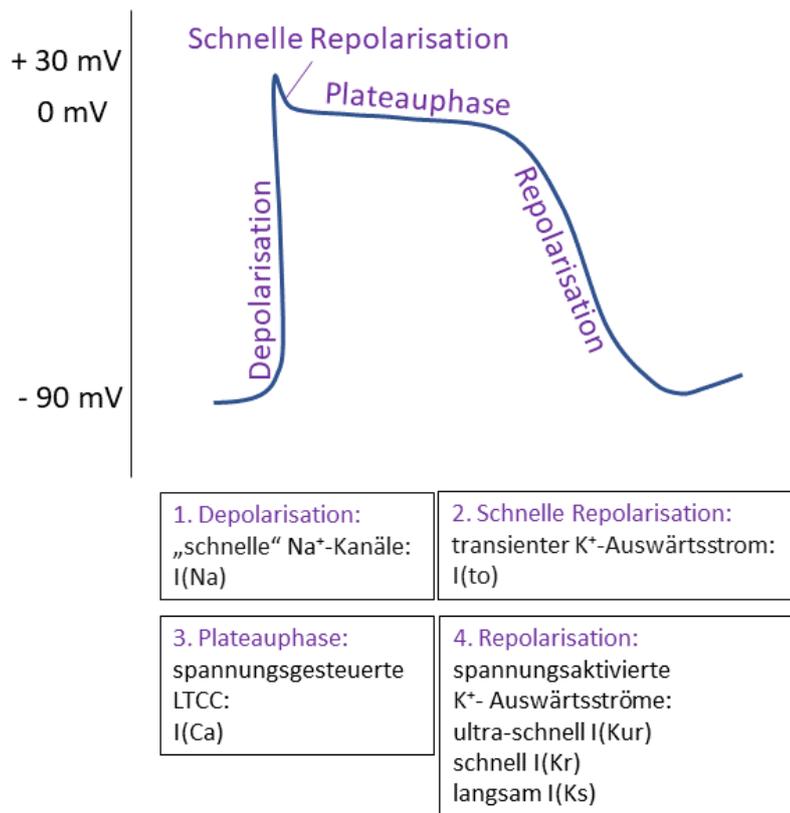
**Abbildung 2: Elektromechanische Kopplung von Kardiomyozyten**

Dargestellt ist ein vereinfachtes Schema der elektromechanischen Kopplung und des Kalziumhaushalts von KM. Die Kaskade der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung ist durch hellblaue Pfeile markiert, die Ca<sup>2+</sup>-Verminderung durch hellbraune Pfeile (die vernachlässigbaren sarkolemmalen Ca<sup>2+</sup>-ATPasen sind nicht abgebildet).

Abkürzungen: L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanal (LTCC), Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX), Phospholamban (PLN), Ryanodinrezeptoren (RyR), Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA), Sarkoplasmatisches Retikulum (SR)  
(Eigene Abbildung erstellt in PowerPoint aus der Referenz (Bers 2002).)

Das AP einer Zelle beschreibt die Änderung des Membranpotentials über der Zellmembran. In Abbildung 3 wird das AP einer KM des Arbeitsmyokards dargestellt. Die erste Phase ist die Depolarisationsphase, in der durch erregte Nachbarzellen der Schwellenwert von -55 mV erreicht wird und an den Glanzstreifen lokalisierte, spannungsgesteuerte, „schnelle“ Na<sup>+</sup>-Kanäle öffnen (s. auch Abbildung 2). Die erste schnelle und kurze Repolarisationsphase wird durch einen transienten K<sup>+</sup>-Auswärtsstrom verursacht und durch einen Cl<sup>-</sup>-Einstrom unterstützt. In der Plateauphase werden spannungsgesteuerte LTCC (s. auch Abbildung 2) aktiviert und es entsteht ein langsamer Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, der der Repolarisation entgegenwirkt und das Membranpotenzial auf ungefähr 0 mV hält. Für die weitere Repolarisation erfolgen spannungsaktivierte K<sup>+</sup>-Auswärtsströme durch verschiedene K<sup>+</sup>-Kanäle. Allgemein sind

am AP noch weitere Kanäle beteiligt, die in kleinerem Ausmaß zu den Strömen beitragen. Zum Beispiel sind im Bereich des Ruhemembranpotentials auch T-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle beteiligt, die schon bei geringer Depolarisation von etwa  $-50\text{ mV}$  öffnen (Behrends et al. 2012). Außerdem werden weitere Kanäle erforscht, wie die TRPC-Kanäle (*transient receptor potential classical*), die einen Einfluss auf den Kalziumhaushalt haben (Bandleon et al. 2019).



**Abbildung 3: Aktionspotential von Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards**

Das AP besteht aus verschiedenen Phasen, die hier vereinfacht und zusammengefasst dargestellt sind. Die wichtigsten Ströme ( $I$ ) der Phasen sind darunter beschrieben.

(Eigene Abbildung erstellt in PowerPoint aus der Referenz (Behrends et al. 2012).)

## 1.2.2 Elektromechanische Pathophysiologie bei arrhythmogener Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz

Bei ACM wird die elektromechanische Kopplung an verschiedenen Stellen gestört. In der Literatur wurden elektromechanische Veränderungen an mehreren Maus-Modellen und Modellen mit KM aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS) untersucht, denen unterschiedliche ACM-Mutationen zugrunde lagen.

El-Battrawy et al. erforschten die elektrischen Dysfunktionen von hiPS-KM einer erkrankten Person mit DSG2-Mutation. Im Vergleich der ACM-KM und gesunden KM waren beispielsweise die maximalen Ströme von Na<sup>+</sup>-Kanälen und des NCX vermindert, der LTCC-Strom allerdings nicht verändert (s. Abbildung 2). Durch die Na<sup>+</sup>-Strom-Minderung wurde die Amplitude des APs kleiner (s. Abbildung 3). Die Aktivität des NCX war gegen Ende der Repolarisation des APs eingeschränkt und transportierte weniger Ca<sup>2+</sup> aus der Zelle. Trotzdem war die Aktionspotentialdauer (APD) in ACM-KM nicht verkürzt, da andere Kanäle auch beeinträchtigt waren. Die ACM-KM reagierten mit veränderter Sensitivität auf β-adrenerge Stimulation, weil sich im Gegensatz zu gesunden KM die APD stärker verkürzte. Denn der NCX-Strom war bei ACM-KM unter β-adrenerger Stimulation noch stärker reduziert als bei gesunden KM. Die diastolischen und systolischen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> veränderten sich durch die DSG2-Mutation nicht (El-Battrawy et al. 2018).

Cerrone et al. untersuchten den Kalziumhaushalt anhand von adulten Mäusen mit induziertem PKP2-*Knockout* (PKP2-KO). Sie fanden diverse reduzierte Genexpressionen und erniedrigte Protein-Level, darunter elektrophysiologisch relevante Proteine: RyR, AnkyrinB, Triadin und Cav1.2, eine Untereinheit des LTCC. Deshalb wurden in PKP2-KO-KM weniger LTCC gefunden als in gesunden KM (s. Abbildung 2). In *Voltage-Clamp*-Messungen nahm die maximale Stromdichte der LTCC ab und ihre Inaktivierung verlangsamte sich. Da die Menge an RyR abnahm, aber ihre Aktivität erhalten blieb, reduzierte sich der Ca<sup>2+</sup>-Verlust des SR, das Ca<sup>2+</sup>-Leck. Dadurch erhöhte sich der Ca<sup>2+</sup>-Gehalt des SR bei PKP2-KO-KM. Folglich traten häufiger spontane Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungen, sogenannte Ca<sup>2+</sup>-*Sparks*, mit erhöhten Amplituden auf. Bei Messungen der

intrazellulären  $[Ca^{2+}]_i$  war die  $Ca^{2+}$ -Amplitude und die diastolische  $[Ca^{2+}]_i$  erhöht, und die Dauer der  $Ca^{2+}$ -Transienten verlängert (Cerrone et al. 2017).

Kim et al. modellierten die ACM ebenso mit PKP2-KO-Mäusen und fanden die folgenden Veränderungen nur in rechtsventrikulären KM. Die Amplitude der  $Ca^{2+}$ -Transienten, die diastolische  $[Ca^{2+}]_i$ , der SR- $Ca^{2+}$ -Gehalt und die Dauer der  $Ca^{2+}$ -Transienten war erhöht. RyR zeigten erhöhte  $Ca^{2+}$ -Sensitivität, waren an einer bestimmten Stelle stärker phosphoryliert und zeigten eine erhöhte Aktivität  $Ca^{2+}$  aus dem SR freizusetzen (Kim et al. 2019).

Neben den  $Ca^{2+}$ -Mechanismen spielt bei ACM auch das strukturelle Aufbrechen der Desmosomen eine Rolle. Dadurch wird die funktionelle Einheit der Desmosomen mit *Gap Junctions* gestört, insbesondere die Interaktion zwischen PKP2 und Connexin 43 (Cx43). Weil Cx43 die Expression und Lokalisation von  $Na^+$ -Kanälen beeinflusst, vermindert sich der  $Na^+$ -Strom und es folgt eine Störung der Erregungsleitung (Moccia et al. 2019). Bei ACM entsteht durch Cx43-abhängige Membranpermeabilität wiederum eine Störung des Kalziumhaushalts (Kim et al. 2019).

Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, ist bei ACM häufig die Gesamtmenge von PLN und die Menge an phosphoryliertem PLN erhöht. Da eigentlich Dephosphorylierung durch Hemmung der SERCA zu kontraktile Dysfunktion führt, könnte hier ein Kompensationsmechanismus entdeckt worden sein oder ein unbekannter Mechanismus vorliegen (Akdis et al. 2016).

Da die HI eine Komplikation der ACM in späten Phasen sein kann, werden im Folgenden auch die pathophysiologischen Veränderungen von KM mit HI dargelegt. Dabei werden nur einige der beobachteten Differenzen beispielhaft erklärt.

In pathologischen Zuständen, wie HI oder hohem Zellalter, werden RyR hyperphosphoryliert, wodurch eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit vorliegt. Weil RyR dadurch durchlässig werden, steigt das diastolische  $Ca^{2+}$ -Leck des SR. Durch den Verlust enthält das SR weniger  $Ca^{2+}$ , setzt beim nächsten AP weniger  $Ca^{2+}$  frei und die Amplitude der folgenden  $Ca^{2+}$ -Transienten wird vermindert (Bers, Despa, and Bossuyt

2006; Moccia et al. 2019). Gleichzeitig werden Proteinlevel der SERCA herunterreguliert und durch das erniedrigte Verhältnis aus SERCA zu PLN wird die SR-Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme gestört (Gambardella et al. 2018). Insgesamt ist die APD verlängert und über den NCX findet ein stärkerer Ca<sup>2+</sup>-Influx statt, der normalerweise sehr klein bleibt (Bers and Weber 2002). Allgemein erhöhte NCX-Aktivität trägt nochmals zum erniedrigten SR-Ca<sup>2+</sup>-Gehalt bei. Weiterhin ist die intrazelluläre Natriumkonzentration erhöht, die mit dem Kalziumhaushalt eng verknüpft ist (Bers, Despa, and Bossuyt 2006).

Insgesamt kommt aber nur durch die vielen zellulären Veränderungen der Zustand der KM bei HI zustande, die hier unvollständig dargestellt wurden.

### 1.2.3 Entstehung von Arrhythmien

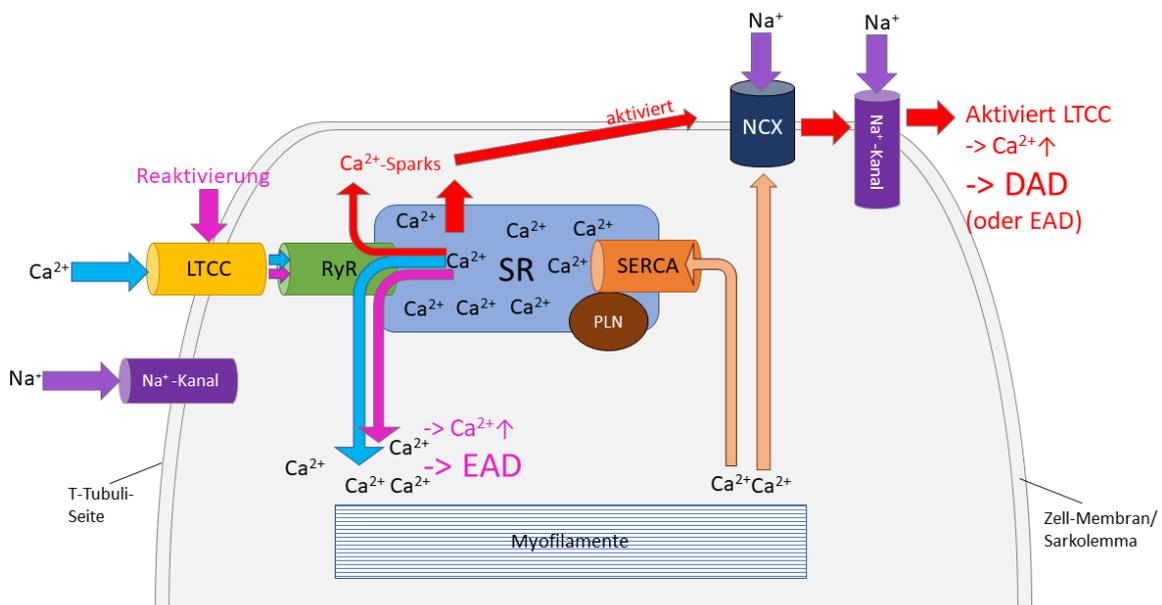
Da Arrhythmien bei ACM schon vor strukturellen Veränderungen des Myokards auftreten, existieren verschiedene Theorien zur elektrischen Instabilität und Arrhythmogenese in der Literatur (Pilichou et al. 2016).

Weitgehend bekannt ist, dass AP-Verlängerungen und AP-Verkürzungen arrhythmogen wirken können (El-Battrawy et al. 2018). Genauso führt eine veränderte Kalziumhomöostase und Instabilität der Ca<sup>2+</sup>-Transportsysteme zu Arrhythmien. Denn die intrazelluläre [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> beeinflusst die elektrischen Prozesse der Zellmembran und dadurch entsteht eine allgemeine elektrische Instabilität (Ter Keurs and Boyden 2007).

Ein spezifischer Weg der Arrhythmogenese sind sowohl späte Nachdepolarisationen, „*delayed afterdepolarizations*“ (DADs), als auch frühe Nachdepolarisationen, „*early afterdepolarizations*“ (EADs). Während DADs nach kompletter Relaxation der Ca<sup>2+</sup>-Transienten auftreten, kommen EADs während der Repolarisation der Ca<sup>2+</sup>-Transienten vor. Die Morphologie der DADs und EADs bei Ca<sup>2+</sup>-Messungen ist in Tabelle 14 in den Ergebnissen dargestellt. Sie kommen bei KM mit DSG2-Mutationen gehäuft mit und ohne  $\beta$ -adrenerge Stimulation vor (El-Battrawy et al. 2018). Auch bei PKP2-KO-KM eines Mausmodells rufen elektrische Stimulationen DADs und EADs hervor (Cerrone et al. 2017; Kim et al. 2019).

DADs entstehen durch spontane, unsynchronisierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen aus dem SR, die benachbarte Einheiten aktivieren und dann zu sogenannten  $\text{Ca}^{2+}$ -*Sparks* werden (Song et al. 2015) (Abbildung 4). Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -*Sparks* können durch einen zu hohen SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt entstehen, wie im PKP2-KO-Mausmodell (Cerrone et al. 2017), oder durch erhöhte diastolische  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Song et al. 2015). In pathologischen Zuständen, wie HI, werden RyR zu stark phosphoryliert und das  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck führt zu  $\text{Ca}^{2+}$ -*Sparks* (Eisner et al. 2017). Wenn  $\text{Ca}^{2+}$ -*Sparks* das Schwellenpotential der  $\text{Na}^+$ -Kanäle erreichen, wird ein AP getriggert (Song et al. 2015). Denn die  $\text{Ca}^{2+}$ -*Sparks* werden durch den NCX eliminiert und dessen  $\text{Na}^+$ -Einwärtsstrom löst eine Depolarisation aus. Diese triggert wiederum das AP in Form einer DAD und dadurch können ventrikuläre Arrhythmien entstehen (Eisner et al. 2017; Moccia et al. 2019).

EADs können ebenso durch  $\text{Ca}^{2+}$ -*Sparks* oder Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten aufgrund der Durchlässigkeit der RyR (Abbildung 4) oder veränderter SERCA-Aktivität entstehen. Allerdings können all diese Faktoren auch EADs unterdrücken, was zur Komplexität ihrer Entstehung beiträgt. Hauptsächlich werden EADs aber durch Spannungsschwankungen in der Repolarisationsphase des APs verursacht, die wiederum durch Störung des Kalziumhaushalts entstehen können (s. 1.2.2 und Abbildung 3) (Song et al. 2015). Und zwar nimmt man an, dass EADs durch die Reaktivierung von LTCC- $\text{Ca}^{2+}$ -Strömen vermittelt werden, die sich von der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Inaktivierung während des langen Plateaus eines langen APs regeneriert haben (Bers 2008).



**Abbildung 4: Entstehung von DADs und EADs im Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten**  
 Dargestellt ist ein vereinfachtes Schema der elektromechanischen Kopplung und des Kalziumhaushalts von KM (s. auch Abbildung 2).

Die Entstehung von DADs wird durch rote Pfeile verdeutlicht:  $Ca^{2+}$ -Sparks entstehen bei hohem  $Ca^{2+}$ -SR-Gehalt direkt, oder über undichte RyR. Der NCX eliminiert diese  $Ca^{2+}$ -Sparks und aktiviert durch Spannungsveränderung die  $Na^+$ -Kanäle, die der Auslöser eines APs sind. Dadurch erhöht sich wieder das  $Ca^{2+}$  und eine DAD ist entstanden.

Der Mechanismus von EADs wird mit rosa Pfeilen verdeutlicht: Die Reaktivierung von LTCC in refraktären Phasen des Plateaus aktiviert die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung durch RyR-Kanäle, wodurch eine EAD entsteht.

Abkürzungen: delayed afterdepolarization (DAD), early afterdepolarization (EAD), L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanal (LTCC), Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX), Phospholamban (PLN), Ryanodinrezeptor (RyR), Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA), sarkoplasmatisches Retikulum (SR)

(Eigene Abbildung erstellt in PowerPoint aus den Referenzen (Bers 2002, 2008).)

In dem Ausmaß und ihrer zeitlich-räumlichen Synchronisation, in der die SR- $Ca^{2+}$ -Freisetzungen in PKP2-KO-KM tatsächlich stattfinden, können sie suffizient ventrikuläre Arrhythmien auslösen (Cerrone et al. 2017). Ursächlich hierfür ist, dass DADs Leitungsblöcke und ventrikuläre Extrasystolen auslösen und EADs das AP und die Refraktärphase verlängern. Als Folge verursachen beide *Reentry*, also erneute AP in refraktären Phasen (Song et al. 2015). Zusätzlich besitzen viele Proteine der KM eine starke  $Ca^{2+}$ -Sensitivität, sodass durch leicht erhöhte intrazelluläre  $[Ca^{2+}]_i$  über

diastolischem Level die kontraktilen Proteine aktiviert werden (Ter Keurs and Boyden 2007).

Auch außerhalb des Kalziumhaushalts gibt es arrhythmogene Mechanismen. Tachyarrhythmien können durch veränderten Na<sup>+</sup>-Strom und dadurch reduzierte AP-Amplitude und verlangsamte AP-Aufstrich-Geschwindigkeit entstehen (El-Battrawy et al. 2018). Ähnliche Mechanismen entstehen durch Störung der *Gap Junctions* (s. 1.2.2).

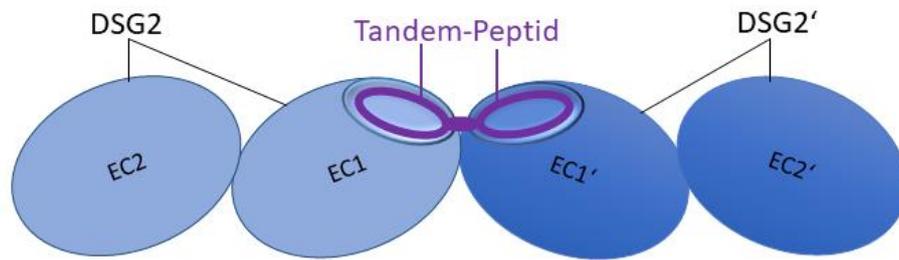
In fortgeschrittenen Stadien der ACM können ventrikuläre Arrhythmien durch kreisende Erregungen um fibrös-fettiges Narbengewebe ausgelöst werden (Pilichou et al. 2016).

## 1.3 Tandem-Peptid als Therapie-Ansatz

Die Destabilisierung der Desmosomen bei ACM führte Schlipp et al. zur Überlegung, sie mit Hilfe eines Tandem-Peptids (TP) wieder zu stabilisieren und dadurch einen Therapie-Ansatz zu entwickeln (Schlipp et al. 2014).

### 1.3.1 Aufbau des Tandem-Peptids und Theorie der Wirkweise

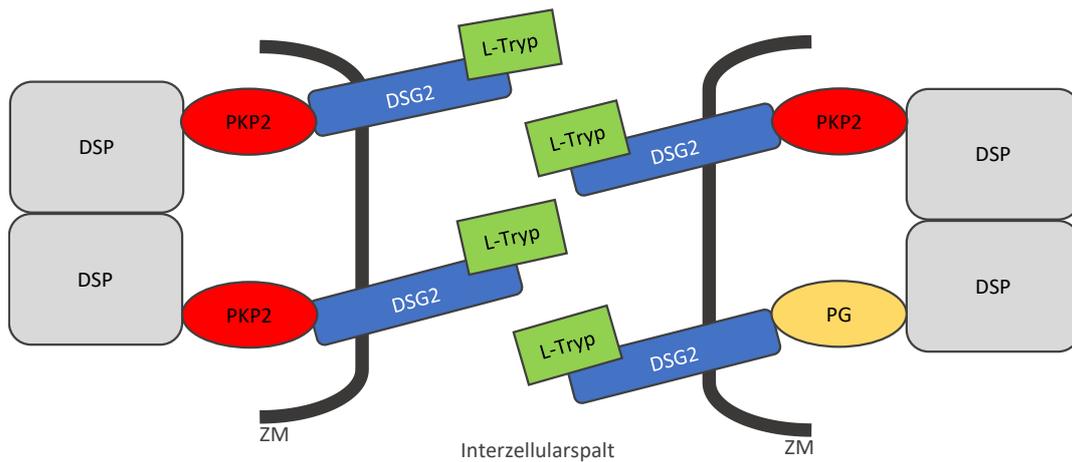
Das TP wurde von Heupel et al. ursprünglich entwickelt, um an interzelluläre DSG3- und DSG1-Bindungen zu binden (Heupel et al. 2009). Da Cadherine aber strukturell hoch konserviert sind, funktioniert es auch bei DSG2 (Schlipp et al. 2014). Die Peptid-Aminosäuren-Sequenz wurde designt, indem die Strukturen der DSG-Transinteraktionen modelliert wurden. Passend zur Adhäsionsstelle der DSG wurde ein Peptid prognostiziert, das aufgrund von Sequenz-Homologien von DSG1 und DSG3 die extrazellulären Domänen beider imitierte. Dieses „*Single*-Peptid“ wurde dann durch Cystein-Enden zyklisch konstruiert, um eine geeignete Passform für die extrazelluläre DSG-Bindungsstelle zu erreichen. Damit homophile Transinteraktionen von DSG stabilisiert werden können, wurden zwei Kopien dieses Peptids dimerisiert und als Tandem-Peptid bezeichnet (Abbildung 5) (Heupel et al. 2009).



**Abbildung 5: Bindung des Tandem-Peptids an die Extrazellulärdomänen von zwei DSG2**  
 Dargestellt sind Ausschnitte von zwei DSG2-Proteinen, wovon nur zwei Extrazellulärdomänen (EC) abgebildet sind. In der Mitte bindet das Tandem-Peptid (TP) an die Abschnitte der EC1, für die es passgenau hergestellt wurde.

Die Sequenz des TP besteht aus Ac-Cys-Leu-Asn-Ser-Met-Gly-Gln-Asp-Cys-εAhx-Cys-Leu-Asn-Ser-Met-Gly-Gln-Asp-Cys-NH<sub>2</sub> (Disulfid-Bindungen zwischen Cys1 und Cys9/Cys11 und Cys19).  
 (Eigene Abbildung erstellt in PowerPoint aus den Referenzen (Schinner et al. 2020; Heupel et al. 2009).)

Um die Funktionsweise des TPs zu überprüfen, kann L-Tryptophan (L-Tryp) verwendet werden. Freies L-Tryp stört die Transinteraktion von zwei DSG (Abbildung 6). Denn die Cadherine zeichnen sich durch eine interzelluläre Bindung mit Hilfe des sogenannten „Tryptophan-Swaps“ aus. Dieser funktioniert, indem ein konservierter Tryptophan-Rest (an Position 2) der extrazellulären Domäne in eine hydrophobe Tasche mit der Stelle der Adhäsionserkennung des anderen Cadherins bindet (Spindler et al. 2013). Somit können durch L-Tryp die DSG2-Bindungen der gesunden KM gestört werden, was die Auswirkungen der ACM-Mutationen imitiert. Dies dient als Kontrollfunktion für die TP-Bindung.



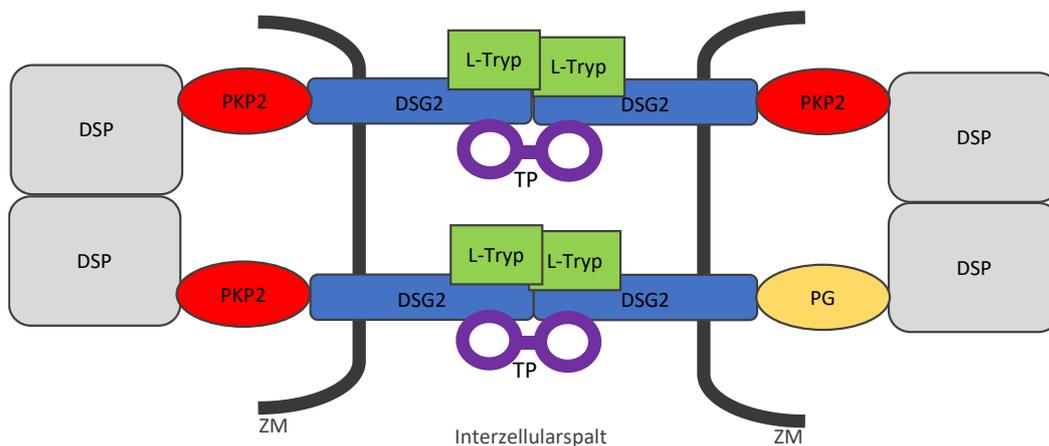
**Abbildung 6: Schwächung der DSG2-Bindungen durch L-Tryptophan**

Vereinfachte Darstellung eines Desmosoms mit Behandlung durch L-Tryp. L-Tryp interferiert mit den interzellulären Bindungen von DSG2.

Abkürzungen: Desmoglein-2 (DSG2), Desmoplakin (DSP), L-Tryptophan (L-Tryp), Plakoglobin (PG), Plakophilin-2 (PKP2), Zellmembran (ZM)

(Eigene Abbildung erstellt in Word.)

Da das TP instabile DSG-Bindungen verstärken soll, sollte es seine Wirkung sowohl bei den degenerierten Desmosomen der ACM zeigen als auch in künstlich durch L-Tryp geschwächten Desmosomen (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Postulierte Wirkweise des TP**

Das TP sollte die durch L-Tryp gestörten Bindungen durch DSG2-spezifische Bindung wieder stabilisieren.

Abkürzungen: Desmoplakin (DSP), Plakoglobin (PG), Plakophilin-2 (PKP2), Tandem-Peptid (TP), Zellmembran (ZM)

(Eigene Abbildung erstellt in Word.)

### 1.3.2 Forschungsergebnisse zur Wirkung des Tandem-Peptids

Heupel et al. entwickelten das TP, um Pemphigus vulgaris zu therapieren. Bei Pemphigus vulgaris entstehen Blasen in der Haut und Schleimhäuten, weil Autoantikörper gegen DSG3 gebildet werden und deshalb die Desmosomen dieser Epithelien gestört werden. Das TP wurde eingesetzt, um die DSG3-Transinteraktion zu stärken. In vitro konnte das TP in Anwesenheit des Antikörpers tatsächlich die Bindungen verstärken. Das TP hatte keine Auswirkungen, wenn es allein appliziert wurde (Heupel et al. 2009). Die Antikörper-induzierte Hautblasen-Bildung wurde auch in vivo durch intradermale Injektion oder topische Applikation des TPs wirksam verhindert (Spindler et al. 2013).

Bei Erkrankten mit Morbus Crohn sind DSG2-Level in Desmosomen von Darm-Epithelzellen reduziert. Die Permeabilität der Darmbarriere wird durch DSG2-Destabilisierung durch TNF- $\alpha$  herabgesetzt. Auch hier wirkte das TP in der Zellkultur, indem es die Desmosomen verstärkte und somit die durch TNF- $\alpha$  gestörte Darmbarriere-Funktion verbesserte (Spindler et al. 2015).

Schlipp et al. untersuchten ebenfalls DSG2-Verbindungen, allerdings in Maus-KM in Zellkultur. L-Tryp zeigte eine beschädigende Wirkung auf die DSG2-Bindungen, indem DSG2 nicht mehr regelmäßig auf die Zellmembran verteilt waren, sondern irregulär und streifig akkumulierten. Außerdem entstanden durch mechanischen Stress mehr Zellfragmente, was auf eine geringere Zellkohäsion hindeutet. Bei gemeinsamer Inkubation mit dem TP konnte der Effekt von L-Tryp auf die Kohäsion aufgehoben werden. Ein Hinweis darauf, dass das SP und TP spezifisch DSG2 binden, entstand, weil die Desmosom-Umverteilung durch das SP nicht das klassische N-Cadherin betraf, sondern nur DSG2. Außerdem funktionierte die Reparatur des L-Tryp-Effekts durch das TP nur bei DSG2, nicht bei N-Cadherin.

Dass DSG2-Bindungen auch für KM-Funktionen und  $\beta$ -adrenerge Anpassung wichtig sind, wurde anhand von adulten Maus-Herzen gezeigt. Denn L-Tryp und das SP, das spezifisch die DSG2-Bindungen unterbricht, führten zu unregelmäßigen und reduzierten Herzfrequenzen, vor allem bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation. Auch die Herzarbeit und die

Reaktion auf Isoproterenol wurde leicht reduziert. Es wurde nicht versucht, die Auswirkungen von ACM-Mutationen mit dem TP zu behandeln (Schlipp et al. 2014).

In unserem Labor wurde zuvor festgestellt, dass bei PKP2-KO-KM das DSG2 verstärkt im Zytoplasma statt in der Zellmembran lokalisiert ist. Deshalb entstand die Hypothese, das TP könne DSG2 zurück in die Membran lokalisieren und die Bindungen stärken.

## 1.4 Stammzell-abgeleitete Kardiomyozyten

In dieser Arbeit soll die ACM mit Kardiomyozyten, die aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-KM) generiert werden, nachgestellt werden.

Der Vorteil von hiPS-KM besteht in einem in-vitro-Modell aus humanen KM und der Möglichkeit, krankheitsassoziierte Mutationen einzufügen und ethisch zweifelsfrei Tests von humanen Therapiemöglichkeiten durchzuführen.

Dafür sollen hiPS-KM einer gesunden Zelllinie, als isogene Kontrolle, und jeweils eine Zelllinie mit PKP2-KO und DSG2-*Knockout* (DSG2-KO) benutzt werden.

### 1.4.1 Modellierung von Erkrankungen mit Kardiomyozyten aus hiPS

Aus Fibroblasten können hiPS auf Grundlage der Arbeit von Takahashi und Yamanaka reprogrammiert werden (Takahashi and Yamanaka 2006). Die humanen Fibroblasten müssen die vier Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, Klf4 und c-Myc auf hohen Leveln exprimieren, um zu pluripotenten Stammzellen zu werden (Takahashi et al. 2007). Um die hohen Expressionslevel der Pluripotenz-Gene zu erreichen, können die humanen Fibroblasten zum Beispiel mit Sendai-Virus-Vektoren behandelt werden (Fusaki et al. 2009).

Das Genom der hiPS kann mit dem CRISPR/Cas9-System bearbeitet werden (Jinek et al. 2012). Es können bestimmte Gene geschnitten werden und damit ein *Knockout* erzeugt werden, wodurch die Zellen die eigentlich codierten Proteine nicht mehr exprimieren. Die Methode funktioniert, indem die Endonuklease Cas9 die DNA an der Stelle schneidet, zu der sie durch eine Guide-RNA-Sequenz geleitet wurde. Durch den Doppelstrangbruch und Reparaturmechanismen der Zelle entstehen Insertions- oder Deletionsmutationen, die zu *Frameshift*-Mutationen oder *Stopcodons* und damit zu einem Gen-*Knockout* führen (Ran et al. 2013). So können beispielsweise für die Nachstellung der ACM die Gene für die Proteine PKP2 und DSG2 jeweils ausgeschaltet werden. Der Vorteil der CRISPR/Cas-Methode ist, dass zu den mutierten Zelllinien eine

isogene Kontrollzelllinie hergestellt werden kann, wodurch sich die Zelllinien nur in dem bearbeiteten Gen unterscheiden, und somit verbesserte Vergleichbarkeit besteht.

Um die Stammzellen zu KM zu differenzieren, müssen verschiedene Signalwege aktiviert werden und dafür folgende Wachstumsfaktoren und Moleküle zum Medium gegeben werden. Der WNT-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Kardiogenese, denn zu Beginn der embryonalen mesodermalen Spezifikation wird er aktiviert. Somit wird in der Zellkultur mit dem Zusatz von CHIR99021, einem WNT-Aktivator und GSK3-Inhibitor, begonnen. Gleichzeitig wird der Wachstumsfaktor BMP4 hinzugefügt, um die Zellen in die kardiovaskuläre Zellart zu lenken. Die späte kardiale Spezifikation wird allerdings durch WNT gehemmt, weshalb dann dem Medium der WNT-Inhibitor IWR1 zugefügt wird. Die allgemeine Kombination mit Ascorbinsäure verstärkt die kardiale Differenzierung durch den MEK/ERK-Signalweg. Zu Beginn wird Insulin im Medium belassen, um Stress zu reduzieren, später aber entzogen, da es einen negativen Einfluss auf die kardiale Spezifikation hat. Der genaue Ablauf des Differenzierungsprotokolls ist den Methoden im Kapitel 2.2.2.3 zu entnehmen (Kadari et al. 2015).

#### 1.4.2 Zellreifung der hiPS-Kardiomyozyten

Beim in-vitro-Modell mit hiPS-KM tritt das Problem auf, dass die neu generierten Zellen späten fetalen oder neonatalen KM ähneln (Austin et al. 2019). Die Unterschiede zu adulten humanen KM äußern sich morphologisch, indem diese größer und stabförmiger aufgebaut sind. Unreife KM sind dagegen rund oder dreieckig und haben somit eine kleinere Zelloberfläche und Membrankapazität, was wichtig für die Depolarisation, Impulsweitergabe und Kontraktilität ist. Frische hiPS-KM sind noch einkernig und ihnen mangelt es an T-Tubuli und der Diadenstruktur, die erst mit dem Alter ausgebildet wird. Ihre Sarkomere sind kürzer und anders strukturiert als die der adulten KM. Erst mit fortgeschrittenem Reifegrad lokalisieren sich die Hemi-Connexone der *Gap Junctions* in der Zellmembran und gewährleisten schnelle AP-Fortleitung. Auch elektrophysiologisch funktionell ähneln ventrikuläre hiPS-KM eher embryonalen ventrikulären KM und äußern unreife elektromechanische Kopplung. Sie weisen spontane Kontraktionen mit

verschiedenen AP-Zeiten und langsameren Aufstrichgeschwindigkeiten durch unreife Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Kanäle auf. Zudem unterscheidet sich der Kalziumhaushalt, weil bei adulten KM der Großteil des Ca<sup>2+</sup> durch das SR über den RyR einströmt und somit über die SERCA zurück, während bei unreifen KM das SR unterentwickelt ist, und der LTCC und der NCX eine größere Rolle spielen. Des Weiteren entwickeln unreife KM eine geringere Kontraktionskraft als adulte KM. Die Reaktion auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation unterscheidet sich, weil adulte KM hauptsächlich  $\beta$ 1-Rezeptoren und hiPS-KM  $\beta$ 2-Rezeptoren exprimieren (Kolanowski, Antos, and Guan 2017).

Damit sich hiPS-KM eignen, um Krankheiten nachzustellen, muss deren Reifung gewährleistet werden. Feaster et al. erreichen dies, indem sie die KM auf der sogenannten *Matrigel-Mattress* kultivieren, die physiologische Steifigkeit und somit geeignete biophysikalische und biochemische Eigenschaften aufweist, und in den Methoden näher beschrieben wird (s. 2.2.2.5). Dadurch verbesserte sich vor allem die Kontraktilität, denn die Amplitude der Zellverkürzung entsprach der von 100-tägigen hiPS-KM und von adulten Maus- und Hase-KM. Alle KM auf *Mattresses* kontrahierten sichtbar, während bei den Kontrollzellen nur ein kleiner Teil kontrahierte. Die Morphologie der KM auf *Mattresses* zeigte sich stabförmiger mit längs organisierten Myofibrillen und längeren Sarkomeren, die adultes Troponin enthielten. Funktionelle Analysen zeigten eine stabile Reaktion auf positiv inotrop wirkende Substanzen, wie extrazelluläre Kalziumkonzentrationen ( $[Ca^{2+}]_e$ ) (Feaster et al. 2015).

Da Schilddrüsenhormone und Glukokortikoide eine wichtige Rolle für die kardiale Reifung während der fetalen Entwicklung spielen, ergänzten Parikh et al. das Reifungsprotokoll um eine Behandlung mit Triiodthyronin (T3) und Dexamethason (Dex) mit anschließender *Mattress*-Kultivierung (s. 2.2.4.1). Mit der Kombination konnten zusätzliche Effekte beim Kalziumhaushalt beobachtet werden, denn die Ca<sup>2+</sup>-Kinetik beschleunigte sich, weil die SERCA und der NCX schneller transportierten. Im Vergleich zu unbehandelten hiPS-KM trug das SR stärker zum Ca<sup>2+</sup>-Einstrom bei, der sich durch Kopplung von LTCC und RyR gleichförmiger ereignete. Die elektromechanische Kopplung verbesserte sich allgemein, da auch die Funktion des RyR verstärkt wurde. Morphologisch optimierte sich die Ausdehnung, Dichte und Organisation der T-Tubuli.

Zusammenfassend kann durch das Reifungsprotokoll der Reifegrad der hiPS-KM hinsichtlich ihrer morphologischen und funktionellen Eigenschaften beschleunigt werden. Sie entsprechen zwar noch nicht vollständig adulten ventrikulären KM, können sich aber gut für wissenschaftliche Forschung eignen, weil sie hinreichend adulten KM ähneln (Parikh et al. 2017).

## 1.5 Fragestellungen und Hypothesen der Arbeit

ACM wird durch desmosomale Mutationen, z. B. in PKP2 und DSG2, verursacht. Es existieren aktuell keine spezifischen Therapien für ACM-Erkrankte. Das Ziel dieser Arbeit ist, die therapeutische Wirkung eines Tandem-Peptids auf hiPS-KM mit einem *Knockout* des PKP2-Gens (PKP2-KO) zu prüfen.

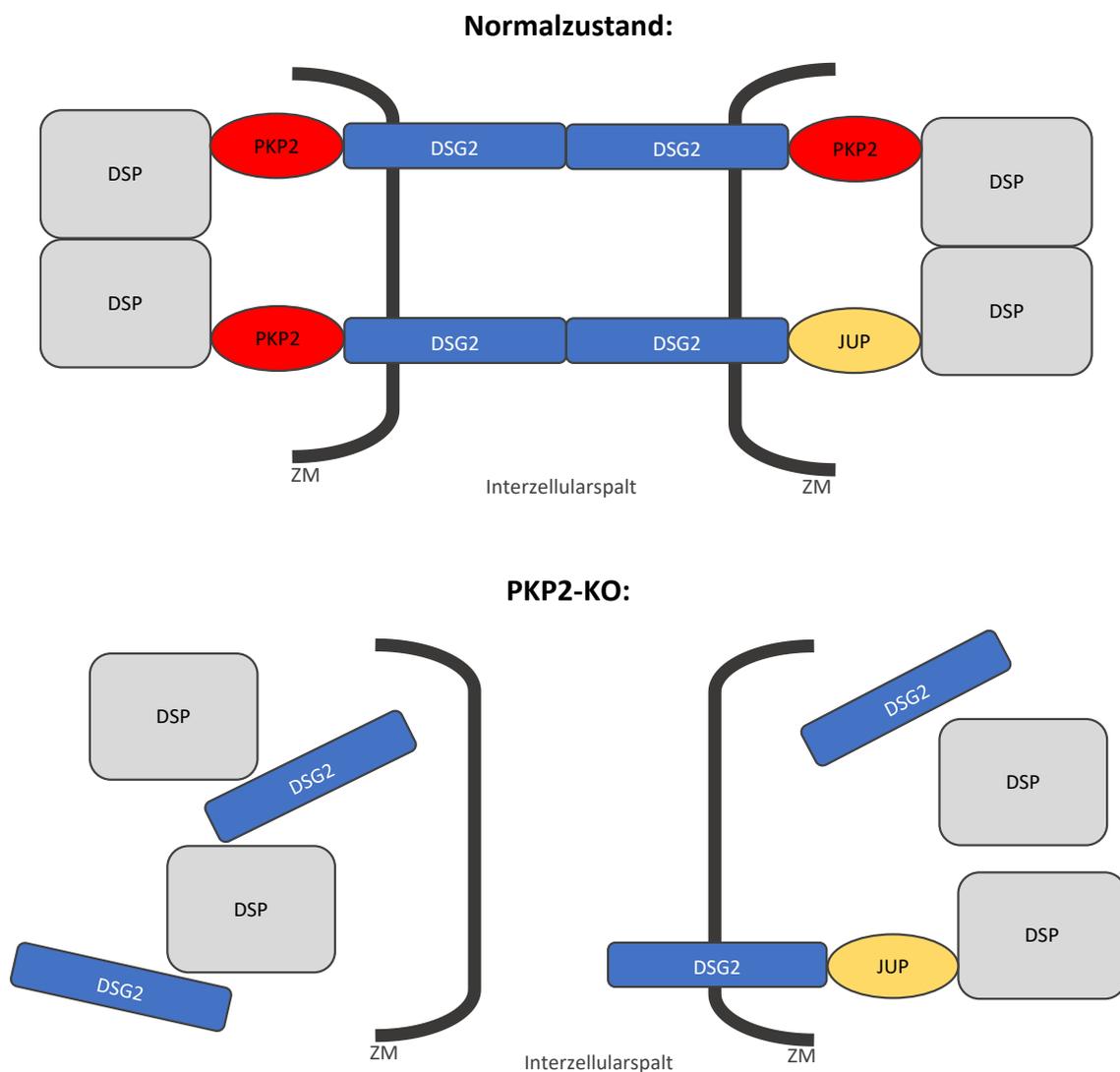
Für das in-vitro-Modell der ACM wurden drei humane induzierte Stammzelllinien von Dr. Anna Janz reprogrammiert. Mit Hilfe der CRISPR/Cas-Methode wurde zusätzlich zur isogenen Kontrolle ein PKP2- und DSG2-*Knockout* eingefügt (Janz et al. 2021). Durch die Etablierung der isogenen PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM wurde ein neues Modell geschaffen, was die Forschung an ACM ergänzt und die Grundlage dieser Arbeit darstellt.

Da der Reifegrad der aus hiPS-Zellen differenzierten Kardiomyozyten ein wichtiger Parameter für deren Funktionalität ist, wurde im ersten Teil dieser Arbeit ein Reifungsprotokoll durch die sogenannte *Mattress*-Kultivierung und Hormonzugabe etabliert und angewandt.

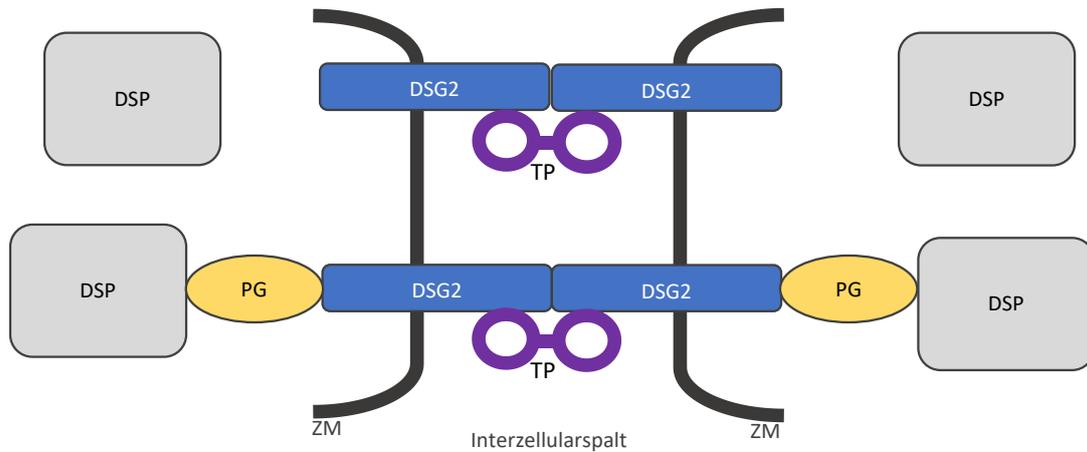
Ein weiteres Ziel bestand darin, KM der PKP2- und DSG2-KO-Linien funktionell zu charakterisieren und einen möglichen „ACM-Phänotyp“ untereinander und mit der isogenen Kontrolle zu vergleichen. In Publikationen mit PKP2-KO-Mäusen und hiPS-KM mit DSG2-Mutation hat sich gezeigt, dass Veränderungen des Kalziumhaushalts eine Rolle im Pathomechanismus der Erkrankung spielen können (Cerrone et al. 2017; El-Battrawy et al. 2018). Deshalb wurden erstmals in dieser Arbeit funktionelle  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen im direkten Vergleich von PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM in hiPS-KM mit der isogenen Kontrolle durchgeführt. Dabei wurden absolute intrazelluläre Kalziumkonzentrationen und deren Kinetik gemessen. Da die ACM durch Rhythmusstörungen gekennzeichnet ist, wurden auch Analysen der Arrhythmien in vitro durchgeführt. Hierbei haben wir die Häufigkeit und Konfiguration der arrhythmischen Ereignisse bestimmt.

Die Hypothese für diese Arbeit entwickelte sich durch die in unserem Labor beobachtete zytoplasmatische Dispersion von DSG2 in PKP2-KO-KM. Diese könnte durch ein DSG2-

spezifisches Tandem-Peptid stabilisiert werden. Wie in Abbildung 8 aufgezeigt, sollte einerseits das TP durch die extrazelluläre Bindungsstärke die DSG2-Transmembranproteine wieder in die Membran zurück lokalisieren. Andererseits sollte durch Stabilisierung der verbleibenden DSG2-Bindungen an PG der Verlust der Zell-Zell-Bindungsstärke durch den PKP2-KO kompensiert werden. Erwartet wurde, dass der zuvor analysierte „ACM-Phänotyp“ der PKP2-KO-KM durch das TP therapiert wird, während der DSG2-KO-Phänotyp (Kontrolle) nicht durch das TP beeinflusst werden sollte.



### Behandlung durch das Tandem-Peptid:



*Abbildung 8: Desmosom im Normalzustand und mit PKP2-KO sowie die postulierte Wirkweise des TPs bei PKP2-KO*

*Vereinfachte Darstellung eines Desmosoms.*

*Oben: Normalzustand (Anzahl von PKP2 und PG willkürlich gewählt).*

*Mittig: PKP2-KO mit sichtbarer DSG2-Dispersion im Zytoplasma.*

*Unten: postulierte Wirkweise des TPs bei PKP2-KO-KM. Das TP könnte DSG2 zurück an die Zellmembran (ZM) lokalisieren oder die bestehenden Bindungen verstärken.*

*Abkürzungen: Desmoglein-2 (DSG2), Desmoplakin (DSP), Plakoglobin (PG), Plakophilin-2 (PKP2), Tandem-Peptid (TP)*

*(Eigene Abbildung erstellt in Word.)*

Somit sollte zum ersten Mal das TP an humanen KM therapeutisch am PKP2-KO verwendet und seine Spezifität am DSG2-KO bestätigt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellkultur

##### 2.1.1.1 Substanzen

Tabelle 1: Substanzen mit Verwendung in der Zellkultur

| Produkt  | Produktnummer | Hersteller                       |
|--|---------------|----------------------------------|
| <b>Stammzell-Kultur:</b>   |               |                                  |
| Accutase™  | A1105-01      | Gibco™, Thermo Fisher Scientific |
| DMEM/F-12  | 11320033      | Gibco™, Thermo Fisher Scientific |
| DMSO (Dimethylsulfoxid)  | D8418         | Sigma-Aldrich                    |
| DPBS   | D8537         | Sigma-Aldrich                    |
| KnockOut™ Serum  | 10828-028     | Gibco™, Thermo Fisher Scientific |
| Matrigel®- hESC-qualified Matrix   | 354277        | Corning™                         |
| mTeSR™1  | 85850         | STEMCELL                         |
| ROCK Inhibitor Y27632  | 130-103-922   | Miltenyi Biotec                  |
| <b>Kardiomyozyten-Kultur:</b>  |               |                                  |
| B-27™ Supplement   | 17504044      | Gibco™, Thermo Fisher Scientific |
| B-27™ Supplement ohne Insulin  | A1895601      | Gibco™, Thermo Fisher Scientific |
| BMP4 Recombinant Human Protein   | PHC9534       | Thermo Fisher Scientific         |
| CHIR99021  | 1386(-B8)     | Axon Medchem                     |
| FBS Fetal Bovine Serum   | S0615         | Biochrom                         |
| IWR1   | 10161         | Sigma-Aldrich                    |
| L-Ascorbinsäure  | A4544         | Sigma-Aldrich                    |
| Matrigel® hESC-qualified matrix  | 354277        | Corning™                         |
| Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix ( <i>Mattress</i> ) | 356230        | Corning™                         |
| RPMI 1640 Medium, no glucose   | 11879020      | Gibco™, Thermo Fisher Scientific |
| RPMI1640   | 21875034      | Gibco™, Thermo Fisher Scientific |
| Sodium L-lactate   | 71718         | Sigma-Aldrich                    |
| TrypLE™  | 12604-021     | Gibco™, Thermo Fisher Scientific |
| β-Mercaptoethanol  | 31350-010     | Gibco™, Thermo Fisher Scientific |
| <b>Experiment-Substanzen:</b>  |               |                                  |
| Dexamethason   | 11015         | Cayman Chemical                  |
| DMSO (Dimethylsulfoxid)  | D8418         | Sigma-Aldrich                    |
| L-Tryptophan   | T8941         | Sigma-Aldrich                    |
| NaOH (Natronlauge)   | S5881         | Sigma-Aldrich                    |

| Produkt           | Produktnummer | Hersteller    |
|-------------------|---------------|---------------|
| Triiodthyronin T3 | T2877         | Sigma-Aldrich |
| Tandem-Peptid     | 4058320       | Bachem        |

### 2.1.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Geräte und Material mit Verwendung in der Zellkultur

| Produkt  | Hersteller                  |
|--|-----------------------------|
| <b>Geräte:</b>   |                             |
| Inkubatoren  | Thermo Fisher Scientific    |
| Lichtmikroskop (CKX53)   | OLYMPUS CORPORATION         |
| Mikroliter Zentrifuge  | Andreas Hettich GmbH        |
| Mikroskop (color camera DFC 7000 T)                                | Leica Microsystems CMS GmbH |
| Mikroskop (DMi8)   | Leica Microsystems CMS GmbH |
| pH-Meter   | Hanna Instruments           |
| Pipetten 10-100 µl/0,5-10 µl/100-1000 µl/0,1-2,5 µl                | Eppendorf Research          |
| Pipettierhilfe (accu-jet® pro)                                     | BRAND                       |
| Sterilbank (Safe 2020)   | Thermo Fisher Scientific    |
| Thermoschüttler  | Infors AG                   |
| Vortexgerät (VortexMaster SU1901)                                  | Sunlab                      |
| Waage  | Kern & Sohn GmbH            |
| Wasserbad  | Memmert                     |
| ZEISS (LEO912AB)   | Zeiss NTS                   |
| Zellzähler (Cell Counter TC20™)                                    | Bio-Rad Laboratories        |
| Zentrifuge (Universal 32)  | Andreas Hettich GmbH        |
| <b>Verbrauchsmaterial:</b>   |                             |
| CELLSTAR® Polypropylen-Röhrchen 15 ml /50 ml                       | Greiner Bio-One             |
| CELLSTAR® Serologische Pipette 5 ml/10 ml/25 ml/50 ml (in 1/10 ml) | Greiner Bio-One             |
| Coverslips Ø 10 mm/Ø 12 mm   | Paul Marienfeld GmbH        |
| Kryogefäße   | Thermo Fisher Scientific    |
| Pipetten-Spitzen 20 µl/200 µl/1000 µl                              | SARSTEDT                    |
| Reaktionsgefäß 1,5 ml/2 ml   | SARSTEDT                    |
| Zellkulturplatten 6-Well/12-Well/24-Well/48-Well                   | Greiner Bio-One             |

## 2.1.2 IonOptix-Kalziummessungen

### 2.1.2.1 Substanzen

Tabelle 3: Substanzen für die Vorbereitung und Durchführung der IonOptix-Messungen

| Produkt                                 | Produktnummer | Hersteller                            |
|---|---------------|---------------------------------------|
| <b>Tyrode-Lösungen:</b>                 |               |                                       |
| Calciumchlorid CaCl <sub>2</sub>        | 21114         | Honeywell                             |
| D-(+)-Glucose                           | G8270         | Sigma-Aldrich                         |
| Isoprenaline hydrochloride              | I5627         | Sigma-Aldrich                         |
| Kaliumchlorid KCl                       | 1.04936       | Merck                                 |
| L-Ascorbinsäure                         | A5960         | Sigma-Aldrich                         |
| Magnesiumchlorid MgCl <sub>2</sub>      | 1.05833       | Merck                                 |
| Natriumchlorid NaCl                     | S7653         | Sigma-Aldrich                         |
| Natrium-Hepes                           | H7006         | Sigma-Aldrich                         |
| Natriumpyruvat                          | P2256         | Sigma-Aldrich                         |
| Natronlauge NaOH                        | S5881         | Sigma-Aldrich                         |
| Salzsäure HCl                           | 35328         | Honeywell Fluka™                      |
| <b>Färbung der Zellen:</b>              |               |                                       |
| Indo-1, AM                              | I1223         | Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific |
| Pluronic® F-127 (20 % solution in DMSO) | 59004         | Biotium                               |

### 2.1.2.2 IonOptix-Geräte

Tabelle 4: Bestandteile des IonOptix-Versuchsaufbaus

| Produkt   | Funktion                                 | Hersteller         |
|---|--|--------------------|
| <b>Geräte:</b>                                    |  |                    |
| Train/Delay Generator (Model DG2A)                | elektrische Stimulation                  | Digitimer Ltd.     |
| Stimulus Isolation Unit (SIU-102)                 | elektrische Stimulation                  | Warner Instruments |
| MSC100 MyoCam-S (High-Speed Contractility Camera) | Kamera                                   | IonOptix           |
| Nikon Eclipse Ti-S                                | Mikroskop                                | Nikon              |
| μStep filter wheel and controller                 | Schaltung der Filter vor der Lichtquelle | IonOptix           |
| High Intensity Xenon Arc Lamp Power Supply        | Lichtquelle, Xenonlampe                  | Cairn Research     |

| <b>Produkt</b>                               | <b>Funktion</b>   | <b>Hersteller</b>              |
|--|---|--------------------------------|
| CFA300 Cell framing adapter                  | Trennung der Lichtwellenlängen: > 635 nm für Kamera, 405 nm für PMT1, 485 nm für PMT2   | IonOptix, USA                  |
| SP302SA-V 230 V/50 Hz                        | Pumpe zum Absaugen der Lösungen   | Schwarzer Precision            |
| PMT400 Photomultiplier sub-system            | Sensoren für Photonen bzw. die Emissionswellenlängen von Indo   | IonOptix                       |
| Computer Optiplex 755 (mit Monitor von Acer) | Aufzeichnung der Daten  | Dell                           |
| FSI700 Fluorescence system interface         | Schnittstelle zwischen, PC, PMT und Filterrad   | IonOptix, Irland               |
| TC-324B automatic temperature controller     | Temp.-Kontrolle der Messkammer  | Warner Instruments Corporation |
| <b>Spiegel und Filter:</b>                   |   |                                |
| 440DCLP (DC=dichroitisch)                    | Spiegel für Photomultiplier 1 (Licht < 440 nm wird reflektiert, Licht > 440 nm wird transmittiert) Ziel: Trennung von 405 nm und 485 nm | Chroma Technology              |
| 515DCXR                                      | zweiten PMT 2 Spiegel (Licht < 515 nm wird reflektiert, Licht > 515 nm wird transmittiert)  | Chroma Technology              |
| 405/30x                                      | Filter vor PMT1 (zur spezifischen Detektion von 405 nm ohne Streulicht)   | Chroma Technology              |
| 485/25x                                      | Filter vor PMT2 (zur spezifischen Detektion von 485 nm ohne Streulicht)   | Chroma Technology              |
| Neutraldichte Filter 0,3                     | Neutraldichte Filter für die Reduzierung der Durchlichtintensität   | Chroma Technology              |
| 650DCXR                                      | Spiegel vor Kamera, der Durchlicht > 650 nm durchlässt  | Chroma Technology              |
| T660LPXR                                     | Spiegel Im Mikroskop, leitet sichtbares Licht und Emission zur Kamera   | Chroma Technology              |
| 365/535pc                                    | Spiegel leitet Anregungslicht auf Zellen  | Chroma Technology              |
| D340/12x                                     | Filter nach Lampe im Filter-Wheel (Anregungswellen)   | Chroma Technology              |
| <b>Verbrauchsmaterial:</b>                   |   |                                |
| Analysewaage ABS                             |   | Kern                           |
| Dreiwegehahn Discifix C 3SC                  |   | B. Braun Melsungen AG          |

| <b>Produkt</b>                           | <b>Funktion</b> | <b>Hersteller</b>     |
|--|-----------------|-----------------------|
| Exadrop Tropfenregler mit Infusionsgerät |                 | B. Braun Melsungen AG |
| Immersionsöl                             |                 | Cargille Laboratories |
| Microscope Cover Glasses 24x50mm         |                 | VWR                   |
| Original-Perfusor-Spritze OPS 50 ml      |                 | B. Braun Melsungen AG |
| Präzisionswaage PLJ 600-2GM              |                 | Kern                  |

### 2.1.3 Software

*Tabelle 5: Software*

| <b>Produkt</b>                             | <b>Hersteller</b>                       |
|--|---|
| GraphPad Prism 5.0                         | GraphPad Software, CA, USA              |
| IonWizard 6.6                              | IonOptix, Milton, MA, USA               |
| MS Office 2010: Excel, Word und PowerPoint | Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zelllinien und ihre Charakterisierung

Für das in dieser Arbeit verwendete in-vitro-Modell wurden im Labor drei Stammzelllinien von Dr. Anna Janz hergestellt. Dafür reprogrammierte sie humane Fibroblasten zu hiPS (Takahashi et al. 2007) und fügte den PKP2-KO und DSG2-KO mit Hilfe der CRISPR/Cas-Methode ein. Der PKP2-mutationstragende Klon wurde durch Sequenzierung ermittelt, die Homozygotie durch Western Blot überprüft und eine unauffällige Karyotyp-Analyse durchgeführt (Janz et al. 2021).

In unserem Labor wurde die Pluripotenz der gesunden Kontroll- und PKP2-KO-Stammzelllinien bestätigt und die Charakterisierung der differenzierten PKP2-KO-hiPS-KM durchgeführt. Die KM exprimierten kein PKP2, wodurch andere assoziierte Proteine, vor allem Cadherine, beeinflusst wurden. DSG2 lokalisierte sich durch den PKP2-KO nicht mehr in der Zellmembran, sondern verteilte sich im ganzen Zytoplasma.

Die aktuelle Arbeit begann mit der Suche eines mutationstragenden DSG2-Klons mittels PCR und Sequenzierung. Dabei stellte sich der Klon 20 als homozygot mutierter DSG2-KO heraus.

Später wurde im Labor die fehlende Expression von DSG2 in der DSG2-KO-KM-Zelllinie durch Immunfluoreszenz-Färbungen bestätigt.

In Tabelle 6 werden die Eigenschaften der verwendeten hiPS-Linien zusammengefasst.

Tabelle 6: Humane induzierte pluripotente Stammzelllinien (Janz et al. 2021)

| hiPS-Zelllinie              | Gesunde Kontrolle               | PKP2-Knockout  | DSG2-Knockout   |
|-----------------------------|---------------------------------|--|---|
| <b>Identifikationsname:</b> | FS/NC6M<br>(JMU001-A)           | PKP2-KO<br>(JMU001-A-2)  | DSG2-KO<br>(JMU001-A-3)                                 |
| <b>Alter:</b>               | 6 Jahre                         | 6 Jahre  | 6 Jahre   |
| <b>Geschlecht:</b>          | Männlich                        | Männlich   | Männlich  |
| <b>Generiert aus:</b>       | Fibroblasten                    | FS-hiPS  | FS-hiPS   |
| <b>Methode:</b>             | Lentivirus-<br>Reprogrammierung | CRISPR/Cas9<br>Genom-Editierung  | CRISPR/Cas9<br>Genom-Editierung                         |
| <b>Mutation:</b>            | keine                           | NM_001005242<br>(PKP2):<br>c.[142_145delGGCC;<br>148C>A];<br>[142_145delGGCC;<br>148C>A] | NM_001943.5<br>(DSG2):<br>c.[9_24del16];<br>[9_24del16] |

## 2.2.2 Zellkultur

### 2.2.2.1 Auftauen und Kultivieren der Stammzellen

Die hiPS wurden in 6-Well-Platten kultiviert, die sechs kleine Schalen beinhalten. Für die Beschichtung der Platten wurde jedes Well (W) mit 1 ml einer Lösung, bestehend aus 229 µl Matrigel (*Matrigel® hESC-qualified matrix*, Aliquot-Information im Beipackzettel) und 37 ml DMEM/F-12, mit gekühlten Pipetten gefüllt. Die Platten wurden für mindestens eine halbe Stunde bei 37 °C aufgewärmt, bevor die Beschichtung abgenommen wurde. Die Hälfte des Stammzellmediums, also 0,5 ml pro W (ml/W), wurde vorgelegt. Das Stammzellmedium bestand aus mTeSR1-Medium inkl. 10 µM gelöstem Rock-Inhibitor (RI) und wurde dauerhaft gewärmt. Das Kryo-Röhrchen mit den

eingefrorenen Zellen wurde im Wasserbad angetaut, bis noch ein schwimmender Kristall zu erkennen war. Dann wurden die Zellen mit 4 ml DMEM/F-12 vorsichtig suspendiert und bei 1300 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands konnte das Zell-Pellet mit 0,5 ml/W von mTeSR1 inkl. RI langsam resuspendiert und auf die Well-Platte verteilt werden. Mit zwei senkrechten und zwei Seitwärtsbewegungen der Platte, dem sogenannten *T-Shake*, wurden die Zellen verteilt. Ab dem nächsten Tag wurde das Medium mit 1 ml/W mTeSR1 täglich gewechselt.

### 2.2.2.2 *Splitten und Einfrieren von Stammzellen*

Da die hiPS zu Gewebezellen differenzieren, wenn sie die Ws zu dicht besiedeln, wurden sie bei ungefähr 80-prozentiger Konfluenz passagiert und meist im Verhältnis 1:6 gesplittet bzw. aufgeteilt. Erneut wurde die Well-Platte nach Abnehmen des Beschichtungsmediums mit der Hälfte des Zellmediums, also 0,5 ml/W, vorbereitet, um das Medium auf 37 °C vorzuwärmen.

Nach dem Waschen der Zellen mit gewärmten 0,5 ml/W DPBS wurde 0,5 ml Accutase in jedes W gegeben und für drei Minuten in den Inkubator gestellt. Leichtes Klopfen am Rand der Platte löste die Zellen von der Grundlage. Der Vorgang des Ablösens wurde mit 1,5 ml/W DMEM/F-12 gestoppt und die schwimmenden Zellen in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Nach dem Zentrifugieren bei 1300 rpm für 3 Minuten wurde das Pellet mit 0,5 ml/W von mTeSR1 inkl. 10 µM RI gelöst und auf die Platte verteilt, die mit dem *T-Shake* bewegt wurde, um den Einzelzellen Abstand zum Wachsen zu gewährleisten.

Übrige hiPS wurden eingefroren, um von allen Zelllinien Reserven zum Auftauen bereitstellen zu können. Das Ablösen der Zellen bestand aus den gleichen Arbeitsschritten wie beim Splitten, allerdings wurde danach das Zellpellet in einem Kryo-Medium, bestehend aus 90 % Knockout-Serum mit 10 % DMSO, resuspendiert. Ein ungefähr 80 %-konfluentes W wurde mit 1 ml Kryo-Medium in einem Kryo-Röhrchen eingefroren.

### 2.2.2.3 Differenzierung zu Kardiomyozyten

Für den Beginn des Differenzierungsprotokolls zu KM ist eine Konfluenz von 90 % am besten geeignet (Kadari et al. 2015). Dafür wurden die Zellen zwei Tage vorher gezählt und mit einer Zellzahl von  $5 \cdot 10^5$  Zellen pro W in eine 12-Well-Platte ausgesät.

Der Vorgang des Ablösens wurde wie beim Splitten durchgeführt. Nachdem die Zellen mit DMEM/F-12 eingesammelt wurden, wurde mit einem automatischen Zell-Zähler die Konzentration im Gemisch bestimmt und nur die benötigte Gesamtmenge zu einem Pellet zentrifugiert. Dieses wurde mit der Gesamtmenge des benötigten mTeSR1 inkl. RI vorsichtig suspendiert, um jedes W der vorbereiteten 12-Well-Platte mit insgesamt 0,5 ml zu füllen. Die Zellmischung musste exakt gleichmäßig verteilt werden und der T-Shake der Platte ermöglichte den Kolonien so zu wachsen, dass am nächsten Tag 60 % des Bodens mit hiPS bedeckt waren. Dann wurde ein Medium-Wechsel mit 0,75 ml/W mTeSR1 durchgeführt.

Wenn am nächsten Tag, an Tag 0 der Differenzierung, 90 % Konfluenz von undifferenzierten hiPS bestand, begann der Differenzierungsvorgang. Das Medium wurde mit 1 ml/W kardialen Basalmedium (CBM) (Tabelle 7) inkl. 10  $\mu$ M CHIR99021 und 25 ng/ml BMP4 gewechselt.

An Tag 1 wurde zur möglichst gleichen Uhrzeit das Medium mit 1 ml/W CBM inkl. 25 ng/ml BMP4 gewechselt.

Zur gleichen Uhrzeit wurde an Tag 2 1 ml/W kardiales Spezifikationsmedium (CSM) (Tabelle 7) verwendet.

Ab Tag 3 wurde das Medium CSM inkl. 10  $\mu$ M IWR1 für die Zellen verwendet, an Tag 3 mit 1 ml/W, danach mit 0,5 ml/W.

Ungefähr an Tag 8 oder 9 konnte man beobachten, dass die Zellverbindungen zu kontrahieren begannen und ab diesem Zeitpunkt KM waren. An diesem Tag wurde noch einmal wie vorher CSM inkl. IWR1 verwendet und das Alter der KM mit 0 Tagen bezeichnet.

Wenn am nächsten Tag nicht mehr Zellen zu kontrahieren begannen, wurden sie (statt in CSM inkl. IWR1) in CBM kultiviert, welches je nach Zelldichte und Flüssigkeitsverfärbung ungefähr alle 3 Tage gewechselt wurde.

Um die entstandenen KM aufzureinigen und übrige Zellen anderer Gewebearten zu entfernen, wurde die Versorgung mit CBM nach wenigen Tagen unterbrochen und für ungefähr 5 Tage täglich mit 1 ml/W kardialen Anreicherungsmedium (CEM) (Tabelle 7) ersetzt. Dies wurde wiederholt, wenn fremde Gewebetypen sich zu verbreiten schienen, denn nur KM können das in CEM ausschließlich enthaltene Laktat verwerten und überleben.

*Tabelle 7: Zusammensetzung der Medien für die kardiale Differenzierung*

| <b>CBM (<i>cardiac basal medium</i>): kardiales Basalmedium</b>                  |        |
|--|--------|
| RPMI 1640  | 500 ml |
| B27 Supplement   | 10 ml  |
| L-Ascorbinsäure (Stocklösung mit 25 mg/ml in H <sub>2</sub> O)                   | 1 ml   |
| β-Mercaptoethanol  | 1 ml   |
| <b>CSM (<i>cardiac specification medium</i>): kardiales Spezifikationsmedium</b> |        |
| RPMI 1640  | 500 ml |
| B27 Supplement ohne Insulin  | 10 ml  |
| L-Ascorbinsäure (Stocklösung mit 25 mg/ml in H <sub>2</sub> O)                   | 1 ml   |
| β-Mercaptoethanol  | 1 ml   |
| <b>CEM (<i>cardiac enrichment medium</i>): kardiales Anreicherungsmedium</b>     |        |
| RPMI 1640 ohne Glukose   | 500 ml |
| Sodium L-Lactate (4 M Stocklösung)   | 500 µl |

#### 2.2.2.4 *Replatzieren und Kultivieren von Kardiomyozyten auf normalem Matrigel*

Für das Experimentieren und Mikroskopieren mussten die KM auf Deckgläser platziert werden. Bei vorher großen, kontrahierenden Netzwerken, die weitläufig den Rand des Ws bedeckten, wurde im Verhältnis 1:6 gesplittet.

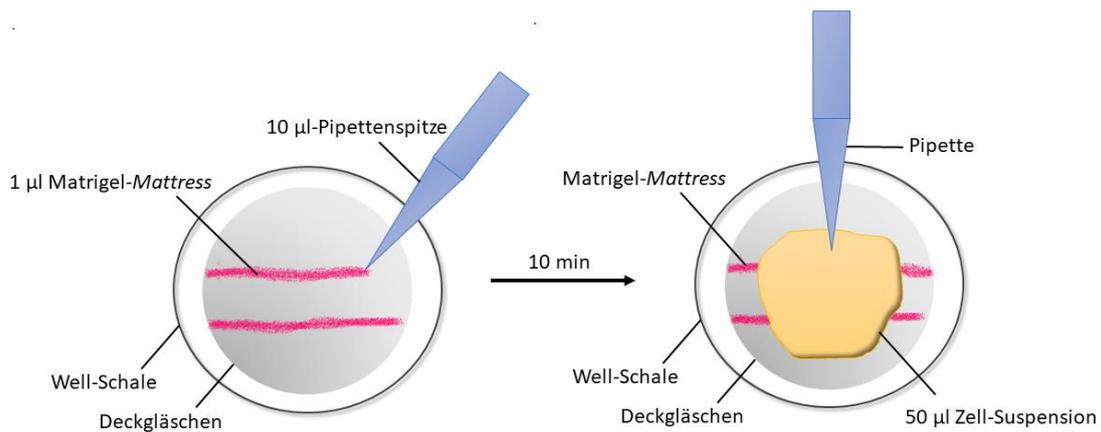
Der Vorgang begann mit dem Ablösen der KM, wofür sie zuerst mit 0,25 ml/W DPBS gewaschen wurden. Es folgte das Lösen der KM mit 0,25 ml/W TrypLE, wobei nach 8 bis 12 Minuten im Inkubator durch Schütteln der Platte getestet wurde, ob die Zellen vom Untergrund gelöst waren. Dann wurde der Vorgang mit 0,75 ml/W DMEMF/12 inkl. 10 %

FBS beendet. Mit einer 5 ml- oder 10 ml-Pipette wurden die Zellverbindungen eingesammelt und bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Aussäen begonnen.

Beim gewöhnlichen Aussäen wurde zuerst die Flüssigkeit der zuvor mit je einem Deckgläschen pro W beschichteten 24-Well-Platte abgenommen. Dann wurde das Zellpellet erneut mit einer großen Pipette mit 0,25 ml/W CBM resuspendiert und auf die Deckgläschen verteilt.

#### *2.2.2.5 Replatieren und Kultivieren von Kardiomyozyten auf der Matrigel-Mattress*

Das Aussäen auf die sogenannten *Matrigel-Mattresses*, sozusagen auf eine „Matrigel-Matratze“, erfolgte nach Beschreibungen von Cadar et al. und Feaster et al. (Cadar et al. 2017; Feaster et al. 2015). Vorher wurde eine 24-Well-Platte mit Deckgläsern, aber ohne Beschichtung, vorbereitet. Das KM-Pellet wurde mit 50 µl/W CBM und einer 5 ml-Pipette 10-mal auf- und abpipettiert, um die Zellverbände zu vereinzeln. Dann wurden die *Mattress*-Linien mit gekühlten 10 µl-Pipettenspitzen gezogen. Auf jedem Deckglas wurden zwei parallele *Mattress*-Linien mit jeweils 1 µl gekühltem Matrigel (*Matrigel® Growth Factor Reduced Basement Membrane Matrix*) gezogen und diese mit offenem Deckel für 10 Minuten trocknen gelassen. Anschließend wurden je 50 µl/W der Zellmischung in die Mitte der *Mattresses* aufgetragen. Nach 20 Minuten Wartezeit bei Raumtemperatur, die zum Anhaften der Zellen diente, wurden die Ws mit 250 µl/W CBM aufgefüllt (Abbildung 9).



#### **Abbildung 9: Auftragen der Matrigel-Mattressen**

Auf ein Deckglas wurden zügig die Linien der Matrigel-Mattressen (pink dargestellt, eigentlich transparent) aufgetragen und nach 10 Minuten Wartezeit die Zell-Suspension mit gelösten KM im Medium (gelb dargestellt, eigentlich trüb farblos) darauf gegeben.

(Eigene Abbildung erstellt in PowerPoint aus der Referenz (Feaster et al. 2015).)

#### **2.2.2.6 Einfrieren und Auftauen von Kardiomyozyten**

Das Auftauen der KM erfolgte wie bei den Stammzellen beschrieben, außer dass DMEM-F/12 inkl. 10 % FBS statt reinem DMEM/F-12 verwendet wurde. Die KM wurden dann auf die Matrigel-Mattressen, wie oben beschrieben, ausgesät.

Um KM einzufrieren, wurde wie bei den Stammzellen vorgegangen, aber als Medium wurde FBS inkl. 10 % DMSO verwendet. Die Zellmenge pro Kryo-Röhrchen wurde notiert.

#### **2.2.3 IonOptix-Kalziummessungen**

Die Ca<sup>2+</sup>-Messungen wurden mit einer Anlage durchgeführt, die hauptsächlich vom Hersteller IonOptix stammt und aus mehreren Geräten zusammengesetzt war: Xenon-Lampe, Filter, Spiegel, *Photomultiplier*, Kamera, *System Interface* und Zellstimulator. Im Mittelpunkt des Aufbaus stand das Epifluoreszenzmikroskop.

Während der Messung wurde mit Durchlicht-Mikroskopie die Länge der Zelle und ihre Kontraktionen gefilmt. Gleichzeitig konnten durch Fluoreszenz-Messungen die intrazellulären  $[Ca^{2+}]_i$  in Echtzeit und somit auch die Kinetik der Kalziumtransienten erfasst werden. Für die  $Ca^{2+}$ -Bestimmung wurden die Zellen mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Indo-1 (Indo) gefärbt. Die  $Ca^{2+}$ -Signale des Farbstoffs wurden über mehrere Spiegel und Filter des IonOptix-Systems verarbeitet. Währenddessen wurden die Zellen mit Tyrode-Lösungen mit verschiedenen  $Ca^{2+}$ - und Isoprenalin-Konzentrationen umspült, um sie zu stimulieren.

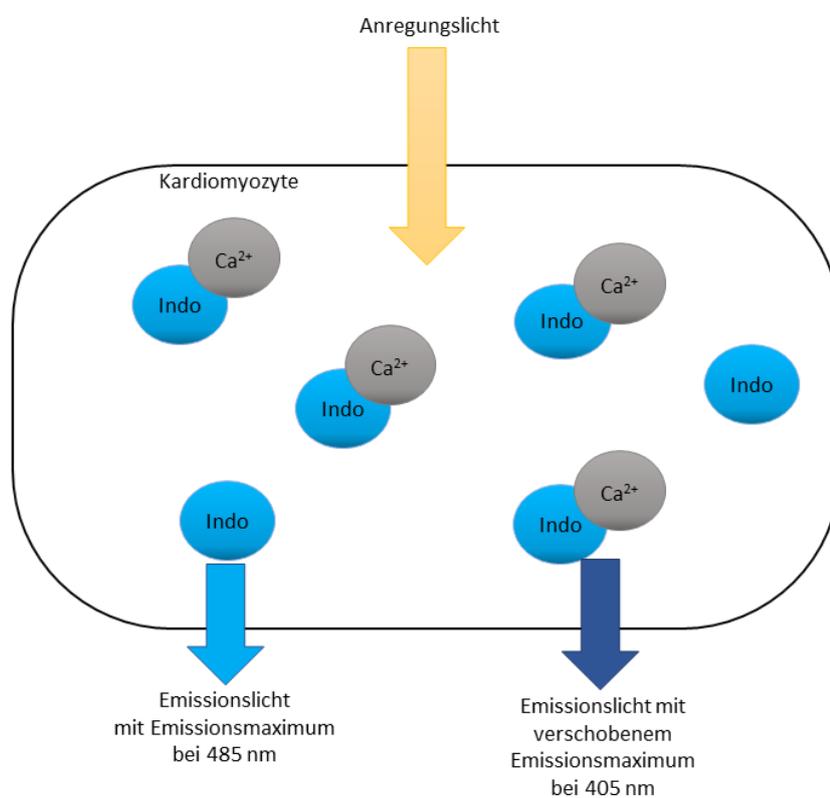
Nachfolgend werden die Funktion des Fluoreszenzfarbstoffs, die Verarbeitung der Farbstoffsignale, die Gewinnung der Signale über Spiegel sowie Filter, der Versuchsaufbau mit den Zellen im Zentrum und die chronologische Abfolge der Versuchsdurchführung erklärt.

### 2.2.3.1 Verwendung des Farbstoffs Indo für Kalzium-Fluoreszenz-Messungen

Für die  $Ca^{2+}$ -Messungen wurden KM mit dem ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoff Indo-1, AM gefärbt. Ratiometrisch bedeutet, dass Indo mit einer anderen Wellenlänge fluoresziert, je nachdem ob es  $Ca^{2+}$  gebunden hat oder nicht. Deshalb wird das Verhältnis, die *Ratio*, dieser beiden Wellenlängen gebildet, das dann für die intrazelluläre  $[Ca^{2+}]_i$  steht und die Zielgröße ist. Indo-1, AM kann als Acetoxymethylester (AM) die Zellmembran passieren, worauf intrazelluläre unspezifische Esterasen der Zellen den AM-Ester zu Formaldehyd und Essigsäure hydrolysieren. Das  $Ca^{2+}$ -sensitive Indo-1 verbleibt dann im Zytosol (Molecular Probes 2011).

Die Xenon-Lampe mit Filtern und Spiegeln des Ion-Optix-Aufbaus regte den Fluoreszenzfarbstoff mit der Exzitationswellenlänge von 338 nm an. Da Indo ein ratiometrischer Farbstoff ist, fluoresziert er ohne gebundenes  $Ca^{2+}$  mit dem Emissionsmaximum von  $\lambda = 485$  nm. Bei gebundenem  $Ca^{2+}$  verschiebt sich das Emissionsmaximum von Indo auf  $\lambda = 405$  nm (Abbildung 10). Wenn KM kontrahieren, ändert sich deren intrazelluläre  $[Ca^{2+}]_i$  und damit auch der Anteil der Indo-Moleküle mit gebundenem  $Ca^{2+}$ . Somit verändern sich auch die Intensitäten des Emissionslichts der

jeweiligen Wellenlängen, welche das Epifluoreszenzmikroskop aufzeichnet. Indem das Verhältnis bzw. *Ratio* der beiden Wellenlängen gebildet wurde, wurde ein Maß für die intrazelluläre  $[Ca^{2+}]_i$  gebildet, dessen Einheit auch im Folgenden als Verhältnis der Fluoreszenz-Intensitäten angegeben wird. Da verschiedene Faktoren beide Intensitäten gleichermaßen beeinflussen, ist das Emissions-Verhältnis unter anderem korrigiert nach der Farbstoffkonzentration, dem Zellvolumen und dem Ausbleichen, wofür Indo sensibel ist (Grynkiewicz, Poenie, and Tsien 1985).



**Abbildung 10: Funktionsweise von Indo als Indikator für intrazelluläre Kalziumkonzentrationen**

Eine mit Indo gefärbte KM ist schematisch dargestellt. Wenn das Anregungslicht auf die Zelle fällt, geht von ungebundenem Indo ein Emissionslicht mit einem Fluoreszenzspektrum aus, das das Maximum bei einer Wellenlänge von 485 nm hat. Bei Indo mit gebundenem  $Ca^{2+}$  verschiebt sich das Emissionsmaximum des Fluoreszenzspektrums auf eine Wellenlänge von 405 nm. Daraus kann das Verhältnis berechnet und die intrazelluläre  $[Ca^{2+}]_i$  bestimmt werden.

(Eigene Abbildung erstellt in PowerPoint.)

### 2.2.3.2 Versuchsaufbau zur Kalzium- und Kontraktilitätsmessung mit IonOptix

Verbunden mit dem IonOptix-System war ein Computer mit dem Programm IonWizard 6.6, der die eingehenden Signale verarbeitete. Abbildung 11 zeigt eine Bildschirm-Moment-Aufnahme während der  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung. Die obere Spur 1, der *Numerator* (Zähler), stellte die absolute Intensität des Farbstoff-Signals des mit  $\text{Ca}^{2+}$  beladenen Indos dar, womit die Farbstoff-Beladung der Zellen überprüft werden konnte. Der *Numerator* (Zähler) gab die Intensität des Emissionslichts bei 405 nm wieder. Die Spur 2 ist ausgeblendet und würde den *Denominator* (Nenner) darstellen, der die Intensität des Emissionslichts bei 485 nm wiedergab. Die mittlere Spur 3 darunter, die *Ratio* (Verhältnis), enthielt die berechneten Werte des Indo-Signal-Verhältnisses aus der 405 nm-Intensität geteilt durch die 485 nm-Intensität. Die *Ratio* gab die intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  an und war die Zielgröße. Die untere Spur 4, die *Length*, zeichnete die jeweilige Länge der ausgewählten Zelle oder des Zellverbunds auf und gab somit die Kontraktionen wieder. Dafür wurde, wie in Abbildung 11 sichtbar, eine rote und grüne Markierung an den Rändern der Zelle gesetzt und der sich verändernde Abstand dazwischen aufgezeichnet. Für die Markierungen wurden geeignete schwarze oder weiße Punkte im Live-Bild der Zelle manuell ausgewählt, die vom Programm erkannt und deren Bewegung aufgezeichnet wurde. Diese Technik wird auch *Edge Detection* genannt.

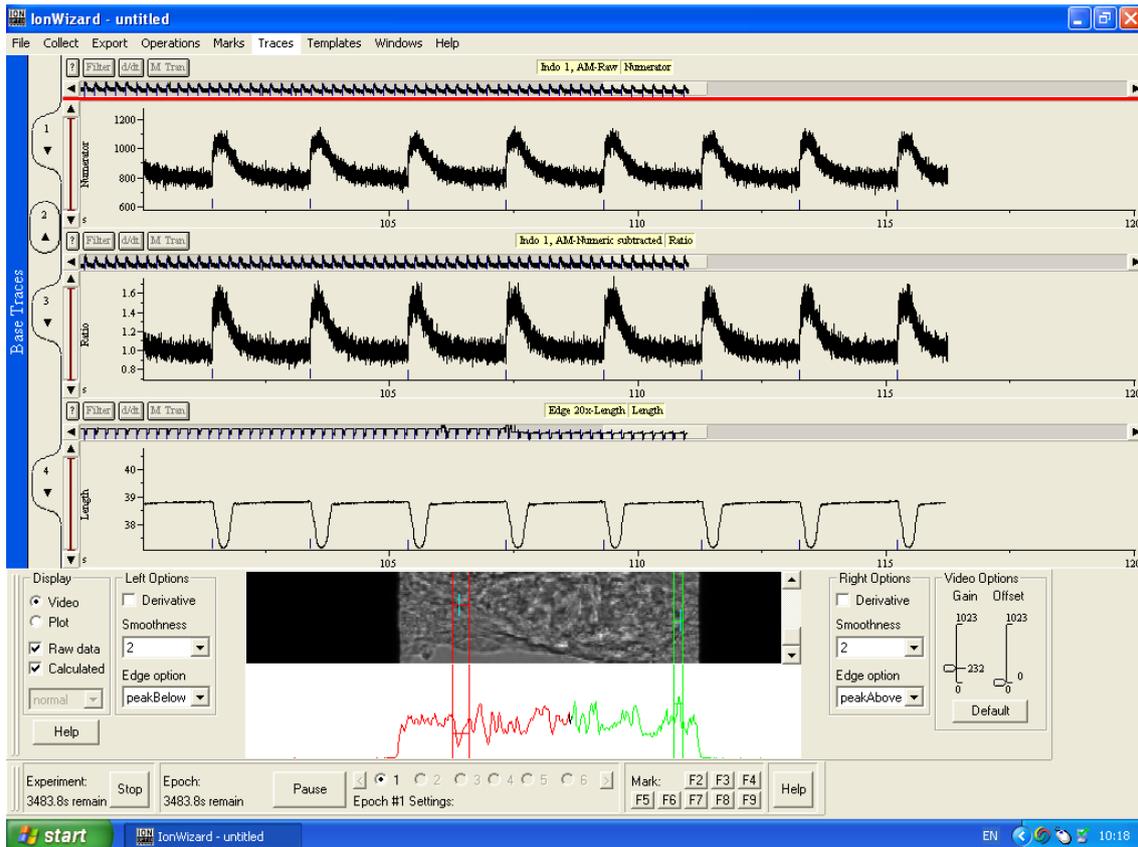


Abbildung 11: Screenshot des IonWizard-Programms während einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung

Sichtbar sind die Spuren für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte und die Zelllänge.

1. Obere Spur: Numerator  $\hat{=}$  absolute Intensität des  $\text{Ca}^{2+}$ -beladenen Indo-Signals.
2. Mittlere Spur: Ratio  $\hat{=}$  Verhältnis des  $\text{Ca}^{2+}$ -beladenen Indo-Signals zu nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -beladenem Indo-Signal.
3. Untere Spur: Length  $\hat{=}$  Zellkontraktion dargestellt als Strecke zwischen beiden Rändern der Zelle.

Bild unten: Die Zelle bzw. der Zellverbund wird gefilmt und mit den roten und grünen Grenzen dessen Ränder an schwarzen bzw. weißen Punkten im Bild markiert.

(Eigens erstellter Screenshot des Programms IonWizard während einer Messung (mit freundlicher Genehmigung der Firma IonOptix).)

Der Versuchsaufbau des gesamten IonOptix-Systems, bestehend aus verschiedenen Geräten, ist in Abbildung 12 dargestellt (s. auch Tabelle 4). Auf dem Mikroskopisch im Mittelpunkt des Systems war die Messkammer (Abbildung 12: MK) angebracht, in der sich die KM befanden. Die KM wurden geheizt (Abbildung 12: H), elektrisch stimuliert (Abbildung 12: Myopacer) und von verschiedenen Lösungen umspült (Abbildung 12: T 1-5). Auf die Zellen wurde sowohl Durchlicht als auch die passenden Wellenlängen für die Fluoreszenzmessungen mit Indo gelenkt. Die abgehenden Signale wurden über

mehrere Filter und Spiegel geleitet und anschließend zum Interface und PC gesendet, wie nachfolgend beschrieben.

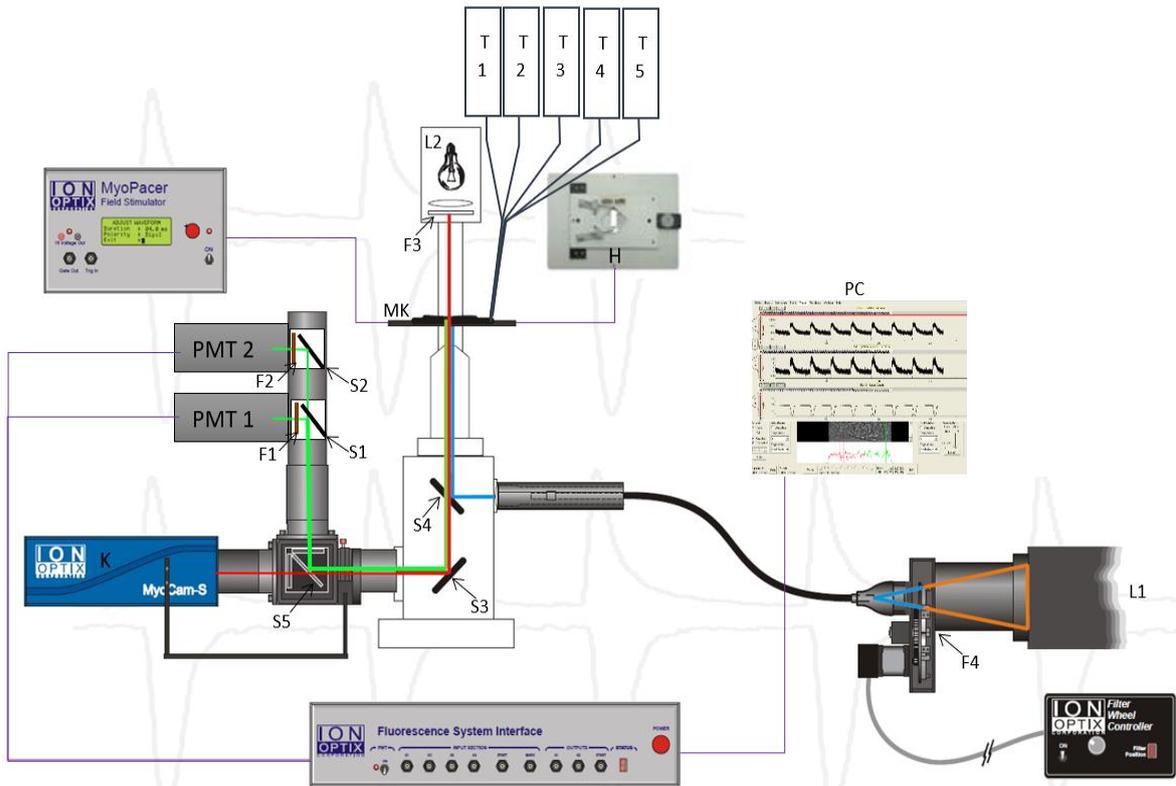


Abbildung 12: Aufbau des IonOptix-Systems mit Beschreibung der Spiegel und Filter

H: Heizung mit Temperatur-Kontrolle

K: Kamera

L1: Xenon-Lampe mit nachgeschaltetem Filter-Wheel mit Filter F4

L2: Lampe für Durchlicht mit Filter F3

MK: Messkammer

PMT: Photomultiplier

T 1-5: Gefäße mit Tyrode-Lösungen

S1: Spiegel vor PMT1: 440DCLP; Spiegelung < 440 nm; Transmission > 440 nm

S2: Spiegel vor PMT2: 515DCXR; Spiegelung < 515 nm; Transmission > 515 nm

F1: Filter vor PMT1: D405/30x; Transmission > 405 ± 15 nm

F2: Filter vor PMT2: D485/30x; Transmission > 485 ± 15 nm

F3: Filter: T660LPXR; Transmission: λ > 660 nm

F4: Filter: D340/12x; Transmission: λ = 340 ± 6 nm

S3: Spiegel: 100 % Spiegel (zum Umlenken des Strahlengangs)

S4: Spiegel: 365/535 pc; Spiegelung: 340 nm/540 nm; Transmission: 405 nm/485 nm/> 600 nm

S5: Spiegel: 650DCXR; Spiegelung < 650 nm; Transmission > 650 nm

(Abbildung modifiziert nach (IonOptix 2014) mit freundlicher Genehmigung der Firma IonOptix.)

Für die Echtzeit-Darstellung und Kontraktionsmessung der Zellen wurde durch eine Lampe (Abbildung 12: L2) und einen nachgeschalteten Filter (Abbildung 12: F3), der eine Transmission von  $\lambda > 660$  nm besaß, also sichtbares Licht passieren ließ, das Durchlicht (Abbildung 12: roter Strahl) erzeugt. Dieses wurde über den Spiegel S3 (Abbildung 12: S3) zur Kamera (Abbildung 12: K) abgelenkt, die das Bild an den PC sendete. Die Kamera war drehbar und enthielt Blenden (CFA), um den Bildausschnitt passend einzustellen.

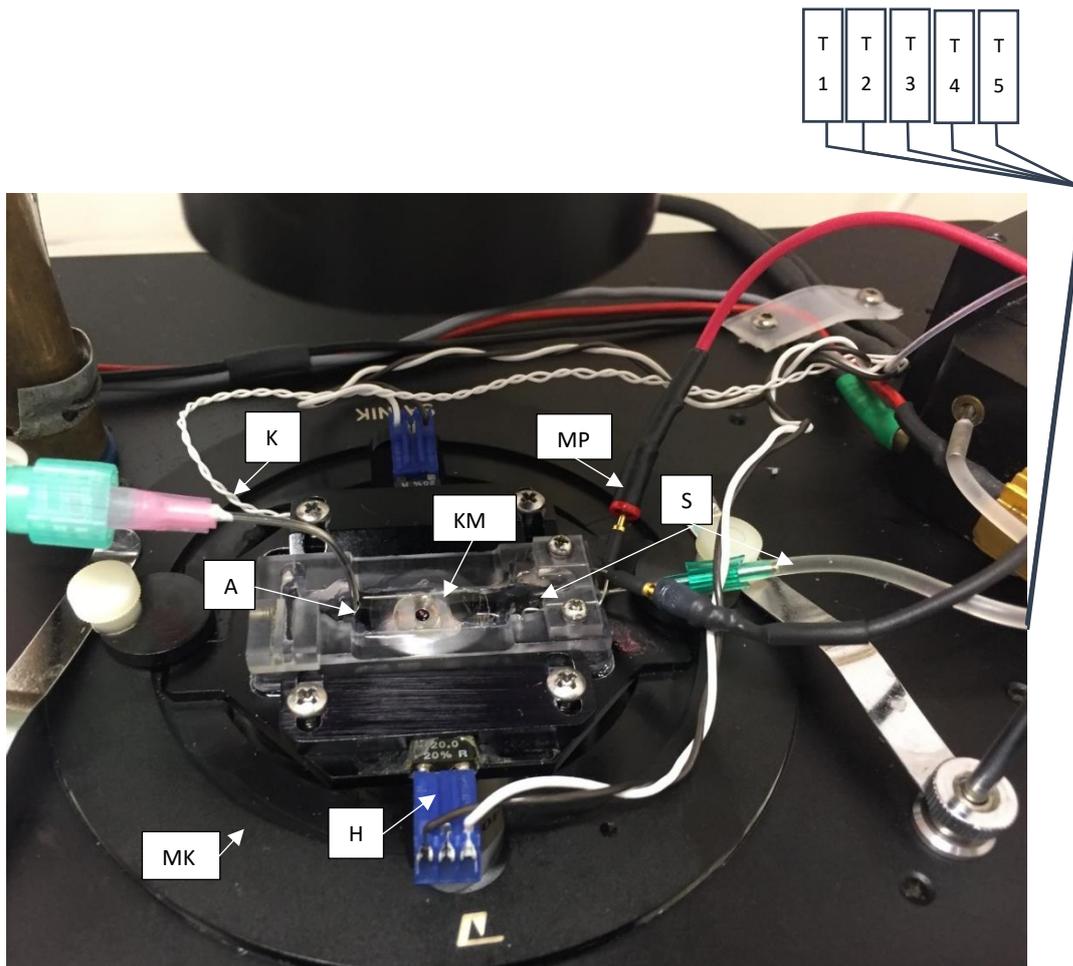
Gleichzeitig wurde zum Hervorrufen des Fluoreszenz-Signals durch die Xenon-Lampe (Abbildung 12: L1) mit nachgeschaltetem Filter (Abbildung 12: F4) im Filterwechsler das Anregungslicht (Abbildung 12: blauer Strahl) der benötigten Wellenlänge erzeugt. Um die Intensität des Anregungslichts anzupassen, befand sich hinter dem Filter-Wechsler ein Neutralsichtfilter mit der Neutralsichtdichte 0,3. Durch den Spiegel S4 (Abbildung 12: S4) wurde das Anregungslicht auf den Objektträger mit den Zellen geleitet, um dort den Farbstoff Indo anzuregen, der durch Fluoreszenz das Emissionslicht (Abbildung 12: grüner Strahl) abstrahlte. Dieses wurde über den Spiegel S3 zusammen mit dem Durchlicht abgelenkt, allerdings vor der Kamera wiederum über den Spiegel S5 (Abbildung 12: S5) in die Richtung der Messstation umgelenkt. Dort führte der dichroitische (DC) Strahlenteiler (Abbildung 12: S1) Wellenlängen mit  $\lambda < 440$  nm dem *Photomultiplier* (PMT) 1 zu. Diesem war noch ein Filter (Abbildung 12: F1) vorgeschaltet, um nur die gesuchten Wellenlängen zu detektieren. Das restliche Licht traf auf einen Spiegel (Abbildung 12: S2), welcher Wellenlängen mit  $\lambda < 515$  nm in den PMT 2 lenkte, vor den wiederum ein Filter (Abbildung 12: F2) vorgeschaltet war. Die PMTs verstärkten die gemessenen Emissionslicht-Signale und wandelten diese in Stromspannungs-Signale um, die die Licht-Intensitäten widerspiegelten. Das *Fluoreszenz-System-Interface* (Abbildung 12) leitete diese zum Computer, der die Intensitäten der beiden Wellenlängen ins Verhältnis setzte und daraus die Kalzium-*Ratio* berechnete (Abbildung 11).

### 2.2.3.3 Zellfärbung mit Indo und Durchführung der IonOptix-Messungen mit Tyrode-Lösungen

Je nach Experiment wurden die KM am Tag zuvor vorbereitet und das Medium mit 0,25 ml/W der 24-Well-Platte gewechselt. Am Tag der Messung wurde jeweils mit aufgewärmtem CBM auf 0,5 ml/W aufgefüllt. Für die Färbung wurde dann 0,5  $\mu$ l der Indo-Stocklösung (50  $\mu$ g Indo-1, AM + 50  $\mu$ l Pluronic) für eine Endkonzentration von 1  $\mu$ M zu den KM gegeben. Nach der Inkubation bei 37 °C für 12 Minuten wurde das Färben beendet, indem die Deckgläschen in frisches CBM gesetzt wurden. Die Färbung hielt für ungefähr 3 Stunden.

Wie in Abbildung 13 zu sehen, wurde das runde Deckglas mit den KM (Abbildung 13: KM) auf ein rechteckiges Deckglas gelegt und wasserdicht in die Messkammer montiert. Diese wurde dann auf dem Epifluoreszenz-Mikroskop über einem mit Immersionsöl bedeckten 20-fach Objektiv befestigt. Von der rechten Seite der Messkammer floss die Tyrode-Lösung über das Deckglas und wurde auf der linken Seite abgesaugt (Abbildung 13: A). Die Flüssigkeit und die Messkammer selbst wurden auf 37 °C erwärmt (Abbildung 12 und Abbildung 13: H) und über eine Temperatursonde kontrolliert (Abbildung 13: K). Der Pacer (Abbildung 12: MyoPacer und Abbildung 13: MP) stimulierte die Zellen über zwei Drähte in der Messkammer mit einem elektrischen Feld in der Frequenz 0,5 Hz. Diese Drähte lagen in der Flüssigkeit senkrecht zum Fluss seitlich neben den KM, wie in der Abbildung 13 horizontal schwach zu erkennen ist.

Je nach Bedingungen des Experiments wurde eine passende Zelle oder ein Zellnetzwerk gesucht, welche möglichst regelmäßig aufgrund der elektrischen Stimulation kontrahieren sollten. Dann wurde die Tyrode-Lösung während der Messung mit verschiedenen Zusätzen nach den Zeiten des Protokolls gewechselt, indem die Dreiwegehähne, die den Behältern (Abbildung 13: T 1-5) nachgeschaltet waren, geöffnet wurden. Zum Schluss wurde das Hintergrundsignal gemessen, das vom Indo-Signal bei der Auswertung abgezogen wurde, indem ein Sichtfenster ohne Zellen gesucht wurde.



*Abbildung 13: Anschlüsse an die Messkammer auf dem Mikroskopisch*

*A: Absauger*

*H: Heizung*

*K: Temperatur-Kontrolle*

*KM: Deckglas mit Kardiomyozyten*

*MK: Messkammer*

*MP: MyoPacer*

*S: zuführender Schlauch*

*T 1-5: Gefäße mit Tyrode-Lösungen*

*(Eigens erstelltes Foto nach einer Messung.)*

An den zuführenden Schlauch (Abbildung 13: S) waren mehrere Gefäße (Abbildung 12 und Abbildung 13: T 1-5) angeschlossen, die mit Drei-Wege-Hähnen geöffnet werden konnten. Darin befanden sich die Tyrode-Lösungen mit jeweils verschiedenen Zusätzen, die während der Messung die Zellen umspülen sollten. Diese sogenannte  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Normal-Tyrode bestand grundlegend aus den Substanzen in Tabelle 8 (außer  $\text{CaCl}_2$ ). Die

letzten vier Stoffe (außer  $\text{CaCl}_2$ ) wurden wöchentlich beigemischt. Der Rest wurde als 10-fach-Lösung steril filtriert und war somit länger haltbar. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Danach wurde die Tyrode-Lösung an das jeweilige Protokoll angepasst und das  $\text{Ca}^{2+}$  dazugegeben, wie in den nächsten Kapiteln der Messprotokolle 2.2.4 beschrieben.

*Tabelle 8: Zusammensetzung der Normal-Tyrode*

| <b>Stoff<br/>(molare Masse (g/mol))</b> | <b>Endkonzentration (mM)</b>  | <b>Menge (g) in 1l H<sub>2</sub>O</b> |
|---|-------------------------------|---------------------------------------|
| <b>NaCl</b> (58,44)                     | 130                           | 7,597                                 |
| <b>KCl</b> (74,56)                      | 5                             | 0,373                                 |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b> (203,31)        | 1                             | 0,203                                 |
| <b>Na-Hepes</b> (260,29)                | 10                            | 2,603                                 |
| <b>Na-Pyruvat</b> (110,04)              | 2                             | 0,220                                 |
| <b>Ascorbinsäure</b> (176,12)           | 0,3                           | 0,053                                 |
| <b>Glucose</b> (180,16)                 | 10                            | 1,802                                 |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b> (110,98)        | 0,5 – 10 (je nach Experiment) | s. Text                               |

## 2.2.4 Messprotokoll der *Mattress*-Etablierung

### 2.2.4.1 *Kultivierungsbedingungen der Versuchsgruppen*

Das Ziel des Versuchs war, das Protokoll zur Zellreifung von Parikh et al. mit unseren KM-Zelllinien zu etablieren. Somit wurde das Experiment an deren Methoden angelehnt (Parikh et al. 2017). Der Reifungsvorgang sollte mit Hilfe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen und Arrhythmie-Analysen überprüft werden.

Von der gesunden Zelllinie und der PKP2-KO-Linie wurde jeweils ein biologisches Replikat differenziert. Je Zelllinie wurden drei Versuchsgruppen gebildet, wie in Tabelle 9 dargestellt. KM der Gruppe „Unreif – *Mattress* – Hormone“ wurden, einige Tage nachdem sie kontrahierten, auf eine mit Deckgläsern gewöhnlich beschichtete 48-Well-

Platte ausgesät (s. 2.2.2.4). Wiederum einige Tage später konnten sie für Messungen herangezogen werden.

Da Schilddrüsen-Hormone und Glukokortikoide die Reifung der KM beschleunigen sollen, wurden Zellen der Gruppe „*Mattress* + Hormone“ mit Triiodthyronin (T3) und Dexamethason (Dex) behandelt (Parikh et al. 2017). Hierfür wurde eine Stammlösung aus 0,1 mM T3 in NaOH (20 mM in H<sub>2</sub>O) hergestellt und ebenso eine Lösung aus 1 mM Dex in DMSO. Dann wurde täglich ein Mediumwechsel mit CBM durchgeführt, in das die T3- und Dex-Stocklösungen jeweils 1:1000 beigemischt wurde. Somit wurde eine Endkonzentration von 0,1 µM T3 und 1 µM Dex täglich erreicht. Nach 14 Tagen wurden sie auf die Matrigel-*Mattress* platziert (s. 2.2.2.5) und dort für mindestens 5 Tage in CBM kultiviert (Feaster et al. 2015). Die KM wurden mit einer gesamten Kultivierungszeit von 19-36 Tagen für Messungen verwendet.

Um die Wirksamkeit der Hormone zu überprüfen, wurde eine Kontrollgruppe „*Mattress* – Hormone“ gegenübergestellt. Bei dieser wurden in das CBM-Medium nur die Lösungsmittel, also DMSO und 20 mM NaOH, im Verhältnis 1:1000 beigemischt. Wiederum nach 14 Tagen wurden sie ebenso auf die *Mattresses* ausgesät. Auch diese konnten nach 5-tägigem Anheften zum Messen verwendet werden. Die KM wurden mit einer gesamten Kultivierungszeit von 18-36 Tagen für Messungen verwendet.

Bei allen Gruppen wurde ungefähr alle 3 Tage und immer am Tag vor der Messung das CBM gewechselt.

Tabelle 9: Gruppierung der Kardiomyozyten aufgrund der Kultivierungseigenschaften

| <b>Gruppe</b>                              | <b>Unreif<br/>– <i>Mattress</i><br/>– Hormone</b> | <b><i>Mattress</i><br/>– Hormone</b>    | <b><i>Mattress</i><br/>+ Hormone</b> |
|--|---|---|--------------------------------------|
| <u>Alter</u>                               | 12 bis 22   | 20 bis 32                               | 19 bis 36                            |
| <u>Täglicher<br/>Mediumwechsel</u>         | CBM   | CBM +<br>Lösungsmittel<br>(NaOH + DMSO) | CBM + Hormone<br>(T3 + Dex)          |
| <u>Deckglas-<br/>Beschichtung</u>          | Matrigel®   | Matrigel® <i>Mattress</i>               | Matrigel® <i>Mattress</i>            |
| <b><u>Gruppen-<br/>zusammenfassung</u></b> |   | <b><i>Mattress</i></b>                  |                                      |
| <u>Deckglas-<br/>Beschichtung</u>          |   | Matrigel® <i>Mattress</i>               |                                      |

#### 2.2.4.2 Kalziummessungen mit unterschiedlichen extrazellulären Kalziumkonzentrationen

Während des Messprotokolls wurden die KM mit aufsteigenden extrazellulären  $[Ca^{2+}]_e$  für eine bestimmte Zeit umspült (Tabelle 10). Die Tyrode-Lösung wurde mit  $Ca^{2+}$  in verschiedenen Konzentrationen versetzt, wofür eine Stammlösung von 1 M  $CaCl_2$  verwendet wurde.

Zu Beginn der Messung erfolgte die Wahl der am besten geeigneten Zelle auf dem Deckglas während der ersten 0,5 mM  $Ca^{2+}$ -Phase. Durch Beobachten wurde die KM gesucht, die möglichst regelmäßig der elektrischen Stimulation mit 0,5 Hz folgte. Ebenso sollte sie auf der Matrigel-*Mattress* platziert sein und möglichst einzeln und länglich sein, da dies das Ziel der *Mattresses* war. Falls keine Zellen vorhanden waren, die messbar kontrahierten, wurde dies notiert.

Wenn die KM aufhörten zu kontrahieren, wurde die Messphase auf bis zu 360 s verlängert. Wenn die KM dadurch nicht wieder kontrahierten, wurde direkt die Erholung mit 0,5 mM  $Ca^{2+}$  angeschlossen, um die Vitalität zu überprüfen.

Tabelle 10: Messprotokoll der *Mattress*-Etablierung mit Tyrode-Lösungen und Zeitspannen

| Ca <sup>2+</sup> -Konzentration der Tyrode-Lösung | Dauer des Umspülens |
|---|---------------------|
| 0,5 mM  | ≥ 90s               |
| 1 mM  | 240s                |
| 2 mM  | 240s                |
| 5 mM  | 240s                |
| 10 mM   | 240s                |
| 0,5 mM (Erholung)                                 | 240s                |

## 2.2.5 Messprotokoll des Versuchs der Tandem-Peptid-Anwendung

### 2.2.5.1 Kultivierungsbedingungen der Versuchsgruppen

Das Ziel dieses Versuchs war es, die Auswirkungen der PKP2- und DSG2-Mutation und die Wirkung eines Tandem-Peptids (TP) zu untersuchen. Weiterhin sollten die Mutationen mit L-Tryp nachgeahmt werden, ähnlich wie bei Schlipp et al. (Schlipp et al. 2014). Deshalb wurden die in Tabelle 11 beschriebenen Gruppen gebildet und wieder die Kalzium-Fluoreszenz aufgezeichnet.

Es wurden KM aller drei vorhandenen Zelllinien verwendet, der gesunden Kontrolle, PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM. Jeweils drei biologische Replikate wurden hergestellt, also drei verschiedene Differenzierungen von verschiedenen Zeitpunkten. Alle Zellen wurden, wie bei der *Mattress*-Etablierung, mit dem Reifungsprotokoll behandelt. Allerdings wurden sie nach der Aufreinigung mit CEM direkt auf die Matrigel-*Mattresses* gesät und dann für zwei Wochen mit den Hormonen behandelt. Dadurch gingen vor allem bei aufgetauten KM weniger KM durch doppeltes Umsetzen verloren. Die jüngsten KM des Versuchs waren 41 Tage alt.

Genau 24 Stunden vor der Messung wurde das Medium mit 250 µl/W CBM gewechselt und dem Medium die in Tabelle 11 dargestellten Substanzen zugefügt. Die TP-Stammlösung bestand aus PBS mit TP in der Stockkonzentration von 1 mM. Für die L-

Tryp-Lösung wurde L-Tryp in der Stockkonzentration von 10 mM zu PBS gegeben und musste dann auf den pH-Wert von 7,4 eingestellt werden.

*Tabelle 11: Versuchsgruppen des Tandem-Peptid-Experiments*

| Zelllinie und Gruppe                    | 24-stündiger Zusatz zum Medium | Endkonzentration des Zusatzes |
|---|--------------------------------|-------------------------------|
| <b>Gesunde Kontrollzelllinie</b>        |                                |                               |
| Kontrolle                               | PBS                            | 1:25                          |
| Kontrolle + TP                          | Tandem-Peptid                  | 20 µM                         |
| Kontrolle +TP + L-Tryp<br>400 µM        | Tandem-Peptid + L-Tryptophan   | 20 µM (TP) + 400 µM (L-Tryp)  |
| Kontrolle + L-Tryp<br>400 µM            | L-Tryptophan                   | 400 µM                        |
| Kontrolle + L-Tryp<br>800 µM            | L-Tryptophan                   | 800 µM                        |
| <b>Plakophilin-2-Knockout-Zelllinie</b> |                                |                               |
| PKP2-KO                                 | PBS                            | 1:25                          |
| PKP2-KO + TP                            | Tandem-Peptid                  | 20 µM                         |
| <b>Desmoglein-2-Knockout-Zelllinie</b>  |                                |                               |
| DSG2-KO                                 | PBS                            | 1:25                          |
| DSG2-KO + TP                            | Tandem-Peptid                  | 20 µM                         |

### 2.2.5.2 Kalziummessungen mit steigender $\beta$ -adrenerger Stimulation

Die Tyrode-Lösung wurde immer mit 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  versetzt, um Phänotypen der Zelllinien hervorzurufen. Wie in Tabelle 12 dargestellt wurde zusätzlich Isoprenalin (Iso) in verschiedenen Konzentrationen beigemischt. Dafür wurde eine Stammlösung von  $10^{-4}$  M Iso in  $\text{H}_2\text{O}$  verwendet.

Zu Beginn der Messung erfolgte die Wahl der am besten geeigneten Zellen auf dem Deckglas während der ersten 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Phase. Durch Beobachten wurden die KM gesucht, die am besten der elektrischen Stimulation mit 0,5 Hz folgten. Ebenso sollten sie auf der Matrigel-Matress platziert sein, aber nun möglichst als Zellverbund vorliegen, denn in diesem Experiment standen Zell-Zell-Verbindungen im Mittelpunkt.

Die Bedingung, um eine Messung zu starten, war, dass die Zellen zumindest in dieser Phase auf die elektrische Stimulation reagierten. Auch wenn sie nicht nach jeder Stimulation kontrahierten oder zusätzliche Kontraktionen zeigten, wurde die Messung begonnen. Falls ein von jeder Stimulation abweichender Rhythmus vorlag oder aus anderen, zum Beispiel technischen, Gründen keine Messung möglich war, wurde dies notiert.

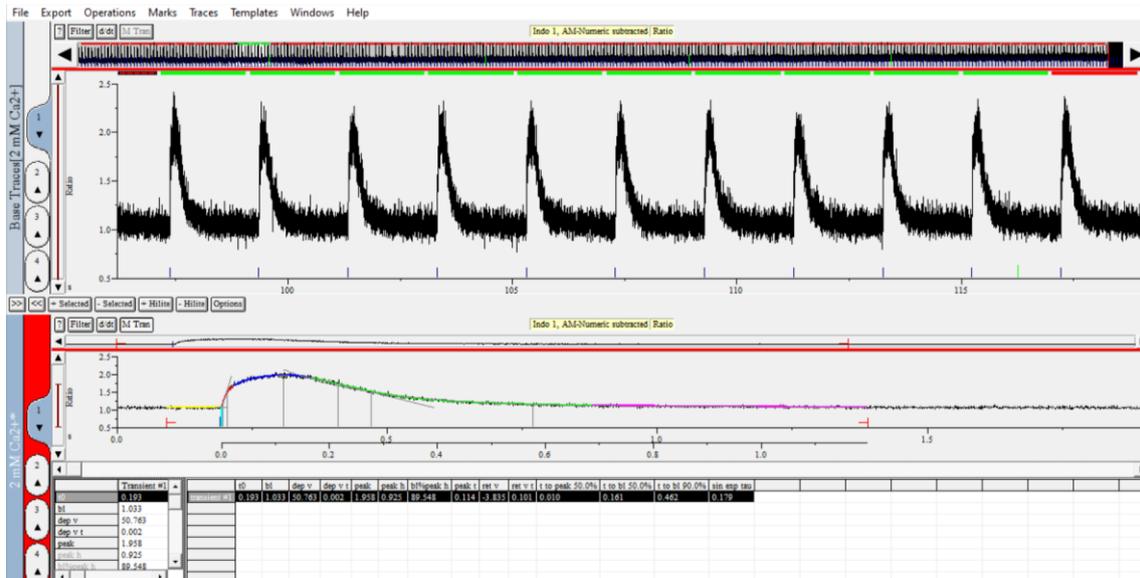
*Tabelle 12: Messprotokoll des TP-Experiments mit Tyrode-Lösungen und Zeitspannen*

| <b>Zusätze zur Normal-Tyrode</b>           | <b>Dauer des Umspülens</b> |
|--|----------------------------|
| 2 mM Ca <sup>2+</sup>                      | ≥ 90 s                     |
| 2 mM Ca <sup>2+</sup> + 10 nM Isoprenalin  | 120 s                      |
| 2 mM Ca <sup>2+</sup> + 30 nM Isoprenalin  | 120 s                      |
| 2 mM Ca <sup>2+</sup> + 100 nM Isoprenalin | 120 s                      |
| 2 mM Ca <sup>2+</sup> (Erholung)           | 120 s                      |

## 2.2.6 Auswertung

### 2.2.6.1 Kalziummessungen

Für die Auswertung wurde das Programm IonWizard verwendet, von dem Abbildung 14 einen Screenshot zeigt. Zuvor wurden die Intensitäten der zellfreien Hintergrundmessung von den gemessenen Werten abgezogen, um nur die intrazellulären Werte zu erhalten.



**Abbildung 14: Automatische Auswertung mit IonWizard**

Auf dem Bildschirm ist im oberen Teil die Auswahl von zehn Transienten zu sehen. Darunter ist der daraus berechnete Durchschnittstransient dargestellt.

(Eigens erstellter Screenshot des Programms IonWizard während der Auswertung (mit freundlicher Genehmigung der Firma IonOptix).)

In der oberen Spur ist die *Ratio*, das Verhältnis der Emissionswellenlängen von *Numerator* (Intensität des  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Indos) und *Denominator* (Intensität des ungebundenen Indos), dargestellt (Abbildung 14). Hier wurden zehn  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten ausgewählt, sichtbar an den grünen Balken (Abbildung 14: grüne, horizontale Striche). Dabei durften nur Transienten gewählt werden, die eindeutig auf eine elektrische Stimulation folgten (Abbildung 14: blaue Striche). Daraus bildete das Programm den Durchschnitt und stellte diesen gemittelten Transient unten dar. Darunter zeigt das Programm die verschiedenen berechneten Parameter, die dann in einer Excel-Datei gesammelt und sortiert wurden. Genauso konnte auch die Längenverkürzung der Zellen analysiert werden. Der gesamte Vorgang wurde für jede Phase der verschiedenen Tyrode-Lösungen wiederholt.

Von Interesse waren vor allem die Werte *baseline* und *peak*, da sie die diastolischen und systolischen intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wiedergaben. Daraus wurde auch die *peak height* also die Amplitude zwischen den beiden Werten gebildet und somit die Erhöhung der zytosolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  darstellt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude setzt sich aus dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über

den LTCC und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR über den RyR zusammen. Die Kinetik der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten wurde unter anderem anhand der Relaxationszeit (RT) betrachtet. Hier wurde sowohl die *time to baseline 50 %*, als auch die *time to baseline 90 %* berechnet, also jeweils die Zeit, die benötigt wurde, um von der Transienten-Spitze die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wieder um 50 % oder um 90 % der Amplitude abzusenken. Aus der 50%-RT kann die SERCA-Aktivität abgeleitet werden und aus der 90%-RT die NCX-Aktivität. *Single exponential tau* einer exponentiellen Funktion beschreibt die Zeit, die benötigt wird, um sich um 63 % zu reduzieren. In diesem Fall ist die Erholungsphase der Kalziumtransienten die exponentielle Funktion. Somit konnte die Steigung der Kurve, also die Geschwindigkeit, allgemeiner bestimmt werden, da diese Größe den gesamten Verlauf des Kalziumausstroms beschreibt und nicht nur einen Bereich davon wie die RT. Die *time to peak* (TTP) beschreibt die Zeit, die von der Grundlinie bzw. diastolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zur systolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  benötigt wurde. Aus der TTP kann die Interaktion von LTCC und RyR abgeleitet werden.

Da die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik von der Frequenz der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten abhängt, wurden zur Auswertung von RT, tau und TTP nur Messungen einbezogen, in denen bei allen ausgewerteten Transienten eine Frequenz von 0,5 Hz identifizierbar waren.

Vor allem beim Versuch der *Mattress*-Etablierung kontrahierten die KM oft in ihrem eigenen Rhythmus. Deshalb konnten Messungen, bei denen keine zehn Transienten pro Phase existierten, die einer Stimulation eindeutig folgten, nicht mit diesem Verfahren ausgewertet werden. Diese mussten durch eine manuelle Auswertung analysiert werden, wie in Abbildung 15 dargestellt. Hierfür wurden zehn aufeinander folgende Transienten manuell ausgewählt (Abbildung 15: rote Kreuze an der Zeitleiste). Jetzt wurde vom Programm der Transient im Bereich der Markierung gesucht und nicht mehr im Bereich zwischen zwei Stimulationen. Die analysierten Parameter wurden für jeden Transient einzeln ausgegeben. Die Werte wurden dann mit Excel gemittelt. Bei diesem Verfahren traten oft Fehlermeldungen auf und deshalb wurde ein Filter eingesetzt, der die  $\text{Ca}^{2+}$ -Spur glättete (sichtbar in Abbildung 15). Um die Vergleichbarkeit zu wahren, wurde er bei diesem Experiment immer eingesetzt.

Der Vorteil der manuellen Auswertung war, dass auch die Frequenz ausgehend von den Werten für  $t_0$ , also für den Beginn jedes Transienten, berechnet werden konnte. Die Abstände von  $t_0$  zwischen aufeinander folgenden Transienten also  $\Delta t$  wurden in Excel gemittelt und dann in die Frequenz umgerechnet.

Auch die Schwankung der Frequenz, also der relative Standardfehler des Mittelwerts (SEM), konnte analysiert werden. Hierfür wurde der SEM des  $\Delta t$ -Mittelwerts berechnet und der relative Fehler bezogen auf den Mittelwert. Da die Frequenz der Kehrwert von  $\Delta t$  ist, ist der relative Fehler der Frequenz und von  $\Delta t$  derselbe. Da er relativ ist, ist er vergleichbar und steht für die Frequenzschwankung einer einzelnen Zelle.

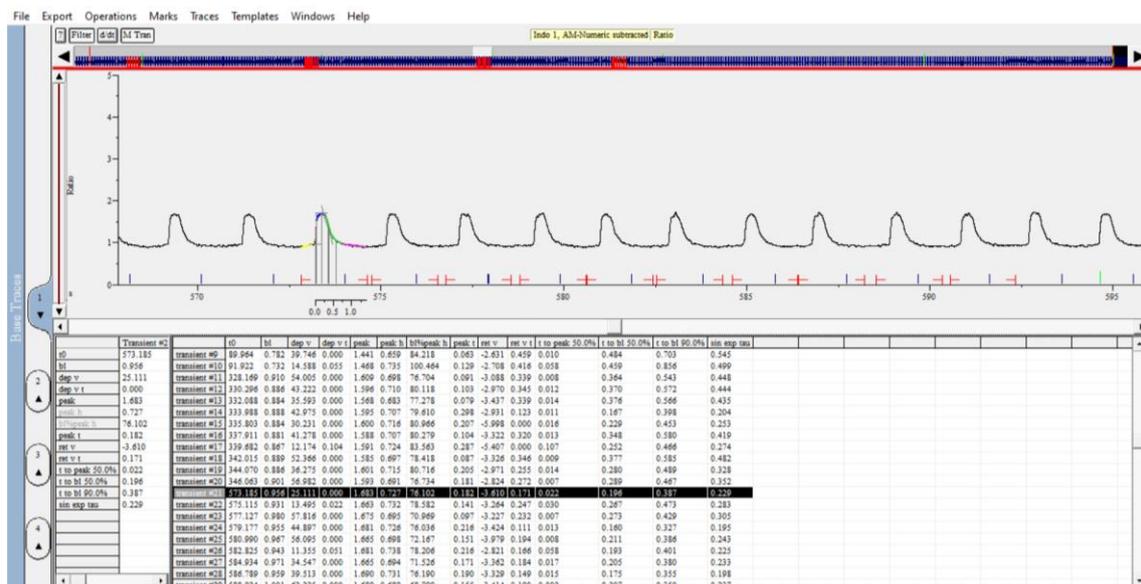


Abbildung 15: Manuelle Auswertung mit IonWizard

Die Spur oben zeigt zehn markierte  $Ca^{2+}$ -Transienten, die mit der Filterfunktion geglättet wurden. Darunter wurden die Werte jedes einzelnen Transienten analysiert, was durch die farbige Markierung beispielhaft an einem Transient dargestellt ist.

(Eigens erstellter Screenshot des Programms IonWizard während der Auswertung (mit freundlicher Genehmigung der Firma IonOptix).)

Bei der Auswertung des Tandem-Peptid-Experiments wurden die Kalziumwerte nur von Messungen, die mit der automatischen Methode funktionierten, analysiert. Allerdings wurde bei den DSG2-KO-KM teilweise mit der manuellen Methode ausgewertet, um die n-Zahl zu erhöhen und das dritte biologische Replikat miteinbeziehen zu können.

### 2.2.6.2 Arrhythmie-Analyse

Während der IonOptix-Messungen fiel auf, dass die Zellen unterschiedliche arrhythmische Ereignisse aufzeigten. Deshalb wurde die Reaktion auf die elektrischen Stimulationen mit 0,5 Hz analysiert, also ob die Zellen rhythmisch oder überhaupt reagierten, zusätzliche Kontraktionen oder Pausen zeigten.

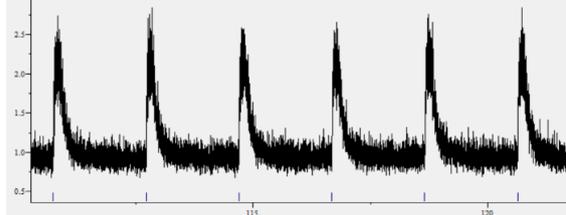
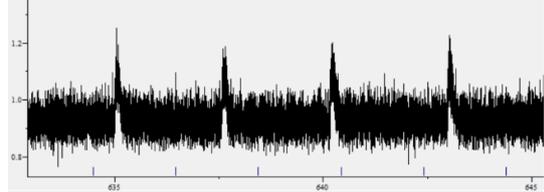
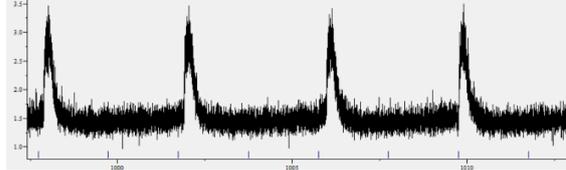
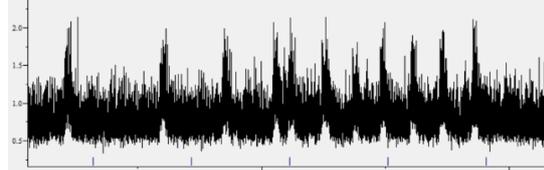
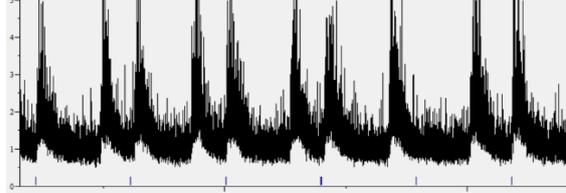
Für diese Analyse wurden die KM bezüglich ihrer Stimulierbarkeit sortiert (stimulierbar oder nicht stimulierbar). Tabelle 13 zeigt beispielhafte Transienten der verschiedenen Ereignisse.

Der Kategorie „stimulierbar“ wurden Zellen zugeordnet, bei denen Reaktionen auf die Stimulation erkennbar waren, wenn auch teilweise zusätzliche Kontraktionen zwischen zwei Stimulationen auftraten oder auf manche elektrischen Stimuli kein  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient folgte.

Dem wurde die Kategorie „nicht stimulierbar“ gegenübergestellt. Denn diese KM zeigten keine Reaktion auf die Stimulationen, sondern kontrahierten in der überwiegenden Zeit in ihrem eigenen Rhythmus, teilweise regelmäßig oder arrhythmisch.

**Tabelle 13: Beispiele für stimulierbare und nicht stimulierbare Kalziumtransienten**

Dargestellt sind die beiden Kategorien, die darunter dargestellte Kontraktionsmuster zusammenfassen. Die originalen  $Ca^{2+}$ -Spuren sind abgebildet ohne Anwendung der Filterfunktion.

| Stimulierbar   | Nicht stimulierbar   |
|--|--|
|  <p data-bbox="236 667 794 734">Rhythmisch: Jeder Stimulation folgt ein Transient.</p>  |  <p data-bbox="809 645 1353 712">Die Transienten erfolgen regelmäßig, aber nie aufgrund von Stimulationen.</p> |
|  <p data-bbox="236 931 794 999">Pausen: Nicht jeder Stimulation folgt ein Transient.</p>  |  <p data-bbox="809 931 1353 999">Die Transienten erfolgen unregelmäßig und ohne Bezug zu Stimulationen.</p>    |
|  <p data-bbox="236 1227 794 1328">Zusätzliche Transienten: Auf die Stimulationen wird reagiert, aber dazwischen treten zusätzliche Transienten auf.</p> |  |

Grundlage dieser Analysen bildeten die IonWizard-Aufzeichnungen. Da dort die Zeiten der Stimulationen mit einem blauen Strich (Abbildung 14 und Abbildung 15) markiert sind, waren die entsprechenden Reaktionen der Zellen an den Zeitpunkten der Transienten meist gut erkennbar. Falls keine Messung stattfand, konnte durch Beobachten im Mikroskop und Notieren die erste Phase des Protokolls auch in die Analyse eingehen. Daraus wurde eine Tabelle gebildet, in der den Zellen pro Protokoll-Phase eine Verhaltenskategorie zugeordnet wurde.

## 2.2.7 Statistische Analyse

Die graphische und statistische Auswertung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen erfolgte selbstständig mit GraphPad Prism 5.0. Die verschiedenen Parameter, wie z. B.  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden oder RT, wurden jeweils eigenständig ausgewertet. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zweier Gruppen bzw. Zelllinien wurde durch die zweifaktorielle Varianzanalyse *Two-way ANOVA* untersucht. Durch diese Varianzanalyse kann der Unterschied zwischen Mittelwerten zweier Gruppen, die sich bezüglich zwei Faktoren, also der Zelllinie und extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ - bzw. Iso-Konzentration, unterscheiden, bestimmt werden. Betrachtet wurde immer der statistische Unterschied bezüglich des Faktors Zelllinie.

Um statistische Unterschiede der jeweiligen  $\text{Ca}^{2+}$ - bzw. Iso-Konzentration differenziert zu betrachten, wurde ein Post-hoc-Test, der Bonferroni-Posttest, durchgeführt. Durch den Bonferroni-Posttest wird bei solch vielen Vergleichen das Signifikanzniveau angeglichen, weil sonst der  $\alpha$ -Fehler hoch werden würde (Backhaus et al. 2018).

Graphisch wurde der arithmetische Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt.

Die Unterschiede der Arrhythmien und Stimulierbarkeit wurden jeweils pro Messprotokoll-Phase im Vergleich zweier Zelllinien untersucht. Die statistische Auswertung ausgewählter Diagramme wurde mit GraphPad Prism 5.0 durchgeführt. Es lagen absolute Anzahlen an Zellen, die zum Beispiel rhythmisch oder nicht rhythmisch waren, vor. Der exakte Fisher-Test wurde zweiseitig durchgeführt. Beim Fisher-Test werden keine bestimmten Stichprobengrößen wie bei anderen Tests benötigt (Weiß 2013). Graphisch wurden die Diagramme, die nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen darstellten, mit Microsoft Excel umgesetzt.

Bei einem p-Wert kleiner als 0,05 wurde ein statistisch signifikanter Unterschied angenommen.

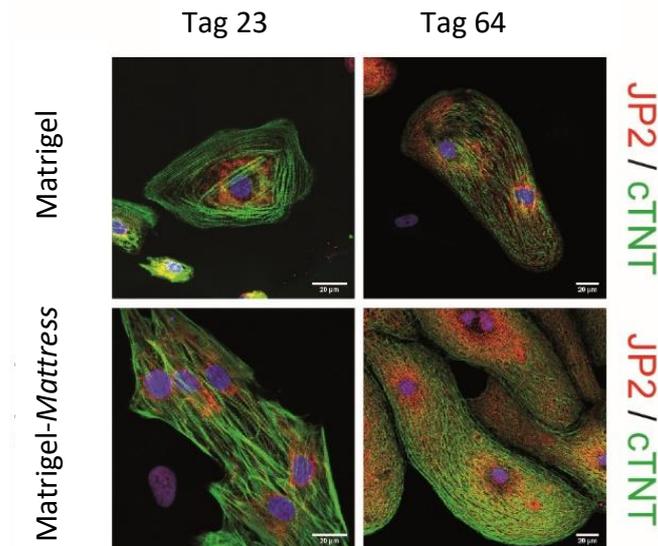
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung von Kultivierungsbedingungen, die zur Reifung von hiPS-Kardiomyozyten führen

Im Folgenden wird die Wirkung spezieller Bedingungen, wie die Kultivierung auf sogenannten *Mattresses* und/oder Hormonzugabe, auf die Reifung der hiPS-Kardiomyozyten getestet. Um die optimalen Bedingungen für  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen zu ermitteln, werden weitere Faktoren, wie das Alter in Bezug zur Stimulierbarkeit, Kontraktionsfrequenzen und Arrhythmien, untersucht. Ziel war es, das am besten geeignete Messprotokoll für die im Teil 3.3 und 3.4 durchgeführten Therapieversuche zu etablieren.

#### 3.1.1 Anwendung von Matrigel-Linien, sogenannten *Mattresses*, zur beschleunigten Reifung

Es ist aus der Literatur bekannt, dass KM schneller reifen, wenn sie auf sogenannten *Mattresses* („Matratzen“) kultiviert werden. Diese Methode wurde von mir erstmals unter den lokalen Bedingungen getestet und etabliert. KM wurden für mindestens fünf Tage auf feinen Linien des Matrigels kultiviert, welches der Basalmatrix ähnelt (s. Abbildung 9 in 2.2.2.5). Durch die physiologische Festigkeit und Längsausdehnung der Matrigel-Linien sollten die KM eine schnellere Reifung erlangen (Feaster et al. 2015). Ausdruck der Reifung ist wie in Abbildung 16 dargestellt, eine Streckung bzw. Längenausdehnung der KM entlang der Linien. Sichtbar wurde die Längenausdehnung mit *Mattress*-Kultivierung bereits an Tag 23. Im Gegensatz dazu blieben KM ohne *Mattress*-Kultivierung rund und kugelig, was ein Zeichen für Unreife darstellt.



**Abbildung 16:** Kultivierung auf Matrigel-Mattresses führte zu einer frühen Streckung der Kardiomyozyten entlang der Linien und entsprechend einer früheren Reifung. (Abbildung von Dr. Anna Janz)

Immunfluoreszenzfärbung von reifungsassoziierten Proteinen (JP2, cTNT) der KM auf normalem Basalmatrigel (oberes Panel) im Vergleich zur Kultivierung auf Mattresses, die aus Matrigellinien bestehen (unteres Panel). Verglichen wurden 23-tägige (linkes Panel) und 64-tägige Kultivierung (rechtes Panel). Rot gefärbt Junctophilin-2 (JP2), grün gefärbt kardiales Troponin T (cTNT). Maßstabsbalken 20  $\mu\text{m}$ .

(Abbildung von Dr. Anna Janz, Dissertation unveröffentlicht am 22.08.2022, mit freundlicher Druckerlaubnis der Urheberin.)

### 3.1.2 Anwendung von Hormonen zur beschleunigten Reifung

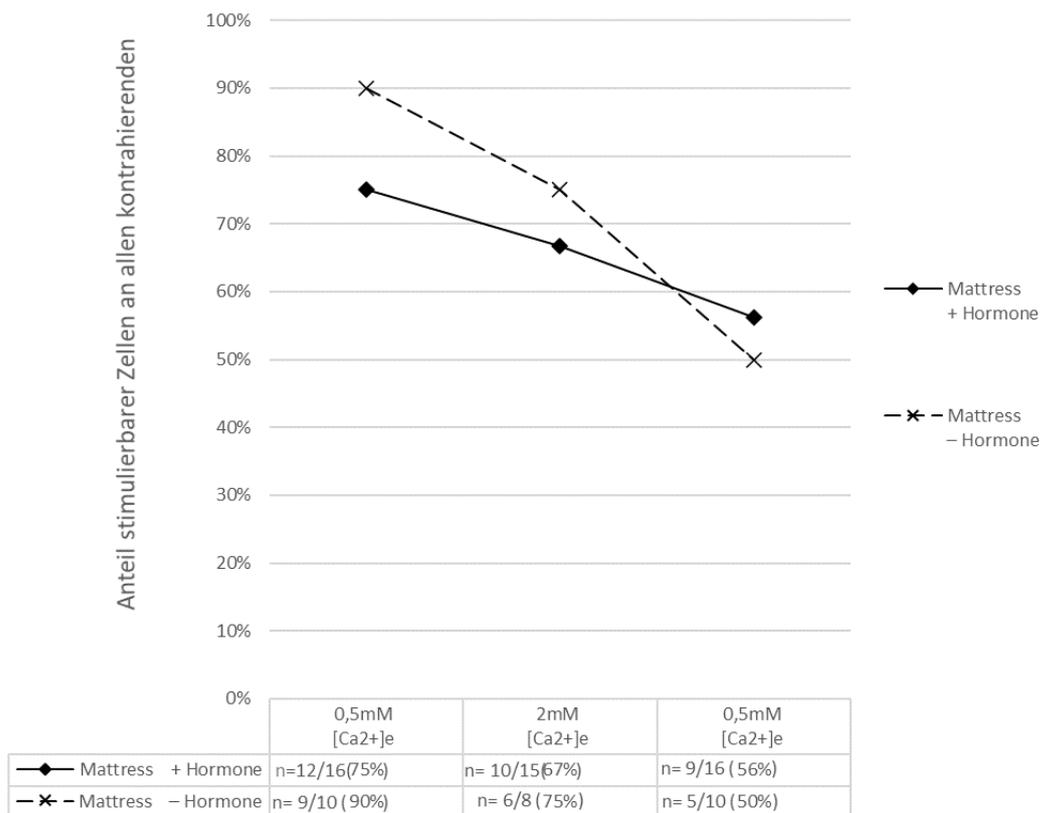
Es hat sich gezeigt, dass die Anwendung von Hormonen, wie dem Schilddrüsenhormon Triiodthyronin (T3) und dem Glukokortikoid Dexamethason (Dex), zu einer beschleunigten Reifung der KM führt (Parikh et al. 2017). Entsprechend haben wir die Auswirkungen der Hormone auf die Stimulierbarkeit, Frequenzstabilität und Kalziumtransienten untersucht. Dabei wurden drei Versuchsbedingungen miteinander verglichen (s. Methoden Tabelle 9):

1. Unreife Kardiomyozyten (Tag 12-22) ohne *Mattress*-Kultivierung ohne Hormone (Negativkontrolle) (Unreif – *Mattress* – Hormone)
2. Mittelreife Kardiomyozyten (Tag 20-32) mit *Mattress*-Kultivierung ohne Hormone (*Mattress* – Hormone)
3. Mittelreife Kardiomyozyten (Tag 19-36) mit *Mattress*-Kultivierung plus Hormone (*Mattress* + Hormone)

### 3.1.2.1 *Auswirkung der Hormonbehandlung auf die elektrische Stimulierbarkeit*

Die Stimulierbarkeit mit und ohne Hormonbehandlung wurde verglichen. Auf die elektrischen Stimulationen mit 0,5 Hz sollten Kalziumtransienten als Reaktion der KM folgen (s. Methoden Tabelle 13).

Die Kultivierungsbedingung mit Hormonen ergab keinen sichtbaren Unterschied in der Stimulierbarkeit (Abbildung 17). Mit zunehmender extrazellulärer Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_e$ ) reduzierte sich die Stimulierbarkeit in beiden Gruppen gleichermaßen. In der folgenden Erholungsphase setzte sich der Trend in beiden Gruppen fort.



**Abbildung 17: Die Stimulierbarkeit der Kontrollzelllinie wurde durch die Hormonbehandlung nicht beeinflusst.**

Dargestellt ist der Prozentsatz bzw. die Anzahl (n) der Zellen, die auf Stimulation reagierten, in Bezug zu der Gesamtzahl der untersuchten Zellen. Untersucht wurden KM auf Mattresses bei drei extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen nacheinander, die während des Protokolls vital blieben.

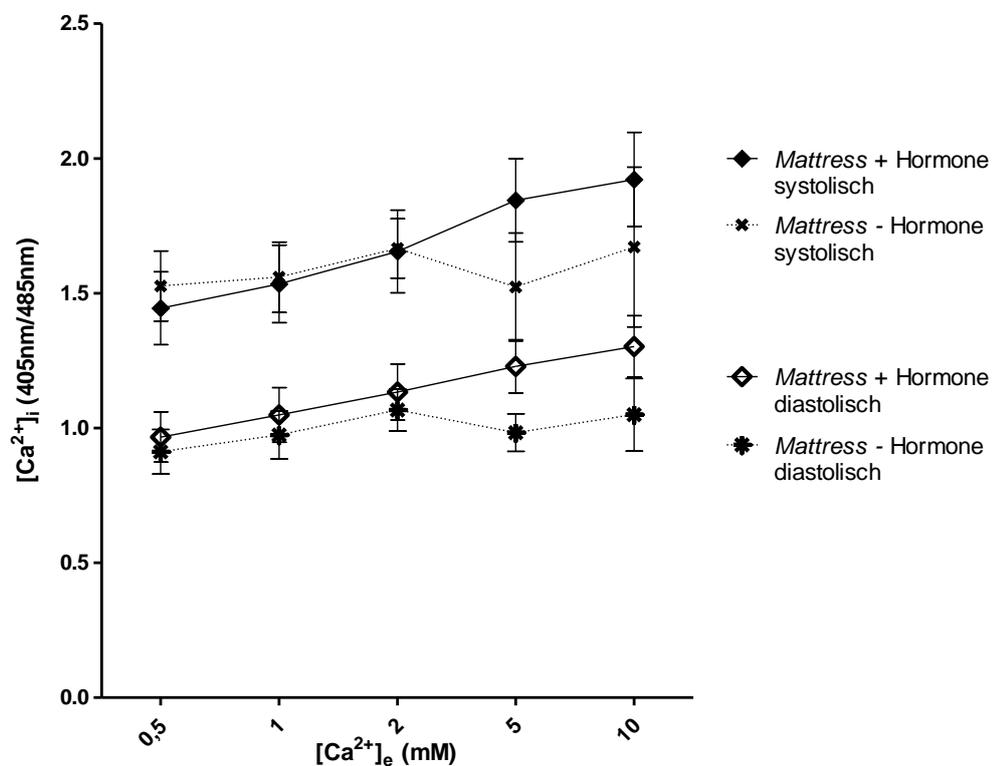
Absolute Anzahlen (n) der KM der Kontrolllinie und Prozentsatz tabellarisch unter dem Graph.

### 3.1.2.2 Analyse der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in Abhängigkeit von der Hormonbehandlung

Es sollte untersucht werden, ob eine Hormonbehandlung die absoluten systolischen und diastolischen intrazellulären Kalziumkonzentrationen ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) beeinflusst. Dies wurde zunächst an der Kontrollzelllinie gemessen.

Die Hormonbehandlung ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied der systolischen und diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$ . Mit zunehmender extrazellulärer  $[Ca^{2+}]_e$  stiegen die intrazellulären  $[Ca^{2+}]_i$  wie zu erwarten an (Abbildung 18).

Mit steigenden extrazellulären  $[Ca^{2+}]_e$  konnte in der Gruppe ohne Hormone eine zunehmende Zahl an Zellen beobachtet werden, die aufhörten zu kontrahieren (abnehmende n-Zahl in dieser Gruppe). Die geringe n-Zahl könnte die Abweichung zu niedrigeren intrazellulären  $[Ca^{2+}]_i$  im Verlauf der Kurven ohne Hormone erklären.



|                        |    |    |    |    |    |
|------------------------|----|----|----|----|----|
| n (Mattress + Hormone) | 16 | 16 | 15 | 14 | 13 |
| n (Mattress - Hormone) | 10 | 10 | 9  | 4  | 3  |

**Abbildung 18:** Die Hormonbehandlung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die systolischen und diastolischen intrazellulären Kalziumkonzentrationen.

Intrazelluläre  $[Ca^{2+}]_i$  dargestellt als Verhältnis der Indo-Fluoreszenz-Intensitäten auf der y-Achse. Die Messung erfolgte bei steigender extrazellulärer  $[Ca^{2+}]_e$  auf der x-Achse.

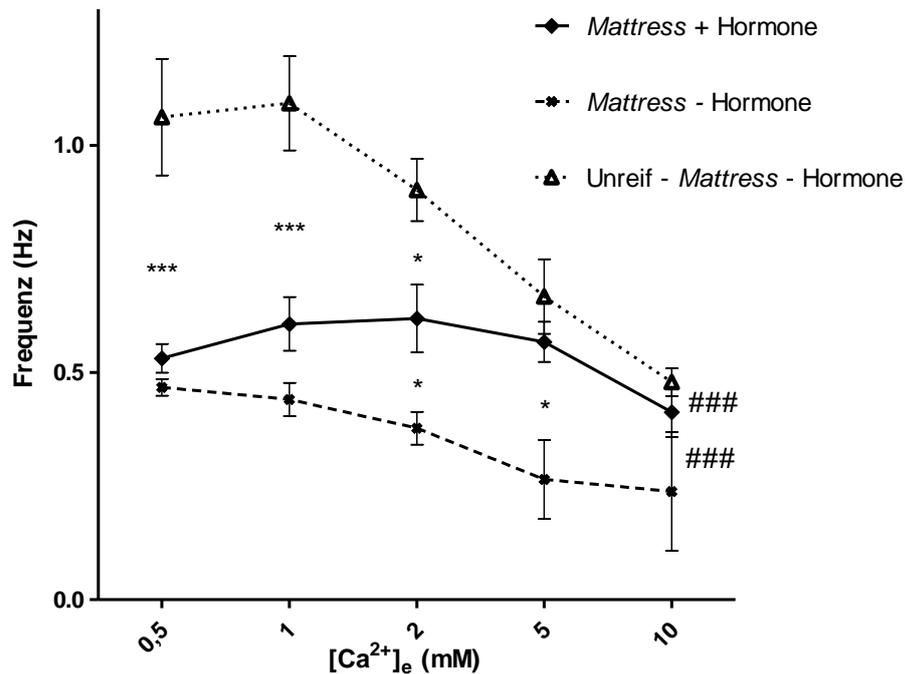
Anzahl (n) der vitalen KM der Kontrolllinie tabellarisch unter dem Graph. Graph dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM. Statistischer Test: Two-way ANOVA und Bonferroni-Posttest.

### 3.1.2.3 Auswirkung der Hormonbehandlung und Reifung auf die Kontraktionsfrequenz

Die Analyse der Kontraktionsfrequenzen erfolgte vergleichend an unreifen KM ohne *Mattresses* und an reiferen KM auf *Mattresses*, die jeweils mit und ohne Hormone behandelt wurden. Die Messung fand während einer elektrischen Stimulation mit 0,5 Hz statt, weshalb Kontraktionsfrequenzen von 0,5 Hz im Idealfall erwartet wurden.

Die Kontraktionsfrequenz der KM mit Hormonbehandlung verlief nahe der Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz (Abbildung 19). Sie reagierten somit am besten auf die Stimulationen. KM ohne Hormone kontrahierten mit einer signifikant niedrigeren Frequenz im Vergleich zu denen mit Hormonen ( $p < 0.0001$ ), vor allem bei hohen extrazellulären  $[Ca^{2+}]_e$ . Ein Teil der KM ohne Hormone war bei zu hohen  $[Ca^{2+}]_e$  nicht mehr vital.

Unreife KM ohne *Mattresses* und ohne Hormone kontrahierten mit einer signifikant höheren Frequenz ( $p < 0.0001$ ). Die Frequenz der KM war während der niedrigen, physiologischeren extrazellulären  $[Ca^{2+}]_e$  etwa doppelt so hoch wie auf *Mattresses*, aber nahm mit steigender extrazellulärer  $[Ca^{2+}]_e$  ab.



|                                 |    |    |    |    |    |
|---------------------------------|----|----|----|----|----|
| n (Mattress + Hormone)          | 16 | 16 | 15 | 14 | 13 |
| n (Mattress - Hormone)          | 10 | 10 | 9  | 4  | 3  |
| n (Unreif - Mattress - Hormone) | 9  | 9  | 9  | 9  | 8  |

Abbildung 19: Kardiomyozyten auf Mattresses mit Hormonen kontrahierten mit einer stabileren Frequenz als ohne Hormone und als unreife Zellen ohne Mattresses und Hormone.

Die Kontraktionsfrequenz der gesunden Kontrollzelllinie wurde anhand der gemittelten Abstände zwischen Kalziumtransienten während elektrischer Stimulation mit 0,5 Hz bestimmt.

Darstellung des Mittelwerts  $\pm$  SEM im Graph, n-Zahlen tabellarisch darunter. Statistischer Test jeweils im Vergleich zu Mattress + Hormone: Two-way ANOVA (###  $p < 0,001$ ) und Bonferroni-Posttest (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

### 3.1.2.4 Schlussfolgerungen aus den Versuchen zur Mattress- und Hormonbehandlung

Wir konnten zeigen, dass eine Kultivierung auf Mattresses zu einer schnelleren Reifung und Streckung, sowie Stimulierbarkeit, der KM führt. Folglich wird bei allen folgenden Versuchen eine Kultivierung auf Mattresses (Matrigel-Linien) vorgenommen.

Des Weiteren wurden keine signifikanten Unterschiede bzw. Nachteile der Hormonbehandlung auf Stimulierbarkeit und intrazelluläre  $[Ca^{2+}]_i$  gesehen. In den nachfolgenden Auswertungen (der Kapitel 3.1.3 und 3.2) wurden somit alle auf *Mattresses* kultivierten KM, ob mit oder ohne Hormonbehandlung, zusammengefasst, und somit die n-Zahl in den entsprechenden Experimenten erhöht.

Letztlich hatte die Hormonbehandlung bei uns nur einen positiven Einfluss auf die Kontraktionsfrequenz. Da die Literatur (Parikh et al. 2017) von einer beschleunigten Reifung durch Hormonbehandlung ausgeht, die über die von uns betrachteten Parameter hinausgeht, haben wir für die Experimente in 3.3 und 3.4 eine Hormonbehandlung aller Zellen durchgeführt.

### **3.1.3 Einfluss der Kultivierungszeit auf die elektrische Stimulierbarkeit der PKP2-KO-Kardiomyozyten im Vergleich zu Kontrollen**

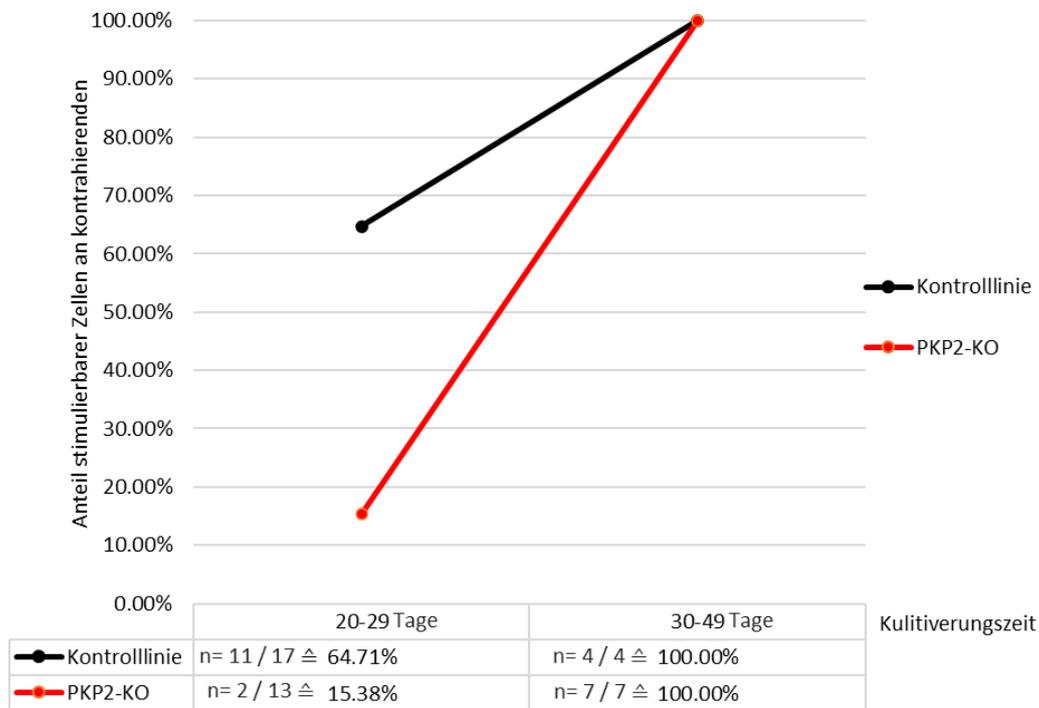
Neben den bereits untersuchten Faktoren spielt das Alter der KM (Zeit in Kultur nach der Differenzierung) eine entscheidende Rolle für die Reife. So ist auch die elektrische Stimulierbarkeit unter anderem abhängig von der Reife und vom Alter der KM, kann aber auch differieren zwischen verschiedenen Zelllinien. Die folgenden Experimente untersuchten den Zusammenhang von Stimulierbarkeit und Kultivierungsalter, und bestimmten den Zeitpunkt der vollständigen Stimulierbarkeit der PKP2-KO-KM bzw. Kontrollzell-KM.

#### ***3.1.3.1 Analyse der Stimulierbarkeit in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit***

Zunächst wurde untersucht, ob die Kultivierungszeit einen Einfluss auf die Stimulierbarkeit hatte und ob ein Unterschied zwischen den Zelllinien vorlag.

In der Gruppe der 20-29-tägigen Kultivierungszeit ließ sich ein deutlich geringerer Anteil der PKP2-KO-KM im Vergleich zur Kontrollzelllinie elektrisch stimulieren (sichtbar in

Abbildung 20, statistisch nicht ausgewertet). Nach 30-49 Tagen Kultivierungszeit waren alle kontrahierenden Zellen beider Linien stimulierbar.



**Abbildung 20: PKP2-KO-KM zeigten bei kurzer Kultivierungszeit geringere Stimulierbarkeit als gesunde Kardiomyozyten.**

Die Messungen erfolgten bei 2 mM  $[Ca^{2+}]_e$  mit KM auf Mattresses (mit und ohne Hormone). Berechnet wurde der Anteil der Messungen mit KM, die auf Stimulationen reagierten, an allen Messungen mit kontrahierenden KM.

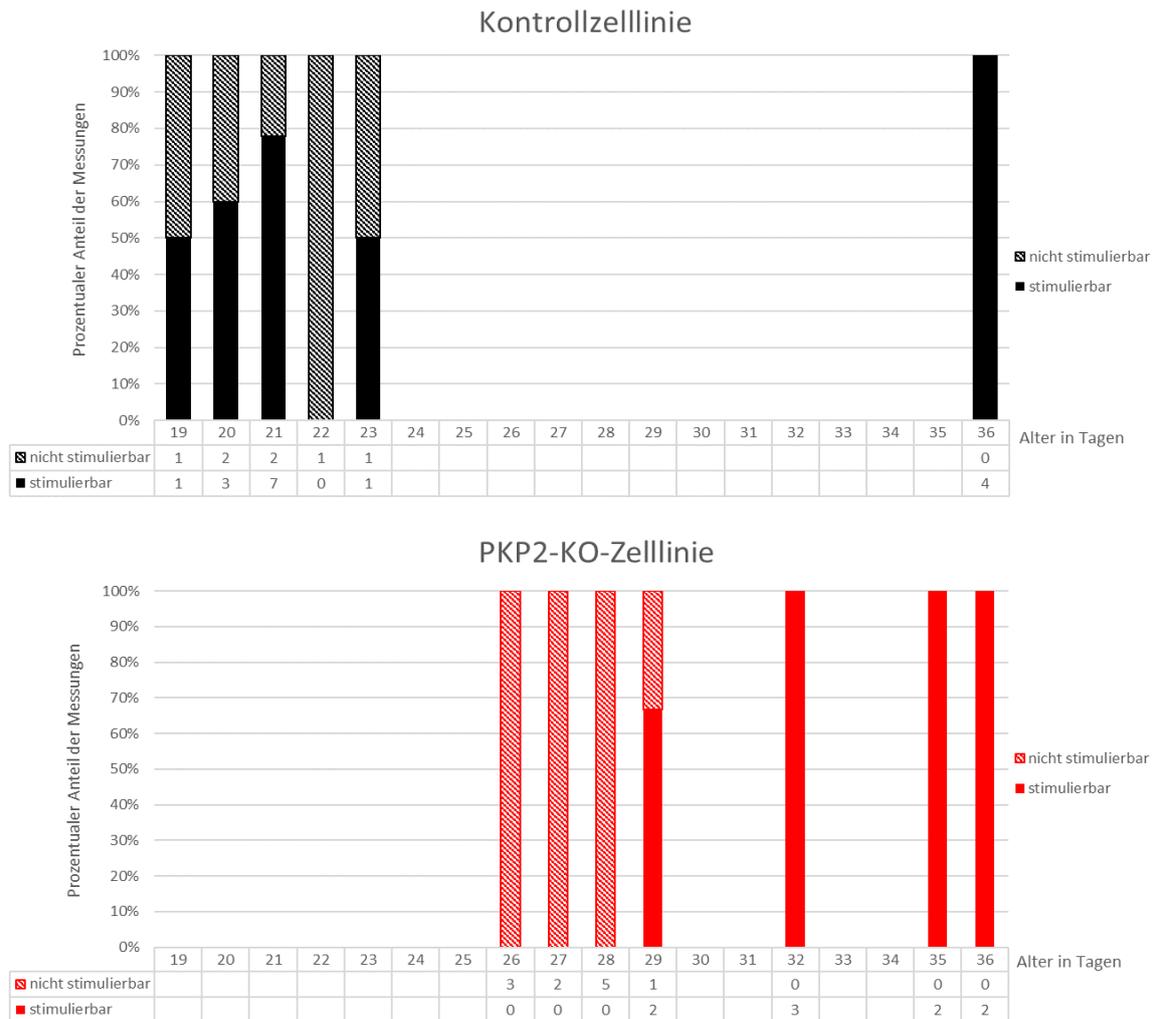
Die absoluten Anzahlen (n) und Prozentsätze sind tabellarisch unter dem Graph dargestellt. Abkürzung: Plakophilin-2-Knockout (PKP2-KO)

### 3.1.3.2 Analyse der Schwelle für vollständige Stimulierbarkeit bei PKP2-KO- und Kontrollzellen

Die Kultivierungszeit, ab welchem Alter der Kultivierung die KM beider Zelllinien auf elektrische Stimulationen reagierten, wurde analysiert. Dafür wurden die Zellen nach dem Tag der Messung im Anschluss an die Differenzierung sortiert.

Bereits ab Tag 19 ließ sich die Hälfte der gesunden Kontrollzellen stimulieren, was bei den PKP2-KO-Zellen erst am Tag 29 zu beobachten war (Abbildung 21). Nach weniger als

29 Tagen Kultivierungszeit reagierten die meisten PKP2-KO-KM nicht auf die Stimulationen. Die PKP2-KO-KM zeigten somit eine spätere Stimulierbarkeit als Zeichen einer späteren Reife bzw. eines phänotypischen Merkmals. Ab einem Alter von 36 Tagen ließen sich alle KM stimulieren. Unklar blieb die minimale Kultivierungszeit der Kontrollzellen für eine komplette Stimulierbarkeit, weil die Versuchsdurchführung keine Untersuchungen zwischen Tag 24 und 35 zuließ.



**Abbildung 21: PKP2-KO-KM benötigen mehr Tage der Kultivierung als gesunde Kontroll-KM, um die Eigenschaft der Stimulierbarkeit zu erlangen.**

Die Messungen erfolgten bei 2 mM  $[Ca^{2+}]_e$  mit KM auf Mattresses.

Die Messungen wurden nach dem exakten Alter der Zellen sortiert. Jeweils der Anteil der Messungen mit stimulierbaren KM an allen Messungen mit kontrahierenden KM wurde berechnet. Zu beachten waren niedrigere n-Zahlen, die durch enge Sortierung entstanden.

Absolute Anzahlen (n) tabellarisch unter dem Graph.

### *3.1.3.3 Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen zur Stimulierbarkeit und Kultivierungszeit*

Durch längere Kultivierungszeiten ließen sich mehr KM elektrisch stimulieren. Als Zeichen der verspäteten Reife oder des Phänotyps zeigten PKP2-KO-KM erst nach längerer Kultivierungszeit eine vollständige Stimulierbarkeit. Eine Mindestkultivierungsdauer von 36 Tagen sollte eingehalten werden, um eine generelle Stimulierbarkeit beider Zelllinien zu gewährleisten.

## 3.2 Vergleichende phänotypische Analyse von PKP2-KO- und Kontroll-Kardiomyozyten bei unterschiedlichen extrazellulären Kalziumkonzentrationen

Ziel war es, eine basale phänotypische Charakterisierung der PKP2-KO-Zelllinie durchzuführen. Der Phänotyp wurde anhand von Stimulierbarkeit, Kontraktionsfrequenzen und Kalziumkonzentrationen untersucht. Außerdem sollte eine geeignete extrazelluläre Kalziumkonzentration für nachfolgende Messprotokolle etabliert werden. Gleichzeitig wurden Effekte der Reifung durch *Mattresses*, Hormonbehandlung und Kultivierungszeit nochmals mitbetrachtet. Die folgenden Auswertungen erfolgten auf Grundlage der gleichen Messungen wie beim Abschnitt 3.1.

### 3.2.1 Vergleich der Stimulierbarkeit von Kontroll- und PKP2-KO-Kardiomyozyten bei unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen

Die elektrische Stimulierbarkeit der KM wurde im Vergleich der beiden Zelllinien bei aufsteigenden extrazellulären  $[Ca^{2+}]_e$  und einem Alter von mindestens 19 Tagen untersucht.

Es waren insgesamt weniger PKP2-KO-KM als Kontroll-KM stimulierbar (Abbildung 22). Bei niedriger extrazellulärer  $[Ca^{2+}]_e$  bestand ein größerer Unterschied. Mit steigender extrazellulärer  $[Ca^{2+}]_e$  nahm die Stimulierbarkeit der Kontroll-KM ab, während die Stimulierbarkeit der PKP2-KO-KM zunahm. Da die Belastung durch hohe extrazelluläre  $[Ca^{2+}]_e$  eher zu einer abnehmenden Stimulierbarkeit führen sollte, ist davon auszugehen, dass die Zunahme der Stimulierbarkeit der PKP2-KO-KM ein phänotypisches Merkmal darstellt.

Für nachfolgende Versuche erwies sich eine 2 mM  $Ca^{2+}$ -Tyrode-Lösung als geeignet, weil ein Phänotyp ausgelöst werden konnte und gleichzeitig möglichst viele Zellen stimulierbar waren.

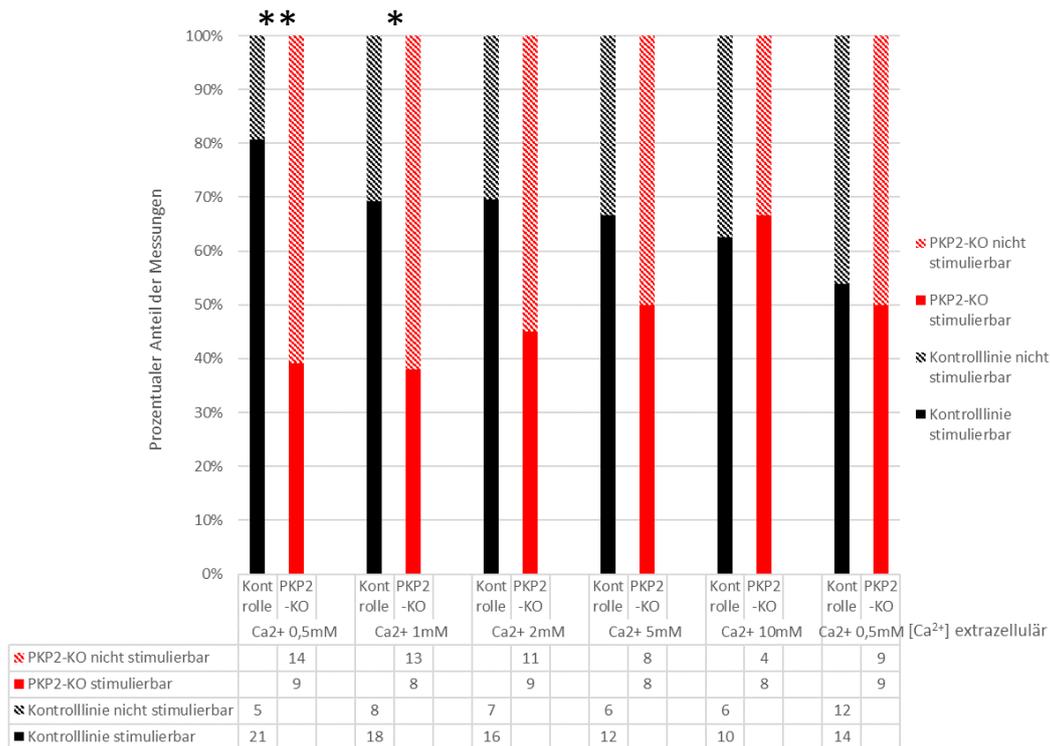


Abbildung 22: Weniger PKP2-KO-KM als gesunde KM waren elektrisch stimulierbar bei niedrigen extrazellulären  $[Ca^{2+}]_e$ .

Es wurden KM auf Mattresses bei Kalziumkonzentrationen von 0,5 mM bis zu 10 mM und folgender Erholung bei 0,5 mM  $[Ca^{2+}]_e$  in der Tyrode-Lösung untersucht. Dargestellt sind die Anteile der stimulierbaren KM an allen kontrahierenden KM bei jeweiliger extrazellulärer  $[Ca^{2+}]_e$  mit den Zelllinien nebeneinander. Anteil der stimulierbaren KM: ausgefüllter Balken, Anteil der nicht stimulierbaren KM: schraffierter Balken.

N-Zahlen unter dem Graph tabellarisch. Statistischer Test: zweiseitiger exakter Fisher-Test je extrazellulärer  $[Ca^{2+}]_e$  (\*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ).

### 3.2.2 Kontraktionsfrequenz und der zugehörige relative Fehler als Maß für Arrhythmien im Vergleich der PKP2-KO-Zellen mit der Kontrolllinie

Die Kontraktionsfrequenzen der reifen, auf Mattresses kultivierten KM, wurden zwischen der Kontrollzelllinie und PKP2-KO-KM verglichen. Zusätzlich wurden die Kontraktionsfrequenzen der unreifen KM (ohne Mattresses) beider Linien untereinander und mit den reifen Linien verglichen. Die Messungen fanden während

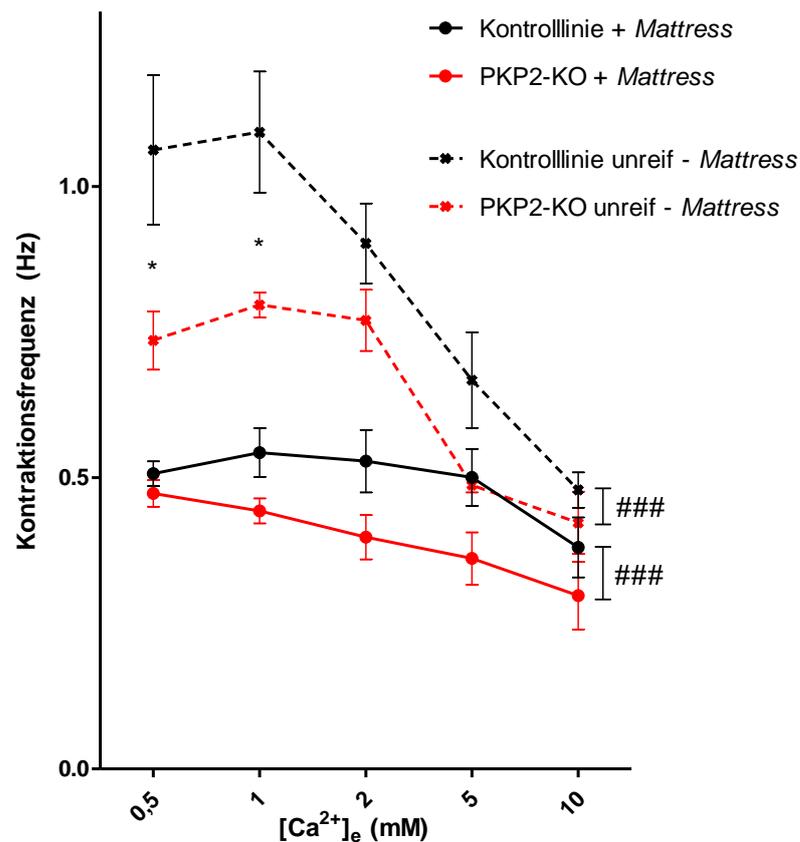
einer elektrischen Stimulation mit 0,5 Hz statt, weshalb Kontraktionsfrequenzen von 0,5 Hz im Idealfall erwartet wurden.

Die Kontraktionsfrequenzen der reifen Kontrollzelllinie verliefen nahe der Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz (Abbildung 23). Sie reagierten somit am besten auf die Stimulationen. Die Frequenzen der reifen PKP2-KO-KM waren signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrolllinie ( $p = 0,0003$ ). Reife PKP2-KO-KM zeigten eine niedrigere Frequenz, heißt nicht auf jede Stimulation erfolgte eine Reaktion. Dies könnte ein phänotypisches Merkmal sein.

Die Kontraktionsfrequenz der unreifen PKP2-KO-KM war signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrolllinie ( $p < 0.0001$ ). Dabei war zu beachten, dass die Kontrollzellen jünger waren als die PKP2-KO-KM.

Die Kontraktionsfrequenzen der unreifen KM (ohne *Mattresses*) waren bei beiden Zelllinien insgesamt signifikant höher als die der reifen KM (jeweils  $p < 0.0001$ , in Abbildung 23 nicht markiert). Die Stimulierbarkeit, und damit eine Kontraktionsfrequenz von 0,5 Hz, wurde als Zeichen der Reife bestätigt.

KM beider Zelllinien zeigten bei hohen extrazellulären  $[Ca^{2+}]_e$  abnehmende Kontraktionsfrequenzen.



|                              |    |    |    |    |    |
|------------------------------|----|----|----|----|----|
| n (Kontr. <i>Mattress</i> )  | 26 | 26 | 24 | 18 | 16 |
| n (PKP2-KO <i>Mattress</i> ) | 21 | 21 | 19 | 15 | 11 |
| n (Kontr. unreif)            | 9  | 9  | 9  | 9  | 8  |
| n (PKP2-KO unreif )          | 8  | 8  | 8  | 8  | 8  |

Abbildung 23: Die Kontraktionsfrequenz der reifen Kontroll-KM verlief nahe der Stimulationsfrequenz und die der reifen PKP2-KO-KM signifikant niedriger, während unreife KM allgemein höhere Frequenzen zeigten.

Die Frequenzen der reifen KM (auf *Mattresses* und mit längerer Kultivierungszeit) wurden im Vergleich der Zelllinien beurteilt und im Graph markiert.

Die Frequenzen der unreifen KM (ohne *Mattress* und mit kürzerer Kultivierungszeit) wurden im Vergleich der Zelllinien beurteilt und im Graph markiert.

Es erfolgte die elektrische Stimulation mit 0,5 Hz.

Graph dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM und darunter tabellarisch die n-Zahlen. Statistischer Test: Two-way ANOVA (###  $p < 0,001$ ) mit Bonferroni-Posttest (\*  $p < 0,05$ ).

Durch den relativen Fehler der Frequenz konnte ein Maß für die Rhythmik der Zellen geschaffen werden (Abbildung 24). Denn der relative Fehler des Mittelwerts der Frequenz einer Zelle gibt die Schwankung der Frequenz wieder. In Abbildung 24 stehen

somit hohe Werte für eine große Änderung der Frequenz und damit für arrhythmisch kontrahierende Kardiomyozyten.

Reife KM (auf *Mattresses*) beider Zelllinien kontrahierten arrhythmischer mit steigenden extrazellulären  $[Ca^{2+}]_e$ . Bei unreifen KM (ohne *Mattresses*) konnte dagegen kein Zusammenhang zwischen den extrazellulären  $[Ca^{2+}]_e$  und Arrhythmien festgestellt werden. Reife KM reagierten somit adäquat auf die extrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Belastung, unreife dagegen nicht.

Beim Vergleich der reifen KM deutete sich nur an, dass die PKP2-KO-KM arrhythmischer als die Kontroll-KM wären (statistisch nicht signifikant,  $p = 0,0872$ ).

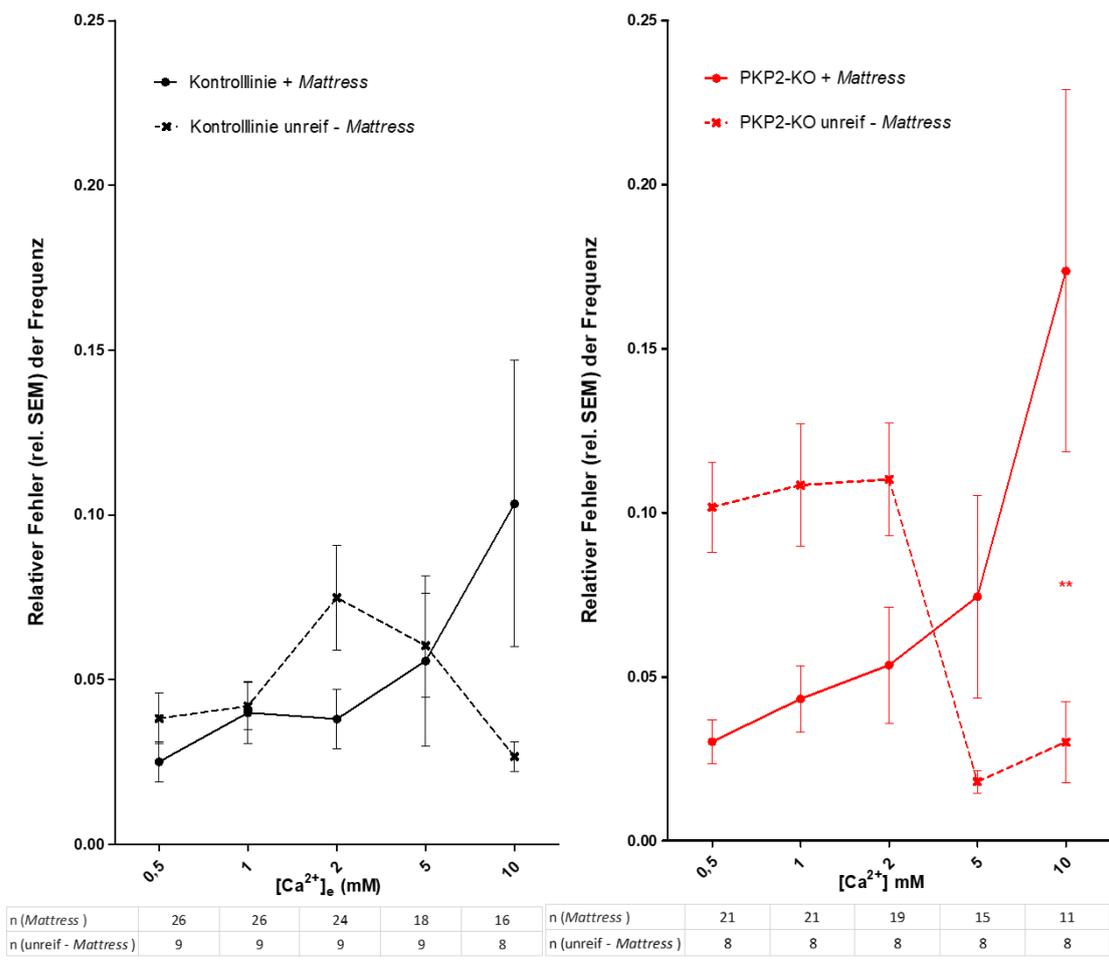


Abbildung 24: Der relative Fehler der Frequenz als Maß für Arrhythmie stieg bei reifen Zellen mit höheren  $[Ca^{2+}]_e$  an und deutete mehr Arrhythmien bei PKP2-KO-KM im Vergleich zur Kontrolle an.

Höhere Werte des relativen SEM der Frequenz stehen für stärkere Frequenzschwankungen innerhalb einer Zelle und damit für stärkere Arrhythmie. Die Frequenz und deren Fehler wurde durch die zeitlichen Abstände von zehn Kalziumtransienten berechnet.

Links die gesunde Kontrollzelllinie und rechts die PKP2-KO-Linie dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM, darunter die n-Zahlen tabellarisch. Statistischer Test: Two-way ANOVA mit Bonferroni-Posttest (\*\*  $p < 0,01$ ).

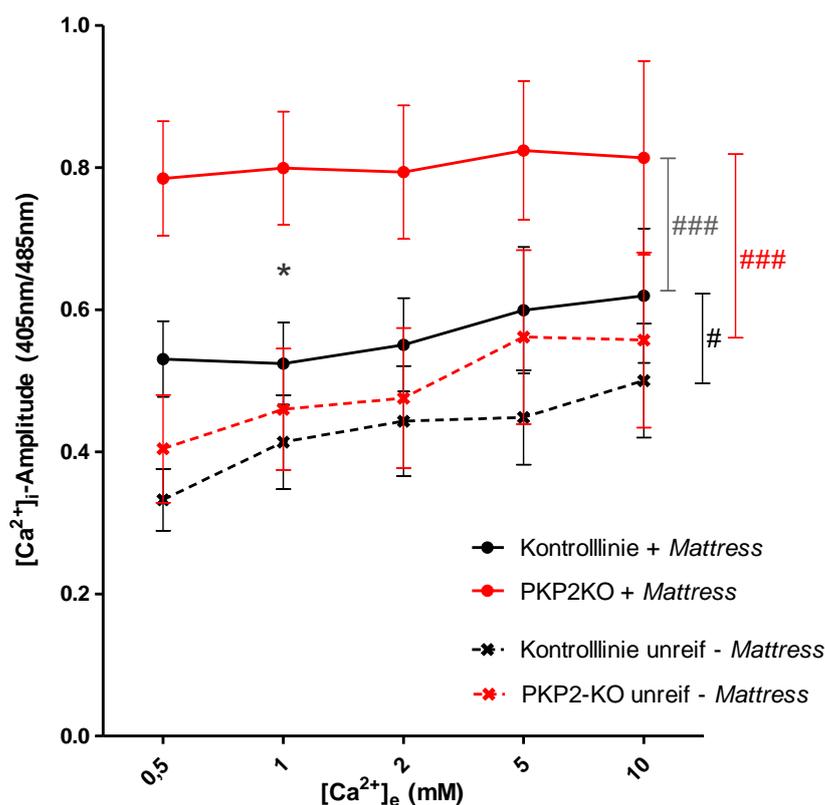
### 3.2.3 Auswertung der Kalziumkonzentrationen und -amplituden im Vergleich der PKP2-KO- und Kontroll-Kardiomyozyten

Die Amplituden der Kalziumtransienten, also die Differenz der minimalen und maximalen intrazellulären Kalziumkonzentrationen, wurden zwischen beiden reifen Zelllinien verglichen und anschließend jeweils mit den unreifen KM.

Reife PKP2-KO-KM zeigten signifikant erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden im Gegensatz zur Kontrolllinie (Abbildung 25,  $p < 0.0001$ ). Bei den unreifen PKP2-KO-KM deutete sich im Vergleich zur Kontrolllinie der Unterschied nur an (nicht signifikant, Abbildung 25).

Unreife KM hatten jeweils niedrigere Amplituden im Vergleich zu reifen KM der gleichen Zelllinie (PKP2-KO  $p < 0.0001$ , Kontrolllinie  $p = 0,0104$ ).

Ein phänotypisches Merkmal der reifen PKP2-KO-KM könnte somit durch erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden zum Ausdruck kommen.



|                               |    |    |    |    |    |
|-------------------------------|----|----|----|----|----|
| n (Kontr.+ Mattress )         | 26 | 26 | 24 | 18 | 16 |
| n (PKP2-KO+ Mattress )        | 21 | 21 | 19 | 15 | 11 |
| n (Kontr. unreif- Mattress)   | 9  | 9  | 9  | 9  | 8  |
| n (PKP2-KO unreif- Mattress ) | 8  | 8  | 8  | 8  | 8  |

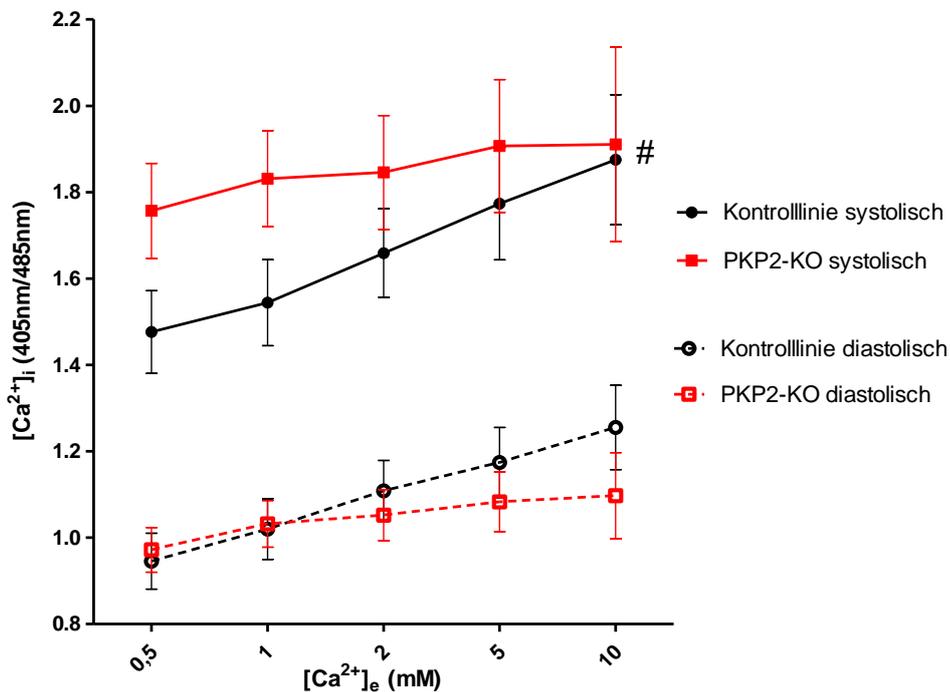
Abbildung 25: Die  $Ca^{2+}$ -Amplituden der reifen PKP2-KO-KM fielen signifikant höher aus als die der reifen Kontrollzellen.

Die  $Ca^{2+}$ -Amplituden wurden als Differenz zwischen der diastolischen und systolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration der  $Ca^{2+}$ -Transienten berechnet (als Intensitätsverhältnis der Emissionswellenlängen von Indo). Reife KM wurden auf Mattresses kultiviert, unreife ohne Mattresses mit kürzerer Kultivierungszeit.

Graph dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM und darunter tabellarisch die n-Zahlen. Statistischer Test: Two-way ANOVA (###  $p < 0,001$  und #  $p < 0,05$ ) mit Bonferroni-Posttest (\*  $p < 0,05$ ).

Als nächstes wurden die absoluten systolischen und diastolischen intrazellulären  $[Ca^{2+}]_i$  zwischen reifen PKP2-KO-KM und Kontroll-KM verglichen (Abbildung 26). Aus diesen beiden Werten wurden zuvor die  $Ca^{2+}$ -Amplituden berechnet.

PKP2-KO-KM zeigten eine signifikant höhere systolische  $[Ca^{2+}]_i$  verglichen mit den gesunden Kontroll-KM ( $p = 0,0225$ ). Diastolisch lag kein Unterschied zwischen den Zelllinien vor. Somit kann der zuvor beobachtete Unterschied der  $Ca^{2+}$ -Amplituden hauptsächlich durch die Veränderung der systolischen Werte zustande kommen. Mit höherer extrazellulärer  $[Ca^{2+}]_e$  stieg auch das intrazelluläre  $[Ca^{2+}]_i$  an. Allerdings war bei PKP2-KO-KM sowohl systolisch als auch diastolisch ein schwächerer Anstieg festzustellen und damit eine schwächere Reaktion auf die extrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Belastung.



|                   |    |    |    |    |    |
|-------------------|----|----|----|----|----|
| n (Kontrolllinie) | 26 | 26 | 24 | 18 | 16 |
| n (PKP2-KO)       | 21 | 21 | 19 | 15 | 11 |

Abbildung 26: Die systolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen der PKP2-KO-Linie verliefen signifikant höher als die der gesunden Kontrolllinie.

Dargestellt sind die maximalen (systolischen) und minimalen (diastolischen) intrazellulären  $[Ca^{2+}]_i$ , als Intensitätsverhältnis der Emissionswellenlängen von Indo. Alle KM wurden auf Mattresses (mit und ohne Hormone) kultiviert.

Graph als Mittelwert  $\pm$  SEM und darunter tabellarisch die n-Zahlen. Statistischer Test: Two-way ANOVA (#  $p < 0,05$ ) mit Bonferroni-Posttest.

### 3.2.4 Schlussfolgerungen aus der phänotypischen Charakterisierung der PKP2-KO-KM und der Anpassung des Versuchsprotokolls

Zusammenfassend zeigten PKP2-KO-KM erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden und erhöhte systolische  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sowie arrhythmische Kontraktionsfrequenzen und eine geringere Stimulierbarkeit. Auf dieser phänotypischen Grundlage konnte in den folgenden Experimenten ein Therapieversuch durch ein spezielles Tandem-Peptid getestet werden.

Für die folgenden Experimente wurde eine extrazelluläre  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  von 2 mM gewählt, da sich der Phänotyp der PKP2-KO-KM bei dieser Konzentration am besten darstellte und auswerten ließ. Außerdem waren beide Linien bei dieser extrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  stimulierbar. Das folgende Protokoll wurde durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin ergänzt.

Unreife KM zeigten Veränderungen der intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Hinweis auf eine fehlende Ausreifung der T-Tubuli), Arrhythmien und eine geringe Stimulierbarkeit als Zeichen fehlender Reife. Es bestätigte sich, dass unreife KM ungeeignet für die folgenden Versuche waren, da sie keine eindeutige phänotypische Abgrenzung der PKP2-KO-KM im Vergleich zur Kontrolle zeigten. Final wurden daher reife, auf *Mattresses* kultivierte KM mit Hormonbehandlung und einer mindestens 36-tägigen Kultivierungszeit für die folgenden Experimente generiert.

### 3.3 Auswirkung eines Tandem-Peptids auf den Kalziumhaushalt von PKP2-KO- und DSG2-KO-Kardiomyozyten

Ziel war es, ein Tandem-Peptid (TP) erstmals an PKP2-KO-hiPS-KM als Therapieversuch für ACM zu testen. Frühere Daten haben gezeigt, dass ein DSG2-spezifisches TP geschwächte Cadherin-Bindungen durch Verstärkung der DSG2-Bindungen stabilisieren konnte (Schlipp et al. 2014). Mit Hilfe des TPs sollten die in Kapitel 3.2 beschriebenen Veränderungen der PKP2-KO-KM rückgängig gemacht werden (s. Einleitung 1.3). Als „Negativ“-Kontrolle wurde eine DSG2-*Knockout*-Linie (DSG2-KO) verwendet (Janz et al. 2021). Aufgrund der zu erwartenden DSG2-Spezifität des TPs sollte es keine Effekte auf DSG2-KO-KM und die Kontrolllinie haben, bzw. entsprechende Effekte nicht der Wirkung des TPs zugeordnet werden.

Als weitere Kontrolle wurden bei gesunden KM die interzellulären Cadherin-Bindungen durch L-Tryptophan (L-Tryp) gestört. L-Tryp sollte mit dem „Tryptophan-Swap“ interferieren, durch den Cadherine sich extrazellulär verbinden (Spindler et al. 2013). So sollten die geschwächten interzellulären Bindungen der *Knockout*-Linien nachgestellt werden. Eine reparierende Wirkung des TPs wurde durch Restabilisierung erwartet.

In der Literatur wurde postuliert, dass Störungen des Kalziumhaushalts zur Pathogenese der ACM beitragen (Cerrone et al. 2017; El-Battrawy et al. 2018). Deshalb wurden die Veränderungen durch die Mutationen und das TP anhand von  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen untersucht.

Für die folgenden Experimente wurden KM aller Linien neu differenziert und kultiviert unter den vorher etablierten *Mattress*- und Hormonbedingungen. Zunächst wurde in einem Vorversuch die Auswirkung von verschiedenen Konzentrationen des TPs und L-Tryp nach dem Protokoll von Schlipp et al. auf die Vitalität der KM erfolgreich getestet (Schlipp et al. 2014) (s. Anhang Tabelle A 1). Als optimal erwiesen sich 20  $\mu\text{M}$  TP und 400  $\mu\text{M}$  L-Tryp bzw. 800  $\mu\text{M}$  L-Tryp.

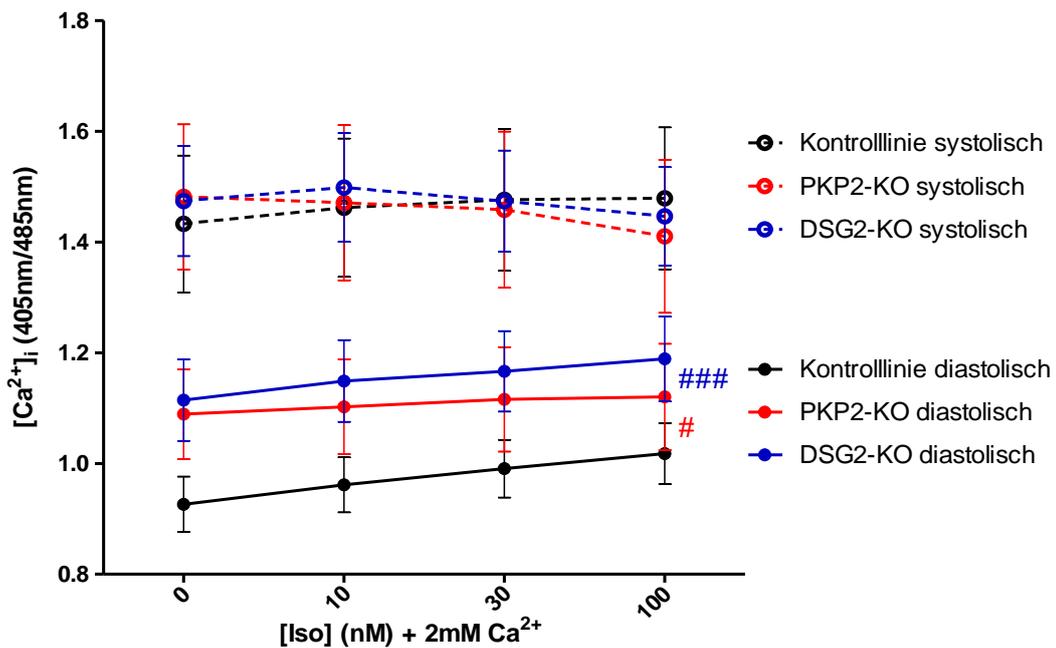
### 3.3.1 Diastolische und systolische intrazelluläre Kalziumkonzentrationen

Um die Kalziumhomöostase grundlegend zu untersuchen, wurden die diastolischen und systolischen intrazellulären  $[Ca^{2+}]_i$  untersucht. Diese entsprechen den minimalen und maximalen  $[Ca^{2+}]_i$ -Werten der Kalziumtransienten von KM.

Beim Vergleich der unbehandelten Zelllinien zeigte sich bereits, dass die diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$  beider mutationstragenden Zelllinien signifikant erhöht waren (PKP2-KO versus (vs.) Kontrolle  $p = 0,0228$ ; DSG2-KO vs. Kontrolle  $p = 0,0001$ ). Das bedeutet, dass die KM in Relaxation eine erhöhte Menge an  $Ca^{2+}$  im Zytosol aufwies, das nicht herausgepumpt wurde. Die diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$  der DSG2-KO-KM und PKP2-KO-KM waren nicht unterschiedlich. Mit steigender  $\beta$ -adrenerge Stimulation durch Erhöhung der Konzentration von Isoprenalin (Iso) stiegen alle diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$  an (Abbildung 27).

Die systolischen  $[Ca^{2+}]_i$  der Zelllinien unterschieden sich nicht. Es konnte keine einheitliche Reaktion auf die steigenden Iso-Konzentrationen beobachtet werden. Bei hohen Iso-Konzentrationen verminderten sich die systolischen  $[Ca^{2+}]_i$  der mutationstragenden Linien tendenziell.

Vergleicht man die Ergebnisse der  $[Ca^{2+}]_i$  der PKP2-KO-Zellen mit den in Abschnitt 3.2.3 gemessenen Werten, zeigten sich Unterschiede. Im Gegensatz zum aktuellen Experiment waren dort die systolischen  $[Ca^{2+}]_i$  der PKP2-KO-KM erhöht und die diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$  nicht. Dabei sind die unterschiedlichen Messprotokolle und die Reifung der Zellen zu beachten und zu diskutieren (s. Diskussion 4.2.1).



|             |    |    |    |    |
|-------------|----|----|----|----|
| n (Kontr.)  | 15 | 15 | 15 | 15 |
| n (PKP2-KO) | 23 | 21 | 21 | 21 |
| n (DSG2-KO) | 16 | 15 | 15 | 15 |

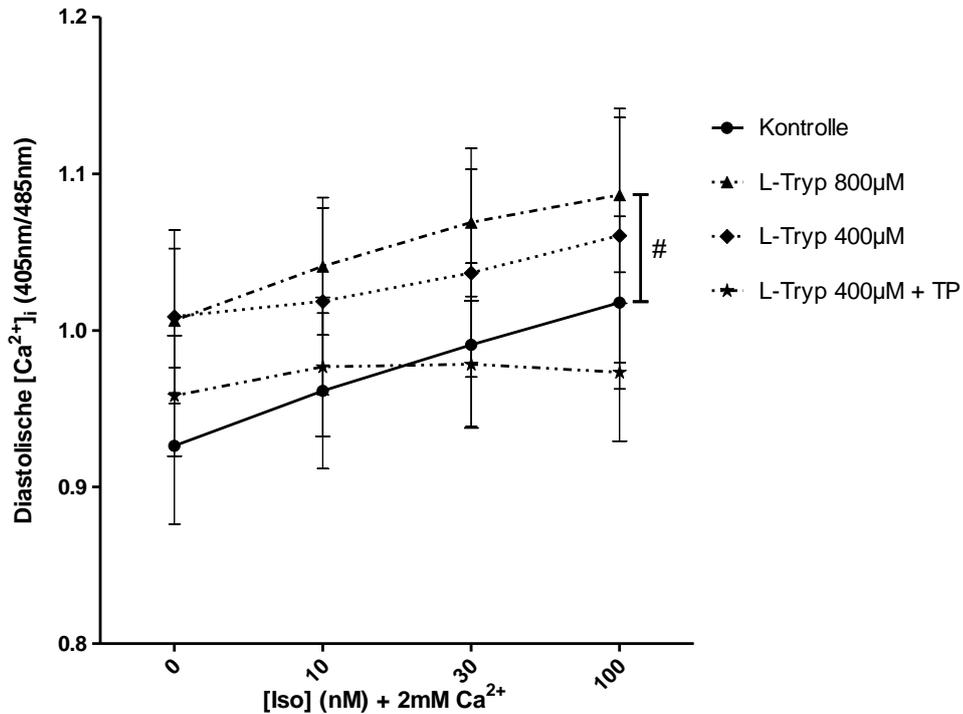
Abbildung 27: Die diastolischen intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen von PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM waren jeweils signifikant höher als die der Kontrollzellen.

Dargestellt sind die maximalen (systolischen) und minimalen (diastolischen) intrazellulären  $[Ca^{2+}]_i$ , als Intensitätsverhältnis der Emissionswellenlängen von Indo. Im Messprotokoll wurden 3 verschiedene Isoprenalin-Konzentrationen (Iso) zur Tyrode-Lösung mit 2 mM  $Ca^{2+}$  hinzugefügt. Graph dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM und darunter tabellarisch die n-Zahlen. Statistischer Test: Two-way ANOVA (#  $p < 0,05$  und ###  $p < 0,001$ ) mit Bonferroni-Posttest (\*  $p < 0,05$ ). Abkürzungen: Desmoglein-2-Knockout (DSG2-KO), Plakophilin-2-Knockout (PKP2-KO)

Die Veränderungen der diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$  der *Knockout*-Linien sollten durch die Behandlung mit L-Tryp an der Kontrolllinie nachgestellt werden (Abbildung 28). Geprüft wurde, ob durch die Schwächung von Cadherin-Bindungen durch L-Tryp Auswirkungen auf die  $[Ca^{2+}]_i$  wie bei den *Knockout*-Linien entstehen (Schlipp et al. 2014). Das Ziel war, den Effekt von L-Tryp durch das TP rückgängig zu machen und dadurch eine Kontrollsituation zu erlangen.

Die hohe L-Tryp-Konzentration von 800  $\mu$ M bewirkte signifikant erhöhte diastolische  $[Ca^{2+}]_i$  ( $p = 0,0417$ ) und konnte somit die Auswirkungen der Mutationen nachstellen.

Auch durch L-Tryp 400  $\mu\text{M}$  deuteten sich erhöhte diastolische  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  im Diagramm an (nicht signifikant,  $p = 0,175$ ). Die gleichzeitige Behandlung mit L-Tryp 400  $\mu\text{M}$  und TP führte zu diastolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nahe der Kontrolle. Somit entstand ein Hinweis, dass das TP die Wirkung von L-Tryp teilweise ausgleichen könnte.



|                  |    |    |    |    |
|------------------|----|----|----|----|
| n (Kontr.)       | 15 | 15 | 15 | 15 |
| n (L-Tryp 800µM) | 10 | 10 | 10 | 10 |
| n (L-Tryp 400µM) | 15 | 15 | 15 | 14 |
| n (L-Tryp + TP)  | 15 | 14 | 12 | 13 |

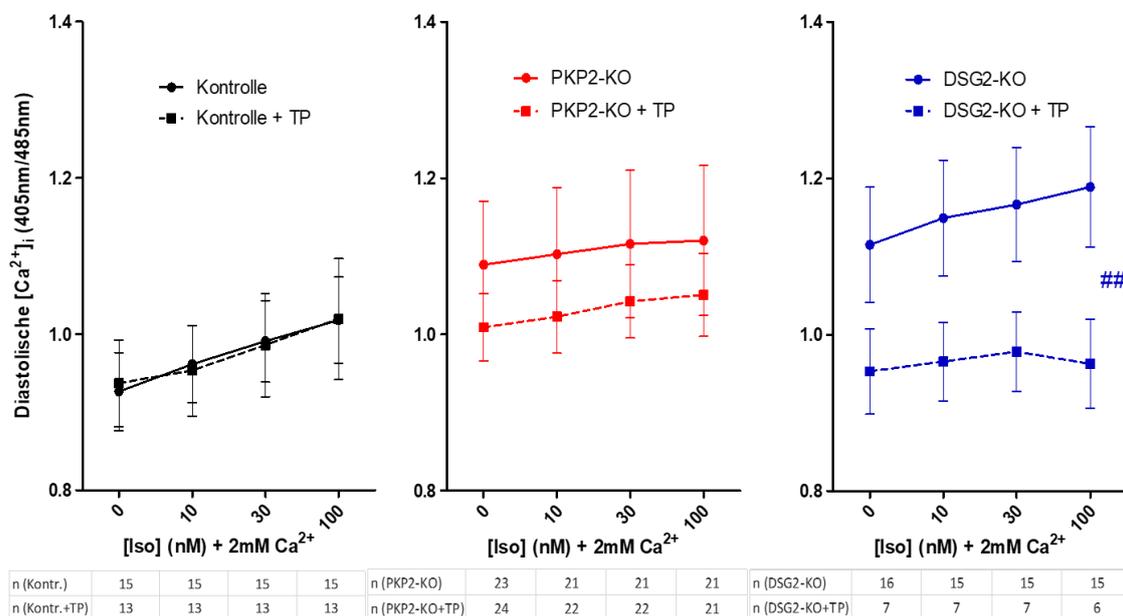
**Abbildung 28:** Die diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen der Kontrolllinie wurden durch L-Tryp erhöht und teilweise durch das TP korrigiert.

Kontroll-KM wurden jeweils 24h mit L-Tryptophan (L-Tryp) und dem Tandem-Peptid (TP) behandelt. Dargestellt sind die diastolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  der gesunden Kontrollzelllinie bei aufsteigender Isoprenalin (Iso)-Konzentration. Die Behandlungen wurden jeweils statistisch mit der unbehandelten Kontrollbedingung verglichen.

Graph dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM und darunter tabellarisch die n-Zahlen. Statistischer Test: Two-way ANOVA ( $\# p < 0,05$ ) mit Bonferroni-Posttest.

Abbildung A 1 (s. Anhang) zeigt keine Unterschiede der Kontrolllinie unter Behandlung mit L-Tryp in Bezug auf die systolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und dementsprechend keinen Effekt des TP.

Als nächstes wurde die Wirkung des TP auf die erhöhten diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$  der Mutationszelllinien, wie in Abbildung 29 dargestellt, getestet. Bei Kontrollzellen zeigte das TP wie erwartet keine Wirkung. Die erhöhten diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$  der PKP2-KO-Zellen wurden durch das TP auf Werte nahe der gesunden Kontrolle gesenkt (PKP2-KO vs. PKP2-KO + TP:  $p = 0,1316$ ). Unerwarteterweise wurden auch die erhöhten diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$  der DSG2-KO-KM durch das TP signifikant gesenkt ( $p = 0,0019$ ). Die Spezifität des eigentlich nur an DSG2 bindenden TP galt es somit zu diskutieren (s. 4.3.1).



**Abbildung 29:** Das TP verminderte die diastolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen von PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM.

Dargestellt sind die diastolischen intrazellulären  $[Ca^{2+}]_i$  der gesunden Kontrollzelllinie links, PKP2-KO mittig und DSG2-KO rechts. Die TP-Behandlung erfolgte jeweils für 24h.

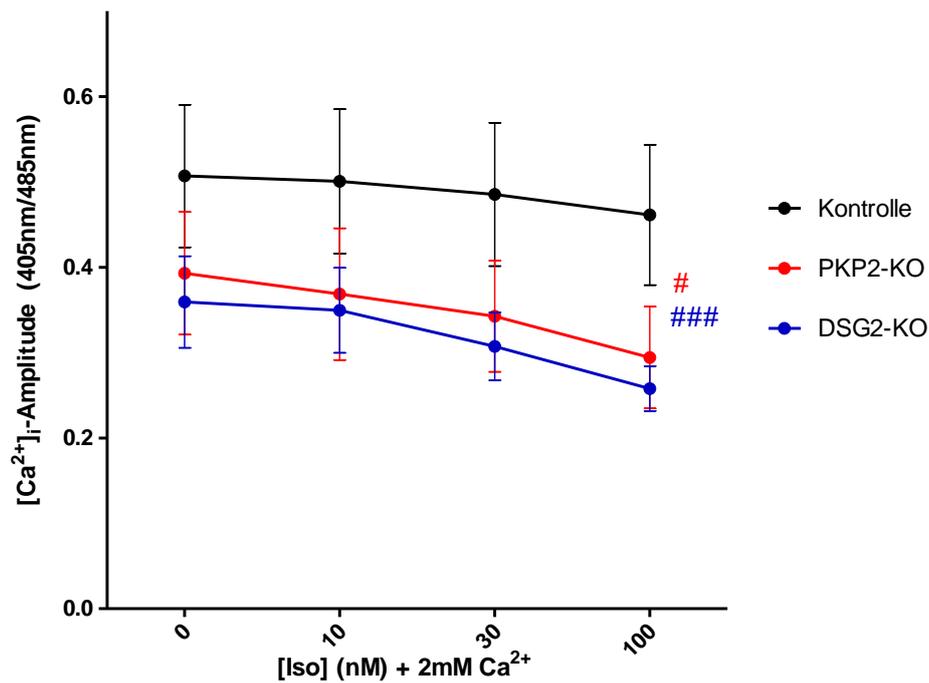
Die Graphen sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM mit der gleichen Skala und darunter tabellarisch die n-Zahlen. Statistischer Test: Two-way ANOVA (#  $p < 0,05$  und ##  $p < 0,01$ ) mit Bonferroni-Posttest.

Abbildung A 2 (s. Anhang) zeigt, dass das TP gegen die Erwartungen auch die systolischen  $[Ca^{2+}]_i$  der DSG2-KO-KM signifikant absenkte ( $p = 0,0145$ ). Auf die systolischen  $[Ca^{2+}]_i$  der PKP2-KO-KM sowie der Kontroll-KM hatte es keine Auswirkungen.

### 3.3.2 Amplituden der intrazellulären Kalziumkonzentrationen

Die Kontraktionskraft von KM hängt unter anderem vom Ausmaß der  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung ab (Eisner et al. 2017). Deshalb wurden die  $Ca^{2+}$ -Amplituden, also die Differenzen zwischen den systolischen und diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$ , ausgewertet.

Die  $Ca^{2+}$ -Amplituden waren bei beiden mutationstragenden Zelllinien signifikant vermindert (PKP2-KO vs. Kontrolle  $p = 0,0111$ ; DSG2-KO vs. Kontrolle  $p = 0,0004$ ). Somit strömte eine kleinere Menge an  $Ca^{2+}$  in das Zytosol hinein und heraus. Es lag kein Unterschied zwischen den  $Ca^{2+}$ -Amplituden von PKP2-KO und DSG2-KO vor. Bei steigenden Iso-Konzentrationen reduzierten sich die  $Ca^{2+}$ -Amplituden in den mutationstragenden Zelllinien stärker als in der Kontrollzelllinie (Abbildung 30).



|             |    |    |    |    |
|-------------|----|----|----|----|
| n (Kontr.)  | 15 | 15 | 15 | 15 |
| n (PKP2-KO) | 23 | 21 | 21 | 21 |
| n (DSG2-KO) | 16 | 15 | 15 | 15 |

Abbildung 30: Die intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Amplituden von PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM waren signifikant niedriger als die der Kontroll-KM.

Die  $Ca^{2+}$ -Amplituden wurden als Differenz zwischen der diastolischen und systolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration der  $Ca^{2+}$ -Transienten berechnet (Einheit: Intensitätsverhältnis der Emissionswellenlängen von Indo). Aufsteigende  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin (Iso). Graph: Mittelwert  $\pm$  SEM, n-Zahlen tabellarisch darunter. Two-way ANOVA (#  $p < 0,05$ ; ###  $p < 0,001$ ) mit Bonferroni-Posttest.

Abbildung A 3 (s. Anhang) zeigt, dass L-Tryp und bzw. oder TP-Behandlungen der Kontrolllinie keinen Einfluss auf die  $Ca^{2+}$ -Amplituden hatten.

Im Folgenden wurde wieder die Wirkung des TPs auf die intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Amplituden getestet, wobei sich in beiden KO-Zelllinien kein signifikanter Effekt zeigte (Abbildung 31). Ein leichter Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Amplituden in den PKP2-KO-Zellen ohne Signifikanz konnte allerdings beobachtet werden.

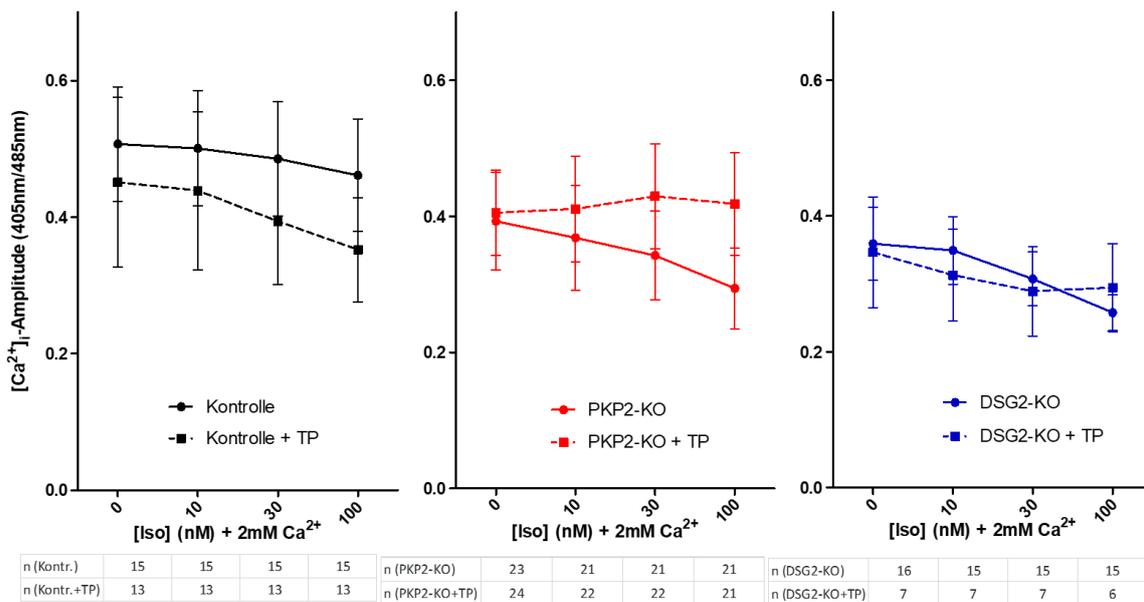


Abbildung 31: Das TP hatte keine signifikante Wirkung auf die  $Ca^{2+}$ -Amplituden aller Zelllinien.

Im linken Diagramm ist die Kontrollzelllinie dargestellt, mittig PKP2-KO, rechts DSG2-KO. Die Behandlung mit dem Tandem-Peptid erfolgte je 24h.

Graph: Mittelwert  $\pm$  SEM, darunter tabellarisch die n-Zahlen. Statistischer Test: Two-way ANOVA mit Bonferroni-Posttest.

### 3.3.3 Relaxationszeiten als Maß der Geschwindigkeit des zytosolischen Kalziumausstroms

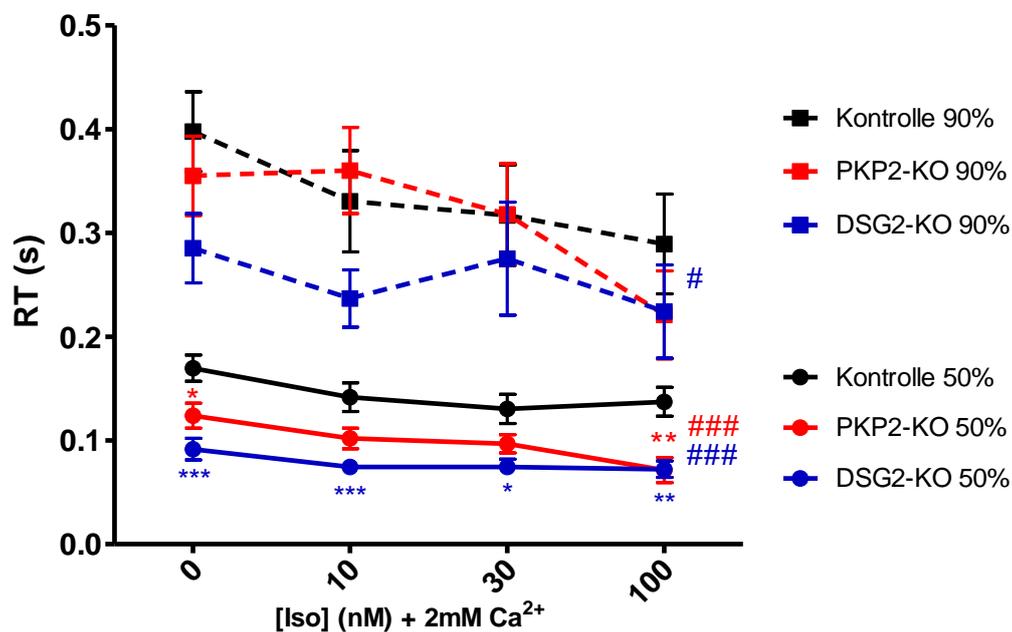
Weiterhin wurde die Kinetik des zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Ausstroms analysiert, da dessen Verlängerungen oder Verkürzungen arrhythmogen wirken können (El-Battrawy et al. 2018). Die 50-prozentigen (50 %) und die 90-prozentigen (90 %) Relaxationszeiten (RT) der Kalziumtransienten wurden bestimmt. Das sind die Zeiten, die benötigt werden, um 50 % bzw. 90 % der  $Ca^{2+}$ -Amplitude aus dem Zytosol über die SERCA ins SR und über den NCX nach extrazellulär zu pumpen.

PKP2-KO-KM zeigten kürzere 50%-RT im Vergleich zu gesunden Kontroll-KM ( $p < 0.0001$ ), während kein Unterschied bei der 90%-RT vorlag. Somit könnte eine erhöhte SERCA-Aktivität bei PKP2-KO-KM vorliegen. DSG2-KO-KM zeigten kürzere 50%-

und 90%-RT im Vergleich zu Kontroll-KM (50%-RT:  $p < 0.0001$ ; 90%-RT:  $p = 0,0168$ ). Deshalb könnten erhöhte SERCA- und NCX-Aktivitäten bei DSG2-KO-KM vorliegen.

Allgemein strömte das  $Ca^{2+}$  bei den KO-KM anteilig der  $Ca^{2+}$ -Amplitude schneller aus dem Zytosol nach extrazellulär und ins SR. Insgesamt zeigten die DSG2-KO-KM einen stärkeren Effekt auf die 50%-RT mit kürzeren RT im Vergleich zu den PKP2-KO-KM ( $p = 0,0205$ , in Abbildung 32 nicht markiert).

Mit steigenden Iso-Konzentrationen relaxierten die meisten KM schneller.



|             |    |    |    |    |
|-------------|----|----|----|----|
| n (Kontr.)  | 13 | 11 | 10 | 8  |
| n (PKP2-KO) | 19 | 16 | 15 | 15 |
| n (DSG2-KO) | 9  | 9  | 6  | 7  |

**Abbildung 32:** Die Relaxationszeiten von PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM waren kürzer im Vergleich zur Kontrolllinie.

Dargestellt sind die RT, die für einen 90%- bzw. 50%-Ausstrom der Kalziumtransientenamplitude aus dem Zytosol benötigt wurden. Da die  $Ca^{2+}$ -Kinetik von der Kontraktionsfrequenz abhängt, wurden nur vergleichbare, mit 0,5 Hz kontrahierende KM einbezogen.

Graph: Mittelwert  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA (#  $p < 0,05$ ; ###  $p < 0,001$ ) mit Bonferroni-Posttest (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Markiert ist jeweils der Vergleich der Mutationszelllinien mit der Kontrolllinie.

Abbildung A 4 (s. Anhang) zeigt, dass die Behandlung der Kontrollzelllinie mit L-Tryp 400  $\mu\text{M}$  verlängerte 90%- und 50%-RT auslöste (90%-RT  $p = 0,0049$ ; 50%-RT  $p = 0,0146$ ). Allerdings gab es bei L-Tryp-Konzentrationen von 800  $\mu\text{M}$  keinen Unterschied.

Das TP konnte die verkürzten RT der PKP2-KO-Zellen nicht therapieren (Abbildung 33). Außerdem hatte die Behandlung mit dem TP auf die DSG2-KO-Zellen und die Kontrollzellen keinen Einfluss.

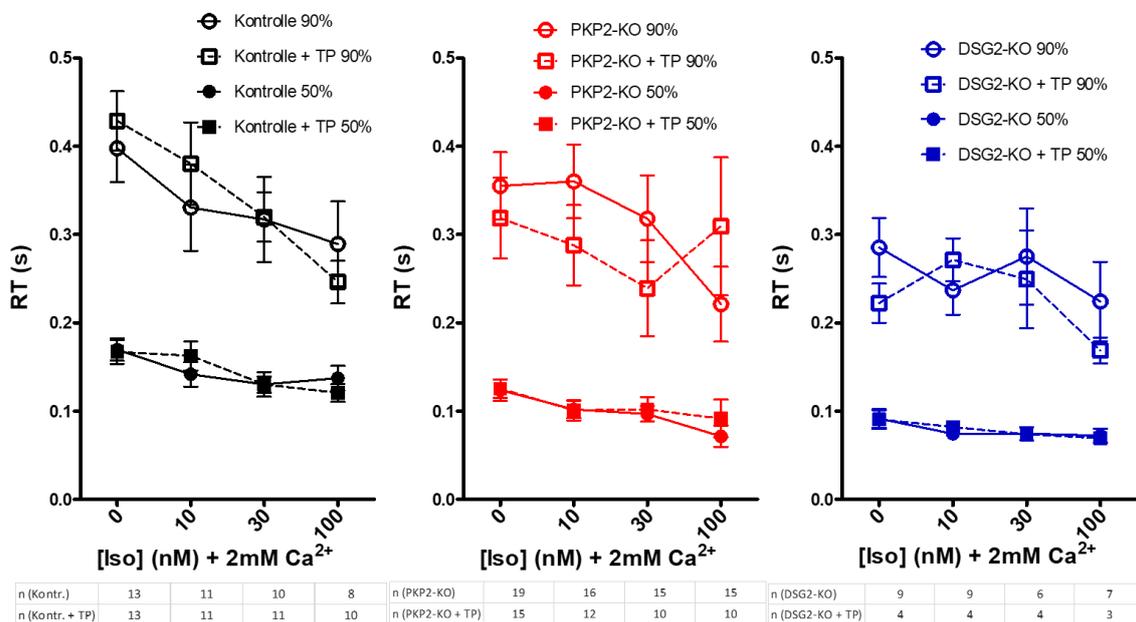


Abbildung 33: Das TP hatte keinen Einfluss auf die Relaxationszeiten aller drei Zelllinien. Dargestellt sind die 50%- und 90%-Relaxationszeiten (RT), im linken Diagramm der Kontrollzelllinie, mittig PKP2-KO und rechts DSG2-KO. Die Behandlung mit dem Tandem-Peptid erfolgte je 24h.  
Graph: Mittelwert  $\pm$  SEM, darunter tabellarisch die n-Zahlen. Statistischer Test: Two-way ANOVA mit Bonferroni-Posttest

### 3.3.4 Zeitkonstante tau zur Objektivierung der Kalzium-Ausstromgeschwindigkeit

Anhand der Zeitkonstante tau ( $\tau$ ) sollte die Geschwindigkeit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stroms aus dem Zytosol nach extrazellulär und ins SR erneut beschrieben werden. Der Grund für die verkürzten Relaxationszeiten der Mutationszelllinien (Abbildung 32) könnten die verminderten ausströmenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden (Abbildung 30) sein und nicht, dass tatsächlich die Geschwindigkeit des Kalziumausstroms beschleunigt war.

Tau beschreibt die gesamte Steigung der Kalziumausstromphase des Kalziumtransienten und nicht bestimmte Anteile davon, wie 50%-RT und 90%-RT. Ein größeres tau steht für eine längere Erholungszeit und damit für eine langsamere  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstromgeschwindigkeit.

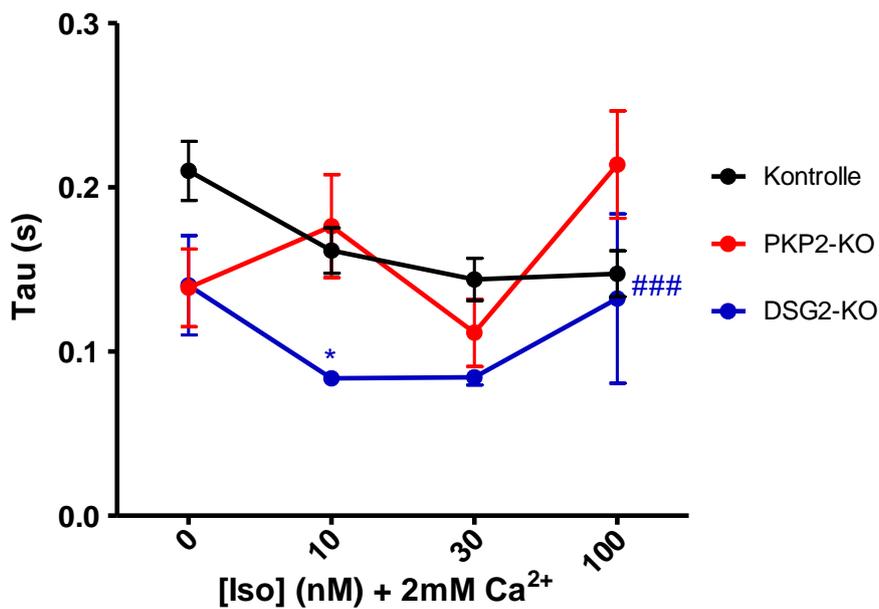
Die Werte von tau der DSG2-KO-KM waren signifikant niedriger im Vergleich zur gesunden Kontrolle ( $p = 0,0006$ ). Es bestätigte sich eine tatsächlich beschleunigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstromgeschwindigkeit der DSG2-KO-Zellen (Abbildung 34).

Die Werte von tau der PKP2-KO-Zellen waren nicht unterschiedlich im Vergleich zu den Kontrollzellen und variierten bei aufsteigenden Iso-Konzentrationen ohne Zusammenhang.

Die Zeitkonstante tau der PKP2-KO-KM war signifikant höher als die der DSG2-KO-KM ( $p = 0,0304$ , in Abbildung 34 nicht markiert). Das bedeutet, dass PKP2-KO-KM langsamere  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstromgeschwindigkeiten hatten als die DSG2-KO-KM.

Bei steigenden Iso-Konzentrationen reduzierte sich tau nur bei der Kontrollzelllinie.

Zusammenfassend bestätigte sich die tatsächlich beschleunigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstromgeschwindigkeit von DSG2-KO-Zellen, welche bei den PKP2-KO-Zellen nicht so eindeutig zu sehen war (s. Diskussion 4.2.2).



|             |    |    |    |    |
|-------------|----|----|----|----|
| n (Kontr.)  | 13 | 11 | 10 | 8  |
| n (PKP2-KO) | 19 | 16 | 15 | 15 |
| n (DSG2-KO) | 9  | 9  | 6  | 7  |

Abbildung 34: Die Zeitkonstante tau der DSG2-KO-KM war niedriger im Vergleich zu den Kontroll-KM.

Dargestellt ist das „Single exponential tau“ der Kalziumtransienten. Tau einer exponentiellen Funktion, die hier die Kalziumausstromphase der Kalziumtransienten war, beschreibt die Zeit, die benötigt wird, um sich um 63 % zu reduzieren.

Graph: Mittelwert  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA (###  $p < 0,001$ ) mit Bonferroni-Posttest (\*  $p < 0,05$ ). Markiert ist jeweils der Vergleich der Mutationszelllinien mit der Kontrolllinie.

Letztlich hatte das TP keinen signifikanten Einfluss auf die Zeitkonstante tau der PKP2-KO- und DSG2-KO-Zellen. Beide Graphen unterschieden sich mit und ohne TP-Behandlung kaum (nicht dargestellt).

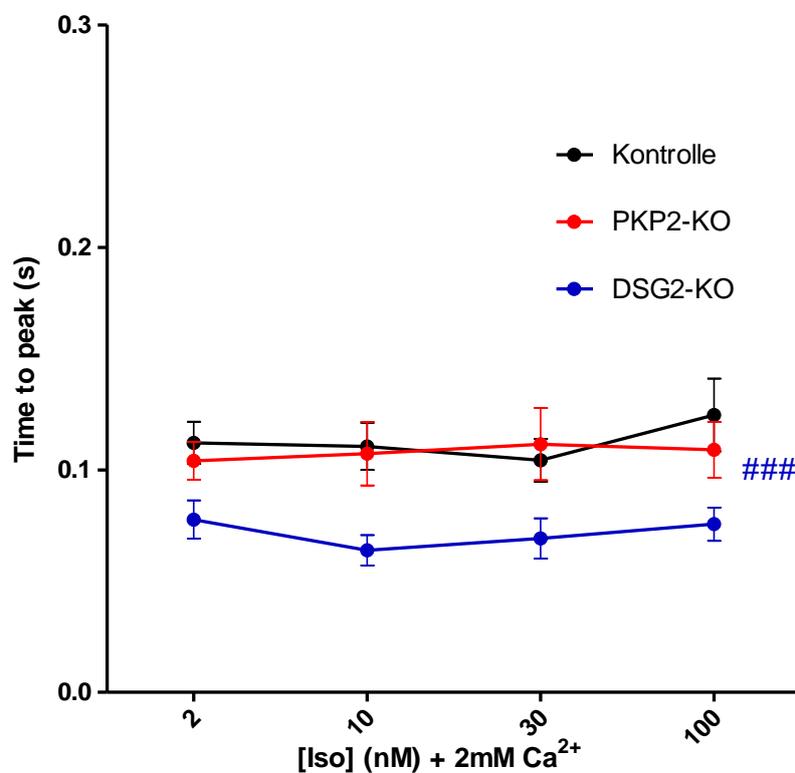
### 3.3.5 Time to peak als Maß der zytosolischen Kalzium-Einstromgeschwindigkeit aus dem sarkoplasmatischen Retikulum

Einen weiteren Parameter der Kinetik der Ca<sup>2+</sup>-Transienten stellt die *time to peak* (TTP) dar. Sie entspricht der Zeit von der diastolischen Grundlinie bis zum systolischen Maximum des Ca<sup>2+</sup>-Transienten. Die TTP gibt die Ca<sup>2+</sup>-Einstromgeschwindigkeit ins

Zytosol hauptsächlich aus dem SR wieder, was durch die Interaktion von LTCC und RyR geschieht.

Die TTP von DSG2-KO-KM war signifikant vermindert im Vergleich zu Kontroll-KM ( $p < 0,0001$ , Abbildung 35), sowie im Vergleich zu PKP2-KO-KM ( $p = 0,0003$ ). Dies könnte auf eine beschleunigte Interaktion von LTCC und RyR bei DSG2-KO-KM im Gegensatz zu den anderen Zelllinien hinweisen.

Die TTP von PKP2-KO-KM unterschied sich nicht im Vergleich zu Kontroll-KM.



|             |    |    |    |    |
|-------------|----|----|----|----|
| n (Kontr.)  | 13 | 11 | 10 | 8  |
| n (PKP2-KO) | 19 | 16 | 15 | 15 |
| n (DSG2-KO) | 9  | 9  | 6  | 7  |

Abbildung 35: Die TTP von DSG2-KO-KM war verkürzt im Vergleich zu Kontroll-KM und PKP2-KO-KM.

Die time to peak (TTP), also Ca<sup>2+</sup>-Einstromgeschwindigkeit ins Zytosol hauptsächlich aus dem SR, ist dargestellt. Die TTP entspricht der Zeit von der diastolischen Grundlinie bis zum systolischen Maximum des Ca<sup>2+</sup>-Transienten.

Graph dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM und darunter tabellarisch die n-Zahlen. Statistischer Test: Two-way ANOVA (###  $p < 0,001$ ) mit Bonferroni-Posttest.

### 3.3.6 Zellkontraktion

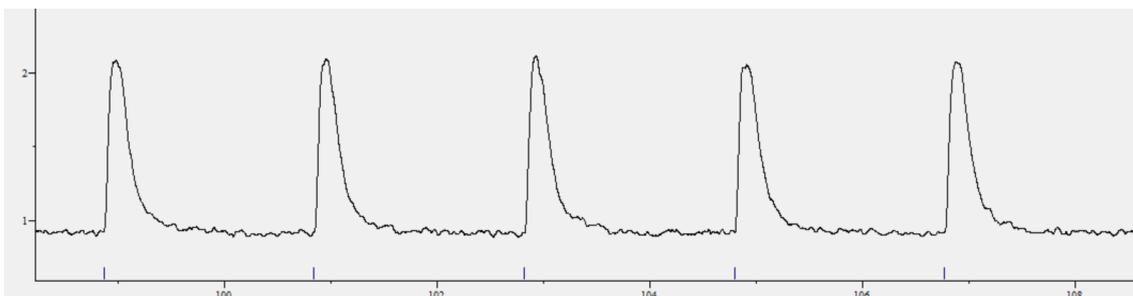
Parallel zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten wurden bei den Ion-Optix-Messungen die Kontraktionen der KM aufgezeichnet, wie in Abbildung A 5 dargestellt (s. Anhang). Gemessen wurden die Amplitude der Zellverkürzung, welche keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Zelllinien ergab, allerdings fielen große Fehlerbalken auf.

## 3.4 Analyse der Arrhythmien von PKP2-KO- und DSG2-KO-Kardiomyozyten

Ziel war es, die Arrhythmien der Zelllinien zu vergleichen und wenn möglich mit dem TP zu therapieren. Dabei wurde postuliert, dass hiPS-KM mit PKP2-KO und DSG2-KO eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Arrhythmien aufweisen. Methodisch wurde zur Analyse der arrhythmischen Ereignisse die Konfiguration der Kalziumtransienten betrachtet.

### 3.4.1 Anteil arrhythmischer Kardiomyozyten und Auswirkungen des Tandem-Peptids auf die drei Zelllinien

Im Vergleich der Zelllinien sollte analysiert werden, wie viele KM rhythmisch bzw. arrhythmisch kontrahierten. KM, die auf jede elektrische Stimulation mit einem Kalziumtransient reagierten, wurden als rhythmisch stimulierbar gewertet (Abbildung 36). Alle arrhythmischen Ereignisse, wie z. B. Pausen, zusätzliche Kontraktionen oder fehlende Stimulierbarkeit (s. Methoden 2.2.6.2), wurden den rhythmisch stimulierbaren Zellen gegenübergestellt.

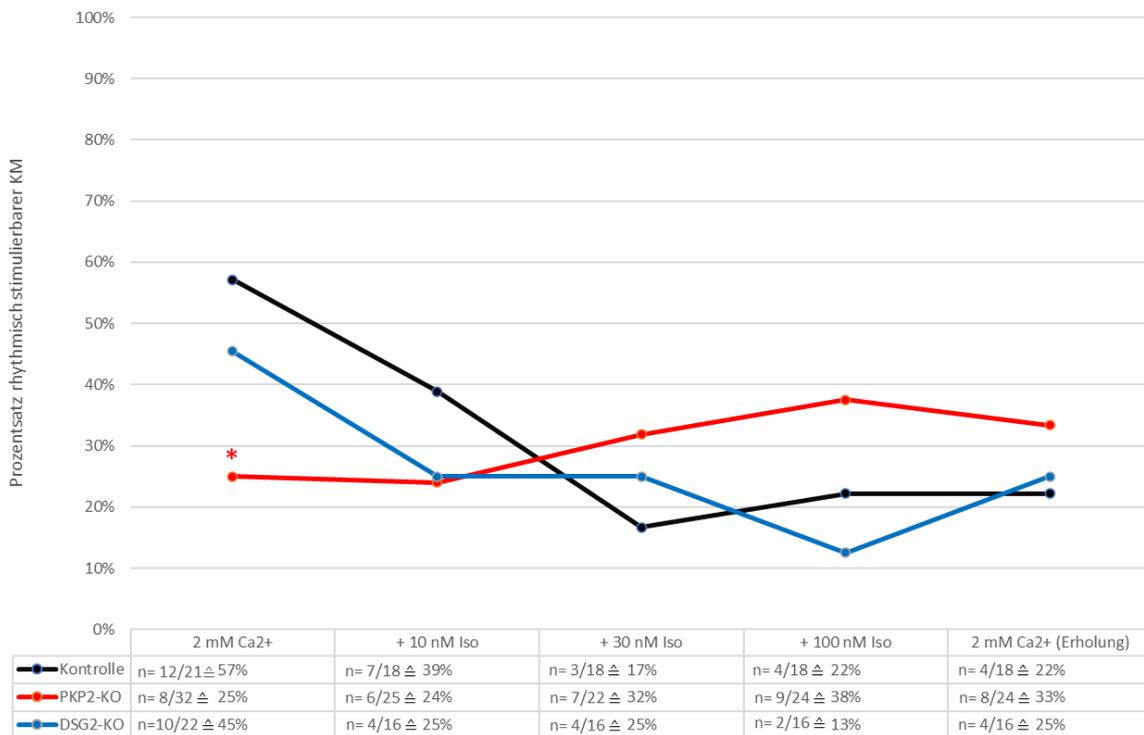


**Abbildung 36: Darstellung rhythmisch stimulierbarer Kalziumtransienten.**

Wenn in einer Phase des Messprotokolls auf jede elektrische Stimulation genau ein Kalziumtransient folgte, wurde die KM der Kategorie „rhythmisch stimulierbar“ zugeordnet. Dargestellt ist eine beispielhafte Aufzeichnung einer Ion-Optix-Messung, die mit der Filterfunktion geglättet wurde. Die blauen vertikalen Striche der Zeitleiste markieren die elektrischen Stimulationen mit 0,5 Hz. Die Einheit der y-Achse ist das Intensitätsverhältnis der Emissionswellenlängen von Indo.

Ohne  $\beta$ -adrenerge Stimulation kontrahierten signifikant mehr PKP2-KO-KM arrhythmisch als Kontroll-KM ( $p = 0,0235$ ). PKP2-KO-KM wurden mit steigenden Iso-Konzentrationen rhythmischer, in der Erholungsphase nach der Iso-Stimulation wieder arrhythmischer (Abbildung 37).

DSG2-KO-KM zeigten ohne  $\beta$ -adrenerge Stimulation eine Tendenz zur Arrhythmie im Gegensatz zur Kontrolllinie. Es bestand kein signifikanter Unterschied. Die Kontrollzellen und DSG2-KO-Zellen wurden durch die  $\beta$ -adrenerge Stimulation arrhythmischer.



**Abbildung 37:** Anteil rhythmisch stimulierbarer Zellen in Abhängigkeit von der Zelllinie und Iso-Konzentrationen. PKP2-KO-KM ohne Iso waren arrhythmischer im Vergleich zu Kontroll-KM, mit Iso kehrte sich der Effekt um.

Dargestellt ist der Anteil rhythmisch stimulierbarer Zellen an allen kontrahierenden Zellen in der jeweiligen Phase des Messprotokolls. Einbezogen wurden alle Messungen mit Aufzeichnung der Rhythmik, auch wenn keine Ca<sup>2+</sup>-Messung, z. B. wegen fehlerhafter Indo-Färbung, durchgeführt wurde.

Graph als Mittelwerte, darunter tabellarisch die absoluten Anzahlen (n) bzw. Prozentsätze. Statistischer Test: zweiseitiger exakter Fisher-Test zwischen Kontrolllinie und jeweils Mutationslinien pro Tyrode-Phase (\*  $p < 0,05$ ).

Letztlich wurde der Einfluss des TP auf die Arrhythmien in allen drei Zelllinien untersucht, wie in Abbildung A 6 dargestellt (s. Anhang). Das TP hatte keinen Einfluss auf die Arrhythmien der PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM.

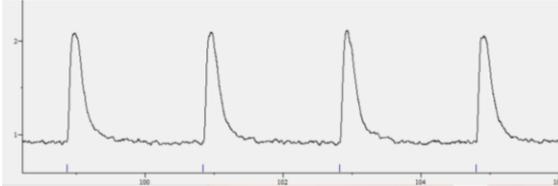
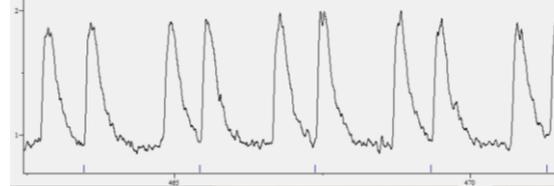
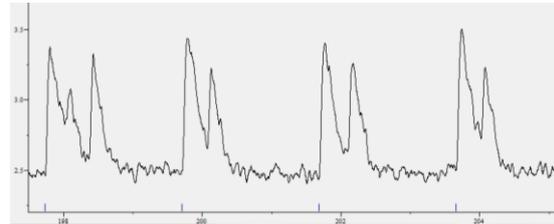
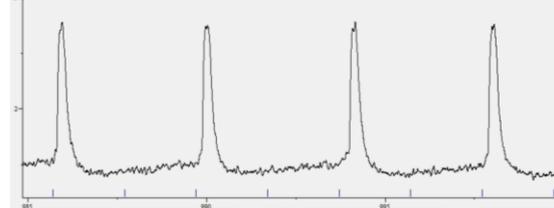
Zusammenfassend waren PKP2-KO-KM arrhythmischer verglichen mit den anderen beiden Zelllinien. Interessant war die Beobachtung (s. Diskussion 4.2.3), dass unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation die Arrhythmien der PKP2-KO-KM besser wurden und in der Erholung wiederkehrten. Das TP hatte keinen Einfluss.

### 3.4.2 Unterscheidung unterschiedlicher Arrhythmien anhand der Konfiguration der Kalziumtransienten

Nach Betrachtung der Häufigkeit von Arrhythmien wurde die Art der arrhythmischen Ereignisse im Vergleich der Zelllinien genauer untersucht. Den rhythmischen KM wurden Arrhythmien im Sinne von verzögerten Nachdepolarisationen (*delayed afterdepolarization* (DAD)), frühen Nachdepolarisationen (*early afterdepolarization* (EAD)) und Pausen gegenübergestellt (Tabelle 14). Es wurden nur stimulierbare KM mit eindeutigen Kalziumtransienten gewertet, da diese den verschiedenen Arrhythmie-Ereignissen zugeordnet werden konnten.

**Tabelle 14: KM wurden nach der Art der Arrhythmien in die folgenden Kategorien eingeteilt, die mit Beispiel-Kalziumtransienten dargestellt sind.**

Alle stimulierbaren KM wurden der Kategorie zugeteilt, die zeitlich während einer Protokollphase überwogen hatte. Dargestellt sind beispielhafte Ion-Optix-Messungen in der Einheit des Intensitätsverhältnisses der Emissionswellenlängen von Indo. Die blauen vertikalen Striche der Zeitleiste markieren die elektrischen Stimulationen mit 0,5 Hz. Die Filterfunktion zum Glätten der Spuren wurde angewendet.

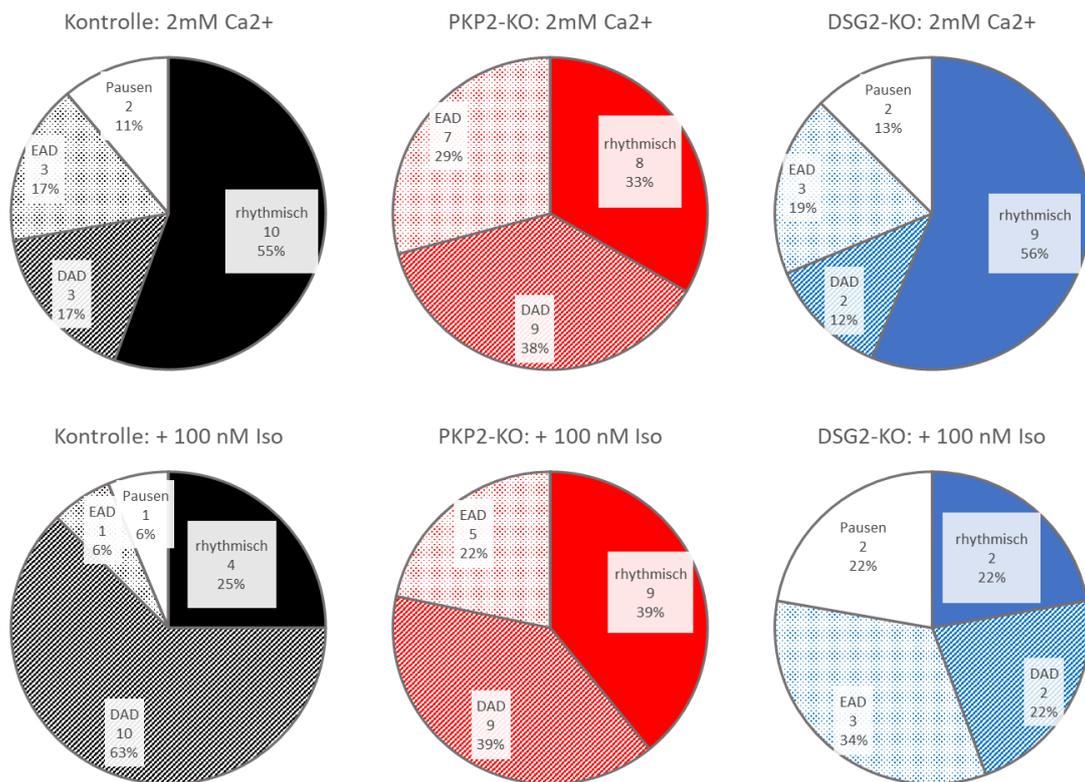
| Rhythmisch  | Arrhythmisch   |
|---|--|
| <p><b>Rhythmisch:</b> Jeder elektrischen Stimulation folgt genau ein Schlag während der kompletten Phase.</p>  | <p><b>DAD (delayed afterdepolarization):</b> Trotz elektrischer Stimulierbarkeit treten zusätzliche Transienten im Sinne von „verzögerten Nachdepolarisationen“ auf, nachdem die Grundlinie wieder erreicht wurde.</p>           |
|   | <p><b>EAD (early afterdepolarization):</b> Auf die Transienten folgt ein erneuter Kalzium-Aufschwung im Sinne einer „frühen Nachdepolarisation“, bevor die Grundlinie des eigentlichen Transienten wieder erreicht wurde.</p>  |
|   | <p><b>Pausen:</b> Nicht jeder elektrischen Stimulation folgt ein Kalziumtransient.</p>   |

Rhythmische und arrhythmische Ereignisse der drei Zelllinien wurden jeweils unter 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ohne Iso und unter 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  mit 100 nM Iso gezählt wie in Abbildung 38 dargestellt.

55 % der Kontrollzellen waren rhythmisch, unter Iso-Stimulation 25 %. PKP2-KO-Zellen waren zu einem Drittel rhythmisch, was sich unter Iso kaum änderte. 56 % der DSG2-KO-Zellen waren rhythmisch, unter Iso-Stimulation 22 %, was sich ähnlich zur Kontrolllinie verhielt.

Im Gegensatz zu den anderen beiden Zelllinien hatten PKP2-KO-KM mehr Arrhythmien, die sich durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation kaum änderten.

Die Kontrollzellen waren ohne Iso überwiegend rhythmisch, und EADs, DADs und Pausen kamen vor. Kontrollzellen zeigten unter Iso-Stimulation zu 63 % DADs. PKP2-KO-Zellen hatten mit und ohne Iso zu je einem Drittel EADs und DADs, und zu keiner Zeit Pausen. DSG2-KO-KM zeigten unter Iso-Stimulation zu je einem Viertel EADs, DADs und Pausen.



**Abbildung 38:** Die KM der drei Zelllinien zeigten ohne und mit Iso-Stimulation unterschiedlich häufig die rhythmische Kategorie und verschiedene arrhythmische Ereignisse.

Im oberen Teil der Abbildung wurden KM der drei Zelllinien in der ersten Protokoll-Phase mit 2 mM Ca<sup>2+</sup> beobachtet, im unteren Teil bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit 100 nM Iso. Darstellung der Kontrolllinie links, PKP2-KO mittig und DSG2-KO rechts. Die Legenden beinhalten die Kategorie, darunter die absolute Anzahl (n) der Zellen und darunter deren prozentualen Anteil an allen stimulierbaren Zellen. Abkürzungen: delayed afterdepolarization (DAD), early afterdepolarization (EAD).

Zusammenfassend unterschied sich vor allem die PKP2-KO-Linie im Vergleich zu den anderen Zelllinien durch insgesamt mehr Arrhythmien ohne Iso. Die Iso-Stimulation hatte dann wiederum keinen Einfluss auf die arrhythmischen Ereignisse. Pausen traten im Gegensatz zu den anderen Zelllinien nicht auf.

### 3.4.3 Quantifikation der Arrhythmien anhand von Beispiel-Zellen der PKP2-KO-Zelllinie

Arrhythmien traten bei einzelnen Zellen unterschiedlich häufig auf. Daher sollte gezeigt werden, wie viele arrhythmische Ereignisse innerhalb einer Messphase bei vier repräsentativen PKP2-KO-Zellen auftraten. Hierbei wurde die Anzahl arrhythmischer Ereignisse pro Zelle analysiert. In Abbildung 38 in Kapitel 3.4.2 wurden bei Iso-Stimulation mehr PKP2-KO-Zellen rhythmisch und folglich wurde analysiert, ob bei einzelnen PKP2-KO-KM weniger arrhythmische Ereignisse durch Iso auftraten.

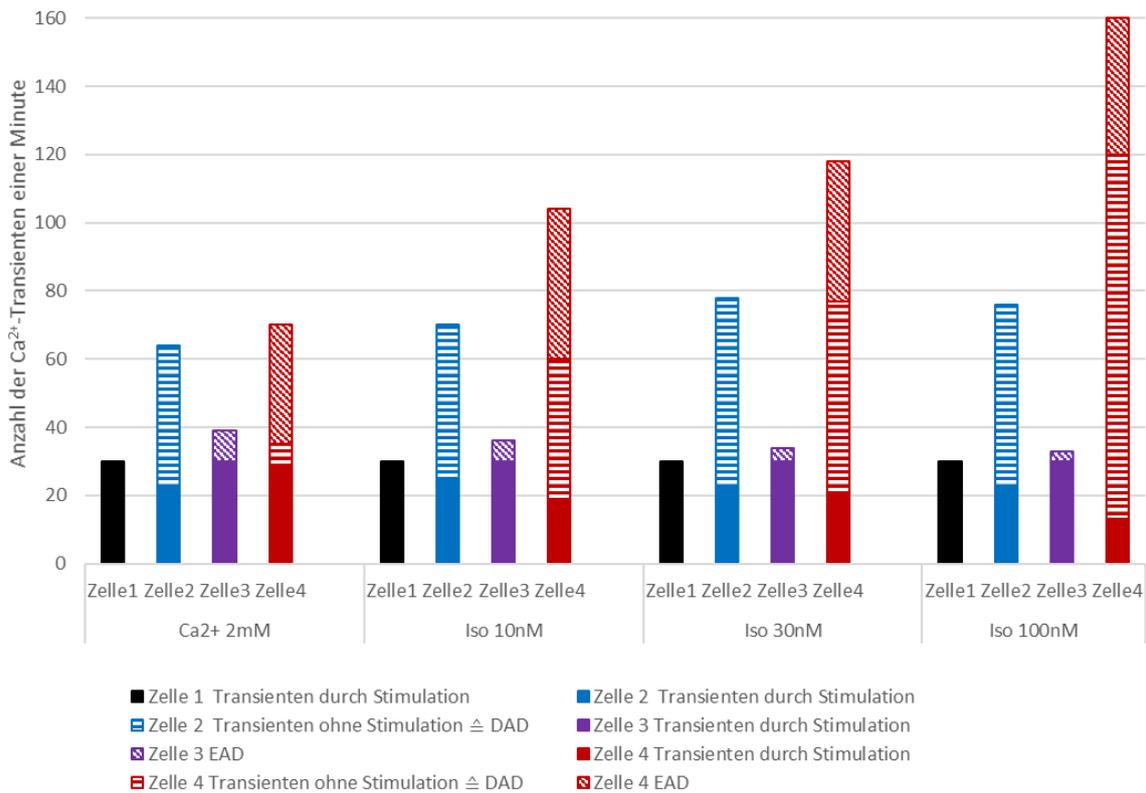
Aufgezeichnet wurden alle Kalziumtransienten pro Minute entsprechend 30 elektrischen Stimulationen (Abbildung 39). Unterschieden wurde zwischen Transienten, die auf eine Stimulation folgten, und Transienten, die ohne Stimulation erfolgten (meist DADs). Zusätzlich wurden EADs gezählt.

Zelle 1 blieb während des gesamten Messprotokolls im Stimulationsrhythmus mit 30  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten pro Minute. Es traten keine Arrhythmien auf.

Zelle 2 hatte ungefähr ein Drittel normale Transienten auf Stimulation folgend und zusätzlich viele Transienten ohne Stimulation, die zu kompensatorischen Pausen oder Rhythmusverschiebungen führten. Diese DADs wurden mit steigender Iso-Konzentration etwas häufiger.

Zelle 3 blieb im Stimulationsrhythmus, zeigte aber zusätzlich EADs, die mit steigenden Iso-Konzentrationen seltener wurden.

Zelle 4 zeigte mit steigenden Iso-Konzentrationen weniger stimulierte Transienten. Der Anteil an Transienten ohne Stimulation nahm durch Iso zu. Das könnte bedeuten, dass die anfänglichen DADs zu einer Rhythmusentkopplung geführt haben. Die Anzahl der EADs blieb ungefähr gleich trotz steigender Iso-Konzentration.



**Abbildung 39:** Die Anzahl der Arrhythmien von vier repräsentativen PKP2-KO-Zellen änderte sich bei steigender Iso-Konzentration nicht bei allen Zellen.

Dargestellt sind vier Beispiel-PKP2-KO-KM in verschiedenen Farben bei aufsteigenden Iso-Konzentrationen nebeneinander. Gezählt wurden die absoluten Anzahlen von Ca<sup>2+</sup>-Transienten in einer Minute, bei elektrischer Stimulation mit 0,5 Hz (entspricht 30 Stimulationen pro Minute). Ausgefüllter Balken: stimulierte Transienten; quergestreift: Transienten ohne Stimulation, also meist delayed afterdepolarizations (DADs); schräggestreift: early afterdepolarizations (EADs).

Zusammenfassend tendierten die einzelnen PKP2-KO-KM zu speziellen Mustern von Arrhythmien, deren Anzahl sich bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation bei den meisten Zellen änderte.

## 4 Diskussion

Die Ergebnisse der Versuche bestanden aus veränderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Parametern und arrhythmischen Ereignissen der PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM. Unter anderem waren bei beiden mutationstragenden Zelllinien die diastolischen intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erhöht, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden erniedrigt und die Kinetik der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten beschleunigt. Arrhythmien waren bei PKP2-KO-KM häufiger im Vergleich zur gesunden Kontrolle. Das TP konnte nur eine eingeschränkte therapeutische Wirkung zeigen. Dies wird im Folgenden interpretiert und diskutiert.

Zuvor werden die positiv getesteten Protokolle zur beschleunigten Reifung von hiPS-KM verglichen und diskutiert.

### 4.1 Vor- und Nachteile von verschiedenen Faktoren und Protokollen, die die Reifung von hiPS-Kardiomyozyten beeinflussen

Um hiPS-KM für Experimente nutzen zu können, müssen sie eine gewisse Reife erlangen. Dafür existieren in der Literatur verschiedene Reifungsprotokolle, von denen zwei getestet wurden, was im Folgenden interpretiert wird. Anschließend wird diskutiert, welche Eigenschaften von hiPS-KM sich trotzdem von adulten humanen KM unterscheiden, und ob eine Eignung für Versuche vorliegt.

#### 4.1.1 Wirksamkeit der *Mattress*-Kultivierung

KM, die auf *Mattresses* kultiviert wurden, zeigten im Vergleich zu unreifen KM ohne *Mattresses* erwartungsgemäß veränderte Eigenschaften bezüglich ihres Kalziumhaushalts und Kontraktionsverhaltens sowie verbesserte Eignung für Experimente. Feaster et al. hatten die Matrigel-*Mattress*-Methode etabliert und eine 35-42-tägige Kultivierung getestet. Davon wurden die letzten 5-7 Tage auf *Mattresses*

kultiviert. Fast alle KM auf *Mattresses* kontrahierten in dem Versuch sichtbar, dagegen kaum KM ohne *Mattress*-Kultivierung (Feaster et al. 2015). Vergleichbar war, dass unsere KM auf *Mattresses* häufiger elektrisch stimulierbar waren als unreife KM (33 % vs. 80 %, nicht graphisch dargestellt).

In der Publikation stieg die Zellkontraktilität mit inotroper Intervention durch steigende extrazelluläre  $[Ca^{2+}]_e$  an (Feaster et al. 2015). Unsere KM auf *Mattresses* reagierten auf extrazelluläre  $[Ca^{2+}]_e$ , indem die systolischen und diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$  anstiegen und sie stetig arrhythmischer wurden.

Die Amplitude der Zellkontraktion der KM auf *Mattresses* hatte große Fehlerbalken. Das war ein Hinweis dafür, dass die verbesserte Kontraktilität, wie bei herkömmlichen 100-tägigen hiPS-KM, die in der Publikation erzielt wurde, nicht reproduziert werden konnte. Allerdings berichteten sie von maximal 14-tägiger Kontraktilitätsverbesserung, weil danach die Matrigel-*Mattress* ihre Integrität verliert (Feaster et al. 2015). In unseren Beobachtungen zeigten sich allerdings keine nachteiligen Auswirkungen längerer *Mattress*-Kultivierung.

Die Morphologie der hiPS-KM wurde in unserem Labor von Dr. Anna Janz analysiert. Mit *Mattresses* war nach 23 Tagen eine Längenausdehnung zu erkennen, während KM ohne *Mattresses* rund und kugelig blieben. Die Zellgröße der KM auf *Mattresses* war signifikant ca. 2,5-fach größer als ohne *Mattresses* ab 20-30-tägiger Kultivierung (Janz et al. 2021) (Dissertation von Dr. Anna Janz, unveröffentlicht am 22.08.2022). In der Publikation von Feaster et al. war die morphologische Längenausdehnung und längliche Zellform der KM auf *Mattresses* vergleichbar mit adulten humanen KM (Feaster et al. 2015).

Bezüglich des Kalziumhaushalts und elektrophysiologischer Parameter wurde in der Publikation kein Unterschied festgestellt. Dagegen war die  $Ca^{2+}$ -Amplitude unserer KM auf *Mattresses* erhöht. Außerdem war die Kontraktionsfrequenz der unreifen KM ohne *Mattresses* stark erhöht im Vergleich zu KM auf *Mattresses*, die ungefähr mit der Stimulationsfrequenz kontrahierten und dadurch besser für Experimente geeignet waren.

Eine Limitation des Versuchs war, dass die KM ohne *Mattresses* der Kontrolllinie nur 12 Tage und die KM auf *Mattresses* 19-36 Tage kultiviert wurden. PKP2-KO-KM wurden 20-22 Tage kultiviert und die KM auf *Mattresses* 26-36 Tage. Auch bei dem geringen Zeitunterschied der PKP2-KO-KM hatte die Kultivierung mit *Mattresses* positive Auswirkungen.

Schlussfolgernd konnten wir die Publikation von Feaster et al. auf unsere hiPS-KM übertragen und ihre gemessenen Parameter teilweise vergleichbar nachstellen. Auch wenn einige Ergebnisse in zukünftigen Versuchen überprüft werden sollten, konnten wir für Experimente geeignete KM generieren.

#### 4.1.2 Wirksamkeit der Hormone zur beschleunigten Reifung

Parikh et al. etablierten ein Protokoll zur beschleunigten Reifung durch Hormonzugabe von Dexamethason und Triiodthyronin und anschließender *Mattress*-Kultivierung von insgesamt ca. 35 Tagen (Parikh et al. 2017). Wir testeten dieses Protokoll mit unseren hiPS-KM unter den lokalen Laborbedingungen.

KM mit Hormonbehandlung zeigten signifikant höhere Kontraktionsfrequenzen als ohne Hormone (Abbildung 19). Dabei lag die Kontraktionsfrequenz mit Hormonbehandlung näher an der Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz, was auf eine verbesserte elektromechanische Kopplung hindeutete. Auch in der Publikation war die Exzitations-Kontraktions-Kopplung durch Hormon- und *Mattress*-Kultivierung verbessert im Vergleich zur alleinigen *Mattress*-Kultivierung. Ursächlich war die verstärkte  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über LTCC und RyR (Parikh et al. 2017). Trotzdem zeigte sich bei unseren KM kein Unterschied bei der Stimulierbarkeit mit bzw. ohne Hormone.

Bezüglich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden und diastolischen bzw. systolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  entstand in der Publikation kein Unterschied durch die Hormonbehandlung (Parikh et al. 2017), was auch in dieser Arbeit das Ergebnis war. Allerdings beendete bei hohen extrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  ein großer Anteil der KM ohne Hormonbehandlung die Kontraktionen.

Die Kalziumkinetik, also TTP,  $\text{Ca}^{2+}$ -Zeitkonstante  $\tau$  und die 50%-RT, waren bei den mit Hormonen behandelten KM von Parikh et al. beschleunigt. Wegen der Stimulationsfrequenz von 0,2 Hz war kein direkter Vergleich der Kinetik möglich. Der Grund waren schnellere Transportraten der SERCA und des NCX. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine beschleunigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik ein Zeichen der Reife wäre.

Eine Limitation war, dass die Wirkung der Hormone hauptsächlich durch  $\text{Ca}^{2+}$ - und Arrhythmie-Messungen analysiert wurde. Parikh et al. konnten beweisen, dass die T-Tubuli funktional ausgebildet waren und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Parameter verbessert, was erst durch die Kombination von Hormonen und *Mattresses* auftrat (Parikh et al. 2017). Weil dies besonders wichtig für  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen war, übernahmen wir das Hormon-Protokoll inklusive der *Mattress*-Kultivierung.

#### 4.1.3 Limitationen der Experimente bezüglich der Reife von hiPS-Kardiomyozyten

Eigenschaften reifer KM sind in der Einleitung zusammengefasst und wurden zum Teil in den Experimenten überprüft. Es existieren in der Literatur erwartungsgemäß keine absoluten Grenzen von Parametern, die für die Zellreife sprechen. Deshalb wurden eindeutig unreife KM mit KM des Reifungsprotokolls verglichen. Limitierend war, dass Eigenschaften, die bei älteren, reifungsbehandelten Zellen beobachtet wurden, von uns als reife Eigenschaften angenommen wurden.

Ein Beispiel war die Stimulierbarkeit, die sich bei längerer Kultivierung verbesserte und als Zeichen der Reife gesehen wurde. Fehlende Stimulierbarkeit ist außerdem ein Hinweis auf gestörte elektromechanische Kopplung durch unzureichend ausgebildete T-Tubuli. Ursächlich könnte außerdem die Lokalisation der Hemiconnexe der *Gap Junctions* sein, die erst mit fortschreitender Reifung in der Zellmembran an den Glanzstreifen lokalisiert sind (Kolanowski, Antos, and Guan 2017). Dies könnte auch der Grund für die fehlende Reaktion auf die inotropen extrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  sein. Bei unreifen KM änderten sich die intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  kaum und Arrhythmien wurden

nicht verstärkt. Im Gegensatz dazu sind unreife KM in der Literatur empfänglicher für extrazelluläre  $[Ca^{2+}]_e$ -Änderungen wegen der stärkeren Abhängigkeit von NCX- $Ca^{2+}$ -Strömen (Kolanowski, Antos, and Guan 2017).

Limitierend für die Experimente mit Iso-Stimulation war, dass sich die Reaktion auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation unterscheiden kann, weil adulte KM hauptsächlich  $\beta$ 1-Rezeptoren und hiPS-KM  $\beta$ 2-Rezeptoren exprimieren (Kolanowski, Antos, and Guan 2017).

Trotz einzelner Unterschiede zeigten die hiPS-KM insgesamt einen vergleichbaren Kalziumhaushalt zu adulten humanen KM (Kadari et al. 2015; Knollmann 2013), was durch die Reifungsbehandlung zusätzlich verbessert wurde.

Unreife Zellen entwickeln eine geringere Kontraktionskraft als adulte KM (Kolanowski, Antos, and Guan 2017). Die Zellverkürzung konnte nicht ausgewertet werden, weil sich die Kontraktionen beim Wechsel der Tyrode-Lösungen so veränderten, dass die Markierungen im Bild verschoben wurden und der Parameter nicht durchgängig aufgezeichnet werden konnte.

Allgemein wurde die Empfindlichkeit der hiPS-KM beobachtet. Durch unterschiedliche Umweltfaktoren änderte sich ihr Kontraktions- und Wachstumsverhalten erheblich. Zwischen den biologischen Replikaten und Differenzierungen bestanden auch Unterschiede, z. B. bezüglich der spontan beobachteten Kontraktionsfrequenz. Teilweise hörten sie komplett auf zu kontrahieren, auch unter elektrischer Stimulation.

Zu beachten war, dass alle KM auch ohne elektrische Stimulation spontane Kontraktionen aufwiesen, die erwartungsgemäß bei adulten KM nicht auftreten würden (Knollmann 2013). Die Kontraktionsfrequenzen der unreifen KM ohne *Mattresses* und Hormone waren deutlich höher als die der reifen KM, was die Hypothese bestätigt und zeigt, dass die KM noch nicht reif waren. Die Schrittmacher-Ströme von hiPS-KM sind grundlegend verstärkt, was die Anfälligkeit für Arrhythmien wie DADs fördert (Knollmann 2013). Dies konnte bei den KM der gesunden Kontrolle beobachtet werden, da insbesondere mit Iso DADs auftraten.

Schlussfolgernd ist der Vergleich absoluter Ergebnisse der hiPS-KM mit menschlichen KM eingeschränkt. Trotzdem wurde mehrfach in Publikationen bestätigt, dass hiPS-KM durch Reifungsprotokolle geeignet sind, menschliche Erkrankungen nachzustellen, auch wenn sie nicht die Reife der adulten humanen KM erreichen. Es kann dann der relative Vergleich von Kontroll-KM mit KM der Erkrankung erfolgen. Bei der Diskussion zugrundeliegender Mechanismen müssen allerdings mögliche Abweichungen bei hiPS-KM beachtet werden. Es sollten außerdem immer gleichaltrige KM verglichen werden.

## 4.2 Veränderte Kalziumhomöostase und Arrhythmien bei PKP2-KO- und DSG2-KO-Kardiomyozyten

Da die Kalziumhomöostase eine entscheidende Rolle für die kontraktile Funktion und die Arrhythmien von KM spielt, wurden absolute intrazelluläre  $[Ca^{2+}]_i$  und die  $Ca^{2+}$ -Kinetik analysiert. Im Folgenden erfolgt der Vergleich mit verschiedenen anderen Modellen der ACM und die Translation zu klinischen Phänomenen. Die Auswahl an Studien mit  $Ca^{2+}$ -Messungen an hiPS-KM und desmosomalen Mutationen für direkte Vergleiche ist zwar vorhanden, aber eingeschränkt. Es wurden auch einige Mausmodelle zum Vergleich herangezogen.

### 4.2.1 Erhöhte diastolische Kalziumkonzentrationen und erniedrigte Amplituden der mutationstragenden Kardiomyozyten

Die diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$  von PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM waren erhöht, während die systolischen  $[Ca^{2+}]_i$  unverändert blieben (Abbildung 27). Die  $Ca^{2+}$ -Amplituden der Transienten von PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM waren folglich erniedrigt (Abbildung 30). Es deutete auf eine gestörte Elimination des  $Ca^{2+}$  aus dem Zytosol hin. In der Literatur war die Expression der SERCA in hiPS-KM mit PKP2-Mutation verringert (Kim et al. 2013) und in heterozygoten PKP2-KO-Mäusen waren die SERCA-Proteinlevel verringert (van Opbergen et al. 2019). So liegt auch bei unseren Ergebnissen ein Hinweis auf gestörte SERCA-Aktivität vor (s. auch 4.2.2).

Cerrone et al. fanden im PKP2-KO-Mausmodell erhöhte diastolische  $[Ca^{2+}]_i$ , aber gegensätzlich auch erhöhte  $Ca^{2+}$ -Amplituden (Cerrone et al. 2017). Dies widerspricht den erniedrigten Ejektionsfraktionen in PKP2-KO-Mäusen (Cerrone et al. 2021), da erhöhte  $Ca^{2+}$ -Amplituden in der Zelle theoretisch zu verstärkter Kontraktion führen. Andererseits könnten die erhöhten  $Ca^{2+}$ -Amplituden ein Kompensationsmechanismus bei schwachen Zell-Zell-Verbindungen durch PKP2-KO sein, weil mehr Kontraktionskraft aufgebracht werden muss, um den großen Zellverband auf Organebene im Maus-Herz überhaupt kontrahieren zu lassen. Ein anderes Mausmodell von Kim et al. zeigte nur in

rechtsventrikulären KM erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden und ubiquitär erhöhte diastolische  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Sie erklärten die hohen diastolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch eine erhöhte RyR-Sensitivität bei  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung und dessen veränderte Phosphorylierung. Durch eine Absenkung von Cx43 normalisierten sich die diastolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Kim et al. 2019). Die Ursache könnte somit nicht nur in den Kanälen zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Eliminierung liegen, sondern auch an der gestörten *Gap Junction*-Funktion bei PKP2-KO-KM. Eine heterozygote PKP2-Mutation in Mäusen veränderte weder die diastolischen noch die systolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Hammer et al. 2021).

HiPS-KM mit patientenspezifischer DSG2-Mutation (35-50 Tage alt) zeigten ebenso keine Veränderungen der diastolischen und systolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Das NCX-Proteinlevel war allerdings erniedrigt (El-Battrawy et al. 2018).

Allgemein besitzen KM bei HI dagegen eine verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude (Bers 2006). PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM unseres Versuchs besaßen somit teilweise  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte, die bei KM mit ACM anderer Modelle gemessen wurden, und teilweise Werte, die bei KM aus herzinsuffizienten Herzen gemessen wurden.

Beim Vergleich mit den Daten unseres ersten Versuchs, der *Mattress*-Etablierung, fällt widersprüchlich auf, dass dort PKP2-KO-KM eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude als Kontroll-KM zeigten. Ihre diastolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wiesen keinen Unterschied auf, die systolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  waren erhöht. Im Vergleich mit oben genannten Publikationen ergeben sich sowohl bei uns als auch in der Literatur insgesamt unterschiedliche Ergebnisse der intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Limitationen des Versuchs der *Mattress*-Etablierung waren, dass die KM durchschnittlich kürzer kultiviert wurden. Dadurch kann interpretiert werden, dass die PKP2-KO-KM eventuell viel langsamer reifen und sehr spät den Phänotyp der adulten Erkrankung ACM annehmen. Die n-Zahl und Zahl der biologischen Replikate war niedriger als im zweiten Experiment und nicht alle Zellen wurden mit Hormonen behandelt. Es gibt keinen Hinweis auf eine fehlerhafte Experimentdurchführung, weil die absoluten Werte der gesunden Zelllinie bei beiden Experimenten gut übereinstimmen. Die Ergebnisse unseres zweiten Versuchs untermauern sich selbst,

indem beide Mutationen in Richtung niedriger Amplituden abweichen. Die klinisch verminderte Pumpfunktion bei ACM steht im Einklang damit (Corrado, Basso, and Judge 2017).

Eine weitere Limitation war, dass im ersten Versuch der *Mattress*-Etablierung eher Einzelzellmessungen stattfanden und im zweiten Versuch größere Zellverbände gemessen wurden. Blazeski et al. bestätigten, dass der Phänotyp der ACM mit großen Zellverbänden besser nachgestellt wird als in Einzelzellschicht-Messungen (Blazeski et al. 2019). In der Zukunft sollten somit Experimente an möglichst großen hiPS-KM-Zellverbänden durchgeführt werden und näher untersucht werden, ob die Zellverband-Größe zu Unterschieden führt.

#### 4.2.2 Beschleunigte Kalzium-Relaxation der mutationstragenden Kardiomyozyten

PKP2-KO-KM zeigten eine kürzere 50-prozentige Relaxationszeit (50%-RT) als die gesunde Kontrolle. DSG2-KO-KM zeigten kürzere 50%-RT und 90%-RT als die gesunde Kontrolle (Abbildung 32). Somit war bei den mutationstragenden Zelllinien der  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom aus dem Zytosol in das SR und nach extrazellulär beschleunigt. Zur Elimination des  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol tragen hauptsächlich die SERCA zu ca. 70 % und der NCX zu ca. 28 % bei (Bers 2002). Dabei pumpt die SERCA schneller als der NCX (Song et al. 2015). Folglich könnte eine erhöhte SERCA-Aktivität bei PKP2-KO-KM und eine erhöhte SERCA- und NCX-Aktivität beim DSG2-KO-KM vorliegen.

In Zusammenschau mit den erhöhten diastolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM lassen sich Rückschlüsse auf die möglichen Mechanismen ziehen. Eine Hypothese wäre, dass die SERCA und der NCX normale Aktivitäten aufwiesen und die beschleunigten RT durch die erniedrigten  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden entstanden. Dann könnten die erhöhten diastolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch veränderte Aktivitäten von Kanälen, die das Ruhemembranpotential regeln, entstanden sein. Dabei spielen z. B. T-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle eine Rolle, die schon bei geringer Depolarisation von etwa  $-50$  mV öffnen (Behrends et al. 2012). Außerdem haben TRPC-Kanäle (*transient receptor potential classical*) einen

Einfluss auf den Kalziumhaushalt und das Ruhemembranpotential (Bandleon et al. 2019). Da das AP und die Membranpotentiale aber durch das Zusammenspiel vieler Kanäle zustande kommen (Abbildung 3), sollten in Zukunft zum Beispiel mit *Patch-Clamp*-Messungen Hinweise auf veränderte Ruhemembran-Kanäle gesucht werden. Eine andere Hypothese wäre, dass tatsächlich die Aktivitäten der SERCA und des NCX verändert waren. Da bei PKP2-KO-KM nur die 50%-RT, nicht aber die 90%-RT, verkürzt war, könnte die SERCA eine höhere Aktivität und der NCX eine geringere Aktivität aufweisen, da bei alleiniger SERCA-Veränderung auch die 90%-RT verkürzt gewesen wäre.

Wie oben beschrieben könnten für die beschleunigte Relaxation die verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden der Mutationszelllinien ursächlich sein. Deshalb wurde auch die Zeitkonstante  $\tau$  berechnet.  $\tau$  beschreibt die allgemeine Geschwindigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abgabe aus dem Zytosol, wobei ein größeres  $\tau$  für eine langsamere Geschwindigkeit steht. Die Werte von  $\tau$  der DSG2-KO-KM waren vermindert im Vergleich zur Kontrolllinie, was eine tatsächlich beschleunigte Relaxation aufzeigte. Die Werte von  $\tau$  der PKP2-KO-KM schwankten und ergaben keinen Unterschied zur Kontrolllinie. Dies könnte an den verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden der PKP2-KO-KM liegen, weil weniger Zeit für den Ausstrom von weniger  $\text{Ca}^{2+}$  benötigt wird. Es kann aber auch eine tatsächlich beschleunigte Ausstromgeschwindigkeit zu Beginn vorliegen, weil nur die 50%-RT vermindert war, was mit der 90%-RT einen Mittelwert für  $\tau$  ergibt.

Die TTP der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, also die  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromgeschwindigkeit aus dem SR ins Zytosol, war bei DSG2-KO-KM im Vergleich zur gesunden Kontrolle beschleunigt (Abbildung 35). Die TTP von PKP2-KO-KM unterschied sich nicht im Vergleich zu Kontroll-KM. Somit könnte die Interaktion von LTCC und RyR bei DSG2-KO-KM beschleunigt und verbessert sein. Andererseits könnte die LTCC-RyR-Interaktion von DSG2-KO-KM normal und die von PKP2-KO-KM verlangsamt sein, denn die  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude beider Mutationszelllinien war vermindert und hätte bei beiden Linien zu beschleunigten TTP durch weniger strömendes  $\text{Ca}^{2+}$  führen sollen.

Ca<sup>2+</sup>-RT und die APD sind bei KM direkt proportional zueinander und werden deshalb im Folgenden äquivalent betrachtet (Pioner et al. 2019).

Der Vergleich mit anderen Publikationen zeigt, dass im Gegensatz zu unserem Ergebnis bei PKP2-Mutationen meist die APD und die Ca<sup>2+</sup>-RT verlängert sind. Im PKP2-KO-Mausmodell von Cerrone et al. war die APD und tau der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, also die Dauer der Ca<sup>2+</sup>-Transienten und Relaxation, verlängert. Die Ca<sup>2+</sup>-TTP war verlängert, und kongruierend die LTCC-Stromdichte vermindert, was andererseits unsere TTP-Werte erklären könnte. Da das Ruhemembranpotential leicht depolarisiert war, vermuteten sie die Beteiligung weiterer Repolarisationsströme. Das könnte unsere teilweise widersprüchlichen Ergebnisse unter anderen Versuchsbedingungen erklären (Cerrone et al. 2017).

Kim et al. fanden nur bei rechtsventrikulären KM von PKP2-KO-Mäusen verlängerte Ca<sup>2+</sup>-Transienten und erhöhte Werte von tau. Die SERCA wurde in rechtsventrikulären KM vermindert exprimiert, während keine Unterschiede beim NCX auftraten. RyR-Rezeptoren zeigten eine erhöhte Aktivität Ca<sup>2+</sup> aus dem SR freizusetzen. Es lag aber keine Verkürzung der TTP vor (Kim et al. 2019). Ihre beobachtete Erhöhung der RyR-Aktivität widerspricht der nicht veränderten bzw. möglicherweise verlangsamten TTP unserer PKP2-KO-KM. Auch die Verminderung der SERCA-Expression widerspricht den beschleunigten RT unserer PKP2-KO-KM.

Bei der Untersuchung von Mäusen mit einer heterozygoten Deletion von PKP2 trat kein Unterschied der Ca<sup>2+</sup>-Transientendauer oder der TTP auf (Hammer et al. 2021).

In hiPS-KM mit patientenspezifischer PKP2-Mutation entstanden nur in erhöhten extrazellulären [Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> verlängerte RT (Kim et al. 2013).

El-Battrawy et al. untersuchten die elektrischen Dysfunktionen von hiPS-KM eines Patienten mit DSG2-Mutation. Die APD war nicht verändert, obwohl der NCX-Strom gegen Ende der Repolarisation vermindert war. Dies hatte eine APD-Verkürzung erwarten lassen und könnte die verkürzten Ca<sup>2+</sup>-Transienten unseres Versuchs erklären und würde ebenso für verminderte NCX-Ströme in unseren KM sprechen. Kongruent

wären auch die diastolisch erhöhten  $[Ca^{2+}]_i$  aufgrund geschwächter  $Ca^{2+}$ -Elimination. In der Publikation veränderte die DSG2-Mutation allerdings weitere an der APD beteiligte Kanäle. Unter anderem war die Stromstärke von Kalium- und  $Na^+$ -Kanälen vermindert, während der LTCC-Strom nicht verändert war (El-Battrawy et al. 2018).

Hawthorne et al. erzeugten ein ACM-Modell mit patientenspezifischer heterozygoter DSG2-Mutation in hiPS-KM. Die APD war verkürzt und im Gegensatz dazu die  $Ca^{2+}$ -Zerfallsrate verlangsamt. Bei Betrachtung der  $Ca^{2+}$ -Transienten fiel aber auf, dass die  $Ca^{2+}$ -Relaxation zu Beginn deutlich beschleunigt war und erst zum Ende hin verlangsamt. Wäre die differenzierte Auswertung erfolgt, kann von einer verkürzten 50%-RT ausgegangen werden. Außerdem war die TTP beschleunigt, was durch die erhöhte Expression von RyR begründet werden kann und auch eine Erklärung für unsere beobachtete beschleunigte TTP bei DSG2-KO-KM sein kann (Hawthorne et al. 2021). Es hat sich gezeigt, dass hohe intrazelluläre  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel die  $I_{Ks}$  (*delayed rectifier*-Kaliumkanäle) verstärken, die für die Repolarisation sorgen (Bartos et al. 2017). Dadurch kann die Verkürzung der APD in hiPS-KM mit DSG2-Mutation erklärt werden (Hawthorne et al. 2021). Dies ist kongruent mit unseren Ergebnissen der DSG-KO-KM, wobei auch bei PKP2-KO-KM die diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$  erhöht und folglich die RT verlängert waren. Somit sollten zukünftig weitere Untersuchungen an PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM zu  $I_{Ks}$ -Kaliumkanälen durchgeführt werden.

Im Mausmodell mit DSG2-Mutation war die APD nicht verändert, aber die TTP verlängert, was sie auf die reduzierte Aktivität von  $Na^+$ -Kanälen zurückführten (Rizzo et al. 2012).

Untersuchungen von Myokardbiopsien von ACM-Erkrankten, worunter PKP2- und DSG2-Mutationstragende waren, ergaben erhöhte Proteinmengen von Phospholamban (PLN) und phosphoryliertem PLN (Akdis et al. 2016). Da die Phosphorylierung von PLN zur Enthemmung der SERCA führt, könnten daraus die beschleunigten  $Ca^{2+}$ -RT entstehen. Dabei besteht die Vermutung eines Kompensationsmechanismus, der bei absolutem DSG2- oder PKP2-*Knockout* übersteigert sein könnte.

Zusammenfassend finden sich in der Literatur bei PKP2-Mutationen eher verlängerte RT, während bei DSG2-Mutationen verkürzte RT vorliegen. Insgesamt traten teilweise widersprüchliche Ergebnisse auf, was die Anfälligkeit dieser Parameter auf Störungen durch unterschiedliche Mutationen verdeutlicht. Auf die Klinik übertragen bestätigt dies die Anfälligkeit für Arrhythmien, da sowohl verkürzte als auch verlängerte APD arrhythmogen wirken (El-Battrawy et al. 2018).

Die verkürzte Dauer der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten führt zu einer verminderten Kontraktionskraft, weil diese von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge, die an Troponin bindet, und der Dauer der Troponin-Bindung abhängt (Eisner et al. 2017). Dies steht im Einklang mit der klinisch verschlechterten Pumpfunktion bei ACM.

Vor allem die Ergebnisse der Proteinexpression von Ionenkanälen differierten zwischen den Publikationen. Das kann auf verschiedene Ionenkanal-Veränderungen bei Erkrankten mit unterschiedlichen spezifischen Mutationen hinweisen, die sich unterschiedlich auf die APD auswirken (El-Battrawy et al. 2018). Dadurch treten einige Möglichkeiten auf, welche Kanäle bei unseren PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM verändert sein könnten und weiter untersucht werden sollten.

Ein Grund für die kurzen RT könnte fehlende Reifung sein. Die Hypothese wurde verworfen, da die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik, also TTP und RT, sich mit steigendem Reifegrad der hiPS-KM beschleunigt (Pioner et al. 2019).

Eine Limitation unserer und anderer Arbeiten war, dass wir nur  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten ohne EADs ausgewertet hatten, also die Transienten selbst. Außerdem mussten alle Transienten 0,5 Hz folgen, woraus eine niedrige n-Zahl entstand. Möglich ist, dass andere Forschungsgruppen alle Transienten ausgewertet hatten, womit EADs, die häufiger bei Mutationen auftraten, die Transienten verlängert hatten. Im folgenden Kapitel wird diskutiert, dass das Auftreten von EADs tatsächlich bei PKP2-KO-KM etwas häufiger vorkommt als bei DSG2-KO-KM.

Unsere Auswertung liefert den neuen Hinweis, dass die eigentlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten vor allem im Sinne der RT mit Mutationen kürzer sein könnten als die der gesunden KM und nur durch EADs verlängert werden könnten.

### 4.2.3 Vermehrte Arrhythmien bei PKP2-KO-KM und Verbesserung bei $\beta$ -adrenerger Stimulation

Signifikant mehr PKP2-KO-KM als gesunde Kontroll-KM zeigten Arrhythmien ohne  $\beta$ -adrenerge Stimulation (Abbildung 37). Mit zunehmender  $\beta$ -adrenerger Stimulation nahmen die Arrhythmien von PKP2-KO-KM ab. In der Erholungsphase nach der Iso-Gabe vermehrten sich die Arrhythmien von PKP2-KO-KM wieder.

In einem Mausmodell mit heterozygoter PKP2-Mutation war die Induzierbarkeit von Arrhythmien in elektrophysiologischen Untersuchungen erhöht im Vergleich zu gesunden Mäusen. Mit Isoproterenol traten weniger induzierbare Arrhythmien auf, was im Einklang mit unseren Ergebnissen steht. Die Autoren fanden bei PKP2-Mutations-KM erhöhte Proteinmengen des  $\beta$ 1-Adrenozeptors. Der Grund der unerwarteten Reaktion auf Iso könnte also nicht nur durch den  $\beta$ 1-Rezeptor selbst entstehen, sondern auch durch folgende Signalkaskaden. Zum Beispiel wurde eine Hyperphosphorylierung von RyR festgestellt (Hammer et al. 2021).

In einem weiteren PKP2-KO-Mausmodell traten Arrhythmien wie in unseren Ergebnissen als DADs und EADs der Kalziumtransienten auf. In der gesunden Kontrolle traten keine DADs und EADs auf, was dagegen bei unseren hiPS-KM zu beobachten war. Das Ausmaß der spontanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen war nach Meinung der Autoren ausreichend, um arrhythmische Ereignisse bis zu ventrikulären Arrhythmien auszulösen. Im EKG der PKP2-KO-Mäuse erhöhten sich die ventrikulären Arrhythmien bei Isoproterenol-Gabe, was in unserem Experiment zur gegensätzlichen Verminderung von Arrhythmien führte (Cerrone et al. 2017).

In Langendorff-Herzen eines anderen PKP2-KO-Mausmodell entstanden auch Isoproterenol-induzierte ventrikuläre Arrhythmien. Sie fanden allgemein häufigere spontane SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen. Bei PKP2-KO-KM war die Membranpermeabilität Connexin-43-abhängig erhöht. Dysregulierte Cx43-Hemikanäle ermöglichten den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und damit auch erhöhte diastolische  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , wie sie auch bei unseren PKP2KO-KM zu finden waren (Kim et al. 2019).

Zusammenfassend konnte die Verbesserung der Arrhythmien mit Iso in einem anderen Mausmodell bestätigt werden, während andere PKP2-KO-Mausmodelle dem widersprachen.

DSG2-KO-KM unseres Versuchs zeigten keinen Unterschied in der Häufigkeit von Arrhythmien im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Abbildung 37). Mit Iso nahmen die Arrhythmien von DSG2-KO-KM zu, wie bei der gesunden Kontrolle.

El-Battrawy et al. generierten hiPS eines ACM-Erkrankten mit DSG2-Mutation. Quantitativ mehr DSG2-Mutations-KM hatten EADs und DADs als gesunde Kontroll-KM unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation. Ereignisse ohne  $\beta$ -adrenerge Stimulation wurden nicht dargestellt. Ausgelöst werden könnte das durch die stärker verkürzte APD bei DSG2-Mutation, was arrhythmogen wirkt (El-Battrawy et al. 2018). Dies war kongruent mit den Ergebnissen dieser Arbeit, da auch Iso-induzierte Arrhythmien, DADs und EADs, bei verkürzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten beobachtet wurden. Andererseits verstärkten sich die Arrhythmien der gesunden Kontrolle gleichermaßen unter Iso. Dieser Unterschied könnte durch das Differenzierungsprotokoll begründet werden, denn El-Battrawy et al. nutzten hiPS-KM nach 35-50 Tagen Kultivierungszeit ohne spezielle Induktion der Zellreifung.

Schinner et al. hatten allgemein gezeigt, dass  $\beta$ -adrenerge Stimulation die Anzahl der DSG2-Interaktionen und die Bindungsstärke in HL-1-Zellen erhöht, im Sinne der positiven Adhäsiotropie. Die DSG2-Moleküle wurden zu den Zell-Zell-Bindungen rekrutiert, die vorher auf der Oberfläche verteilt waren (Schinner et al. 2017). Dies könnte die Erklärung für unsere beobachtete Verbesserung der Arrhythmien beim PKP2-KO-KM sein. Denn in unserem Labor wurde zuvor eine DSG2-Umverteilung weg von der Zell-Membran beim PKP2-KO-KM festgestellt. Wenn die  $\beta$ -adrenerge Stimulation die DSG2-Moleküle zurück zur Bindung bringt und die Arrhythmien verbessert, würde das die Hypothese aufstellen, dass die Grundlage der Arrhythmogenese in der DSG2-Umverteilung liegt. Weil die geschwächten Desmosomen bei DSG2-KO-KM nicht durch  $\beta$ -adrenerge Zelladhäsionsstärkung des DSG2 ausgeglichen werden konnten, könnte

deshalb bei DSG2-KO-KM keine Verbesserung der Arrhythmien unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation aufgetreten sein.

Bei KM dieser Arbeit lagen Störungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und beschleunigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kinetik vor, was allgemein bekannt zur Arrhythmogenese führen kann. Allerdings fielen diese Störungen bei DSG2-KO-KM und bei PKP2-KO-KM gleich aus und erklären nicht, warum die Arrhythmien unterschiedlich häufig auftraten. Dies stärkt die Hypothese, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -Veränderungen eine Grundlage für die Arrhythmogenese bei ACM darstellen können, aber nicht der einzige Grund sind. Die bei ACM gefundenen Veränderungen der Cx43-Aktivität und der  $\text{Na}^+$ -Kanalaktivität können dazu beitragen (Gerull and Brodehl 2021; Rizzo et al. 2012). In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, ob ein spezieller von der  $\beta$ -adrenergen Stimulation abhängender Unterschied des Cx43 zwischen DSG2-KO-KM und PKP2-KO-KM besteht.

In klinischen Studien wurden die Herzrhythmusstörungen von ACM-Erkrankten vor dem genetischen Hintergrund untersucht. ACM-Erkrankte mit PKP2-Mutationen hatten ein höheres Risiko für Arrhythmien als DSG2/DSP/DSC2-Mutationsträger. Ventrikuläre Arrhythmien und Tachykardien, Vorhofflimmern und -flattern und allgemein Arrhythmien traten bei PKP2-Mutation häufiger auf. Allerdings war eine Limitation der Studie, dass keine Daten zum körperlichen Training der 419 Erkrankten vorlagen (Christensen et al. 2021). Beim Vergleich mit unseren hiPS-KM ohne  $\beta$ -adrenerge Stimulation stimmen die Erkenntnisse überein, da Arrhythmien häufiger waren.

In einer weiteren Studienkohorte ergab der Vergleich von PKP2- und DSG2-Mutationsträgern keinen Unterschied bezüglich der Häufigkeit von ventrikulären Arrhythmien. Allerdings hatten ungefähr doppelt so viele Erkrankte mit *Nonsense*- bzw. *Frameshift*-Mutationen, die zu Kettenabbrüchen und verkürzten Proteinen führen, ventrikuläre Arrhythmien (Sen-Chowdhry et al. 2007). Folglich könnte neben dem betroffenen Gen die Art der Mutation eine Rolle spielen.

Bei einem Isoproterenol-Test traten bei ACM-Erkrankten vermehrt ventrikuläre Arrhythmien im Vergleich zu gesunden Personen auf, darunter ventrikuläre Extrasystolen und anhaltende bzw. nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardien. Der

Test galt bei Arrhythmien bis zu 10 Minuten nach Isoproterenol-Gabe als positiv. Es wurde nicht dargestellt, ob die Arrhythmien während oder nach Isoproterenol-Gabe auftraten. Zwischen den verschiedenen Mutationen wurde nicht unterschieden (Denis et al. 2014). Somit kann nicht bestätigt werden, ob bei PKP2-Mutationstragenden die Arrhythmien wie bei unseren PKP2-KO-KM nach der Belastung auftraten.

In einer Studie traten bei einer Person mit ACM und PKP2-Deletionsmutation ventrikuläre Extrasystolen erst nach dem Laufband-Belastungstest auf. Während des Trainings kamen keine arrhythmischen Ereignisse vor (Perrin et al. 2013). Auch bei ACM-Erkrankten im Deutschen Zentrum für Herzinsuffizienz wird beobachtet, dass Arrhythmien oft nach den Ergometrie-Untersuchungen vorkommen. Wenn sich diese PKP2-Mutations-spezifische Reaktion auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation bestätigt, könnte es als Ansatz für eine personalisierte Therapie dienen. Dafür sollten zukünftig Studien durchgeführt werden, die nach den Mutationen unterscheiden und die Arrhythmien von Erkrankten nach  $\beta$ -adrenerger Belastung in der Erholungsphase untersuchen.

Die Limitation der Methoden war, dass die Arrhythmien bei Betrachtung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten subjektiv eingeordnet wurden. Das erste Experiment der *Mattress*-Etablierung und das zweite TP-Experiment mit KM unterschiedlicher Differenzierungen lieferten ähnliche Ergebnisse. Denn der erste Versuch zeigte eine geringere Stimulierbarkeit der PKP2-KO-KM, die mit steigender extrazellulärer  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  besser stimulierbar und somit ebenso rhythmischer wurden.

#### 4.2.4 Unterschiede der Arten von Arrhythmien zwischen den Zelllinien

PKP2-KO-KM waren zu gleichen Anteilen rhythmisch, zeigten DADs oder zeigten EADs (Abbildung 38). Die Verteilung dieser Muster änderte sich durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation nicht.

Im PKP2-KO-Mausmodell von Cerrone et. al. wurden ebenso  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten mit EADs und DADs ohne  $\beta$ -adrenerge Stimulation beobachtet, die nicht quantifiziert wurden. Zugrunde lagen bei den PKP2-KO-KM erhöhte Amplituden und Frequenzen spontaner

Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungen aus dem SR, der sogenannten Ca<sup>2+</sup>-*Sparks*. Dies kann durch erhöhten SR-Ca<sup>2+</sup>-Gehalt entstehen, wie im PKP2-KO-Mausmodell (Cerrone et al. 2017) oder durch erhöhte diastolische [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Song et al. 2015). Die in unserem Experiment erhöhten diastolischen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> bei PKP2-KO-KM könnten somit ein Grund für die vermehrten DADs und EADs sein. Dem widerspricht, dass auch DSG2-KO-KM erhöhte diastolische [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> hatten, aber keine vermehrten Arrhythmien.

In einem anderen PKP2-KO-Mausmodell gab es auch prozentual mehr KM, die EADs und DADs durch häufigere Ca<sup>2+</sup>-*Sparks* zeigten, allerdings nur in rechtsventrikulären KM. Sie begründeten dies durch die beobachtete erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität von RyR durch Phosphorylierung und erhöhter SR- und diastolischer [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> der PKP2-KO-KM (Kim et al. 2019).

Bei der Erstellung eines Computermodells auf Grundlage der Daten verschiedener PKP2-KO-Modelle konnte die Entstehung der proarrhythmischen DADs berechnet werden. Als Auslöser wurde β-adrenerge Stimulation und Cx43-bedingter Ca<sup>2+</sup>-Einstrom gefunden. Durch erhöhte diastolische [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> steigerte sich die Ca<sup>2+</sup>-Affinität von RyR und vermehrte die spontanen Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungen. Durch Steigerung der NCX-Aktivität könnten die diastolischen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> gesenkt und die Anzahl der DADs reduziert werden (Lyon et al. 2021). Im Gegensatz dazu verursachte bei unseren PKP2-KO-KM β-adrenerge Stimulation keine DADs. Die Theorie der ursächlichen erhöhten diastolischen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und somit eventuelle Therapien über NCX-Kanäle könnte auf unser Modell übertragen werden.

DSG2-KO-KM hatten ohne Iso einen großen Anteil rhythmischer Zellen wie die Kontrolllinie und ansonsten gleichmäßig verteilt DADs, EADs und Pausen (Abbildung 38). Mit Iso nahm die Zahl der rhythmischen und allgemein die Anzahl kontrahierender Zellen ab. Genaue Prozentzahlen wurden aufgrund der niedrigen n-Zahlen nicht berechnet.

Das Phänomen der Pausen bei DSG2-KO-KM trat bei PKP2-KO-KM nicht auf. In anderen Publikationen wurden Pausen nicht ausgewertet. Es könnte ein Zusammenhang mit der

verlangsamten Reizweiterleitung bestehen, die oft beim PKP2-KO-KM beschrieben wird, aber durchaus auch beim DSG2-KO-KM vorkommen kann (Caspi et al. 2013).

In hiPS-KM mit DSG2-Mutation zeigten quantitativ mehr KM EAD- und DAD-ähnliche Ereignisse als gesunde Kontroll-KM unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation. Die Analyse unterschied nicht zwischen DADs und EADs, und die Daten ohne  $\beta$ -adrenerge Stimulation wurden nicht dargestellt (El-Battrawy et al. 2018). Die Ergebnisse widersprachen teilweise dieser Arbeit bei eingeschränkter Vergleichbarkeit.

Die absolute Anzahl der EADs und DADs, die in der obigen Publikation analysiert wurde, hat eine verminderte Aussagekraft. Denn unsere Einzel-Zell-Analyse mit vier repräsentativen PKP2-KO-KM ergab jeweils unterschiedliche Arrhythmie-Arten, entweder keine, nur DADs, nur EADs oder beides (Abbildung 39). Die Häufigkeit änderte sich mit der  $\beta$ -adrenergen Stimulation. Somit sind hohe Zahlen von DADs bzw. EADs in einer Stichprobe von KM möglicherweise auf einzelne sehr arrhythmische Zellen zurückzuführen. Um das auszumitteln, würde man eine sehr große Stichprobengröße benötigen, was allgemein die aussagekräftige Analyse von Arrhythmien erschwert.

Diese Erkenntnisse sind auf die Klinik übertragbar, da auch bei Erkrankten mit derselben Mutation der arrhythmische Phänotyp stark variieren kann. Ein Beispiel des Phänomens konnte bei einer Familie mit derselben DSG2-Mutation beobachtet werden, weil unterschiedliche klinische Symptome und EKG-Zeichen bei den Familienmitgliedern auftraten. Die Häufigkeit von ventrikulären Extrasystolen und Tachykardien und das Alter, in dem sie auftraten, differierte stark, während ein Patient keine Arrhythmien hatte (Gaido et al. 2017).

Schlussfolgernd könnten durch die erkannten Unterschiede zwischen den Mutationen personalisierte Therapien entwickelt werden. Deshalb sollte in zukünftigen Versuchen untersucht werden, welche Arrhythmie-Arten und Mechanismen bei Erkrankten mit speziellen Mutationen vorkommen und dann spezielle Antiarrhythmika genutzt oder entwickelt werden. Dieser Ansatz wird erschwert, weil bei Erkrankten bzw. KM mit derselben Mutation unterschiedliche Arrhythmien vorkamen, was eine patientenspezifische Therapie erfordern würde.

## 4.3 Wirkung des Tandem-Peptids auf die Kalziumhomöostase und Arrhythmien von PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM

In der Literatur gibt es Hinweise, dass das TP DSG-spezifisch extrazelluläre Bindungen stärken könnte (Schlipp et al. 2014). Da bei PKP2-KO-KM die DSG2-Proteine verstärkt im Zytoplasma verteilt sind, entstand die Hypothese, dass das TP DSG2 wieder in die Membran lokalisieren könnte. Eine andere Möglichkeit der Wirkung wäre, dass das TP die verbleibenden DSG2-Bindungen, die über PG binden, verstärken könnte.

Erwartet wurde deshalb, dass der zuvor analysierte Phänotyp von PKP2-KO-KM durch das TP therapiert wird. Dagegen sollte der DSG2-KO-Phänotyp durch das TP nicht beeinflusst werden, weil kein DSG2 zur TP-Bindung existiert.

### 4.3.1 Senkung der diastolischen Kalziumkonzentrationen durch das Tandem-Peptid bei den Mutationszelllinien

Das DSG-spezifische TP normalisierte die bei PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM erhöhten diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$  (Abbildung 29). Die Erwartung, dass das TP eine therapeutische Wirkung bei PKP2-KO-KM zeigen würde, deutete sich an (PKP2-KO vs. PKP2-KO + TP: nicht signifikant). Allerdings entsprach die beobachtete Wirkung auf die DSG2-KO-KM nicht den Erwartungen. Deshalb galt es die DSG-Spezifität des TPs und andere Gründe zu diskutieren.

Postuliert wurde die Wirkung des TPs und die DSG-Spezifität durch Schlipp et al. Sie zeigten mit Hilfe von HL-1 Maus-atrialen KM, dass das TP die Zelladhäsion bei mechanischer Scherbelastung stärkt, nachdem die Cadherin-Bindungen durch L-Tryp geschwächt wurden. In der Rasterkraftmikroskopie wirkte das TP nur auf DSG2 und nicht auf N-Cadherin-Bindungen. Auch das *Single*-Peptid, also die Hälfte des TP, störte nur die DSG2-Lokalisation und nicht die N-Cadherin-Lokalisation. Die Wirkung des TPs auf Desmocollin-2 (DSC2) wurde nicht analysiert (Schlipp et al. 2014).

Unser Versuch erhob die Hypothese der nicht DSG2-spezifischen Bindung des TP, da sich eine normalisierende Wirkung auf die DSG2-KO-KM ergab. Die Bindung des TP könnte beispielsweise an DSC2 stattfinden. Eingeschränkt wird diese Aussage, weil das TP auch die systolischen  $[Ca^{2+}]_i$  der DSG2-KO-KM absenkte. Die systolischen  $[Ca^{2+}]_i$  von DSG2-KO-KM waren allerdings im Gegensatz zur gesunden Zelllinie zuvor nicht verändert. Der Effekt des TP könnte also insgesamt die intrazellulären  $[Ca^{2+}]_i$  der DSG2-KO-KM immer vermindern und nicht auf das Niveau des gesunden Zustands verändern. Dies könnte ein Grund sein, weshalb die  $Ca^{2+}$ -Amplituden von DSG2-KO-KM keine Änderung durch das TP aufwiesen, während bei PKP2-KO-KM eine Tendenz zum gesunden Niveau vorlag.

Die diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$  waren auch bei der Behandlung der gesunden Kontrolllinie durch L-Tryp erhöht. L-Tryp sollte mit dem Bindungsmechanismus, dem sogenannten Tryptophan-Swap, interagieren, der bei Cadherinen vorliegt. So störte L-Tryp in HL-1-Zellen die Zelladhäsion bei mechanischer Scherbelastung, was durch das TP stabilisiert wurde (Schlipp et al. 2014). In unserem Versuch konnte dies nur anhand der diastolischen  $Ca^{2+}$ -Messungen reproduziert werden. Die gleichzeitige Behandlung von 400  $\mu$ M L-Tryp und dem TP ergab diastolische  $[Ca^{2+}]_i$  auf gesundem Level. Allerdings wurde das Ergebnis limitiert, weil die diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$  nur durch 800  $\mu$ M signifikant, durch 400  $\mu$ M L-Tryp aber nur angedeutet erhöht waren. Somit liegt ein schwacher Hinweis vor, dass die erhöhten diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$  von DSG2-KO-KM und PKP2-KO-KM wie erwartet durch eine gestörte Cadherin-Bindung verursacht werden könnten.

#### 4.3.2 Limitierte Wirkung des Tandem-Peptids auf die Kalziumhomöostase

Die Limitation des Versuchs der potentiellen Therapie mit Hilfe des TP bestand darin, dass es nur auf die diastolischen  $[Ca^{2+}]_i$  eine Wirkung zeigte. Die anderen Parameter der  $Ca^{2+}$ -Messungen, sowie die Analysen der Arrhythmien, ergaben keine TP-Wirkung (s. auch Anhang Abbildung A 6 und Abbildung A 7). Schinner et al. erforschten kürzlich die Effekte des TP auf ein ACM-Mausmodell anhand von ex vivo perfundierten Herzen mit Plakoglobin-KO. Das TP reduzierte die Arrhythmien in PG-KO-Mauserherzen. Allerdings

war kein eindeutiger Unterschied der Arrhythmie-Anzahl zwischen PG-KO und gesunder Kontrolle zuvor zu erkennen. Als Erklärung könnte die Lokalisation von DSG2 neben Cx43 in die Membran durch das TP dienen, was im PG-KO gestört war. Die Erregungsleitung in PG-KO-Zellschnitten war verzögert und wurde durch das TP wieder beschleunigt (Schinner et al. 2020).

Diese gemessenen elektromechanischen Aberrationen sind am ehesten mit den RT unseres Experiments vergleichbar. Dabei waren die Zeiten für die Relaxation der  $Ca^{2+}$ -Transienten durch die PKP2- und DSG2-Mutationen verkürzt. Sie konnten nicht durch das TP beeinflusst werden. Auch die deutliche Erhöhung der Arrhythmien in PKP2-KO-KM basal konnte durch das TP nicht gesenkt werden (s. Anhang Abbildung A 6). Da Schinner et al. das im Mausmodell erreichten (Schinner et al. 2020), könnte die Ursache dafür kürzlich gefundene DSG2-Antikörper bei ACM sein. Denn es wurden DSG2-Antikörper bei ACM-Erkrankten mit unterschiedlichen Mutationen, unter anderem mit DSG2- und PKP2-Mutationen, identifiziert (Chatterjee et al. 2018). Solche Autoantikörper können Mäuse durch ihr vorhandenes Immunsystem mit induzierten Gen-Mutationen ausbilden, während dies bei hiPS-KM nicht möglich ist.

Diese Hypothese wird eingeschränkt, da auch in HL-1-Zellen das TP auf reduzierte DSG2- und PG-Level durch siRNA wirkte. Das TP konnte die reduzierte Leitungsgeschwindigkeit nur bei reduziertem PG ausgleichen und verstärkte Arrhythmien bei DSG2- und PG-Reduktion ausgleichen. Bei HL-1-Zellen liegt auch kein Immunsystem vor. Deshalb werden weitere Untersuchungen an verschiedenen ACM-Modellen benötigt, um zu prüfen, ob die TP-Wirkweise mit den DSG2-Autoantikörpern interferiert. Ebenso wie das TP an DSG2 binden sollte, könnte es die Autoantikörper durch Bindung eliminieren.

Eine weitere mögliche Interpretation ist, dass das TP nicht bzw. nur eingeschränkt auf den Kalziumhaushalt wirkt. Auch die Kontrollbehandlung mit L-Tryp, das die Zellbindungen der gesunden Kontrollzellen schwächen sollte, hatte kaum Auswirkungen auf die  $Ca^{2+}$ -Parameter. Auch wenn die  $Ca^{2+}$ -Homöostase eine zentrale Rolle spielt, ist sie eventuell nicht der richtige Parameter, um die TP-Wirkung zu beweisen. Außerdem könnte sein, dass dafür viel größere Stichprobengrößen benötigt werden würden.

Grundlegend fehlt der Nachweis, ob das TP überhaupt an den Zell-Zell-Verbindungen ankommt. Auch ob es dort an DSG2 oder andere Moleküle bindet, ist unbekannt. Zukünftig könnten deshalb zum Beispiel Immunfluoreszenz-Färbungen und Rasterkraftmikroskopie durchgeführt werden, um das TP lokalisieren zu können.

Methodisch wurde die Konzentration des TPs aus der Literatur übernommen (Schlipp et al. 2014). Möglicherweise wird eine höhere oder niedrigere Konzentration für unsere Laborbedingungen und Zellen benötigt.

## 4.4 Allgemeine Limitationen der Methodik

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen wurden durch die Einheit limitiert, die aus dem Intensitätsverhältnis der Emissionswellenlängen von Indo bestand. Es konnten keine absoluten intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  verglichen werden, sondern nur die Abweichungen im Vergleich zur gesunden Kontrolllinie. Durch viele Untereinheiten des Aufbaus des IonOptix-Messsystems kam es durch erhöhte Fehleranfälligkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen zu verringerten n-Zahlen.

Die Wahl der extrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  sollte für folgende Experimente überdacht werden. Die 2 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  erwies sich in den Versuchen als geeignet, aber durch die Nähe zur physiologischen Tyrode-Lösung mit 1,8 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_e$ , könnte die physiologische Konzentration Vorteile bei der Vergleichbarkeit bringen.

Die Limitation der Analyse von Häufigkeiten und Arten der Arrhythmien war, dass sich diese Zielparameter erst durch Beobachtungen während der Messungen entwickelt haben. Zum Beispiel wurden die Kategorien der Arrhythmien ausgewählt, da nur diese beobachtet wurden, und anschließend wurde die subjektiv zeitlich überwiegende Kategorie ausgewählt. Bei der Quantifizierung bestand hauptsächlich das Problem niedriger n-Zahlen. Außerdem sollte jeweils die Anzahl arrhythmischer KM, aber auch die Anzahl der Arrhythmien pro KM, mit und ohne  $\beta$ -adrenerge Stimulation ausgewertet werden, was schwierig zu quantifizieren ist (s. 4.2.4).

Bei der statistischen Auswertung wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse *two-way ANOVA* angewandt. Die Varianzanalyse wird bei kleinen Stichprobengrößen empfindlicher gegenüber fehlender Normalverteilung und Unterschieden in den Varianzen der Gruppen. Das Problem könnte durch erweiterte Statistik, wie zum Beispiel logarithmische Transformationen oder Tests für nichtparametrische Daten, gelöst werden. Alternativ könnte die Stichprobengröße erhöht werden und ein balanciertes Design mit gleichen Gruppengrößen geschaffen werden (Weiß 2013; Segonds-Pichon 2019). Zusätzlich zu den berechneten p-Werten sollten die Unterschiede der Mittelwerte und die Fehlerbalken in den Diagrammen beachtet werden.

Gleiche Gruppengrößen waren aufgrund der Variabilität der hiPS-KM nicht zu realisieren. Zum Beispiel waren von DSG2-KO anteilig weniger KM verwendbar, weil KM eines biologischen Replikats während der Messungen teilweise nicht kontrahierten. HiPS-KM fielen allgemein durch ihre Empfindlichkeit gegenüber Umwelteinflüssen auf (s. 4.1.3). Deshalb sollten möglichst viele biologische Replikate generiert werden, um Unterschiede durch Differenzen zwischen den Replikaten zu minimieren. Eine allgemeine Limitation war die n-Zahl der Versuche, die bei speziellen Auswertungen niedrig war und in folgenden Experimenten erhöht werden sollte.

Die Analyse der Kontraktionsstärke durch Zellverkürzung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien (s. Anhang Abbildung A 5). Die Methode war limitiert in der Berechnung der Kontraktionslänge, weil die Kamera nicht stabil genug eine einzelne Zelle messen konnte. Nach Wechsel der Iso-Konzentrationen veränderte sich oft die Position der Zelle. Dies deutet zwar auf eine reife Reaktion auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation hin, ergab aber große Fehlerbalken bei der Kontraktionsauswertung.

## 4.5 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend konnte das Protokoll zur beschleunigten Zellreifung erfolgreich angewendet werden. Durch die Matrigel-*Mattress*-Kultivierung und Hormonbehandlung mit T3 und Dex konnten hiPS-KM mit reifen Eigenschaften generiert werden. Die behandelten KM waren häufiger elektrisch stimulierbar und kontrahierten mit Frequenzen nahe der Stimulationsfrequenz. In unserem Labor wurde auch die Morphologie, die adulten humanen KM ähnelte, bestätigt (Dissertation von Dr. Anna Janz, unveröffentlicht am 22.08.2022). Insgesamt wurden allerdings hauptsächlich  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen durchgeführt, die keine Unterschiede durch das Reifungsprotokoll ergaben. Weiterhin können nicht alle Unterschiede zu adulten KM durch Reifungsprotokolle ausgeglichen werden. Trotzdem eignen sich die generierten hiPS-KM gut für Experimente, bei denen Vergleiche zwischen verschiedenen Zelllinien der hiPS-KM erfolgen.

Bei den  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen zeigten sich erhöhte diastolische  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und erniedrigte  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden der PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM. Gleichzeitig war die Kalziumkinetik im Sinne der RT beschleunigt. Eine Hypothese wäre, dass SERCA und NCX normal funktionierten und die beschleunigten RT durch die erniedrigten  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplituden entstanden. Dann könnten die erhöhten diastolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch veränderte Aktivität von Kanälen, die das Ruhemembranpotential regeln, entstanden sein, wie z. B. T-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Da bei PKP2-KO-KM nur die 50%-RT, nicht aber die 90%-RT, verkürzt war, könnte andererseits auch die SERCA eine höhere Aktivität und der NCX eine geringere Aktivität aufweisen. Beim Vergleich mit der Literatur traten unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Kalziumhomöostase auf. In der Zukunft sollten die Ergebnisse um *Patch-Clamp*-Messungen ergänzt werden, um weitere Informationen über das AP und die Kanal-Aktivitäten von PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM aus hiPS zu erlangen.

Arrhythmien der PKP2-KO-KM waren im Grundzustand vermehrt, verbesserten sich bei  $\beta$ -adrenerger Stimulation und wurden in der Erholungsphase danach wieder häufiger. Bei ACM-Modellen der Literatur wurden oft allgemein vermehrte Arrhythmien beobachtet, die sich unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation verstärkten. Deshalb sollte in

weiteren Experimenten untersucht werden, ob die Verbesserung von Arrhythmien unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation ein PKP2-KO-spezifisches Phänomen ist. Ein Hinweis dafür entstand, weil die Art der Arrhythmien, also DADs, EADs und Pausen, sich zwischen den drei Zelllinien unterschied. Dann könnte der zugrundeliegende Mechanismus herausgestellt werden, um eine mutationsspezifische Therapiemöglichkeit zu etablieren. Weiterhin sollte analysiert werden, ob an ACM erkrankte Personen Herzrhythmusstörungen ebenso häufiger nach  $\beta$ -adrenerger Belastung verspüren als währenddessen.

Die therapeutische Wirkung des TPs konnte anhand der  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen und Arrhythmie-Analysen nur schwach dargestellt werden und lieferte Hinweise auf fehlende DSG2-Spezifität. Denn es wurden nur die diastolischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  der PKP2-KO-KM therapeutisch durch das TP beeinflusst, allerdings entgegen der Erwartungen auch bei DSG2-KO-KM. Insgesamt sollte überprüft werden, ob das TP überhaupt an den Zellverbindungen bindet und an welchen Proteinen. Da in der Literatur die TP-Wirkung bestätigt wurde (Schinner et al. 2020), gilt es die Hypothese des Wirkmechanismus über DSG2-spezifische Bindung zu überprüfen und Wechselwirkungen mit DSG2-Autoantikörpern zu untersuchen.

Ob für die beobachteten Unterschiede teilweise die sensiblen Reaktionen der hiPS-KM verantwortlich waren, würde mit einer höheren Anzahl biologischer Replikate und n-Zahlen bestätigt werden können. Methoden zur ausreichenden Reifung von hiPS-KM werden stetig in Publikationen diskutiert und revolutioniert, die zeitgemäß beurteilt und angewandt werden sollten.

Abschließend mangelt es in der Literatur an einer ausreichenden Menge von hiPS-KM-Modellen mit verschiedenen desmosomalen Mutationen, um allgemeine Schlussfolgerungen bezüglich der Kalziumhomöostase und Arrhythmien zu ziehen. In Zukunft sollten weitere Experimente mit hiPS-KM und hauptsächlich  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen durchgeführt werden, um die bereits beobachteten Erkenntnisse zu sichern.

## 5 Zusammenfassung

Die arrhythmogene Kardiomyopathie (ACM) ist eine Herzmuskelerkrankung, die durch den fett- und bindegewebigen Umbau von Herzmuskelgewebe charakterisiert ist. Klinisch treten häufig ventrikuläre Herzrhythmusstörungen auf, teilweise bis hin zum plötzlichen Herztod. ACM ist eine genetisch bedingte Erkrankung, die durch Mutationen in desmosomalen Proteinen, wie Plakophilin-2 (PKP2) und Desmoglein-2 (DSG2), entsteht. Die molekularen Mechanismen sind nur teilweise verstanden und aktuell gibt es keine spezifischen Therapiemöglichkeiten.

Ziel der Arbeit war es, die therapeutische Wirkung eines DSG2-spezifischen Tandem-Peptids (TP) durch desmosomale Stabilisierung an humanen Kardiomyozyten (KM) in einem ACM-Modell zu untersuchen. KM wurden aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS) einer PKP2-Knockout- (PKP2-KO), DSG2-Knockout- (DSG2-KO) und deren isogener Kontrollzelllinie differenziert. Zunächst wurden verschiedene Methoden der beschleunigten Zellreifung getestet. Dann wurden die PKP2- und DSG2-KO-KM anhand von intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Messungen und Arrhythmie-Analysen phänotypisch charakterisiert. Letztlich wurde die Wirkung des TPs, das an die DSG2 der geschwächten Zellbindungen von PKP2-KO-KM binden sollte, im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit der Matrigel-Mattress-Kultivierung und einer Hormonbehandlung elektrisch stimulierbare hiPS-KM mit reifen Eigenschaften hergestellt werden konnten. Der Phänotyp der mutationstragenden PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM zeichnete sich durch erhöhte diastolische  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen und erniedrigte  $Ca^{2+}$ -Amplituden sowie durch beschleunigte  $Ca^{2+}$ -Kinetik im Sinne der Relaxationszeiten aus. Weiterhin war bei den PKP2-KO-KM die Häufigkeit der Arrhythmien erhöht, die unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation nachließen. Insgesamt konnte keine eindeutige Wirkung des TPs im ACM-Modell gezeigt werden. Das TP hatte nur auf die diastolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen der PKP2-KO-KM einen therapeutischen Einfluss, allerdings auch auf DSG2-KO-KM, weshalb der Hinweis auf eine fehlende DSG2-Spezifität des TPs entstand.

Schlussfolgernd wurde bestätigt, dass sich reife hiPS-KM mit genetischen Veränderungen als Modell zur Untersuchung der Kalziumhomöostase und von Arrhythmien bei der ACM eignen. Sie können grundsätzlich zum Test von therapeutischen Anwendungen genutzt werden. Die Wirksamkeit und Spezifität des getesteten TPs sollte zukünftig weiter überprüft werden.

## 6 Literaturverzeichnis

Akdis, D., A. Medeiros-Domingo, A. Gaertner-Rommel, J. I. Kast, F. Enseleit, P. Bode, K. Klingel, R. Kandolf, F. Renois, L. Andreoletti, C. A. Akdis, H. Milting, T. F. Luscher, C. Brunckhorst, A. M. Saguner, and F. Duru. 2016. 'Myocardial expression profiles of candidate molecules in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia compared to those with dilated cardiomyopathy and healthy controls', *Heart Rhythm*, 13: 731-41.

Austin, K. M., M. A. Trembley, S. F. Chandler, S. P. Sanders, J. E. Saffitz, D. J. Abrams, and W. T. Pu. 2019. 'Molecular mechanisms of arrhythmogenic cardiomyopathy', *Nat Rev Cardiol*, 16: 519-37.

Backhaus, K., B. Erichson, W. Plinke und R. Weiber. 2018. ‚Multivariate Analysemethoden‘, 15. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56655-8>

Bandleon, S., P. P. Strunz, S. Pickel, O. Tiapko, A. Cellini, E. Miranda-Laferte, and P. Eder-Negrin. 2019. 'FKBP52 regulates TRPC3-dependent Ca(2+) signals and the hypertrophic growth of cardiomyocyte cultures', *J Cell Sci*, 132.

Bartos, D. C., S. Morotti, K. S. Ginsburg, E. Grandi, and D. M. Bers. 2017. 'Quantitative analysis of the Ca(2+) -dependent regulation of delayed rectifier K(+) current I(Ks) in rabbit ventricular myocytes', *J Physiol*, 595: 2253-68.

Basso, C., D. Corrado, F. I. Marcus, A. Nava, and G. Thiene. 2009. 'Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy', *Lancet*, 373: 1289-300.

Basso, C., G. Thiene, D. Corrado, A. Angelini, A. Nava, and M. Valente. 1996. 'Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Dysplasia, dystrophy, or myocarditis?', *Circulation*, 94: 983-91.

Behrends, J., J. Bischofberger, R. Deutzmann, H. Ehmke, S. Frings, S. Grissmer, M. Hoth, A. Kurtz, J. Leipziger, F. Müller, C. Pedain, J. Rettig, C. Wagner und E. Wischmeyer. 2012. ‚Duale Reihe Physiologie‘, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart.

- Bers, D. M. 2002. 'Cardiac excitation-contraction coupling', *Nature*, 415: 198-205.
- Bers, D. M. 2006. 'Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure', *Physiology (Bethesda)*, 21: 380-7.
- Bers, D. M. 2008. 'Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes', *Annu Rev Physiol*, 70: 23-49.
- Bers, D. M., S. Despa, and J. Bossuyt. 2006. 'Regulation of Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> in normal and failing cardiac myocytes', *Ann N Y Acad Sci*, 1080: 165-77.
- Bers, D. M., and C. R. Weber. 2002. 'Na/Ca exchange function in intact ventricular myocytes', *Ann N Y Acad Sci*, 976: 500-12.
- Blazeski, A., J. Lowenthal, Y. Wang, R. Teuben, R. Zhu, S. Gerecht, G. Tomaselli, and L. Tung. 2019. 'Engineered Heart Slice Model of Arrhythmogenic Cardiomyopathy Using Plakophilin-2 Mutant Myocytes', *Tissue Eng Part A*, 25: 725-35.
- Brunello, E., M. Caremani, L. Melli, M. Linari, M. Fernandez-Martinez, T. Narayanan, M. Irving, G. Piazzesi, V. Lombardi, and M. Reconditi. 2014. 'The contributions of filaments and cross-bridges to sarcomere compliance in skeletal muscle', *J Physiol*, 592: 3881-99.
- Cadar, A. G., T. K. Feaster, M. D. Durbin, and C. C. Hong. 2017. 'Production of Single Contracting Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: Matrigel Mattress Technique', *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 42: 4a.14.1-4a.14.7.
- Caspi, O., I. Huber, A. Gepstein, G. Arbel, L. Maizels, M. Boulos, and L. Gepstein. 2013. 'Modeling of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with human induced pluripotent stem cells', *Circ Cardiovasc Genet*, 6: 557-68.
- Cerrone, M., G. M. Marrón-Liñares, C. J. M. van Opbergen, S. Costa, M. Bourfiss, M. Pérez-Hernández, F. Schlamp, F. Sanchis-Gomar, K. Malkani, K. Drenkova, M. Zhang, X. Lin, A. Heguy, B. K. Velthuis, N. H. J. Prakken, A. LaGerche, H. Calkins, C. A. James, Asjm Te Riele, and M. Delmar. 2021. 'Role of plakophilin-2 expression on exercise-related progression of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a translational study', *Eur Heart J*.

Cerrone, M., J. Montnach, X. Lin, Y. T. Zhao, M. Zhang, E. Agullo-Pascual, A. Leo-Macias, F. J. Alvarado, I. Dolgalev, T. V. Karathanos, K. Malkani, C. J. M. Van Opbergen, J. J. A. van Bavel, H. Q. Yang, C. Vasquez, D. Tester, S. Fowler, F. Liang, E. Rothenberg, A. Heguy, G. E. Morley, W. A. Coetzee, N. A. Trayanova, M. J. Ackerman, T. A. B. van Veen, H. H. Valdivia, and M. Delmar. 2017. 'Plakophilin-2 is required for transcription of genes that control calcium cycling and cardiac rhythm', *Nat Commun*, 8: 106.

Chatterjee, D., M. Fatah, D. Akdis, D. A. Spears, T. T. Koopmann, K. Mittal, M. A. Rafiq, B. M. Cattanaach, Q. Zhao, J. S. Healey, M. J. Ackerman, J. M. Bos, Y. Sun, J. T. Maynes, C. Brunckhorst, A. Medeiros-Domingo, F. Duru, A. M. Saguner, and R. M. Hamilton. 2018. 'An autoantibody identifies arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and participates in its pathogenesis', *Eur Heart J*, 39: 3932-44.

Christensen, A. H., P. G. Platonov, H. K. Jensen, M. Chivulescu, A. Svensson, P. Dahlberg, T. Madsen, T. C. Frederiksen, T. Heliö, H. Lie Ø, K. H. Haugaa, J. Hastrup Svendsen, and H. Bundgaard. 2021. 'Genotype-phenotype correlation in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-risk of arrhythmias and heart failure', *J Med Genet*.

Corrado, D., C. Basso, and D. P. Judge. 2017. 'Arrhythmogenic Cardiomyopathy', *Circ Res*, 121: 784-802.

Debus, J. D., H. Milting, A. Brodehl, A. Kassner, D. Anselmetti, J. Gummert, and A. Gaertner-Rommel. 2019. 'In vitro analysis of arrhythmogenic cardiomyopathy associated desmoglein-2 (DSG2) mutations reveals diverse glycosylation patterns', *J Mol Cell Cardiol*, 129: 303-13.

Delva, E., D. K. Tucker, and A. P. Kowalczyk. 2009. 'The desmosome', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1: a002543.

Denis, A., F. Sacher, N. Derval, H. S. Lim, H. Cochet, A. J. Shah, M. Daly, X. Pillois, K. Ramoul, Y. Komatsu, A. Zemmoura, S. Amraoui, P. Ritter, S. Ploux, P. Bordachar, M. Hocini, P. Jaïs, and M. Haïssaguerre. 2014. 'Diagnostic value of isoproterenol testing in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy', *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 7: 590-7.

Eisner, D. A., J. L. Caldwell, K. Kistamas, and A. W. Trafford. 2017. 'Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart', *Circ Res*, 121: 181-95.

El-Battrawy, I., Z. Zhao, H. Lan, L. Cyganek, C. Tombers, X. Li, F. Buljubasic, S. Lang, M. Tiburcy, W. H. Zimmermann, J. Utikal, T. Wieland, M. Borggrefe, X. B. Zhou, and I. Akin. 2018. 'Electrical dysfunctions in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with an arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy', *Europace*, 20: f46-f56.

Feaster, T. K., A. G. Cadar, L. Wang, C. H. Williams, Y. W. Chun, J. E. Hempel, N. Bloodworth, W. D. Merryman, C. C. Lim, J. C. Wu, B. C. Knollmann, and C. C. Hong. 2015. 'Matrigel Mattress: A Method for the Generation of Single Contracting Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes', *Circ Res*, 117: 995-1000.

Fusaki, N., H. Ban, A. Nishiyama, K. Saeki, and M. Hasegawa. 2009. 'Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome', *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 85: 348-62.

Gaido, L., A. Battaglia, M. Matta, C. Giustetto, S. Frea, M. Imazio, E. Richiardi, L. Garberoglio, and F. Gaita. 2017. 'Phenotypic expression of ARVC: How 12 lead ECG can predict left or right ventricle involvement. A familiar case series and a review of literature', *Int J Cardiol*, 236: 328-34.

Gambardella, J., B. Trimarco, G. Iaccarino, and G. Santulli. 2018. 'New Insights in Cardiac Calcium Handling and Excitation-Contraction Coupling', *Adv Exp Med Biol*, 1067: 373-85.

Garrod, D., and M. Chidgey. 2008. 'Desmosome structure, composition and function', *Biochim Biophys Acta*, 1778: 572-87.

Gerull, B., and A. Brodehl. 2021. 'Insights Into Genetics and Pathophysiology of Arrhythmogenic Cardiomyopathy', *Curr Heart Fail Rep*, 18: 378-90.

Gerull, B., A. Heuser, T. Wichter, M. Paul, C. T. Basson, D. A. McDermott, B. B. Lerman, S. M. Markowitz, P. T. Ellinor, C. A. MacRae, S. Peters, K. S. Grossmann, J. Drenckhahn,

B. Michely, S. Sasse-Klaassen, W. Birchmeier, R. Dietz, G. Breithardt, E. Schulze-Bahr, and L. Thierfelder. 2004. 'Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy', *Nat Genet*, 36: 1162-4.

Gerull, B., F. Kirchner, J. X. Chong, J. Tagoe, K. Chandrasekharan, O. Strohm, D. Waggoner, C. Ober, and H. J. Duff. 2013. 'Homozygous founder mutation in desmocollin-2 (DSC2) causes arrhythmogenic cardiomyopathy in the Hutterite population', *Circ Cardiovasc Genet*, 6: 327-36.

Green, K. J., A. Jaiganesh, and J. A. Broussard. 2019. 'Desmosomes: Essential contributors to an integrated intercellular junction network', *F1000Res*, 8.

Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R. Y. Tsien. 1985. 'A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties', *J Biol Chem*, 260: 3440-50.

Hammer, K. P., J. Mustroph, T. Stauber, W. Birchmeier, S. Wagner, and L. S. Maier. 2021. 'Beneficial effect of voluntary physical exercise in Plakophilin2 transgenic mice', *PLoS One*, 16: e0252649.

Hawthorne, R. N., A. Blazeski, J. Lowenthal, S. Kannan, R. Teuben, D. DiSilvestre, J. Morrisette-McAlmon, J. E. Saffitz, K. R. Boheler, C. A. James, S. P. Chelko, G. Tomaselli, and L. Tung. 2021. 'Altered Electrical, Biomolecular, and Immunologic Phenotypes in a Novel Patient-Derived Stem Cell Model of Desmoglein-2 Mutant ARVC', *J Clin Med*, 10.

Heupel, W. M., T. Muller, A. Efthymiadis, E. Schmidt, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2009. 'Peptides Targeting the Desmoglein 3 Adhesive Interface Prevent Autoantibody-induced Acantholysis in Pemphigus', *J Biol Chem*, 284: 8589-95.

Hoorntje, E. T., W. P. Te Rijdt, C. A. James, K. Pilichou, C. Basso, D. P. Judge, C. R. Bezzina, and J. P. van Tintelen. 2017. 'Arrhythmogenic cardiomyopathy: pathology, genetics, and concepts in pathogenesis', *Cardiovasc Res*, 113: 1521-31.

IonOptix, 2014. 'Myocyte Calcium & Contractility Recording System ( $\mu$ Step Configuration)'. Online verfügbar unter <http://www.ionoptix.com/wp->

content/uploads/2014/07/Ca-and-Cont\_MUS\_digital.pdf , zuletzt geprüft am 22.08.2022.

James, C. A., P. Syrris, J. P. van Tintelen, and H. Calkins. 2020. 'The role of genetics in cardiovascular disease: arrhythmogenic cardiomyopathy', *Eur Heart J*.

Janz, A., M. Zink, A. Cirnu, A. Hartleb, C. Albrecht, S. Rost, E. Klopocki, K. Günther, F. Edenhofer, S. Ergün, and B. Gerull. 2021. 'CRISPR/Cas9-edited PKP2 knock-out (JMU001-A-2) and DSG2 knock-out (JMU001-A-3) iPSC lines as an isogenic human model system for arrhythmogenic cardiomyopathy (ACM)', *Stem Cell Res*, 53: 102256.

Janz, A. 2021. 'Human induced pluripotent stem cells (iPSCs) in inherited cardiomyopathies: Generation and characterization of an iPSC-derived cardiomyocyte model system of dilated cardiomyopathy with ataxia (DCMA)', unveröffentlicht am 22.08.2022.

Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier. 2012. 'A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity', *Science*, 337: 816-21.

Kadari, A., S. Mekala, N. Wagner, D. Malan, J. Koth, K. Doll, L. Stappert, D. Eckert, M. Peitz, J. Matthes, P. Sasse, S. Herzig, O. Brustle, S. Ergun, and F. Edenhofer. 2015. 'Robust Generation of Cardiomyocytes from Human iPS Cells Requires Precise Modulation of BMP and WNT Signaling', *Stem Cell Rev Rep*, 11: 560-9.

Kim, C., J. Wong, J. Wen, S. Wang, C. Wang, S. Spiering, N. G. Kan, S. Forcales, P. L. Puri, T. C. Leone, J. E. Marine, H. Calkins, D. P. Kelly, D. P. Judge, and H. S. Chen. 2013. 'Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs', *Nature*, 494: 105-10.

Kim, J. C., M. Perez-Hernandez, F. J. Alvarado, S. R. Maurya, J. Montnach, Y. Yin, M. Zhang, X. Lin, C. Vasquez, A. Heguy, F. X. Liang, S. H. Woo, G. E. Morley, E. Rothenberg, A. Lundby, H. H. Valdivia, M. Cerrone, and M. Delmar. 2019. 'Disruption of Ca(2+) Homeostasis and Connexin 43 Hemichannel Function in the Right Ventricle Precedes

Overt Arrhythmogenic Cardiomyopathy in Plakophilin-2-Deficient Mice', *Circulation*, 140: 1015-30.

Knollmann, B. C. 2013. 'Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: boutique science or valuable arrhythmia model?', *Circ Res*, 112: 969-76; discussion 76.

Kolanowski, T. J., C. L. Antos, and K. Guan. 2017. 'Making human cardiomyocytes up to date: Derivation, maturation state and perspectives', *Int J Cardiol*, 241: 379-86.

Lyon, A., C. J. M. van Opbergen, M. Delmar, J. Heijman, and T. A. B. van Veen. 2021. 'In silico Identification of Disrupted Myocardial Calcium Homeostasis as Proarrhythmic Trigger in Arrhythmogenic Cardiomyopathy', *Front Physiol*, 12: 732573.

Mertens, C., C. Kuhn, and W. W. Franke. 1996. 'Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque', *J Cell Biol*, 135: 1009-25.

Moccia, F., F. Lodola, I. Stadiotti, C. A. Pilato, M. Bellin, S. Carugo, G. Pompilio, E. Sommariva, and A. S. Maione. 2019. 'Calcium as a Key Player in Arrhythmogenic Cardiomyopathy: Adhesion Disorder or Intracellular Alteration?', *Int J Mol Sci*, 20.

Molecular Probes<sup>®</sup>, 2011. 'Fura and Indo Ratiometric Calcium Indicators'. Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fmp01200.pdf>, zuletzt geprüft am 22.08.2022.

Nava, A., B. Bauce, C. Basso, M. Muriago, A. Rampazzo, C. Villanova, L. Daliento, G. Buja, D. Corrado, G. A. Danieli, and G. Thiene. 2000. 'Clinical profile and long-term follow-up of 37 families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy', *J Am Coll Cardiol*, 36: 2226-33.

Parikh, S. S., D. J. Blackwell, N. Gomez-Hurtado, M. Frisk, L. Wang, K. Kim, C. P. Dahl, A. Fiane, T. Tonnessen, D. O. Kryshtal, W. E. Louch, and B. C. Knollmann. 2017. 'Thyroid and Glucocorticoid Hormones Promote Functional T-Tubule Development in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes', *Circ Res*, 121: 1323-30.

Perrin, M. J., P. Angaran, Z. Laksman, H. Zhang, L. F. Porepa, J. Rutberg, C. James, A. D. Krahn, D. P. Judge, H. Calkins, and M. H. Gollob. 2013. 'Exercise testing in asymptomatic gene carriers exposes a latent electrical substrate of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy', *J Am Coll Cardiol*, 62: 1772-9.

Pilichou, K., G. Thiene, B. Bauce, I. Rigato, E. Lazzarini, F. Migliore, M. Perazzolo Marra, S. Rizzo, A. Zorzi, L. Daliento, D. Corrado, and C. Basso. 2016. 'Arrhythmogenic cardiomyopathy', *Orphanet J Rare Dis*, 11: 33.

Pioner, J. M., L. Santini, C. Palandri, D. Martella, F. Lupi, M. Langione, S. Querceto, B. Grandinetti, V. Balducci, P. Benzoni, S. Landi, A. Barbuti, F. Ferrarese Lupi, L. Boarino, L. Sartiani, C. Tesi, D. L. Mack, M. Regnier, E. Cerbai, C. Parmeggiani, C. Poggesi, C. Ferrantini, and R. Coppini. 2019. 'Optical Investigation of Action Potential and Calcium Handling Maturation of hiPSC-Cardiomyocytes on Biomimetic Substrates', *Int J Mol Sci*, 20.

Ran, F. A., P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott, and F. Zhang. 2013. 'Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system', *Nat Protoc*, 8: 2281-308.

Rizzo, S., E. M. Lodder, A. O. Verkerk, R. Wolswinkel, L. Beekman, K. Pilichou, C. Basso, C. A. Remme, G. Thiene, and C. R. Bezzina. 2012. 'Intercalated disc abnormalities, reduced Na(+) current density, and conduction slowing in desmoglein-2 mutant mice prior to cardiomyopathic changes', *Cardiovasc Res*, 95: 409-18.

Schinner, C., B. M. Erber, S. Yeruva, A. Schlipp, V. Rötzer, E. Kempf, S. Kant, R. E. Leube, T. D. Mueller, and J. Waschke. 2020. 'Stabilization of desmoglein-2 binding rescues arrhythmia in arrhythmogenic cardiomyopathy', *JCI Insight*, 5.

Schinner, C., F. Vielmuth, V. Rötzer, M. Hiermaier, M. Y. Radeva, T. K. Co, E. Hartlieb, A. Schmidt, A. Imhof, A. Messoudi, A. Horn, A. Schlipp, V. Spindler, and J. Waschke. 2017. 'Adrenergic Signaling Strengthens Cardiac Myocyte Cohesion', *Circ Res*, 120: 1305-17.

Schlipp, A., C. Schinner, V. Spindler, F. Vielmuth, K. Gehmlich, P. Syrris, W. J. McKenna, A. Dendorfer, E. Hartlieb, and J. Waschke. 2014. 'Desmoglein-2 interaction is crucial for cardiomyocyte cohesion and function', *Cardiovasc Res*, 104: 245-57.

Segonds-Pichon, A. 2019. 'Babraham Bioinformatics: Introduction to Statistics with GraphPad Prism' Version 2019-03. Online verfügbar unter <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/training/GraphPadPrism/Introduction%20to%20Statistics%20with%20GraphPad%20Prism%20manual.docx> , zuletzt geprüft am 22.08.2022.

Sen-Chowdhry, S., P. Syrris, D. Ward, A. Asimaki, E. Sevdalis, and W. J. McKenna. 2007. 'Clinical and genetic characterization of families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy provides novel insights into patterns of disease expression', *Circulation*, 115: 1710-20.

Song, Z., C. Y. Ko, M. Nivala, J. N. Weiss, and Z. Qu. 2015. 'Calcium-voltage coupling in the genesis of early and delayed afterdepolarizations in cardiac myocytes', *Biophys J*, 108: 1908-21.

Spindler, V., M. Meir, B. Vigh, S. Flemming, K. Hutz, C. T. Germer, J. Waschke, and N. Schlegel. 2015. 'Loss of Desmoglein 2 Contributes to the Pathogenesis of Crohn's Disease', *Inflamm Bowel Dis*, 21: 2349-59.

Spindler, V., V. Rotzer, C. Dehner, B. Kempf, M. Gliem, M. Radeva, E. Hartlieb, G. S. Harms, E. Schmidt, and J. Waschke. 2013. 'Peptide-mediated desmoglein 3 crosslinking prevents pemphigus vulgaris autoantibody-induced skin blistering', *J Clin Invest*, 123: 800-11.

Stenson, P. D., M. Mort, E. V. Ball, K. Evans, M. Hayden, S. Heywood, M. Hussain, A. D. Phillips, and D. N. Cooper. 2017. 'The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies', *Hum Genet*, 136: 665-77.

Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka. 2007. 'Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors', *Cell*, 131: 861-72.

Takahashi, K., and S. Yamanaka. 2006. 'Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors', *Cell*, 126: 663-76.

Ter Keurs, H. E., and P. A. Boyden. 2007. 'Calcium and arrhythmogenesis', *Physiol Rev*, 87: 457-506.

van der Zwaag, P. A., I. A. van Rijsingen, A. Asimaki, J. D. Jongbloed, D. J. van Veldhuisen, A. C. Wiesfeld, M. G. Cox, L. T. van Lochem, R. A. de Boer, R. M. Hofstra, I. Christiaans, K. Y. van Spaendonck-Zwarts, R. H. Lekanne dit Deprez, D. P. Judge, H. Calkins, A. J. Suurmeijer, R. N. Hauer, J. E. Saffitz, A. A. Wilde, M. P. van den Berg, and J. P. van Tintelen. 2012. 'Phospholamban R14del mutation in patients diagnosed with dilated cardiomyopathy or arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: evidence supporting the concept of arrhythmogenic cardiomyopathy', *Eur J Heart Fail*, 14: 1199-207.

van Opbergen, C. J. M., M. Noorman, A. Pfenniger, J. S. Copier, S. H. Vermij, Z. Li, R. van der Nagel, M. Zhang, J. M. T. de Bakker, A. M. Glass, P. J. Mohler, S. M. Taffet, M. A. Vos, H. V. M. van Rijen, M. Delmar, and T. A. B. van Veen. 2019. 'Plakophilin-2 Haploinsufficiency Causes Calcium Handling Deficits and Modulates the Cardiac Response Towards Stress', *Int J Mol Sci*, 20.

Vermij, S. H., H. Abriel, and T. A. van Veen. 2017. 'Refining the molecular organization of the cardiac intercalated disc', *Cardiovasc Res*, 113: 259-75.

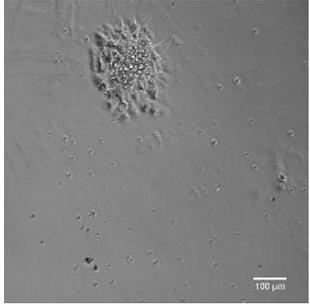
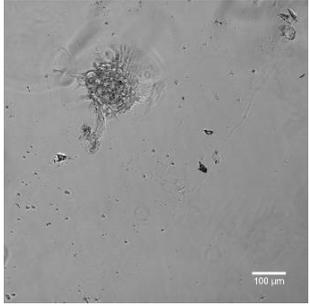
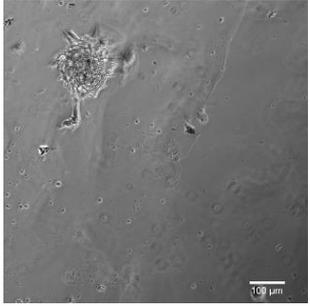
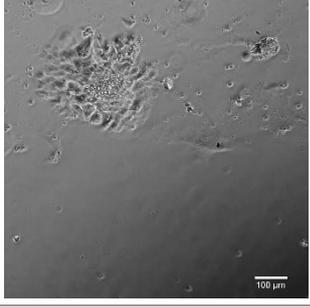
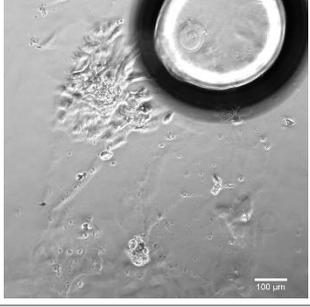
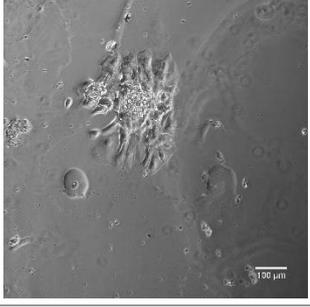
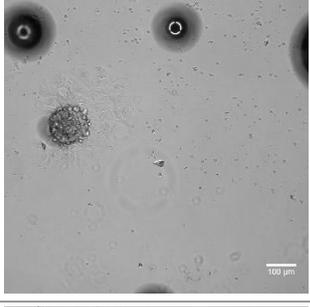
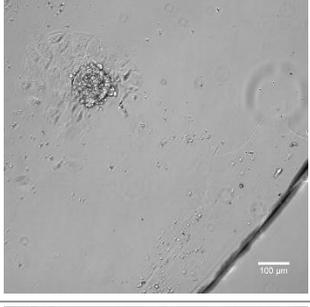
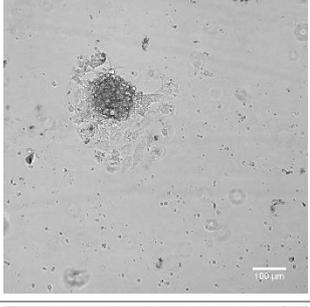
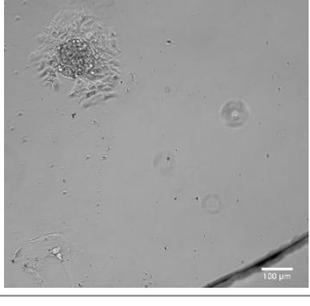
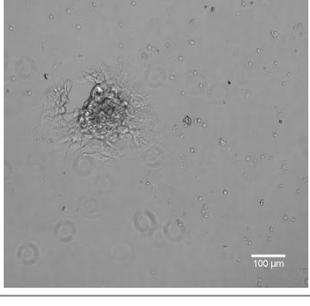
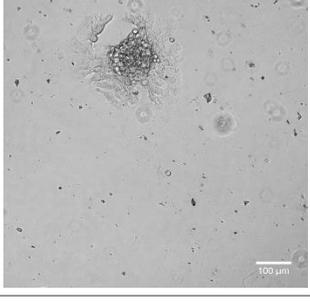
Weiß, C. 2013. ‚Basiswissen Medizinische Statistik‘, 6. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-34261-5>

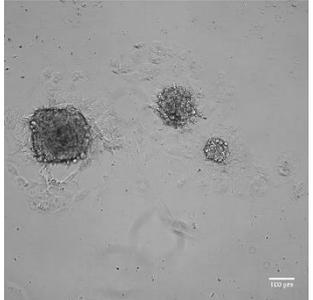
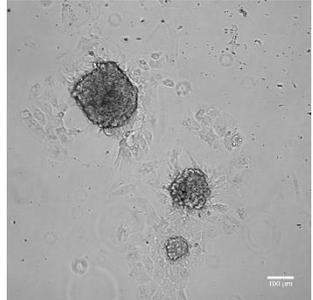
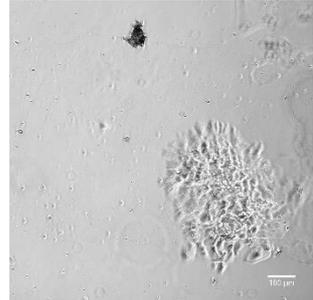
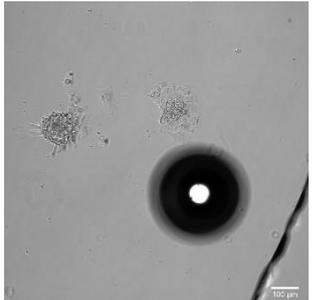
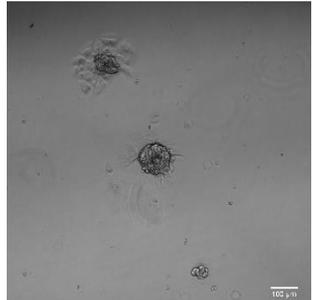
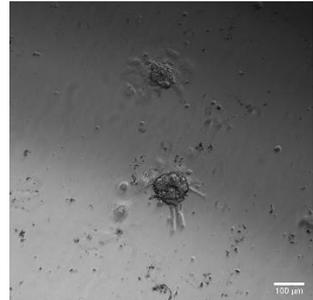
# Anhang

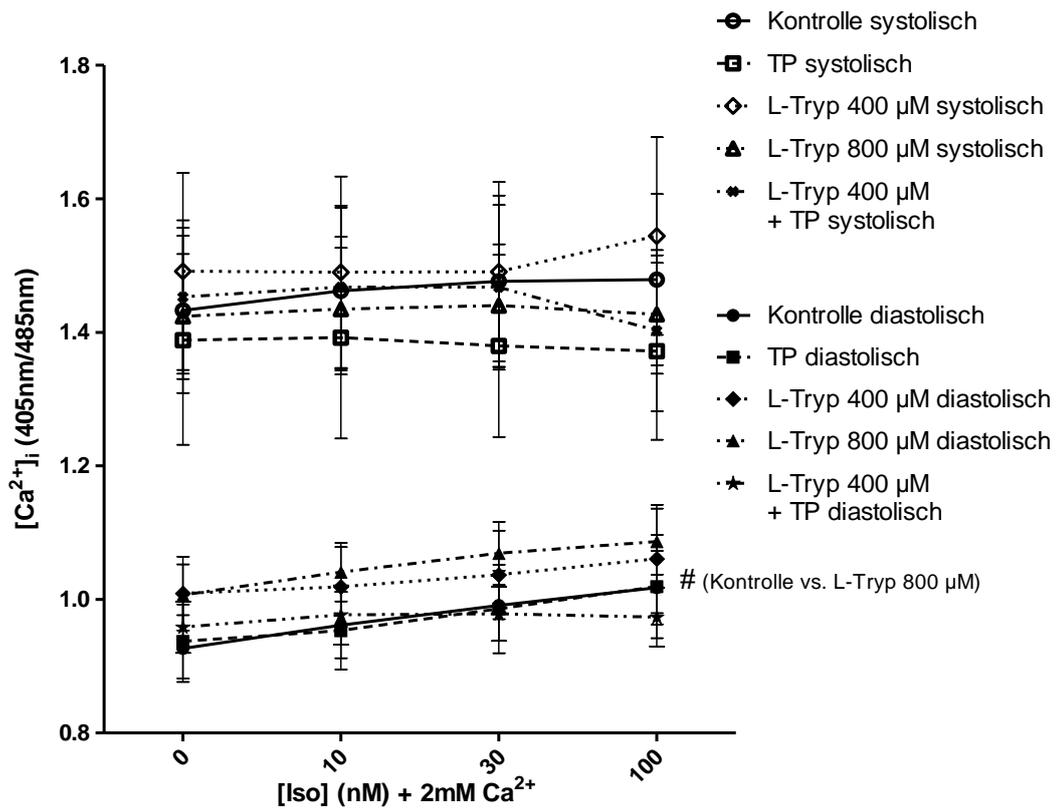
## I Zusätzliche Tabellen und Abbildungen

*Tabelle A 1: Alle Substanzen des Versuchs hinterließen vitale KM.*

*Die Substanzen der Experimente mit TP und L-Tryp wurden getestet. Pro Behandlung wurden drei Zellverbände der Kontrollzelllinie fotografiert. Dieselben wurden nach 24h Behandlung (links in der Tabelle dargestellt) und nach Schütteln der Platten erneut fotografiert. Dargestellt ist jeweils ein beispielhaftes Foto. Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .*

| Behandlung                                     | Vorher  | Nach 24 h Behandlung   | Nach Schütteln  |
|--|---|--|---|
| 1:25 PBS                                       |   |   |   |
| 400 $\mu\text{M}$ L-Tryp                       |  |  |  |
| 20 $\mu\text{M}$ TP                            |  |  |  |
| 20 $\mu\text{M}$ TP + 400 $\mu\text{M}$ L-Tryp |  |  |  |

| Behandlung                            | Vorher  | Nach 24 h Behandlung   | Nach Schütteln  |
|---------------------------------------|---|--|---|
| 40 $\mu$ M TP                         |  |  |  |
| 40 $\mu$ M TP<br>+ 400 $\mu$ M L-Tryp |  |  |  |



|                     |    |    |    |    |
|---------------------|----|----|----|----|
| n (Kontr.)          | 15 | 15 | 15 | 15 |
| n (TP)              | 13 | 13 | 13 | 13 |
| n (L-Tryp 400)      | 15 | 15 | 15 | 14 |
| n (L-Tryp 400 + TP) | 15 | 14 | 12 | 13 |
| n (L-Tryp 800)      | 10 | 10 | 10 | 10 |

Abbildung A 1: Systolische und diastolische  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen der Kontrollzelllinie mit Behandlung durch das TP und L-Tryp. Systolisch entstand kein Unterschied durch die Behandlungen.

Die systolischen Graphen bilden sich oben im Diagramm und die diastolischen unten ab. Die KM wurden jeweils 24h mit der jeweiligen Substanz behandelt.

Systolisch entstand kein signifikanter Unterschied der unterschiedlichen Konditionen im Vergleich zur Kontrollbedingung. Es wurden größere Fehlerbalken als bei den diastolischen Auswertungen deutlich. Abkürzungen: L-Tryp (L-Tryptophan), Kontrolle (Kontr.), Tandem-Peptid (TP)

Graph dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM und darunter tabellarisch die n-Zahlen. Statistischer Test: Two-way ANOVA (#  $p < 0,05$ ) mit Bonferroni-Posttest.

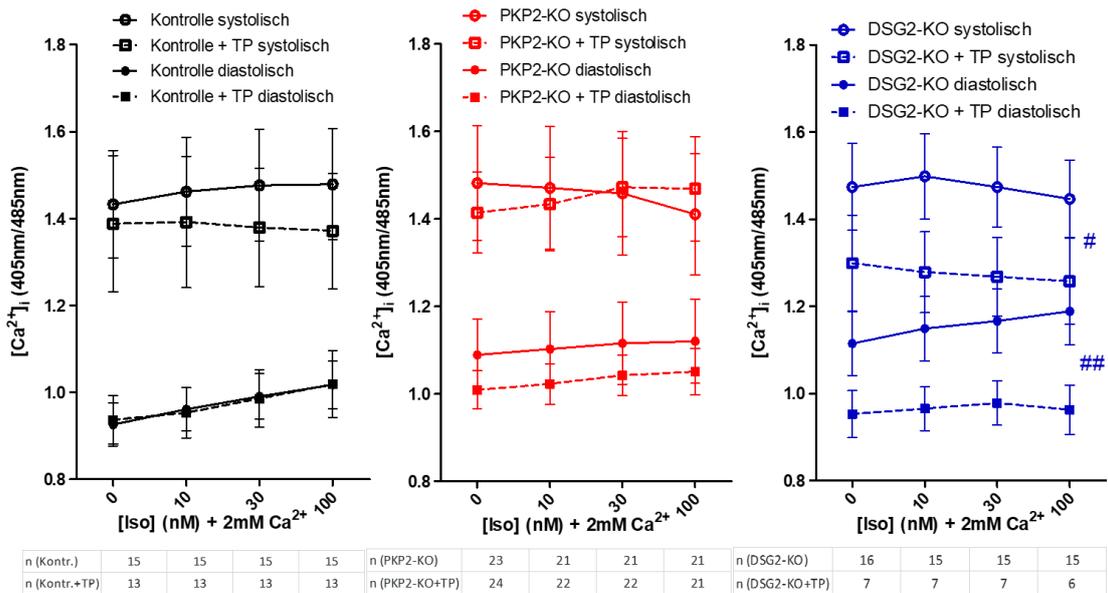
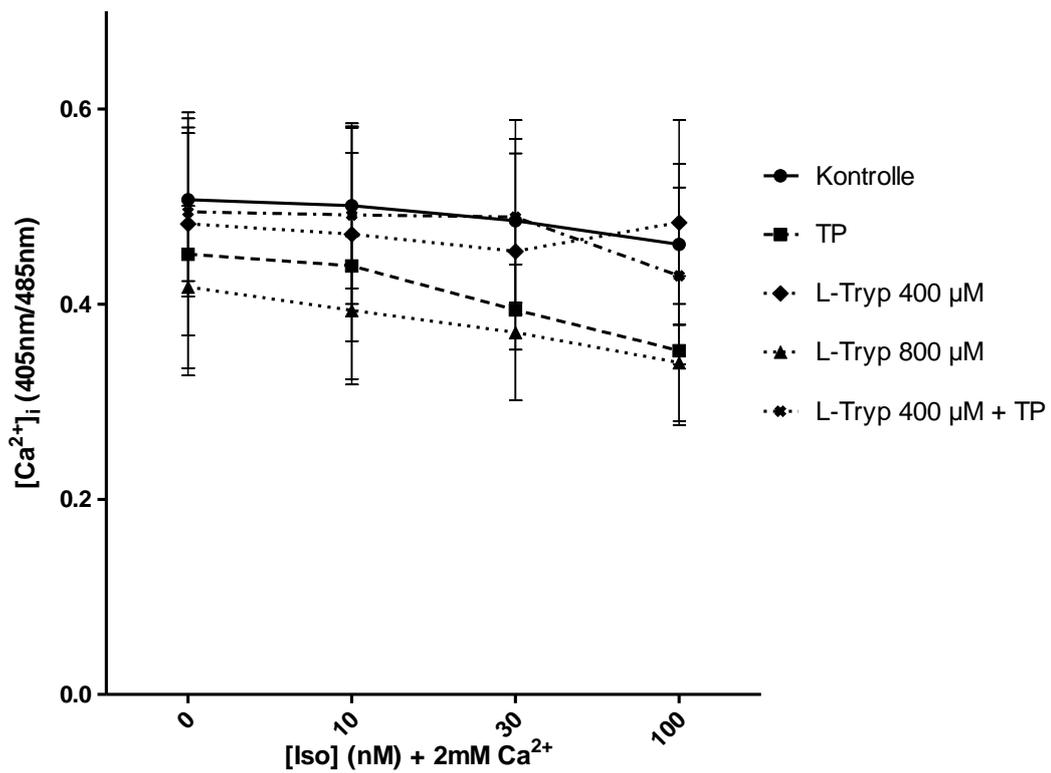


Abbildung A 2: Systolische und diastolische  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen der Kontroll-KM, PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM mit TP-Behandlung. Nur bei DSG2-KO-KM entstanden signifikant niedrigere  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen durch das TP.

Dargestellt sind die systolischen und diastolischen intrazellulären  $[Ca^{2+}]_i$  der gesunden Kontrollzelllinie links, PKP2-KO mittig und DSG2-KO rechts. Die TP-Behandlung erfolgte jeweils für 24h.

Die Graphen sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM mit der gleichen Skala und darunter tabellarisch die n-Zahlen. Statistischer Test: Two-way ANOVA (#  $p < 0,05$  und ##  $p < 0,01$ ) mit Bonferroni-Posttest.

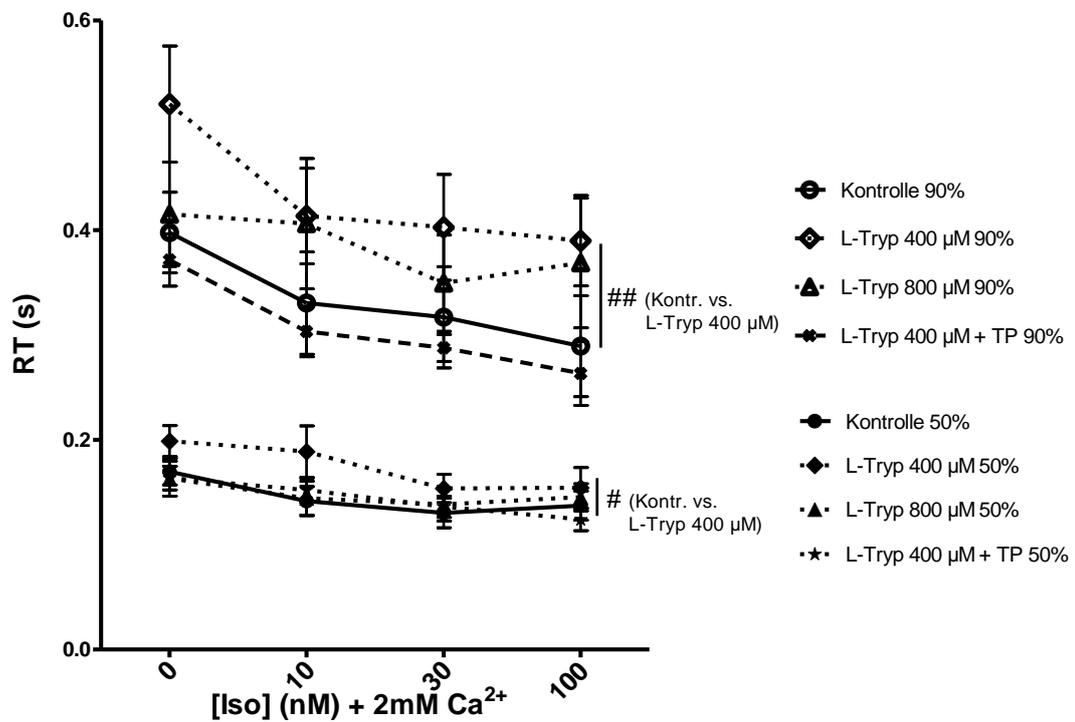


|                     |    |    |    |    |
|---------------------|----|----|----|----|
| n (Kontr.)          | 15 | 15 | 15 | 15 |
| n (TP)              | 13 | 13 | 13 | 13 |
| n (L-Tryp 400)      | 15 | 15 | 15 | 14 |
| n (L-Tryp 400 + TP) | 15 | 14 | 12 | 13 |
| n (L-Tryp 800)      | 10 | 10 | 10 | 10 |

**Abbildung A 3: Ca<sup>2+</sup>-Amplituden der Kontrolllinie mit Behandlung durch das TP und L-Tryp. Es entstanden keine signifikanten Unterschiede durch die Behandlungen.**

Die KM der gesunden Kontrolle wurden jeweils 24h mit der jeweiligen Substanz behandelt. Abkürzungen: L-Tryp (L-Tryptophan), Kontrolle (Kontr.), Tandem-Peptid (TP)

Graph dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM und darunter tabellarisch die n-Zahlen. Statistischer Test: Two-way ANOVA mit Bonferroni-Posttest.

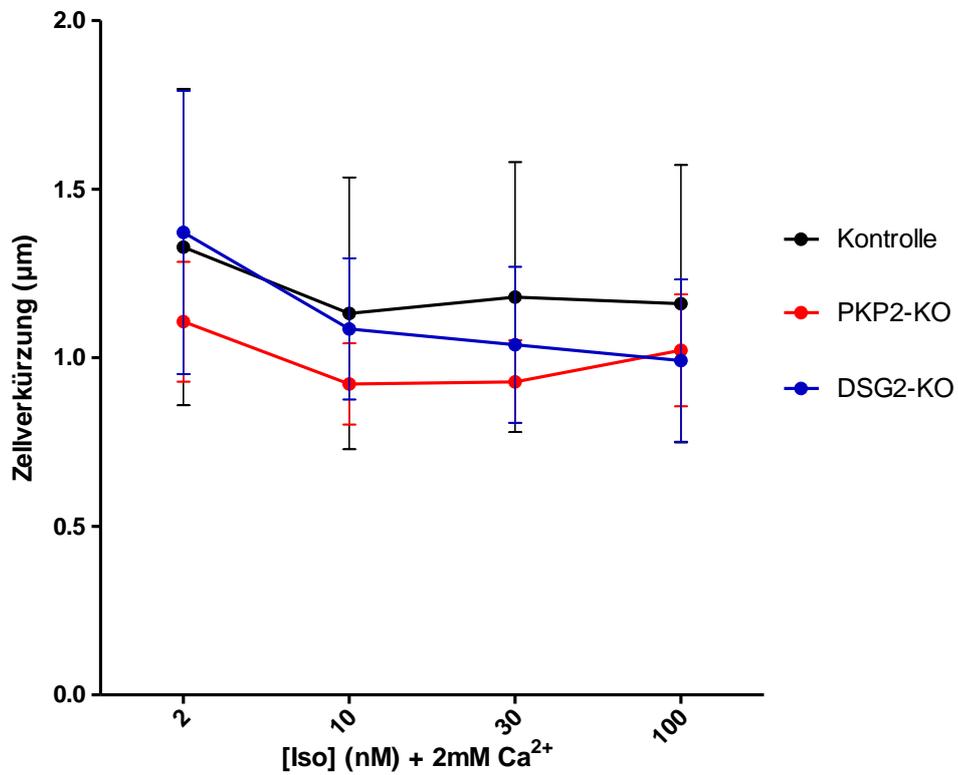


|                    |    |    |    |    |
|--------------------|----|----|----|----|
| n (Kontr.)         | 13 | 11 | 10 | 8  |
| n (L-Tryp 400)     | 11 | 10 | 9  | 11 |
| n (L-Tryp 400+ TP) | 15 | 13 | 12 | 13 |
| n (L-Tryp 800)     | 10 | 9  | 9  | 9  |

Abbildung A 4: 50%- und 90%-Relaxationszeiten der Kontrolllinie mit Behandlung durch das TP und L-Tryp. Die RT mit L-Tryp-Behandlung waren länger im Vergleich zur Kontrolle.

Die 90%-RT bilden sich oben im Diagramm und die 50%-RT unten ab. Die KM wurden jeweils 24h mit der jeweiligen Substanz behandelt.

Graph dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM und darunter tabellarisch die n-Zahlen. Statistischer Test jeweils im Vergleich mit der Kontrolle: Two-way ANOVA (#  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ) mit Bonferroni-Posttest.

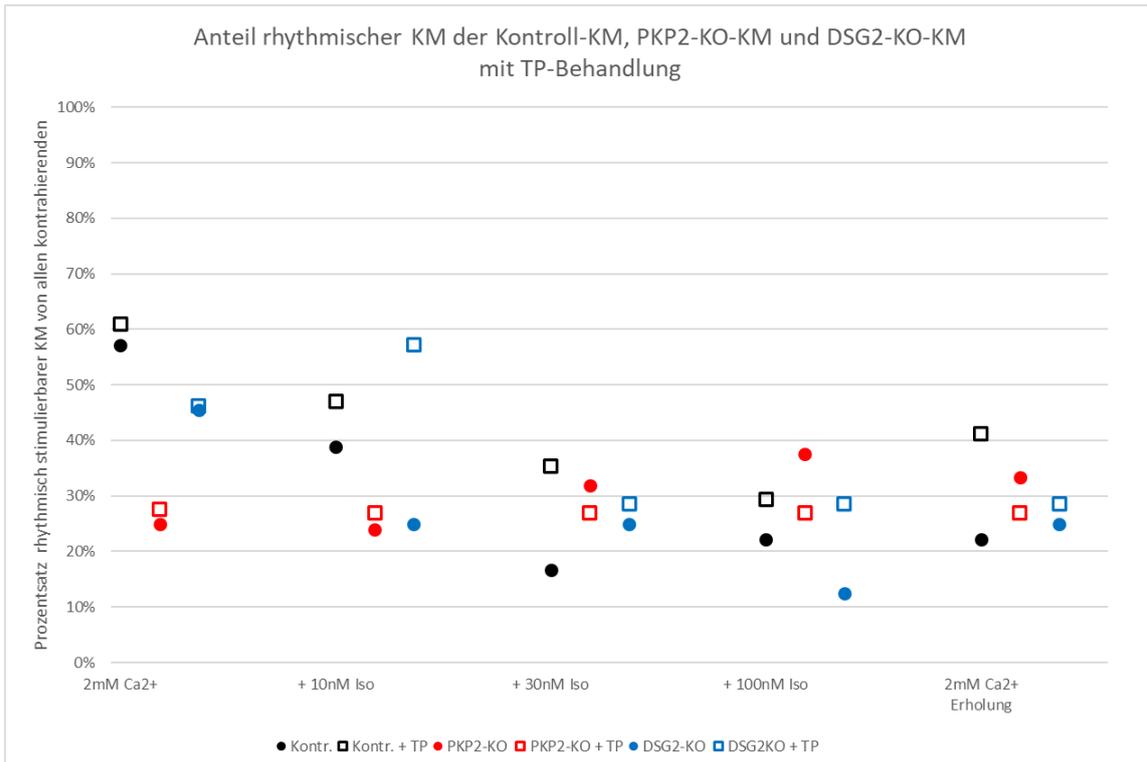


|               |    |    |    |    |
|---------------|----|----|----|----|
| n (Kontrolle) | 13 | 13 | 13 | 13 |
| n (PKP2-KO)   | 23 | 22 | 22 | 22 |
| n (DSG2-KO)   | 10 | 9  | 8  | 8  |

*Abbildung A 5: Kontraktionsamplituden der Kontrolllinie, PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM. Große Fehlerbalken wurden sichtbar.*

*Die Zellverkürzung wurde durch den Abstand der Zellränder berechnet und die Amplituden im Diagramm dargestellt. Es entstanden keine Unterschiede durch die Mutationen im Vergleich zur gesunden Zelllinie. Auffällig waren die großen Fehlerbalken.*

*Graph: Mittelwert ± SEM. Two-way ANOVA mit Bonferroni-Posttest.*



**Abbildung A 6:** Die Arrhythmien der drei Zelllinien wurden durch das TP nicht deutlich beeinflusst.

Dargestellt sind die Anteile rhythmischer KM an allen KM bei aufsteigenden Iso-Konzentrationen, jeweils links die Kontroll-KM, mittig PKP2-KO-KM und rechts DSG2-KO-KM.

PKP2-KO-KM zeigten niedrigere Prozentsätze, also mehr Arrhythmien als die anderen Zelllinien. Dies wurde durch das TP nicht verändert. Auch bei DSG2-KO-KM entstand kein eindeutiger Unterschied durch das TP.

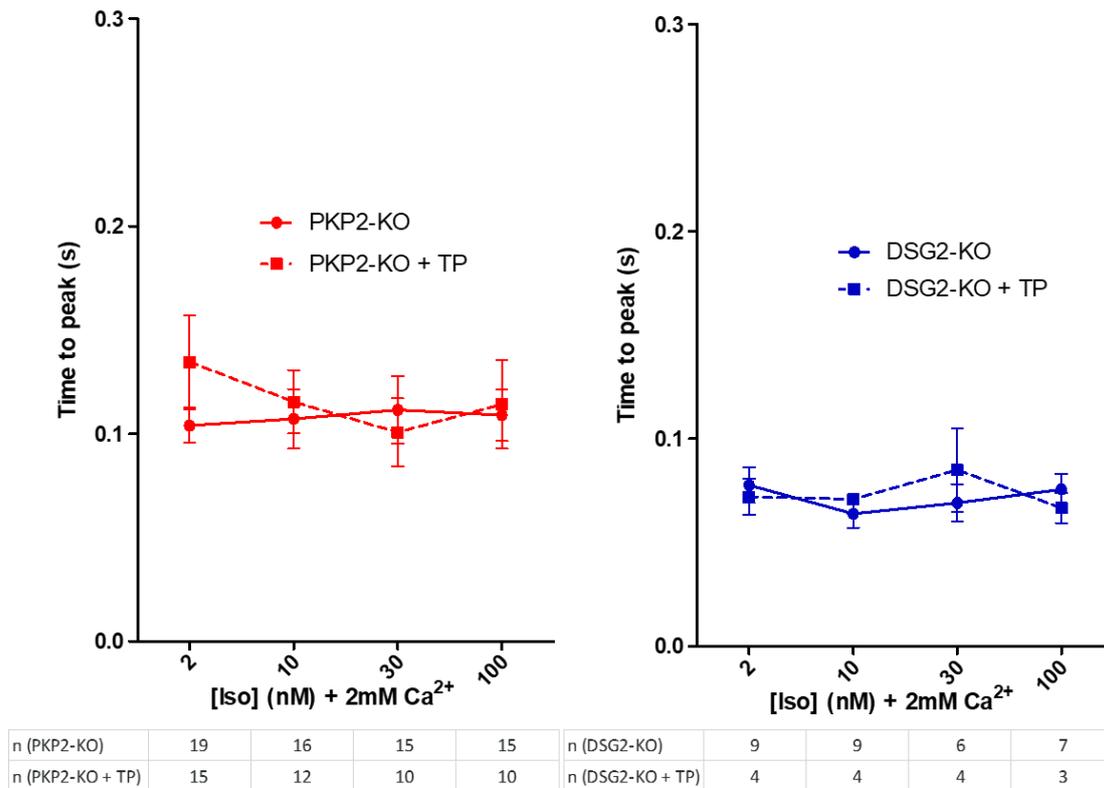


Abbildung A 7: Time to peak von PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM mit TP-Behandlung. Es entstand kein Unterschied durch das TP.

Die time to peak (TTP), also  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromgeschwindigkeit ins Zytosol hauptsächlich aus dem SR, ist dargestellt.

Graph dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM und darunter tabellarisch die n-Zahlen. Statistischer Test: Two-way ANOVA ( $p < 0,01$ ) mit Bonferroni-Posttest.

## II Abkürzungsverzeichnis

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>e</sub> | extrazelluläre Kalziumkonzentration   |
| [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> | intrazelluläre Kalziumkonzentration   |
| ACM                              | arrhythmogene Kardiomyopathie (arrhythmogenic cardiomyopathy)               |
| AM                               | Acetoxymethylester  |
| AP                               | Aktionspotential  |
| APD                              | Aktionspotentialdauer   |
| Ca <sup>2+</sup>                 | Kalzium   |
| CBM                              | kardiales Basalmedium (cardiac basal medium)                                |
| CEM                              | kardiales Anreicherungsmedium (cardiac enrichment medium)                   |
| CSM                              | kardiales Spezifikationsmedium (cardiac specification medium)               |
| cTNT                             | kardiales Troponin T  |
| Cx43                             | Connexin 43   |
| DAD                              | verzögerte Nachdepolarisation (delayed afterdepolarization)                 |
| Dex                              | Dexamethason  |
| DSC2                             | Desmocollin-2   |
| DSG                              | Desmoglein  |
| DSG2-KO                          | Desmoglein-2-Knockout   |
| EAD                              | frühe Nachdepolarisation (early afterdepolarization)                        |
| EC                               | Extrazellulärdomäne   |
| GSK3β                            | Glykogensynthase-Kinase 3 Beta  |
| HI                               | Herzinsuffizienz  |
| hiPS                             | humane induzierte pluripotente Stammzellen                                  |
| hiPS-KM                          | aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen generierte Kardiomyozyten |
| Indo                             | Indo-1  |
| Iso                              | Isoprenalin   |
| JP2                              | Junctophilin-2  |
| KM                               | Kardiomyozyten  |
| Kontr.                           | Kontrolle   |
| LTCC                             | L-Typ-Ca <sup>2+</sup> -Kanal (L-type calcium channel)                      |
| L-Tryp                           | L-Tryptophan  |

|                 |  |
|-----------------|--|
| M               | molar = Mol pro Liter  |
| MK              | Messkammer   |
| ml/W            | Milliliter pro Well  |
| n               | Anzahl   |
| Na <sup>+</sup> | Natrium  |
| NCX             | Natrium-Kalzium-Austauscher  |
| PG              | Plakoglobin  |
| PKP2            | Plakophilin-2  |
| PKP2-KO         | Plakophilin-2-Knockout   |
| PLN             | Phospholamban  |
| PMT             | Photomultiplier  |
| Ratio           | Verhältnis   |
| RI              | Rock-Inhibitor   |
| rpm             | Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)                        |
| RT              | Relaxationszeit (relaxation time)                                      |
| RyR             | Ryanodinrezeptor-2   |
| s.              | siehe  |
| SEM             | Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)            |
| SERCA           | Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums |
| SR              | sarkoplasmatisches Retikulum   |
| T3              | Triiodthyronin   |
| TP              | Tandem-Peptid  |
| TTP             | time to peak   |
| vs.             | versus (im Vergleich zu)   |
| w               | Well   |

### III Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Aufbau des kardialen Glanzstreifens .....  | 3  |
| Abbildung 2: Elektromechanische Kopplung von Kardiomyozyten.....  | 8  |
| Abbildung 3: Aktionspotential von Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards.....   | 9  |
| Abbildung 4: Entstehung von DADs und EADs im Kalziumhaushalt von<br>Kardiomyozyten.....   | 14 |
| Abbildung 5: Bindung des Tandem-Peptids an die Extrazellulärdomänen von zwei<br>DSG2 .....  | 17 |
| Abbildung 6: Schwächung der DSG2-Bindungen durch L-Tryptophan.....  | 18 |
| Abbildung 7: Postulierte Wirkweise des TP.....  | 18 |
| Abbildung 8: Desmosom im Normalzustand und mit PKP2-KO sowie die postulierte<br>Wirkweise des TPs bei PKP2-KO .....   | 27 |
| Abbildung 9: Auftragen der Matrigel-Mattresses .....  | 39 |
| Abbildung 10: Funktionsweise von Indo als Indikator für intrazelluläre<br>Kalziumkonzentrationen.....   | 41 |
| Abbildung 11: Screenshot des IonWizard-Programms während einer Ca <sup>2+</sup> -Messung<br>(mit freundlicher Genehmigung der Firma IonOptix) .....   | 43 |
| Abbildung 12: Aufbau des IonOptix-Systems mit Beschreibung der Spiegel und Filter<br>(mit freundlicher Genehmigung der Firma IonOptix) .....  | 44 |
| Abbildung 13: Anschlüsse an die Messkammer auf dem Mikroskopisch .....  | 47 |
| Abbildung 14: Automatische Auswertung mit IonWizard (mit freundlicher<br>Genehmigung der Firma IonOptix).....   | 54 |
| Abbildung 15: Manuelle Auswertung mit IonWizard (mit freundlicher Genehmigung<br>der Firma IonOptix) .....  | 56 |
| Abbildung 16: Kultivierung auf Matrigel-Mattresses führte zu einer frühen<br>Streckung der Kardiomyozyten entlang der Linien und entsprechend einer früheren<br>Reifung. (Abbildung von Dr. Anna Janz, mit freundlicher Genehmigung der<br>Urheberin) ..... | 61 |
| Abbildung 17: Die Stimulierbarkeit der Kontrollzelllinie wurde durch die<br>Hormonbehandlung nicht beeinflusst.....   | 63 |

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 18: Die Hormonbehandlung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die systolischen und diastolischen intrazellulären Kalziumkonzentrationen. ....   | 64 |
| Abbildung 19: Kardiomyozyten auf Mattresses mit Hormonen kontrahierten mit einer stabileren Frequenz als ohne Hormone und als unreife Zellen ohne Mattresses und Hormone.....  | 66 |
| Abbildung 20: PKP2-KO-KM zeigten bei kurzer Kultivierungszeit geringere Stimulierbarkeit als gesunde Kardiomyozyten.....   | 68 |
| Abbildung 21: PKP2-KO-KM benötigten mehr Tage der Kultivierung als gesunde Kontroll-KM, um die Eigenschaft der Stimulierbarkeit zu erlangen.....   | 69 |
| Abbildung 22: Weniger PKP2-KO-KM als gesunde KM waren elektrisch stimulierbar bei niedrigen extrazellulären $[Ca^{2+}]_e$ . ....   | 72 |
| Abbildung 23: Die Kontraktionsfrequenz der reifen Kontroll-KM verlief nahe der Stimulationsfrequenz und die der reifen PKP2-KO-KM signifikant niedriger, während unreife KM allgemein höhere Frequenzen zeigten..... | 74 |
| Abbildung 24: Der relative Fehler der Frequenz als Maß für Arrhythmie stieg bei reifen Zellen mit höheren $[Ca^{2+}]_e$ an und deutete mehr Arrhythmien bei PKP2-KO-KM im Vergleich zur Kontrolle an.....            | 76 |
| Abbildung 25: Die $Ca^{2+}$ -Amplituden der reifen PKP2-KO-KM fielen signifikant höher aus als die der reifen Kontrollzellen. ....   | 78 |
| Abbildung 26: Die systolischen $Ca^{2+}$ -Konzentrationen der PKP2-KO-Linie verliefen signifikant höher als die der gesunden Kontrolllinie.....  | 79 |
| Abbildung 27: Die diastolischen intrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentrationen von PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM waren jeweils signifikant höher als die der Kontrollzellen.....   | 83 |
| Abbildung 28: Die diastolischen $Ca^{2+}$ -Konzentrationen der Kontrolllinie wurden durch L-Tryp erhöht und teilweise durch das TP korrigiert. ....  | 84 |
| Abbildung 29: Das TP verminderte die diastolischen $Ca^{2+}$ -Konzentrationen von PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM.....   | 85 |
| Abbildung 30: Die intrazellulären $Ca^{2+}$ -Amplituden von PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM waren signifikant niedriger als die der Kontroll-KM. ....  | 87 |

|   |     |
|---|-----|
| Abbildung 31: Das TP hatte keine signifikante Wirkung auf die Ca <sup>2+</sup> -Amplituden aller Zelllinien.....  | 88  |
| Abbildung 32: Die Relaxationszeiten von PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM waren kürzer im Vergleich zur Kontrolllinie. ....   | 89  |
| Abbildung 33: Das TP hatte keinen Einfluss auf die Relaxationszeiten aller drei Zelllinien.....   | 90  |
| Abbildung 34: Die Zeitkonstante tau der DSG2-KO-KM war niedriger im Vergleich zu den Kontroll-KM. ....  | 92  |
| Abbildung 35: Die TTP von DSG2-KO-KM war verkürzt im Vergleich zu Kontroll-KM und PKP2-KO-KM. ....  | 93  |
| Abbildung 36: Darstellung rhythmisch stimulierbarer Kalziumtransienten.....   | 95  |
| Abbildung 37: Anteil rhythmisch stimulierbarer Zellen in Abhängigkeit von der Zelllinie und Iso-Konzentrationen. PKP2-KO-KM ohne Iso waren arrhythmischer im Vergleich zu Kontroll-KM, mit Iso kehrte sich der Effekt um. ....                        | 96  |
| Abbildung 38: Die KM der drei Zelllinien zeigten ohne und mit Iso-Stimulation unterschiedlich häufig die rhythmische Kategorie und verschiedene arrhythmische Ereignisse.....   | 100 |
| Abbildung 39: Die Anzahl der Arrhythmien von vier repräsentativen PKP2-KO-Zellen änderte sich bei steigender Iso-Konzentration nicht bei allen Zellen.....  | 102 |
| <br>  |     |
| Abbildung A 1: Systolische und diastolische Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationen der Kontrollzelllinie mit Behandlung durch das TP und L-Tryp. Systolisch entstand kein Unterschied durch die Behandlungen.....  | III |
| Abbildung A 2: Systolische und diastolische Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationen der Kontroll-KM, PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM mit TP-Behandlung. Nur bei DSG2-KO-KM entstanden signifikant niedrigere Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationen durch das TP. .... | IV  |
| Abbildung A 3: Ca <sup>2+</sup> -Amplituden der Kontrolllinie mit Behandlung durch das TP und L-Tryp. Es entstanden keine signifikanten Unterschiede durch die Behandlungen. ....   | V   |

|  |      |
|--|------|
| Abbildung A 4: 50%- und 90%-Relaxationszeiten der Kontrolllinie mit Behandlung durch das TP und L-Tryp. Die RT mit L-Tryp-Behandlung waren länger im Vergleich zur Kontrolle. .... | VI   |
| Abbildung A 5: Kontraktionsamplituden der Kontrolllinie, PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM. Große Fehlerbalken wurden sichtbar. ....   | VII  |
| Abbildung A 6: Die Arrhythmien der drei Zelllinien wurden durch das TP nicht deutlich beeinflusst. ....  | VIII |
| Abbildung A 7: Time to peak von PKP2-KO-KM und DSG2-KO-KM mit TP-Behandlung. Es entstand kein Unterschied durch das TP. ....   | IX   |

## IV Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Substanzen mit Verwendung in der Zellkultur .....  | 28 |
| Tabelle 2: Geräte und Material mit Verwendung in der Zellkultur .....   | 29 |
| Tabelle 3: Substanzen für die Vorbereitung und Durchführung der IonOptix-Messungen .....  | 30 |
| Tabelle 4: Bestandteile des IonOptix-Versuchsaufbaus .....  | 30 |
| Tabelle 5: Software .....   | 32 |
| Tabelle 6: Humane induzierte pluripotente Stammzelllinien (Janz et al. 2021) .....  | 34 |
| Tabelle 7: Zusammensetzung der Medien für die kardiale Differenzierung .....  | 37 |
| Tabelle 8: Zusammensetzung der Normal-Tyrode .....  | 48 |
| Tabelle 9: Gruppierung der Kardiomyozyten aufgrund der Kultivierungseigenschaften .....   | 50 |
| Tabelle 10: Messprotokoll der Mattress-Etablierung mit Tyrode-Lösungen und Zeitspannen .....  | 51 |
| Tabelle 11: Versuchsgruppen des Tandem-Peptid-Experiments .....   | 52 |
| Tabelle 12: Messprotokoll des TP-Experiments mit Tyrode-Lösungen und Zeitspannen .....  | 53 |
| Tabelle 13: Beispiele für stimulierbare und nicht stimulierbare Kalziumtransienten ...  | 58 |
| Tabelle 14: KM wurden nach der Art der Arrhythmien in die folgenden Kategorien eingeteilt, die mit Beispiel-Kalziumtransienten dargestellt sind. .... | 98 |
| Tabelle A 1: Alle Substanzen des Versuchs hinterließen vitale KM. ....  | I  |

## V Danksagung

Ich möchte mich bei allen, die mich während der Arbeit an dieser Dissertation in jeglicher Art und Weise unterstützt haben, herzlich bedanken.

Allen voran gilt mein Dank Frau Prof. Dr. med. Brenda Gerull, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in der AG kardiovaskuläre Genetik anfertigen zu dürfen. Insbesondere bedanke ich mich für die hervorragende Betreuung, das ausdauernde Korrekturlesen, die wertvollen Anregungen in der Zeit im Labor und auch für all unsere nicht-fachlichen schönen Gespräche.

Ein riesiges Dankeschön möchte ich an Dr. Anna Janz aussprechen, weil ich mir keine bessere Betreuerin hätte vorstellen könne. Danke für die unermessliche Hilfsbereitschaft und die tolle Zeit, die wir im Labor zusammen hatten. Wenn einmal wieder nichts funktioniert hat, konntest du durch deine Motivation und positive Art mir immer weiterhelfen.

Danke an Anne Kiliñ, Susanna Schraut, Annette Berbner, Michelle Gulentz, Dr. Paula Arias Loza, Miriam Zink und allen anderen DZHI-Team-Mitgliedern, die ich kennen lernen durfte. Ich bekam immer sofort Hilfe von jeder einzelnen von euch, danke dafür und für die wunderbare Atmosphäre bei der Arbeit.

Besonders möchte ich mich bei Martina Regensburger für die großartige Unterstützung im Umgang mit den Zellen und für die bewundernswerte Hilfsbereitschaft, egal ob es um Technisches oder Persönliches ging.

Danke an Dr. Michael Kohlhaas für die geduldige Einarbeitung am IonOptix-Gerät, für die sofortige Hilfe, wenn etwas nicht funktionierte und das sehr hilfreiche Korrekturlesen.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine Familie, vor allem an meine Eltern Monika und Gunther Hartleb und meine Schwestern Hanna und Viola. Ohne euch hätte ich diese Arbeit gar nicht beginnen und erst recht nicht fertig stellen können. Danke für

eure Geduld, während ihr mich bei allen Entscheidungen und sonstigen (nicht-existenten) Problemen beraten habt.

Meinem Freund Hannes möchte ich das herzlichste Danke, das es gibt, sagen. Danke, dass du mich jeden Tag aufs Neue motiviert und aufgebaut hast mit deiner selbstlosen, unermüdlich lebensfrohen Art, die ich so sehr an dir schätze. Ich könnte mir kein besseres Team wünschen als mit dir, wodurch ich diese Arbeit, das Studium und so viel mehr überhaupt schaffen konnte.

Zuletzt möchte ich mich auch bei all meinen Freunden bedanken, für jegliche Hilfe oder einfach fürs Zuhören.

## VI Veröffentlichung

Janz, A., M. Zink, A. Cirnu, **A. Hartleb**, C. Albrecht, S. Rost, E. Klopocki, K. Günther, F. Edenhofer, S. Ergün, and B. Gerull. 2021. 'CRISPR/Cas9-edited PKP2 knock-out (JMU001-A-2) and DSG2 knock-out (JMU001-A-3) iPSC lines as an isogenic human model system for arrhythmogenic cardiomyopathy (ACM)', *Stem Cell Research*, 53: 102256.