

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

**Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie**

**Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen**

**PITX2-Knockout in atrialem Engineered Heart Tissue zeigt  
ähnliche elektrophysiologische Veränderungen wie bei  
persistierendem Vorhofflimmern**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von:

Carl Otto Schulz  
aus Leipzig

**Hamburg 2023**

**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 22.01.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Renate Bonin-Schnabel**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Torsten Christ**

**Prüfungsausschuss 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Katja E. Odening**

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>II.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>III.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>Vorhofflimmern</b> .....	<b>9</b>
1.1.1	Allgemeines.....	9
1.1.2	Pathophysiologie und Therapie von VHF.....	9
1.1.3	Ursachen von VHF.....	10
1.1.4	Genetische Faktoren von VHF.....	11
1.1.5	VHF in "Genome-wide association studies".....	11
1.1.6	PITX2.....	12
1.1.7	Geschichte der PITX2-Hypothese.....	13
1.1.8	PITX2-Knockout im Tiermodell.....	14
1.1.9	PITX2 und Genregulation.....	16
1.1.10	VHF und „Genetic Risk Scores“.....	16
<b>1.2</b>	<b>Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) als Herz-Modell</b> .....	<b>17</b>
1.2.1	Entwicklung.....	17
1.2.2	HiPSC-CM und 3D-Modelle zur Untersuchung kardialer Rhythmusstörungen.....	17
1.2.3	HiPSC-aCM als elektrophysiologisches Vorhofmodell.....	18
<b>1.3</b>	<b>CRISPR/Cas9 als Methode für die genetische Modifikation von hiPSC</b> .....	<b>20</b>
<b>1.4</b>	<b>Fragestellung und Ziel dieser Arbeit</b> .....	<b>20</b>
<b>2.</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Zellkultur der hiPSC</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2</b>	<b>Herstellung einer PITX2-Knockout-Zelllinie</b> .....	<b>22</b>
2.2.1	Knockout Strategie.....	22
2.2.2	Durchführung des PITX2-Knockout-Experiments.....	23
2.2.3	Auswahl der Klone.....	23
2.2.4	Analyse der Klone.....	24
2.2.5	Etablierung einer Master- und Working-Cell-Bank.....	24
<b>2.3</b>	<b>Atriale Differenzierung der hiPSC</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>Atriales „Engineered Heart Tissue“ (aEHT)</b> .....	<b>27</b>
2.4.1	Herstellung der aEHTs.....	27
2.4.2	aEHT-Kultur.....	28
<b>2.5</b>	<b>Molekulargenetische Untersuchungen</b> .....	<b>29</b>
2.5.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	29
2.5.2	DNA-Sequenzierung.....	29
2.5.3	Analyse der Genexpression mit RT-qPCR.....	30
2.5.4	Karyotypisierung.....	31
2.5.5	Western Blot.....	31
2.5.6	Durchflusszytometrie (FACS).....	32
2.5.7	RNA-Sequenzierung.....	32
2.5.8	Massenspektrometrie.....	32
<b>2.6</b>	<b>Pharmaka</b> .....	<b>33</b>
<b>2.7</b>	<b>Aktionspotenzialmessung</b> .....	<b>33</b>
2.7.1	Grundprinzip der Messung.....	33

2.7.2	Messkammer.....	34
2.7.3	Badlösung, Wasserbad, Schlauchsystem und Rollenpumpe .....	35
2.7.4	Vorverstärker, Verstärker und Analog-Digital-Wandler.....	36
2.7.5	Messtisch und Faraday'scher Käfig .....	38
2.7.6	Stimulationselektrode .....	38
2.7.7	Herstellung und Präparation der Glaspipetten.....	38
<b>2.8</b>	<b>Ablauf der Messungen.....</b>	<b>39</b>
2.8.1	Einschlusskriterien eines Aktionspotenzials .....	39
2.8.2	Kontrollmessungen.....	39
2.8.3	Zugabe von Pharmaka .....	39
2.8.4	4-Aminopyridin-Protokoll.....	39
2.8.5	Carbachol-Protokoll .....	40
2.8.6	Einfrieren und Aufbewahrung der EHTs .....	40
<b>2.9</b>	<b>Patch-Clamp.....</b>	<b>40</b>
<b>2.10</b>	<b>Datenanalyse und Statistische Auswertung .....</b>	<b>42</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Erfolgreicher PITX2-Knockout in hiPSC .....</b>	<b>43</b>
3.1.1	Erfolgreiches Ausschneiden der Protein-kodierenden DNA-Sequenz.....	43
3.1.2	PITX2 <sup>-/-</sup> -hiPSC zeigen einen unauffälligen Karyotyp und erhaltene Pluripotenz .....	44
<b>3.2</b>	<b>Erfolgreiche atriale Differenzierung der PITX2<sup>-/-</sup>-hiPSC .....</b>	<b>45</b>
3.2.1	PITX2 <sup>-/-</sup> -hiPSC zeigen normales Zellwachstum .....	45
3.2.2	PITX2 <sup>-/-</sup> -EBs beginnen später zu kontrahieren .....	46
3.2.3	PITX2 <sup>-/-</sup> -hiPSC-aCM exprimieren Vorhof-spezifische Proteine .....	46
3.2.1	Fehlende PITX2-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene in PITX2 <sup>-/-</sup> .....	46
<b>3.3</b>	<b>Verringerte Kraft in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT .....</b>	<b>48</b>
3.3.1	Erfolgreiche Herstellung von PITX2 <sup>-/-</sup> -aEHT .....	48
3.3.1	PITX2 <sup>-/-</sup> -aEHTs beginnen später zu kontrahieren.....	48
3.3.1	PITX2 <sup>-/-</sup> -aEHTs relaxieren langsamer .....	51
<b>3.4</b>	<b>PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs zeigen ein verändertes AP .....</b>	<b>51</b>
3.4.1	Negativeres MDP sowie höhere APA und höhere dV/dt <sub>max</sub> in PITX2 <sup>-/-</sup> -aEHTs .....	51
3.4.2	PITX2 <sup>-/-</sup> -aEHTs zeigen triangulierte AP .....	51
3.4.1	Einfluss des PITX2-Knockouts auf den Block Vorhof-selektiver K <sup>+</sup> -Kanäle .....	52
3.4.2	Aktivierung muskarinergere Rezeptoren verkürzt APD ohne Hyperpolarisation des MDP in PITX2 <sup>-/-</sup> -aEHTs .....	54
<b>3.5</b>	<b>Verringerter Ca<sup>2+</sup>-Strom in PITX2<sup>-/-</sup> .....</b>	<b>56</b>
<b>3.6</b>	<b>Stärker negatives MDP in PITX2<sup>-/-</sup> ist nicht mit größerem I<sub>K1</sub> assoziiert.....</b>	<b>56</b>
<b>3.7</b>	<b>Expressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung .....</b>	<b>57</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Atriales EHT: ein Modell für die Elektrophysiologie des menschlichen Vorhofs...59</b>	
4.1.1	Verbessertes atriales Phänotyp der aEHTs .....	59
4.1.2	Ursache des verbesserten atrialen Phänotyps .....	61
<b>4.2</b>	<b>Vollständiger Knockout des PITX2-Gens ist möglich in hiPSC .....</b>	<b>62</b>
<b>4.3</b>	<b>Verringerter I<sub>Ca,L</sub> und verringerte Kraft in PITX2<sup>-/-</sup> und persistierendem VHF....62</b>	
<b>4.4</b>	<b>Effekt des PITX2-Knockouts auf die Frequenzabhängigkeit der APD bleibt unklar</b>	<b>63</b>
<b>4.5</b>	<b>Verlangsamte frühe Repolarisation in PITX2<sup>-/-</sup> ähnelt elektrischem „Remodeling“ bei persistierendem VHF .....</b>	<b>64</b>
<b>4.6</b>	<b>Mögliche Erklärungen für das stärker negative MDP in PITX2<sup>-/-</sup> .....</b>	<b>65</b>

4.7	Limitationen .....	67
5.	Ausblick.....	68
6.	Zusammenfassung der Dissertation .....	69
6.1	Deutsche Zusammenfassung.....	69
6.1	Englische Zusammenfassung.....	70
7.	Literaturverzeichnis.....	71
8.	Anhang .....	79
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	79
8.2	Materialien, Substanzen und Lösungen .....	81
8.3	Kultur- und Differenzierungsmedien .....	85
8.4	Elektrophysiologische Geräte.....	89
8.5	Kits .....	90
8.6	CRISPR/Cas9-Experimente .....	90
8.7	Western Blot.....	93
8.8	Labor-Software.....	94
8.9	Plateau-Spannung.....	94
8.	Danksagung.....	95
9.	Lebenslauf.....	97
10.	Veröffentlichungen.....	99
11.	Eidesstattliche Versicherung.....	100

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: DNA-Varianten und Vorhofflimmern. ....	12
Abbildung 1.2: Links-atriale PITX2-Expression bei Vorhofflimmern und Sinusrhythmus.....	14
Abbildung 1.3: PITX2-Knockout Mäuse zeigen verkürzte atriale Aktionspotenziale .....	15
Abbildung 1.4: „Engineered Heart Tissue“ .....	18
Abbildung 1.5: Retinolsäure induziert eine hohe Expression atrialer Markerproteine.....	20
Abbildung 1.6: Schematischer Ablauf der Arbeit.....	21
Abbildung 2.1: Strategie des PITX2-Knockouts .....	23
Abbildung 2.2: Schematischer Überblick der atrialen Differenzierung .....	26
Abbildung 2.3: Sequenzierungsprobe .....	29
Abbildung 2.4: Elektrophysiologischer Messstand .....	34
Abbildung 2.5: Elektrophysiologische Geräte I.....	35
Abbildung 2.6: Elektrophysiologische Geräte II .....	36
Abbildung 2.7: Elektrophysiologische Geräte III .....	37
Abbildung 2.8: Herstellung der scharfen Mikroelektroden .....	39
Abbildung 2.9: Aufbau der Patch-Clamp-Experimente.....	41
Abbildung 3.1: Fehlende PITX2-mRNA-Expression.....	43
Abbildung 3.2: Karyotyp von PITX2 <sup>-/-</sup> und isogener Kontrolle.....	44
Abbildung 3.3: PITX2 <sup>-/-</sup> -hiPSC zeigen pluripotenten Phänotyp .....	45
Abbildung 3.4: PITX2 <sup>-/-</sup> hiPSC zeigen keine auffällige Morphologie .....	45
Abbildung 3.5: PITX2-Knockout hat keinen Einfluss auf die EB-Morphologie .....	46
Abbildung 3.6: Kein Unterschied in der Expression von MLC2A und MLC2V zwischen PITX2 <sup>-/-</sup> und isogener Kontrolle.....	47
Abbildung 3.7: Keine PITX2-mRNA-Expression in PITX2 <sup>-/-</sup> -hiPSC-aCM .....	47
Abbildung 3.8: Fehlendes PITX2-Protein in PITX2 <sup>-/-</sup> -aEHT .....	48
Abbildung 3.9: aEHT-Morphologie von PITX2-Knockout und Kontrolle .....	49

Abbildung 3.10: Kein Unterschied in der spontanen Schlagfrequenz zwischen PITX2 <sup>-/-</sup> und isogener Kontrolle .....	49
Abbildung 3.11: Geringere Kraftentwicklung in PITX2 <sup>-/-</sup> .....	50
Abbildung 3.12: PITX2 <sup>-/-</sup> -aEHTs relaxieren langsamer .....	50
Abbildung 3.13: Auswirkungen des PITX2-Knockout auf MDP, APA und $dV/dt_{max}$ .....	51
Abbildung 3.14: Trianguliertes Aktionspotenzial in PITX2 <sup>-/-</sup> -aEHTs .....	52
Abbildung 3.15: Effekt des PITX2-Knockouts auf die APD .....	53
Abbildung 3.16: Effekte von 4-AP auf AP-Parameter in PITX2 <sup>-/-</sup> und Kontrolle .....	54
Abbildung 3.17: CCh-Effekte auf PITX2 <sup>-/-</sup> und Kontrolle .....	55
Abbildung 3.18: Verringerter $I_{Ca,L}$ in PITX2 <sup>-/-</sup> .....	56
Abbildung 3.19: Kein Unterschied im $I_{K1}$ zwischen PITX2 <sup>-/-</sup> und isogener Kontrolle .....	57
Abbildung 3.20: Unterschiedlich exprimierte Gene in PITX2 <sup>-/-</sup> .....	58
Abbildung 4.1: Effekt des $I_{Kur}$ -Blocks auf die AP-Form von menschlichem Vorhofgewebe, RA-EHT und aEHT .....	60
Abbildung 4.2: Muskarinerge Effekte auf AP von menschlichem Vorhofgewebe, RA-EHT und aEHT .....	61
Abbildung 4.3: Verringerter $I_{Ca,L}$ bei verringerten PITX2-Konzentrationen .....	63
Abbildung 4.4: AP-Form in Sinusrhythmus und Vorhofflimmern .....	64
Abbildung 4.5: Simulierter Effekt eines verstärkten $I_{K1}$ -Stroms und $I_{K,ACh}$ -Aktivierung auf das MDP .....	66
Abbildung S1: Definition der Plateau-Spannung .....	94

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Master-Mix zur Herstellung atrialer EHTs .....	28
Tabelle 1.2: Primer und Primereigenschaften.....	31
Tabelle S1: Verwendete Substanzen und Hersteller .....	81
Tabelle S2: Zellkultur-Materialien.....	83
Tabelle S3: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen .....	83
Tabelle S4: Stammzell-Kulturmedium (FTDA) .....	85
Tabelle S5: Stage 0-Medium.....	86
Tabelle S6: Stage 1-Medium.....	86
Tabelle S7: FDM-Medium.....	87
Tabelle S8: Stage 2-Medium.....	87
Tabelle S9: RDM-Medium .....	88
Tabelle S10: EHT-Kulturmedium.....	88
Tabelle S11: Medium für die aEHT-Herstellung.....	88
Tabelle S12: Elektrophysiologische Geräte und deren Hersteller .....	89
Tabelle S13: Übersicht der verwendeten Kits.....	90
Tabelle S14: Sequenzen der sgRNA1 und sgRNA2 .....	90
Tabelle S15: Primer-Sequenzen für die Genotypisierung.....	90
Tabelle S16: Off-Target-Analyse der sgRNA1 .....	91
Tabelle S17: Off-Target-Analyse der sgRNA2 .....	92
Tabelle S18: 50 µl PCR-Ansatz .....	93
Tabelle S19: Primärantikörper .....	93
Tabelle S20: Sekundärantikörper .....	93
Tabelle S21: Übersicht der verwendeten Laborsoftware .....	94

# 1. Einleitung

## 1.1 Vorhofflimmern

### 1.1.1 Allgemeines

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste kardiale Arrhythmie des Menschen und betrifft ca. 0,5% der Weltbevölkerung (Lippi et al., 2021). In Europa sind derzeit etwa 10 Millionen Menschen an VHF erkrankt (Timmis et al., 2020). Aufgrund von demografischen Veränderungen und der steigenden Lebenserwartung nimmt die Prävalenz von VHF stetig zu, sodass im Jahr 2040 mit einer Anzahl von 16 Millionen VHF-Patienten in Europa gerechnet wird (Krijthe et al., 2013). Insgesamt erkranken Männer häufiger an VHF als Frauen und die Erkrankungswahrscheinlichkeit steigt mit zunehmendem Alter (Magnussen et al., 2017). VHF-Patienten weisen eine höhere kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität auf als die Allgemeinbevölkerung. Sie erleiden häufig Schlaganfälle, Organinfarkte und haben ein erhöhtes Demenzrisiko (Kalantarian & Ruskin, 2013; Kwok et al., 2011). Die medizinische Versorgung von VHF-Patienten stellt eine große wirtschaftliche Belastung für das Gesundheitssystem dar. Die Hospitalisierungsrate von VHF-Patienten beträgt ca. 25% pro Jahr. Dies entspricht einem Anteil von ca. 50% der entstehenden Gesamtkosten von VHF für das Gesundheitssystem (Blomstrom Lundqvist et al., 2011). Insofern ist die Weiterentwicklung therapeutischer Möglichkeiten auch von großer wirtschaftlicher Bedeutung.

### 1.1.2 Pathophysiologie und Therapie von VHF

Bei Patienten mit VHF läuft die elektrische Erregung des Vorhofs unabhängig vom Sinusknoten ab. Dabei kommt es zu diffusen, unregelmäßigen elektrischen Erregungen innerhalb des Vorhofs mit einer Erregungsfrequenz von ca. 450-600 pro Minute. Diese Erregungen bewirken einen sehr unregelmäßigen und oftmals tachykarden Herzrhythmus („Tachyarrhythmia absoluta“). Dabei wird die hohe Vorhoffrequenz nicht direkt auf die Kammerfrequenz übertragen, weil die Refraktärzeit des AV-Knotens bei ca. 300 ms liegt und damit eine direkte Übertragung des Vorhofrhythmus auf die Herzkammern verhindert (Dhingra et al., 1973). Jedoch kann es zu einer dauerhaft erhöhten Herzfrequenz kommen, die zu Veränderungen an den Ventrikeln und sogar zu einer ventrikulären Kardiomyopathie führen kann (Qin et al., 2019). Die unkoordinierte Vorhoferregung verhindert eine effektive Vorhofkontraktion. Bereiche der Vorhöfe, in denen bereits ohne VHF schon niedrige Flussgeschwindigkeiten (linkes und rechtes Herzohr) herrschen, sind daher prädisponiert für die Entstehung von Thromben bei VHF. Aus diesem Grund erleiden VHF-Patienten häufig Schlaganfälle und andere Gefäßverschlüsse, wie z.B. Mesenterialinfarkt oder aber auch Lungenarterienembolie. VHF kann anhand der Dauer des Bestehens in paroxysmales, persistierendes oder permanentes VHF unterteilt werden. Paroxysmales VHF konvertiert spontan zurück in den Sinusrhythmus (48 Stunden bis 7 Tage), persistierendes VHF hält dagegen länger als

7 Tage an und kann durch therapeutische Interventionen (z.B. Kardioversion) zurück in den Sinusrhythmus konvertiert werden. Im Gegensatz dazu ist es bei permanentem VHF nicht möglich, den physiologischen Herzrhythmus wiederherzustellen. Somit wird das VHF in diesem Fall akzeptiert und nur noch symptomatisch behandelt (Eckardt & Wasmer, 2017). Die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Konversion zum SR nimmt mit zunehmender Dauer des Bestehens von VHF ab.

Die Therapie von VHF ergibt sich zum einen aus der Behandlung der Risikofaktoren, die bei VHF-Patienten für die erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität verantwortlich sind. Die Patienten müssen aber auch mit antikoagulierenden Medikamenten behandelt werden, um die Entstehung von Thromben effektiv zu verhindern. Ein weiteres wichtiges Therapieziel ist die Frequenzkontrolle, bei der die Reduktion der Herzfrequenz im Vordergrund steht. Antikoagulation und Frequenzkontrolle sind keine ursächliche Behandlung von VHF, sondern dienen nur der Verringerung der Symptome bzw. zur Reduktion von Embolien. Die dritte Säule der Therapie ist die Rhythmuskontrolle, die das Ziel hat, die physiologische Vorhoferregung und somit Sinusrhythmus wiederherzustellen. Solche Therapieoptionen der Rhythmuskontrolle, welche die Ursache von VHF direkt behandeln, sind jedoch auch mit Risiken verbunden. Ein Beispiel dafür sind Katheterablationen, bei denen durch gezielte Vernarbung des Gewebes Erregungsbahnen unterbrochen werden. Häufig ist eine solche kausale Therapie nur dann möglich, wenn strukturelle Veränderungen innerhalb des Vorhofs zur Entstehung von VHF beitragen. Dazu gehört u.a. der Bereich um die Mündung der Pulmonalvenen im linken Vorhof, welche eine Prädilektionsstelle für die Entstehung von VHF darstellt. Bei einem solchen Fall stellt die Katheterablation eine mögliche Therapieoption zur Rhythmuskontrolle dar. Nach erfolgreich durchgeführter Katheterablation bleibt jedoch ein gewisses Risiko für das Wiederauftreten von VHF. Innerhalb des ersten Jahres nach Ablation zeigen bis zu 25% der Patienten erneute Vorhofarrhythmien (Wazni et al., 2021). Insofern ist die Entdeckung und Weiterentwicklung kausaler Therapieoptionen von VHF ein wichtiger Bestandteil der kardiovaskulären Forschung.

Trotz intensivierter, evidenzbasierter Therapie bleibt die kardiovaskuläre Mortalität und Hospitalisierungsrate bei Patienten mit VHF deutlich höher als in der Normalbevölkerung (Bassand et al., 2016; Ruddox et al., 2017).

### 1.1.3 Ursachen von VHF

Für die Entstehung von VHF gibt es unterschiedliche Ursachen, anhand derer die Erkrankung ätiologisch in primäres und sekundäres VHF eingeteilt werden kann. Primäres VHF tritt ohne zugrundeliegende Erkrankung auf und wird deswegen auch als idiopathisches VHF bezeichnet. Diese Patienten machen mit ca. 15% einen kleinen Anteil an der Gesamtheit aller Patienten aus. Deutlich häufiger ist das sogenannte sekundäre VHF. Dabei liegt häufig eine strukturelle Herzerkrankung als Ursache zugrunde. Zu diesen Ursachen zählen Erkrankungen wie chronische

Herzinsuffizienz, koronare Herzkrankheit (KHK) oder Veränderungen der Herzklappen (Eckardt & Wasmer, 2017). Neben strukturellen Herzerkrankungen können auch weitere Erkrankungen sekundäres VHF verursachen, wie z.B. Hyperthyreose, Elektrolytstörungen oder aber auch die Einnahme toxischer Substanzen.

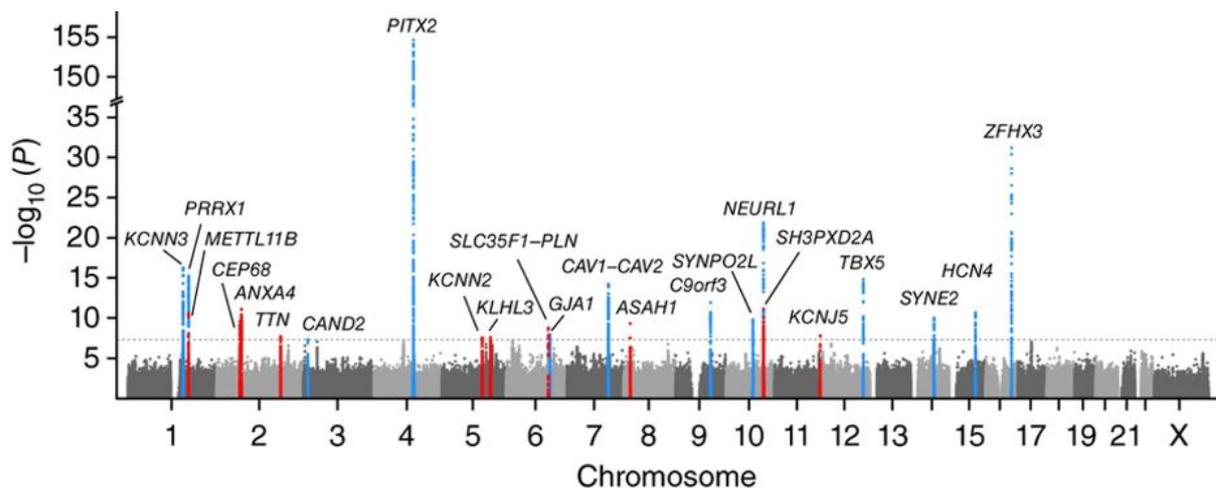
#### 1.1.4 Genetische Faktoren von VHF

Familiäres VHF bezeichnet das Auftreten von VHF ohne weitere Risikofaktoren bei mehreren Personen innerhalb einer Familie. Diese familiärer Häufung ist selten und betrifft ca. 5% der VHF-Patienten (Darbar et al., 2003). Häufig findet sich bei diesen Fällen keine eindeutig genetische Ursache, sodass vermutlich polygen-multifaktorielle Ursachen zugrundeliegen müssen.

Eindeutig identifizierte Ursachen für genetisch-bedingtes VHF sind Mutationen in Genen kardialer Ionenkanäle. Dazu gehören u.a. Mutationen in Kalium-Ionenkanälen, wie z.B. Mutationen in Untereinheiten (*KCNH2*, *KCNE2*) des kardialen hERG-Kanals („human Ether-a-go-go Related Gene“), welcher für die späte Repolarisation im Vorhof verantwortlich ist (Tsai et al., 2008). Diese Mutationen können sowohl mit einer Hyper- als auch Hypoaktivität des jeweiligen Kanals einhergehen. Weitere Beispiele für monogene Ursachen für VHF sind Mutationen in *KCNA5* ( $I_{Kur}$ , Vorhofspezifischer Kaliumstrom; Yang et al., 2009) oder auch *SCN5a* (Nav1.5, spannungsabhängiger Natriumkanal; Savio-Galimberti & Darbar, 2014) Diese Mutationen sind sehr selten, sodass für die größere Zahl von Patienten mit familiär gehäuften VHF weitere Ursachen in Betracht gezogen werden müssen.

#### 1.1.5 VHF in „Genome-wide association studies“

In „Genome-wide association studies“ (GWAS) wurde der Zusammenhang zwischen Erkrankungen und bestimmten DNA-Varianten (Desoxyribonukleinsäure) untersucht. In diesem Zusammenhang gelang die Identifizierung einiger DNA-Varianten, die mit dem Auftreten von VHF assoziiert sind (**Abbildung 1.2**). Besonders häufig waren Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in der Nähe des Gens für den „paired-like homeodomain transcription factor 2“ (*PITX2*; Christophersen et al., 2017). Die meisten dieser SNPs befinden sich in der DNA-Region 4q25, ca. 150 Kilobasenpaare „upstream“ vom *PITX2*-Promotor.



**Abbildung 1.1: DNA-Varianten und Vorhofflimmern.**

Metaanalyse der „Genome-wide association studies“ zeigt die Assoziation zwischen DNA-Varianten in der Nähe bestimmter Gene und Vorhofflimmern (VHF). Es wurden 22.346 VHF-Patienten und 132.086 gesunde Probanden kombinierter Abstammung miteinander verglichen. Es zeigte sich die höchste Signifikanz bei Varianten in der Nähe des PITX2-Gens. Signifikanzniveau (gestrichelte Linie) bei  $p=5 \times 10^{-8}$ . Abbildung entnommen aus Christophersen et al. 2017.

#### 1.1.6 PITX2

PITX2 ist ein Transkriptionsfaktor, der während der Embryonalentwicklung die Expression wichtiger Entwicklungsgene reguliert. Das PITX2-Gen befindet sich auf Chromosom 4 und hat eine Länge von 24701 bp. Insgesamt besteht das Gen aus sieben Exons, von denen jedoch nur die Exons E3-E7 Protein-kodierende Informationen enthalten. Innerhalb des Gens befindet sich die sogenannte Homöobox, welche für die Homöodomäne kodiert. Diese Homöodomäne ermöglicht die Bindung von Proteinen an DNA-Abschnitte und somit die Funktion als Transkriptionsfaktor. Dabei bestimmen weitere Sequenzen innerhalb des PITX2-Proteins die Selektivität der jeweiligen Bindung. Wichtige Entwicklungsschritte, an denen PITX2 beteiligt ist, sind u.a. die Etablierung der Links-Rechts-Körperachse, Herzentwicklung und Augenentwicklung (Hjalt und Semina, 2005).

Derzeit sind vier PITX2-Isoformen bekannt: PITX2a, -b, -c und -d. Diese werden jeweils durch alternatives Spleißen generiert. Die Isoformen werden in den einzelnen Körperregionen unterschiedlich stark exprimiert. Während PITX2a und PITX2b besonders stark im Bereich des Kopfes und Gesichts exprimiert werden, ist PITX2c die im Herzen dominante Isoform (Hjalt und Semina, 2005). Die Isoform PITX2d besitzt weitestgehend regulatorische Funktionen, indem sie die Wirkung der anderen Isoformen im jeweiligen Zielgewebe steuert (Cox et al., 2002). Während der Embryonalentwicklung nimmt PITX2 im gesamten Herzen wichtige Funktionen ein. Mutationen des PITX2-Gens ist mit dem Auftreten von isolierten Ventrikel- oder Vorhofseptumdefekten oder auch der Fallot-Tetralogie assoziiert (Sun et al., 2016).

Interessanterweise ist PITX2 direkt an der Entwicklung der Pulmonalvenenmündung im linken Vorhof beteiligt. Diese Region stellt eine Prädilektionsstelle für die Entstehung von VHF dar (Mommersteeg et al., 2007).

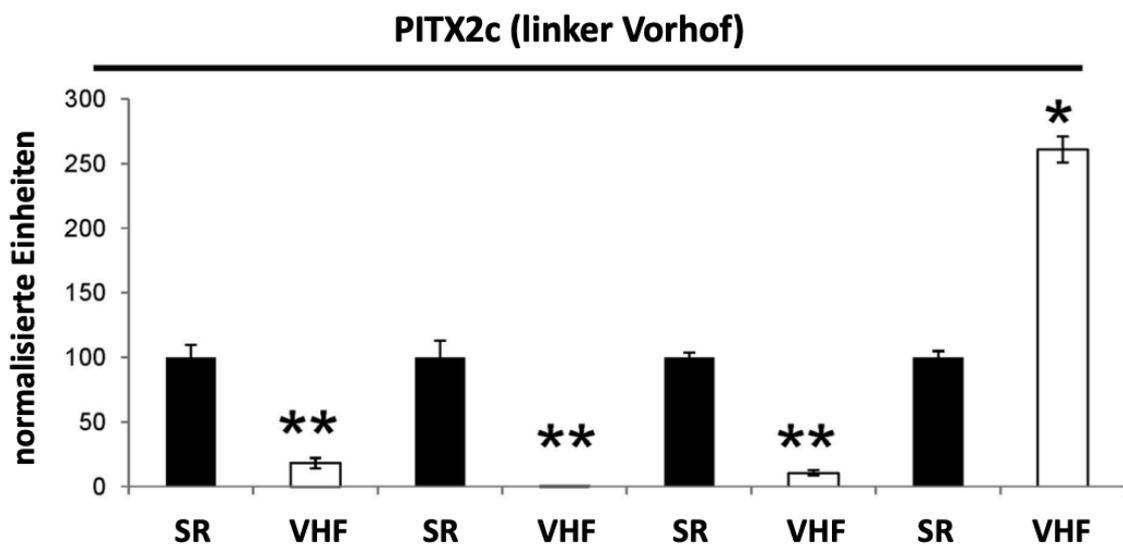
#### 1.1.7 Geschichte der PITX2-Hypothese

Die bereits erwähnten GWAS-Untersuchungen zeigten eine Assoziation zwischen DNA-Varianten im Bereich des PITX2-Gens und dem Auftreten von VHF. Untersuchungen in weiteren Kohorten mit VHF-Patienten bestätigten diese Befunde. Die dabei untersuchten SNPs rs2200733 und rs13143308 traten bei VHF-Patienten bis zu fünfmal häufiger auf, als bei gesunden Probanden (Chinchilla et al., 2011). Die zentrale Frage bei Untersuchungen dieser Art war es, herauszufinden, welchen Einfluss die SNPs auf die Entstehung von VHF haben.

Eine naheliegende Vermutung war, dass die SNPs Einfluss auf die Expression des in ihrer Nähe liegenden PITX2-Gens nehmen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass VHF-Patienten allgemein eine verringerte PITX2-mRNA-Expression zeigen (Chinchilla et al., 2011; Kirchhof et al., 2011). Bei genauerer Betrachtung dieser Untersuchungen ergeben sich jedoch einige Fragen. Chinchilla et al. (2011) untersuchten in ihrer Arbeit die PITX2-mRNA-Expression in humanen Gewebeproben aus linken (n=5) und rechten Vorhöfen (n=5) von Patienten mit VHF und Sinusrhythmus. Die Auswertung dieser Untersuchung zeigte in 4 von 5 VHF-Gewebeproben eine geringere PITX2-mRNA-Expression als in den Proben von Sinusrhythmus-Patienten. Dabei wird in dieser Arbeit jedoch nicht erläutert, welches Gewebe eines Patienten mit Sinusrhythmus mit welchem Gewebe eines VHF-Patienten verglichen wurde. Es scheint so, als sei diese Zuordnung willkürlich erfolgt. Es wurde auch nicht der Mittelwert der 4 VHF-Proben mit dem Mittelwert der Sinusrhythmus-Proben verglichen. Die Arbeit von Kirchhof et al. (2011) zeigten ein ähnliches Ergebnis bei der Frage nach dem Zusammenhang zwischen verringerter PITX2-Expression und VHF. In der Arbeit wird lediglich im Text erwähnt, dass in humanen Proben aus dem linken Vorhof von VHF-Patienten eine verringerte PITX2-mRNA-Expression beobachtet wurde (n=1). Die dazugehörigen Daten werden jedoch nicht gezeigt. Insofern beruht die These, dass eine verringerte PITX2-Expression mit VHF assoziiert sei, zum einen auf Experimenten mit einer nur sehr geringen n-Zahl, die zusätzlich mit sehr fragwürdigen statistischen Mitteln ausgewertet worden sind. Zum anderen wird lediglich die PITX2-Expression auf mRNA-Ebene untersucht. Keine der beiden Arbeiten untersuchte den Zusammenhang zwischen der PITX2-Proteinexpression (z.B. Western Blot) und VHF. Ein weiterer Aspekt ist die Frage nach den SNPs in der Nähe des PITX2-Gens. Bei der Analyse der mRNA sollte es möglich gewesen sein, die Patientenproben auf die mit VHF-assoziierten SNPs zu untersuchen. Diese Untersuchung erfolgte jedoch nicht.

Aus den beschriebenen Ergebnissen resultiert die kontrovers diskutierte Annahme, dass die SNPs im Bereich des PITX2-Gens zu verringerten PITX2-Konzentrationen führen und diese für die

Entstehung von VHF verantwortlich sind. Dem steht gegenüber, dass in humanem Vorhofgewebe von VHF-Patienten, die diese mit VHF-assoziierten SNPs in der Nähe des PITX2-Gens trugen, die PITX2-Expression (mRNA) nicht reduziert war (Gore-Panter et al., 2014). Insofern bleibt es unklar, ob die Assoziation der SNPs in der Nähe von PITX2 mit VHF auf verringerte PITX2-Konzentrationen im menschlichen Vorhof zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass ein SNP (rs2595104) in der Nähe des PITX2-Gens die Expression von PITX2c reguliert (Jiangchuan Ye et al., 2016). Dieser SNP kommt jedoch nicht in ausreichender Häufigkeit vor, um die in den GWAS gezeigte starke Assoziation der SNPs mit VHF allein auf diesen SNP zurückzuführen. Für weitere SNPs konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden.



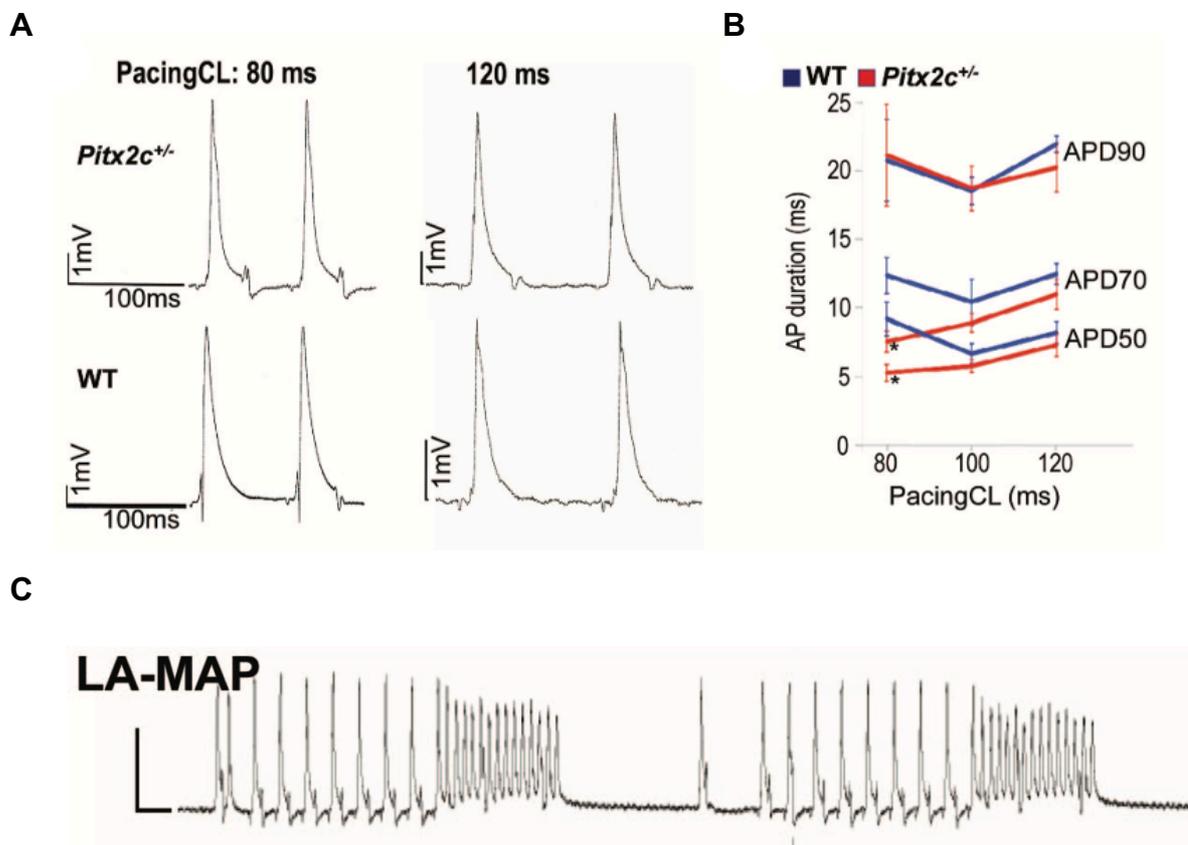
**Abbildung 1.2: Links-atriale PITX2-Expression bei Vorhofflimmern und Sinusrhythmus.**

PITX2-mRNA-Expression (Bestimmung mittels RT-qPCR) in Proben aus dem linken Vorhof von Patienten im Sinusrhythmus (SR; n=4) im Vorhofflimmern (VHF; n=4). mRNA-Konzentration wurde normalisiert zur Konzentration bei SR. Die Zuordnung zwischen VHF und der dazugehörigen SR-Kontrolle erfolgte willkürlich. \*\* p<0,01. Veränderte Abbildung nach Chinchilla et al. (2011).

#### 1.1.8 PITX2-Knockout im Tiermodell

Der Idee folgend, dass verringerte PITX2-Konzentrationen einen Effekt auf die kardiale Elektrophysiologie haben könnten, sind Mausmodelle mit PITX2-Knockout etabliert worden. Mäuse mit einem homozygoten PITX2-Knockout auf Keimbahnebene sind nicht überlebensfähig (Lin et al., 1999). Embryos dieser Mäuse wiesen zahlreiche Fehlbildungen von Herz, Auge, der ventralen und dorsalen Körperwand und des Schädels auf. Diese Befunde unterstreichen die wichtigen Funktionen von PITX2 während der Embryonalentwicklung (Gage et al., 1999). Aus diesem Grund hat man Mäuse mit heterozygotem PITX2-Knockout auf Keimbahnebene generiert. Ganz im Gegensatz zu homozygoten PITX2-Knockout-Mäusen zeigen heterozygote PITX2-Knockout-Mäuse keinerlei äußere morphologischen Unterschiede zu den isogenen Kontrollen

(Kirchhof et al., 2011; Wang et al., 2010). Jedoch weisen heterozygote PITX2-Knockout-Mäuse funktionelle Veränderungen in der kardialen Elektrophysiologie auf. Zwei voneinander unabhängige Studien beobachteten eine verkürzte Aktionspotentialdauer (APD) der Vorhofkardiomyozyten (Kirchhof et al., 2011; Nadadur et al., 2016; **Abbildung 1.3B**). Außerdem zeigen Aktionspotenziale (AP) der heterozygoten PITX2-Knockout-Mäuse ein weniger negatives Ruhemembranpotential (RMP) als die der Wildtypiere (Chinchilla et al., 2011; Kirchhof et al., 2011; **Abbildung 1.3A**). Darüber hinaus sind heterozygote PITX2-Knockout-Mäuse deutlich anfälliger für das Auftreten von VHF, welches durch elektrische Stimulation induziert wird (Kirchhof et al., 2011; Nadadur et al., 2016; Wang et al., 2010, 2014; **Abbildung 1.2C**). Jedoch konnte bisher in keinem der PITX2-Knockout-Mausmodelle das spontane Auftreten von VHF beobachtet werden.



**Abbildung 1.3: PITX2-Knockout Mäuse zeigen verkürzte atriale Aktionspotenziale.**

Monophasische AP-Originale (**A**) bei festfrequenter Stimulation (CL=80 ms und CL=120 ms) und Aktionspotentialdauer (Mittelwerte±SEM; **B**) von heterozygoten PITX2-Knockout-Mäusen und Wildtyp. Links-atriale „MAP“ einer heterozygoten PITX2-Knockout-Maus (**C**) zeigt eine induzierte atriale Arrhythmie (ähnlich zu Vorhofflimmern). Veränderte Abbildung nach Kirchhof et al. (2011).

### 1.1.9 PITX2 und Genregulation

Neben der elektrophysiologischen Charakterisierung widmen sich Untersuchungen in PITX2-Knockout-Modellen der Frage, ob PITX2 einen Einfluss auf die atriale Genexpression wichtiger elektrophysiologischer Gene nimmt und somit zur Entstehung von VHF beitragen könnte. Es konnte gezeigt werden, dass PITX2 Einfluss auf die Expression kardialer Ionenkanäle und somit auf die Morphologie kardialer AP hat. Chinchilla *et al.* (2011) zeigten, dass PITX2-Knockout-Mäuse eine geringere Expression von spannungsabhängigen Natrium- (*Nav1.5*) und einwärtsgerichteten Kalium-Ionenkanälen (*KCNJ2*, *KCNJ12*, *KCNJ4*) aufweisen als Wildtypiere. In einem weiteren heterozygoten PITX2-Knockout-Mausmodell (Syeda *et al.*, 2016) zeigte sich ebenfalls eine verringerte Expression von Kanälen der transienten Kalium-Auswärtsströme (*KCNA6*) und eines zwei Poren-Domänen-Kaliumkanals (*KCNK5*).

Neben einer solchen direkten Regulation der Genexpression scheint PITX2 zusammen mit weiteren Proteinen in einem komplexen regulatorischen Transkriptionsnetzwerk zu wirken. So bildet PITX2 zusammen mit dem „T-box transcription factor 5“ (*Tbx5*) ein komplexes Regulationsnetzwerk auf der Basis eines inkohärenten „Feed-Forward-Loop“ (Nadadur *et al.* 2016). Heterozygote *Tbx5*-Knockout-Mäuse entwickeln spontanes VHF. Die Messung von AP in Vorhofkardiomyozyten dieser Mäuse zeigte im Gegensatz zu PITX2-Knockout-Mäusen eine verlängerte APD<sub>90</sub> und zahlreiche spontane Depolarisationen (Nadadur *et al.*, 2016). Im Vergleich dazu zeigten Mäuse mit heterozygotem *Tbx5*-Knockout und gleichzeitigem heterozygoten PITX2-Knockout kein spontanes VHF. Aus diesem Grund wird angenommen, dass PITX2 und *Tbx5* z.T. gegenläufigen Einfluss auf die Proteinexpression von Genen haben, die für die Regulation der atrialen Elektrophysiologie verantwortlich sind, wie z.B. der Ryanodin-Rezeptor 2 (*Ryr2*), *SERCA2* (Calcium ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums) und Sarcolipin (*Sln*). Möglicherweise müssen die Transkriptionsregulatoren *Tbx5* und PITX2 in einem gesunden Gleichgewicht exprimiert werden (Nadadur *et al.*, 2016).

### 1.1.10 VHF und „Genetic Risk Scores“

Es gibt zahlreiche SNPs, die mit VHF assoziiert sind. Die erwähnten DNA-Varianten könnten aber nicht nur für das Entstehen, sondern auch für den Therapieerfolg von VHF eine Rolle spielen. Die Katheterablation stellt eine wichtige Therapieoption bei VHF dar. Daher war es naheliegend zu prüfen, ob anhand der vorliegenden SNPs eines VHF-Patienten der Erfolg einer Katheterablation vorhergesagt werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit bestimmten SNPs im Bereich des PITX2-Gens auf Chromosom 4 ein erhöhtes Risiko für das Wiederauftreten von VHF nach Katheterablation aufweisen (Choe *et al.*, 2019; He *et al.*, 2018). Anhand der Analyse mehrerer Risiko-SNPs lässt sich ein „Genetic Risk Score“ (GRS) ermitteln, der das individuelle Risiko einer nicht erfolgreichen Katheterablation von VHF-Patienten vorhersagen kann. VHF-Patienten mit

dem größten genetischen Risikoprofil haben ein um den Faktor 2,6 erhöhtes Risiko für das Wiederauftreten von VHF nach durchgeführter Katheterablation (Choe et al., 2019). Ob sich die Kosten der genetischen Analyse vieler VHF-Patienten gegenüber dem klinischen Nutzen rechtfertigen, muss weiter erforscht werden.

## **1.2 Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) als Herz-Modell**

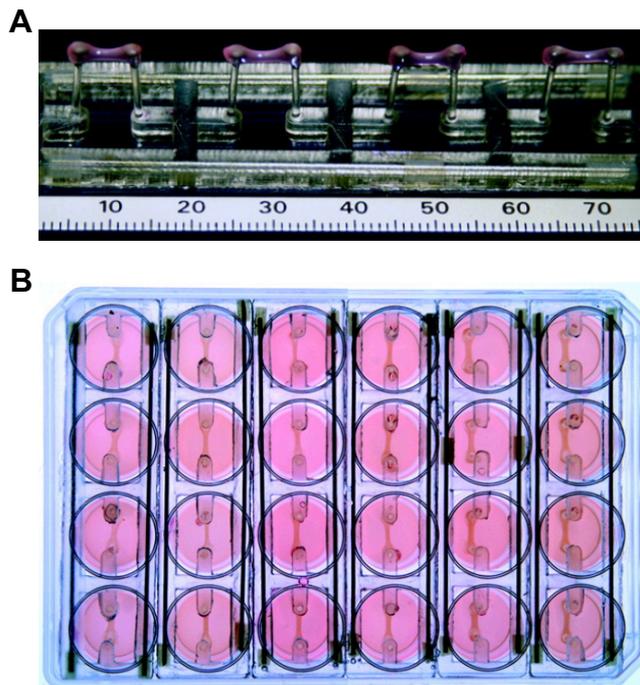
### 1.2.1 Entwicklung

Die Entdeckung der humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) gelang Takahashi und Yamanaka im Jahr 2006. Durch Einbringen von Transkriptionsfaktoren in vollständig differenzierte Fibroblasten der Maus erfolgte die Reprogrammierung der Fibroblasten in ein pluripotentes Zellstadium. Zu diesen Transkriptionsfaktoren gehören Klf4, Oct4, Sox2 und c-Myc, die mittels eines Retrovirus in die Zelle eingebracht wurden (Takahashi und Yamanaka, 2006). Takahashi et al. (2007) gelang es kurze Zeit danach, auch humane Fibroblasten in ein pluripotentes Zellstadium zu bringen. Neben Fibroblasten kann heutzutage auch in anderen Zelltypen Pluripotenz induziert werden, sodass eine Hautbiopsie nicht mehr zwingend notwendig ist. Die Methode der viralen Transduktion hat sich ebenfalls verändert. Inzwischen werden die notwendigen Transkriptionsfaktoren mit anderen Vektoren, wie z.B. Sendai-Viren, in die Zellen gebracht. Somit wird sichergestellt, dass das verwendete Virus keine genomischen Veränderungen in den transduzierten Zellen verursacht (Fusaki et al., 2009). Aufgrund des pluripotenten Zellstadiums teilen sich die hiPSC unendlich lang, sodass theoretisch eine unbegrenzte Anzahl humaner Kardiomyozyten auf der Basis von hiPSC (hiPSC-CM) differenziert werden könnte. Zusätzlich können auch Patientenspezifische Zellen in ein pluripotentes Zellstadium reprogrammiert werden, sodass hiPSC-CM mit der jeweiligen Patienten-DNA und somit Patientenspezifische Zelllinien generiert werden können. Eine weitere Möglichkeit bietet die Genmodifikation von Kontrollzelllinien, sodass die Auswirkungen bestimmter DNA-Veränderungen in hiPSC-CM und ein direkter Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp untersucht werden kann.

### 1.2.2 HiPSC-CM und 3D-Modelle zur Untersuchung kardialer Rhythmusstörungen

Humane iPSC lassen sich in verschiedene Gewebetypen differenzieren. Die Differenzierung zu Kardiomyozyten (hiPSC-CM) ermöglicht die Erforschung genetischer Ursachen von Herzrhythmusstörungen im Allgemeinen, wohingegen sich die Differenzierung zu Vorhofkardiomyozyten besonders für die Erforschung von VHF eignet. Neben der Untersuchung von kardialen Erkrankungen bieten hiPSC ein Modell, um die Wirkung bestimmter Pharmaka an menschlichem Gewebe zu testen (Karakikes et al., 2015; Mannhardt et al., 2020).

Untersuchungen in kardialen Einzelzellen können nicht alle physiologischen Abläufe in dreidimensionalem (3D) menschlichen Herzgewebe wiedergeben. Die Entwicklung von 3D-Modellen auf Basis von hiPSC-CM ist daher essenziell, um „in-vitro“ Untersuchungen unter Physiologie-nahen Bedingungen durchführen zu können. Es gibt verschiedene Ansätze zur Herstellung von 3D-Modellen auf Basis des „Tissue engineering“. Hansen et al. (2010) zeigten, dass „Engineered Heart Tissue“ (EHT) auf Fibrin-Basis mit Kardiomyozyten im 3D-Format kontrahiert und zukünftig mit hiPSC zur Modellierung von Krankheiten verwendet werden kann.



**Abbildung 1.4:** „Engineered Heart Tissue“.

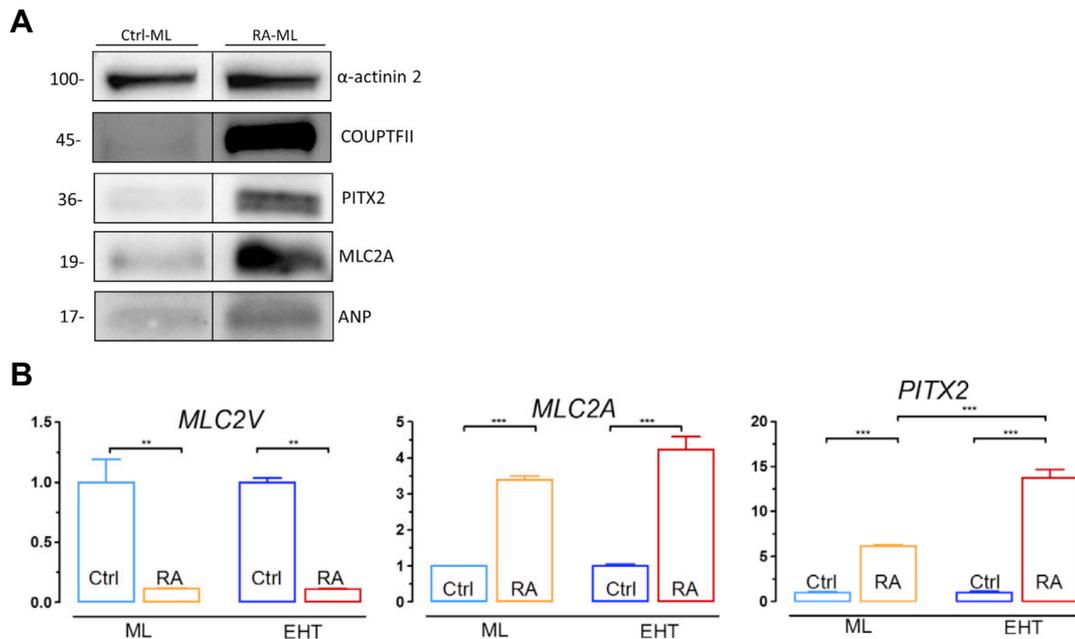
„Engineered Heart Tissue“ (EHT) bestehend aus zu Kardiomyozyten differenzierten hiPSC (hiPSC-CM) in einer Fibrin-Matrix. EHT auf Silikon-Posts (A) und EHT in einer 24-Well-Kulturplatte (B). Veränderte Abbildung nach Hansen et al. (2010).

3D-Modelle, basierend auf hiPSC-CM, haben verschiedene Vorteile gegenüber zweidimensionalen Modellen. Es konnte gezeigt werden, dass Krankheitsmodelle mit reduzierter Kontraktion nur im 3D-Format, aber nicht in 2D-Monolayer-Kulturen diesen Phänotyp zeigen (Hinson et al., 2015). Zudem repräsentieren 3D-Modelle die Kontraktion und elektrophysiologischen Eigenschaften vieler einzelner Zellen, sodass der Einfluss der Variabilität zwischen den Einzelzellen drastisch an Bedeutung verliert (Weinberger et al., 2017).

### 1.2.3 HiPSC-aCM als elektrophysiologisches Vorhofmodell

Untersuchungen von genetisch-bedingtem VHF basieren bislang auf der Verwendung von Mausmodellen. Ein grundlegendes Problem dabei ist die nur begrenzt mögliche Übertragbarkeit

auf den Menschen, weil Tiermodelle nur sehr unzureichend die humane kardiale Elektrophysiologie repräsentieren (Denayer, Stöhrn und Van Roy, 2014). Eine Alternative ist die Untersuchung von menschlichem Gewebe, welches beispielsweise während herzchirurgischer Operationen gewonnen werden kann. Dieses Gewebe stammt jedoch meistens von sehr kranken Patienten und ist nur in sehr geringer Menge verfügbar. Die Verwendung und kardiale Differenzierung von hiPSC eröffnet neue Möglichkeiten. Humane iPSC-CM könnten theoretisch ohne Limitierung in Menge und Zeit benutzt werden. Bisherige elektrophysiologische Untersuchungen in hiPSC-CM zeigten ähnlich große Ionenströme und ähnliche Aktionspotenzialformen wie in menschlichen Kardiomyozyten (Lemme et al., 2018; Lemoine et al., 2017; Zhao et al., 2018). Es existieren allerdings entscheidende elektrophysiologische Unterschiede zwischen Vorhof und Ventrikel. Ein Großteil der hiPSC-CM entspricht elektrophysiologisch einem ventrikulären Phänotyp (Lemoine et al., 2017). Daher ist die Vorhof-spezifische Differenzierung von hiPSC eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung eines auf hiPSC-CM basierenden Vorhofmodells. Bisher wurde in zahlreichen Arbeiten gezeigt, dass während der mesodermalen Induktion die Differenzierung der hiPSC in Richtung atrial oder ventrikulär bestimmt werden kann. Durch die Zugabe von Retinolsäure (RA) wird die Differenzierung entscheidend in Richtung atrial gelenkt (Cyganek et al., 2018; Devalla et al., 2015; Lee et al., 2017; Lemme et al., 2018). Mit RA behandelte hiPSC-Kardiomyozyten (hiPSC-aCM) im Format des EHT (RA-EHT) zeigten gegenüber Standard-EHTs eine stärkere Expression von Vorhof-selektiven Proteinen bei gleichzeitig geringerer Expression von ventrikulären Markern (Lemme et al. 2018). Neben der Genexpression zeigte sich auch in der AP-Form der RA-EHTs ein Vorhof-ähnlicher Phänotyp. Im Gegensatz zu humanem Vorhofgewebe fehlte jedoch eine starke initiale Repolarisation und ein Plateau negativer als 0 mV. Auch weitere Arbeiten mit hiPSC-aCM konnten den typischen humanen atrialen Phänotyp nicht reproduzieren (Cyganek et al., 2018; Devalla et al., 2015). Somit bleiben bei der Entwicklung eines elektrophysiologischen Vorhofmodells einige Ziele offen.



**Abbildung 1.5: Retinolsäure induziert eine hohe Expression atrialer Markerproteine.**

Western Blot (A) von aus hiPSC differenzierten Kardiomyozyten mit (RA-ML) und ohne (Ctrl-ML) die Zugabe von Retinolsäure (RA). Real-Time qPCR (RT-qPCR) atrialer (MLC2A, PITX2) und ventrikulärer (MLC2V) Markerproteine (B). Veränderte Abbildung nach Lemme et al. (2018).

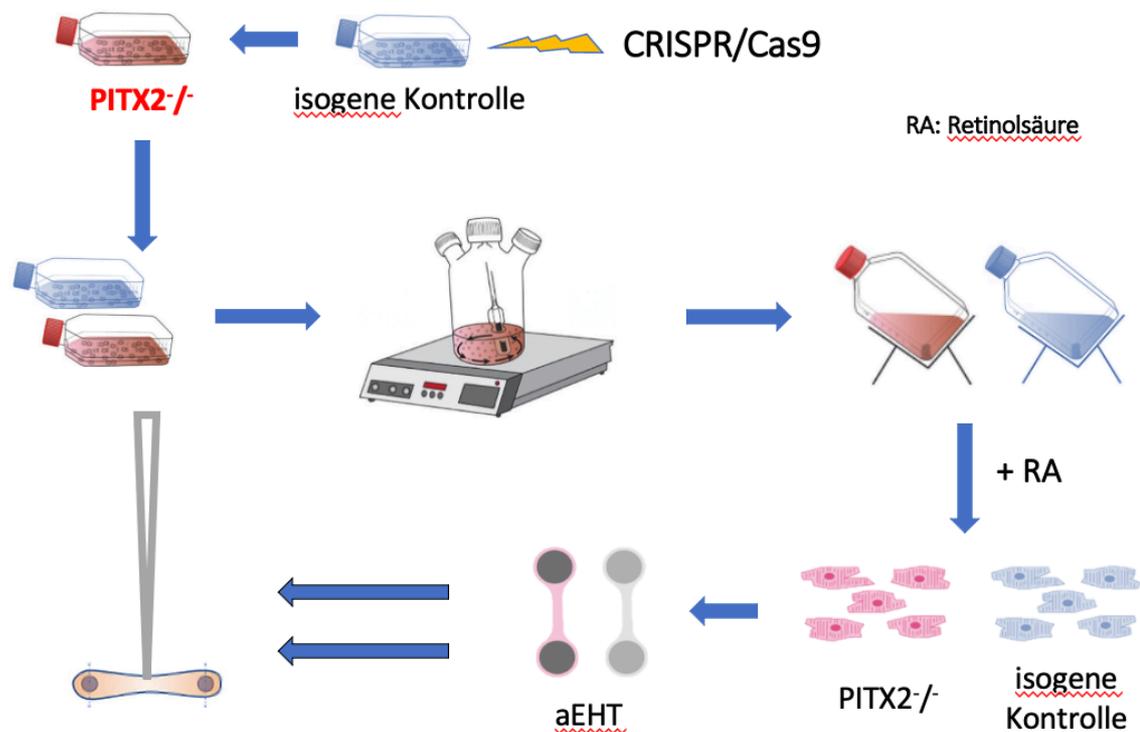
### 1.3 CRISPR/Cas9 als Methode für die genetische Modifikation von hiPSC

„Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“ (CRISPR) und das CRISPR-assoziierte Protein 9 (Cas9) bezeichnen eine molekularbiologische Methode, um DNA gezielt zu verändern. Dabei können sowohl größere DNA-Abschnitte als auch einzelne Nukleotide verändert werden. Die CRISPR/Cas9-Methode wurde von Doudna und Charpentier (2014) etabliert, die für diese Leistung im Jahr 2020 den Nobelpreis für Chemie erhielten. Neben der zunehmenden Bedeutung in klinischen Bereichen ist die CRISPR/Cas9-Methode auch im Bereich der Grundlagenforschung von großer Bedeutung. CRISPR/Cas9 ermöglicht das hocheffiziente Ausschalten bestimmter Gene in hiPSC (De Masi et al., 2020), sodass beispielweise individuelle Modellzelllinien für kardiale Erkrankungen hergestellt werden können. Zudem können mit dieser Methode krankheitsspezifische Mutationen in Patientenzelllinien entfernt werden, sodass Rückschlüsse auf die Effektivität zukünftiger Gentherapien gezogen werden können.

### 1.4 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Der Zusammenhang zwischen dem Vorliegen genetischer Varianten in der Nähe des *PITX2*-Gens, einer verringerten Expression des Transkriptionsfaktors PITX2 und dem Auftreten von VHF ist umstritten (Chinchilla et al., 2011). Bisher ist es unklar, wie verringerte PITX2-Konzentrationen VHF verursachen könnten. Dementsprechend stellt sich die Frage, ob es einen Zusammenhang

zwischen verringerten oder fehlenden PITX2-Konzentrationen in Kardiomyozyten und dem Auftreten von VHF gibt. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, die Auswirkungen einer fehlenden PITX2-Expression auf die Elektrophysiologie in hiPSC-basierten humanen atrialen Kardiomyozyten (hiPSC-aCM) zu untersuchen und mögliche Hinweise auf zugrundeliegende Mechanismen für das begünstigte Auftreten von VHF zu finden. Dafür wurde im ersten Schritt mittels CRISPR/Cas9-Technologie der Protein-kodierende Teil des PITX2-Gens ausgeschaltet. Danach erfolgte die atriale Differenzierung von PITX2-Knockout- (PITX2<sup>-/-</sup>) und isogener Kontrollzelllinie. Nach erfolgreicher Differenzierung zu hiPSC-aCM wurde aus beiden Zelltypen atriales EHT (aEHT) hergestellt. Nach erfolgreicher EHT-Herstellung erfolgte die funktionelle und elektrophysiologische „in-vitro“ Charakterisierung. Parallel erfolgte die Analyse der Genexpression beider aEHT-Typen. Ein schematischer Überblick zum Ablauf dieser Arbeit ist in **Abbildung 1.6** dargestellt.



**Abbildung 1.6: Schematischer Ablauf der Arbeit.**

Homozygoter PITX2-Knockout (PITX2<sup>-/-</sup>) in einer gesunden Kontrollzelllinie (isogene Kontrolle) mittels CRISPR/Cas9. Anschließend erfolgte die atriale Differenzierung beider hiPS-Zelllinien nach Spinner-Protokoll und die Zugabe von Retinolsäure (RA). Die entstandenen Kardiomyozyten (hiPSC-aCM) wurden in aEHT (atrialem „Engineered Heart Tissue“) kultiviert, anschließend elektrophysiologisch charakterisiert (u.a. scharfe Mikroelektrode) und auf ihre Genexpression untersucht.

## 2. Materialien und Methoden

Ein detaillierter Überblick der Materialien, Medien, Chemikalien und technischen Geräte, die in dieser Arbeit verwendet worden sind, ist dem Anhang zu entnehmen. Die Durchführung der PITX2-Knockout-Experimente erfolgte nach Schulz et al. (2023).

Diese Arbeit folgt den ethischen Richtlinien der Deklaration von Helsinki. Alle durchgeführten Methoden zur Etablierung der Zelllinien wurden durch die lokale Ethikkommission von Hamburg genehmigt (Az PV4798, 28.10.2014).

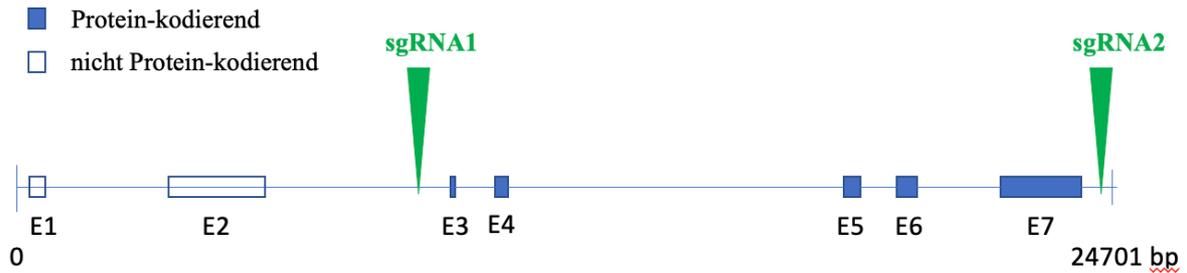
### 2.1 Zellkultur der hiPSC

Zur Etablierung einer hauseigenen Kontrollzelllinie ERC001 wurde einer gesunden Probandin eine Hautbiopsie entnommen. Anschließend erfolgte die Reprogrammierung und Pluripotenz-Induktion der Fibroblasten mittels Sendai-Virus und „CytoTune Reprogramming Kit“ (Life Technologies). Die Expansion der Kontrollzelllinie ERC001 erfolgte nach Breckwoldt et al. (2017) durch Thomas Schulze und Birgit Klampe (beide Mitarbeiter des Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, IEPT). Die Zellkultur erfolgte unter Hypoxie in Geltrex-behandelten (1:200 in DMEM, 1 ml/ 10 cm<sup>2</sup>) 6-Well-Platten und T75-Flaschen. Das Passagieren der hiPSC erfolgte mittels Accutase (Sigma-Aldrich, mit 1 µmol/l Y-27632).

### 2.2 Herstellung einer PITX2-Knockout-Zelllinie

#### 2.2.1 Knockout Strategie

Das Ziel der Knockout-Strategie war es, den gesamten Protein-kodierenden Anteil des PITX2-Gens auszuschneiden (Schulz et al., 2023). Eine Übersicht zu den Exons des PITX2-Gens und den Schnittstellen der Cas9-Enzyme ist in **Abbildung 2.1** dargestellt. Die Planung des homozygoten PITX2-Knockouts erfolgte mit Hilfe des öffentlich zugänglichen Programms „CRISPOR.org“ (Concordet und Haeussler, 2018). Die Sequenzen beider „single guide RNAs“ (sgRNA) sind im Anhang aufgeführt (**Tabelle S15**). Die Auswahl der sgRNAs erfolgte anhand ihres möglichst geringen Off-Target-Scores. Die zehn wahrscheinlichsten Off-Targets (OT) wurden für beide sgRNAs bestimmt. Nach der Auswahl der sgRNAs erfolgte die Herstellung und Lieferung durch IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA).



**Abbildung 2.1: Strategie des PITX2-Knockouts.**

Es sind die Exons E1-E7 des PITX2-Gens dargestellt. Ausschließlich die Exons E3-E7 (blau) kodieren für die Aminosäure-Sequenz des PITX2-Proteins, Exons E1 und E2 sind (weiß) nicht-kodierende Exons. Die grünen Pfeile zeigen die Schnittstellen der CRISPR/Cas9-Enzyme (sgRNA1 und sgRNA2). Abbildung verändert nach Schulz et al. (2023).

### 2.2.2 Durchführung des PITX2-Knockout-Experiments

Für die Durchführung des PITX2-Knockout-Experiments wurde die hauseigene Kontrollzelllinie ERC001 verwendet (Schulz et al., 2023). Diese diente gleichzeitig als isogene Kontrolle. Vor dem Beginn der CRISPR/ Cas9-Behandlung erfolgte die Karyotypisierung (Nanostring, siehe **Kapitel 2.5.4**) und Pluripotenz-Kontrolle (SSEA3-FACS, siehe **Kapitel 2.5.6**). Zusätzlich wurden die sgRNA-Bindungsstellen vor Beginn des Knockout-Experiments sequenziert, um mögliche SNPs in diesen Bereichen ausschließen zu können. Nach Abschluss der Voruntersuchungen wurden die Zellen im 6-Well-Format ausgesät und über mehrere Tage kultiviert. Am Tag des CRISPR/Cas9-Experiments wurden die hiPSC für eine Stunde mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 (1  $\mu\text{mol/l}$ ) vorbehandelt. Anschließend erfolgte das zweimalige Waschen mit PBS und das Ablösen mittels Accutase. Nach dem Zählen wurde eine Zellanzahl von ca. 800.000 hiPSC (ERC001) für die CRISPR-Cas9-Behandlung separiert und in eine Nukleofektionsküvette transferiert. Die Nukleofektion erfolgte mit einem „Aaxa Nucleofector“ (Lonza, Basel, Schweiz). Die beiden sgRNAs wurden auf die Zielkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  verdünnt und anschließend dem Zell-Mix hinzugefügt. Nach der Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  mTeSR Plus-Medium (STEMCELL Technologies) auf die Zellen wurden diese auf eine 24-Well-Platte überführt und über Nacht inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>). Ab dem nächsten Tag wurde das Kultur-Medium (mTesR Plus) täglich gewechselt, bis das „Well“ ausreichend dicht bewachsen war. Als nächster Schritt wurden die Zellen im 6-Well-Format als Einzelzellen ausgesät, um Einzelzellkolonien zu erhalten. Nach ca. 7-9 Tagen waren einzelne Kolonien gut voneinander abgrenzbar und es erfolgte das „Picken“ einzelner CRISPR-Klone.

### 2.2.3 Auswahl der Klone

Vor Beginn der Klon-Auswahl erfolgte die Vorbehandlung mit Y-27632 (1  $\mu\text{mol/l}$ ) für eine Stunde. Anschließend erfolgte das Picken einzelner Kolonien unter dem Mikroskop (10x-

Vergrößerung). Jede ausgewählte Kolonie wurde einem „Well“ einer 48-Well-Platte zugeordnet und entsprechend nummeriert. Für die Analyse des Genotyps der verschiedenen Kolonien wurden identische 48-Well-Platten erstellt („copy plates“): Die Zellen der ersten Platte wurden mittels EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, SigmaAldrich) abgelöst und jedes Well separat bei -150°C eingefroren. Die zweite Platte wurde für die DNA-Extraktion (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen) genutzt. Nach abgeschlossener Genotyp-Analyse der gepickten Klone konnten somit die homozygoten PITX2-Knockout-Klone zielgerichtet aufgetaut werden.

#### 2.2.4 Analyse der Klone

Die Analyse der gepickten Klone erfolgte mittels PCR und nachfolgender DNA-Sequenzierung. Dafür wurde die neue Gen-Sequenz, welche nach der CRISPR/ Cas9-Modifikation entstehen würde, mittels „SnapGene“ (SnapGene, Version 5.1.2, GSLBiotech LLC, San Diego, CA, USA) bestimmt. Anschließend erfolgte das Design der internen und externen Primer-Paare nach folgendem Prinzip: Die externen Primer wurden so gewählt, dass sie die Ränder der Knockoutregion genau abbilden und bei erfolgreichem Knockout ein PCR-Produkt ergeben würden. Im Gegensatz dazu fungierten die internen Primer als Negativkontrolle, weil sich das interne PCR-Produkt innerhalb der Knockoutregion befinden würde. Somit käme es bei erfolgreichem homozygoten Knockout zu keiner Amplifikation des internen PCR-Produkts. Das Design der externen und internen Primer erfolgte mit Hilfe des Programms „PrimerBLAST“ (Jian Ye et al., 2012). Die entstandenen PCR-Produkte wurden für jeden Klon auf Agarose-Gel (1%) aufgetragen und mit Hilfe des ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) detektiert.

Zur Bestätigung des homozygoten PITX2-Knockouts (PITX2<sup>-/-</sup>) erfolgte für jeden potenziell homozygoten Klon die Sequenzierung des externen PCR-Produkts (DNA-Sequenzierung; Eurofins Genomics Germany). Nach bestätigtem Knockout erfolgte die Auswahl des Klons „3B7“ für die Master- und Working-Cell-Bank.

Für diesen Klon wurden alle OT mittels PCR und anschließender Sequenzierung analysiert. Alle dafür verwendeten Primer und weitere Informationen zum amplifizierten PCR-Produkt sind dem Anhang (**Tabelle S16** und **S17**) zu entnehmen.

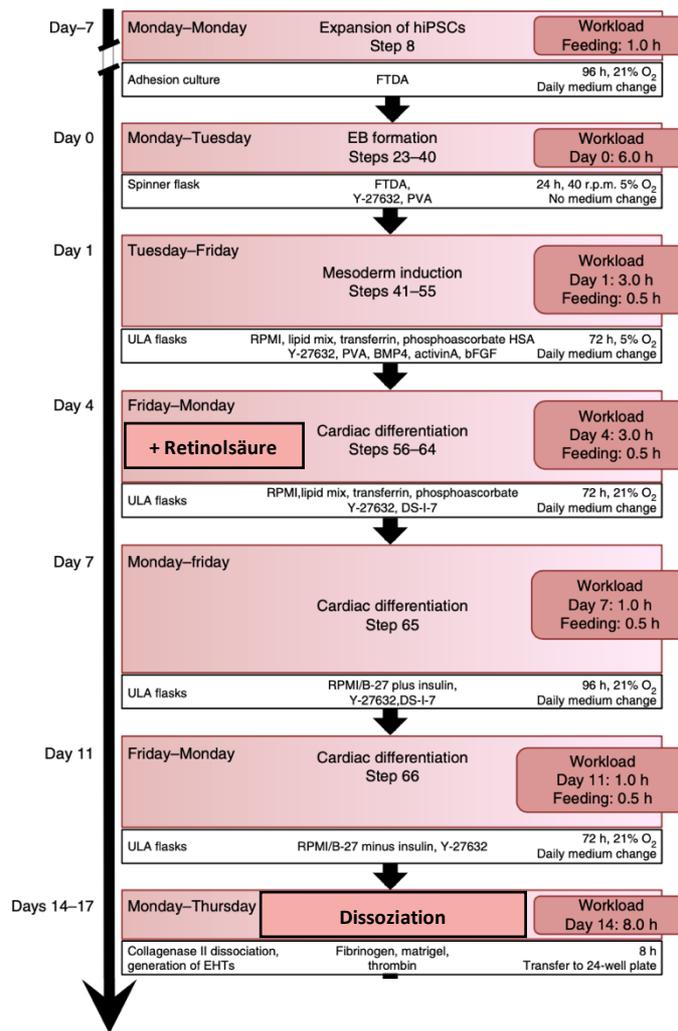
#### 2.2.5 Etablierung einer Master- und Working-Cell-Bank

Für den ausgewählten PITX2<sup>-/-</sup>-hiPSC-Klon erfolgten Pluripotenz-Analyse (SSEA3-FACS) und Karyotypisierung. Anschließend erfolgte die Umstellung des Zellmediums von mTeSR plus auf FTDA (siehe Anhang, **Tabelle S4**). Nach erfolgreicher Expansion von Klon 3B7 wurde dieser in Kryo-Röhrchen für die Master- (8 mal 1 Mio. Zellen, Passage 34) und Working-Cell-Bank (10 mal 2 Mio. Zellen, Passage 36) bei -150 °C eingefroren.

### 2.3 Atriale Differenzierung der hiPSC

Die genaue Zusammensetzung der Zellkulturmedien für die Differenzierungsschritte und Informationen zu Wachstumsfaktoren und Zellkulturmaterialien sind dem Anhang zu entnehmen (**Tabelle S1-S10**).

Die isogene Kontrollzelllinie ERC001 und die daraus hervorgegangene homozygote PITX2-Knockout-Zelllinie (PITX2<sup>-/-</sup>) wurden nach einem am IEPT etablierten Protokoll (Lemme et al., 2018) zu atrialen Kardiomyozyten differenziert. Der schematische Ablauf der Differenzierungsschritte ist in **Abbildung 2.2** dargestellt. Vor Beginn der Differenzierung erfolgte die Expansion der hiPSC nach bekanntem Protokoll (Breckwoldt et al. 2017) in T75-Flaschen und FTDA-Medium. Zu Beginn der Differenzierung wurden die hiPSC mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 (1 µmol/l) vorbehandelt. In einem ersten Schritt („Stage 0“) erfolgte das Ablösen der Zellen durch den Entzug von Ca<sup>2+</sup>-Ionen mittels EDTA, die Bestimmung der Zellmenge, die Zugabe des Stage 0-Mediums (siehe Anhang, **Tabelle S5**) und der Transfer in Spinner-Flaschen (30 Mio. Zellen pro 100 ml Stage 0-Medium). Anschließend wurden die hiPSC über Nacht unter hypoxischen Bedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>) in den Spinnerflaschen inkubiert. Unterhalb der Spinner-Flasche befand sich ein Magnetrührer, der eine kontinuierliche Zirkulation des Rührkolbens innerhalb der Spinnerflasche erzeugte, wodurch sich aus den hiPSC über Nacht Embryoidkörperchen („embryoid bodies“, EB) bildeten. Am nächsten Tag (Stage 1) wurde das Stage 0-Medium ausgewaschen und mit Hilfe eines „Red-Tubes“ das EB-Volumen abgeschätzt. Danach wurden die EBs aus den Spinner-Flaschen in T175-Flaschen überführt (200-250 µl EB-Volumen pro T175-Flasche) und das Stage 1-Medium (siehe Anhang, **Tabelle S6**) hinzugefügt, um die mesodermale Differenzierung zu starten. Für die mesodermale Induktion wurden dem Stage 1-Medium BMP-4 (10 ng/ml), Activin A (3 ng/ml) und bFGF (5 ng/ml) hinzugefügt. Ab diesem Zeitpunkt fanden alle weiteren Differenzierungsschritte in T175-Flaschen und Suspensionskultur statt. Während der nächsten drei Tage erfolgte der tägliche Mediumwechsel.



**Abbildung 2.2: Schematischer Überblick der atrialen Differenzierung.**

Beschreibung von Arbeitsschritten, Zeitplan und Differenzierungsmedien. Für die Induktion des atrialen Phänotyps zu Beginn der kardialen Differenzierung erfolgte die Zugabe von Retinolsäure (RA). Veränderte Abbildung nach (Breckwoldt et al., 2017).

Am vierten Tag startete die kardiale Differenzierung. Dazu wurde das alte Stage 1-Medium vollständig abgesaugt, das EB-Volumen erneut bestimmt und anschließend die EBs in neuer Volumenkonzentration (175-200 µl pro T175-Flasche) auf T175-Flaschen aufgeteilt. Dem neuen Differenzierungsmedium „FDM“ (siehe Anhang, **Tabelle S7**) wurde nach Lemme et al. (2018) Retinolsäure (RA; 1 µmol/l) hinzugefügt, um die kardiale Differenzierung in Richtung des atrialen Phänotyps zu starten. Dabei war es besonders wichtig darauf zu achten, dass die RA-Lösung nicht steril-filtrierte wurde. Durch die Steril-Filtration der RA-Lösung ist in der Vergangenheit vermutlich die gewünschte Wirkung auf die atriale Differenzierung abgeschwächt worden (Schulz et al., 2023). Zusätzlich wurde während der RA-Zugabe das Licht im Labor und in der sterilen Werkbank gedimmt, um eine Beschädigung der lichtempfindlichen RA zu minimieren. Anschließend wurden

die EBs nach der RA-Zugabe zwei Tage in Normoxie ohne Mediumwechsel inkubiert. Am Tag acht der Differenzierung erfolgte die Umstellung des Differenzierungsmediums auf Stage 2-Medium (siehe Anhang, **Tabelle S8**) mit Insulin (2% vol) und dem WNT-Signal-Inhibitor XAV939 (1  $\mu\text{mol/l}$ ; Breckwoldt et al., 2017). An den darauffolgenden vier Tagen wurde das Medium täglich gewechselt. Am zwölften Tag erfolgte der letzte Wechsel des Differenzierungsmediums auf RDM (siehe Anhang, **Tabelle S9**). Während der darauffolgenden Tage wurde Morphologie der EBs und das Auftreten spontaner Kontraktionen täglich kontrolliert, um den bestmöglichen Zeitpunkt der Dissoziation zu bestimmen. Zwischen Tag 18 und 28 wurden die EBs mit Kollagenase II (200 U/L, Worthington, LS004176 in „Hank’s balanced salt solution minus  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$ “, Gibco) enzymatisch in einzelne Kardiomyozyten dissoziiert und anschließend die Zellanzahl bestimmt. Jeweils 5-20 Millionen hiPSC-aCM wurden in 1 ml „Freezing-Medium“ (10% DMSO, 90% inaktiviertes Fetales Kälberserum, FCS) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

## 2.4 Atriales „Engineered Heart Tissue“ (aEHT)

### 2.4.1 Herstellung der aEHTs

Für die Herstellung von aEHT wurden die dafür benötigten hiPSC-aCM aus der Tiefkühltruhe ( $-150^{\circ}\text{C}$ ) entnommen und im Wärmebad bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgetaut, bis nur noch ein kleines Eispellet zu sehen war. Anschließend erfolgte die langsame und schrittweise Zugabe von 10 ml DMEM mit 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco), um das toxische Freezing-Medium zu verdünnen und den osmotischen Stress auf die Zellen möglichst gering zu halten. Nach der Zugabe des Mediums wurde die Anzahl vitaler Zellen bestimmt (Neubauer-Zählkammer, Karl-Hecht KG, Sondheim vor der Rhön, Deutschland; Trypitanblau, Biochrom) und die Zellsuspension bei  $100\text{ g}$  für 10 Minuten zentrifugiert ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Nach der Zentrifugation wurden die hiPSC-CM im für den Master-Mix (MM) benötigten Volumen NKM-Medium aufgenommen und die weiteren Bestandteile des MM (**Tabelle 1.1**) wurden hinzugefügt. Die Zusammensetzung des MM und die weiteren Schritte der EHT-Herstellung erfolgten wie zuvor beschrieben (Breckwoldt et al., 2017; Hansen et al., 2010; Schaaf et al., 2011).

### Tabelle 1.1: Master-Mix zur Herstellung atrialer EHTs.

Die Zusammensetzung des Master-Mix (MM) zur Herstellung eines aEHT. Die Thrombin-Aliquots wurden unabhängig von den anderen Bestandteilen hergestellt und dienten später während der aEHT-Herstellung als Gefäß zum Mischen des MM mit Thrombin. Bei Berechnung des benötigten MM-Volumens mussten zusätzlich 10% Pipettierfehler berücksichtigt werden.

Bestandteil	Menge für 1 EHT
Zellen (hiPSC-aCM)	0,8 – 1 x 10 <sup>6</sup>
2xDMEM	5,6 µl
Y-27632	0,1 µl
Fibrinogen	2,5 µl
NKM	91,8 µl
Thrombin	3 µl (in Aliquots)

Die Ausbildung der aEHTs erfolgte in definierten Mulden, welche mittels Agarose (1%) und „Polytetrafluorethylen-Spacer“ (PTFE-Spacer, EHT Technologies) gebildet wurden. Dazu wurden 1,5 ml Agarose in jedes Well einer 24-Well-Platte gegeben und danach die „Spacer“ eingesetzt. Nach vollständiger Aushärtung der Agarose (10-15 min) wurden die „Spacer“ vorsichtig entfernt und „Silikon-Post-Racks“ (Spezialanfertigung) eingesetzt. In jeder Mulde mit „Silikon-Posts“ wurde im Anschluss der MM nach dem folgendem Prinzip hinzugefügt: 100 µl MM wurden mit 3 µl Thrombin in einem 200 µl-Eppendorf-Röhrchen vermischt und direkt danach zügig in die Formen pipettiert, um ein Verklumpen der Lösung in der Pipettenspitze zu verhindern. Nach jeder Zugabe wurde die 24-Well-Platte kreuzförmig geschwenkt und leicht auf den Boden geklopft, um eine optimale Verteilung des Thrombin-Fibrinogen-Mix in der Agarose-Form zu ermöglichen. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation für 1,5 h (37 °C, 7% CO<sub>2</sub>, 40% O<sub>2</sub>, 98% Feuchtigkeit), um die EHT-spezifische Fibrin-Matrix zwischen den Posts auszubilden. Zehn Minuten vor Ende der Inkubation wurden jedem „Well“ 500 µl frisches EHT-Medium hinzugefügt, um das Lösen und Herausnehmen der neu geformten aEHTs zu erleichtern. Danach erfolgte die Überführung der aEHTs in eine neue 24-Well-Platte mit frischem EHT-Medium.

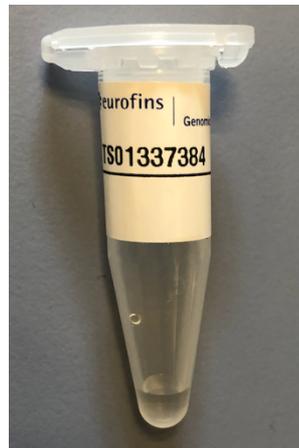
#### 2.4.2 aEHT-Kultur

Die EHT-Kultur erfolgte nach Breckwoldt et al. (2017) mit dem Wechsel des EHT-Mediums (siehe Anhang, **Tabelle S10**) jeweils am Montag, Mittwoch und Freitag (Inkubation bei 37 °C, 7% CO<sub>2</sub>, 40% O<sub>2</sub>, 98% Feuchtigkeit). Bei fortgeschrittenem „Remodeling“ und sehr dünnem Durchmesser der EHTs wurde dem EHT-Medium Tranexamsäure (Stammlösung 80 mmol/l, Verdünnung: 1:400, Sigma-Aldrich) hinzugesetzt. Zusätzlich erfolgte eine tägliche Evaluation der EHT-Morphologie und Farbe des Kulturmediums, um mögliche Kontaminationen frühzeitig zu erkennen.

## 2.5 Molekulargenetische Untersuchungen

### 2.5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Alle PCR-Ansätze zur Untersuchung der CRISPR/Cas9-behandelten Klone, zur „Off-Target“-Analyse und zur Genotyp-Kontrolle vor jedem Differenzierungslauf wurden mit Ampli-Taq Gold (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt (Schulz et al., 2023). Die Extraktion der DNA erfolgte mittels DNeasy-Kit (Qiagen) nach vorgegebenem Protokoll. Anschließend wurde die DNA-Qualität und -Konzentration mit Hilfe des „Nanodrop“ (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes (50 µl) ist beispielhaft im Anhang (**Tabelle S18**) aufgeführt. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf ein 1%-Agarose-Gel (mit Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich) aufgetragen, in der Gelkammer für ca. 30 Minuten bei 120 V laufen gelassen und anschließend am „ChemiDoc Imaging System“ (Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland) visualisiert.



**Abbildung 2.3: Sequenzierungsprobe.**

15 µl PCR-Produkt wurden inklusive eines der beiden Primer an Eurofins Genomics Germany (Ebersberg, Deutschland) geschickt. Jedes der 1,5 ml „Eppendorf-Röhrchen“ wurde mit einem Etikett inklusive der individuellen Probennummer beklebt, sodass das sequenzierte PCR-Produkt eindeutig zugeordnet werden konnte.

### 2.5.2 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte wurde ausschließlich durch das externe Unternehmen Eurofins Genomics Germany (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden 15 µl des PCR-Substrates und 15 µl des „Forward-Primers“ in separaten 1,5 ml „Eppendorf-Röhrchen“ an Eurofins geschickt (**Abbildung 2.3**). Das Sequenzierungsergebnis konnte nach ca. einer Woche unter der individuellen Probennummer auf der Eurofins-Internetseite runtergeladen werden.

### 2.5.3 Analyse der Genexpression mit RT-qPCR

Die Quantifizierung der Genexpression in den PITX2-Knockout-Zellen und der isogenen Kontrolle erfolgte mittels quantitativer „real-time“ PCR (RT-qPCR). Alle RT-qPCR-Experimente wurden durch Frau Anna Steenpaß (Mitarbeiterin des IEPT) durchgeführt (Schulz et al., 2023). Die dafür verwendeten aEHTs (eingefroren in Flüssigstickstoff und Lagerung bei -80 °C) wurden zuerst aufgetaut und mit Proteinase K (Thermo Fisher Scientific) vorverdaut, um eine besser mRNA-Ausbeute zu erzielen. Anschließend wurde die RNA mittels „RNeasy Kit“ (Qiagen) nach vorgegebener Anleitung aus den vorverdauten aEHTs gewonnen. Die Synthese der komplementären DNA (cDNA) erfolgte mit 200 µg mRNA pro Ansatz und wurde mit dem „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Durchführung der RT-qPCR erfolgte mit dem Gerät „ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System“ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) unter Verwendung des „Maxima SYBR Green/ROX“ -Kits (Thermo Fisher Scientific).

Jede qPCR wurde als dreifacher Ansatz durchgeführt und die Werte anschließend gemittelt. Für jeden Ansatz wurde eine Wasserprobe als Negativkontrolle benutzt. Für die Durchführung der RT-qPCR wurden folgende Parameter für einen Zyklus verwendet: 2 min 50 °C, 10 min 95 °C, 15 s 95 °C und 1 min 60 °C, jeder Parameter für 40 Zyklen. Die „Cycle thresholds“ (Ct-Werte) jedes analysierten Gens wurden mit den Ct-Werten des „Housekeeping“-Gens *GUSB* (β-Glucuronidase) normalisiert und anschließend die relative Genexpression mittels  $\Delta\Delta C_t$ -Methode bestimmt. Zur Überprüfung des atrialen Phänotyps erfolgte die Quantifizierung folgender Gene (Lemme et al 2018): atriale (MLC2A) und ventrikuläre Isoform (MLC2V) der regulatorischen Myosin-Leichtkette. Zur Überprüfung des Knockouts erfolgte außerdem die Bestimmung der PITX2-mRNA-Expression. Die Qualitätskontrolle der atrialen Differenzierung erfolgte für PITX2<sup>-/-</sup> und Kontrolle-Zelllinie nach jedem Differenzierungslauf. Die RT-qPCR für PITX2 wurde nach jeder Differenzierung des Knockout-Klons durchgeführt. Die verwendeten qPCR-Primer sind in **Tabelle 1.2** dargestellt.

**Tabelle 1.2: Primer und Primereigenschaften.**

Primersequenzen, Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>), Produktgröße und Genlokus für die Gene Gusb, MLC2A, MLC2V und PITX2. Die Auswahl der Primer für die RT-qPCR erfolgte nach Lemme et al. (2018).

Gen	Primer Forward Primer Reverse	T <sub>m</sub> (°C)	Produktgröße (bp)	Genlokus
Gusb	AAACGATTGCAGGGTTTCAC CTCTCGTCGGTGACTGTTCA	57,21 59,41	171	Chr2: 140043116- 142302796
MLC2A	CACCGTCTTCCTCACACTCTT AGGCACTCAGGATGGCTTC	59,66 59,39	71	Chr7: 44138614- 44141608
MLC2V	GATGTTGCGCCGCTTCCCCGC GCAGCGAGCCCCCTCCTAGT	68,75 66,01	106	Chr12: 110909841- 110921578
PITX2	AGCCATTCTTGCATAGCTCG GTGTGGACCAACCTTACGGA	58,41 59,61	109	Chr4: 110615342- 110640316

#### 2.5.4 Karyotypisierung

Die Karyotypisierung von PITX2<sup>-/-</sup> und isogener Kontrolle erfolgte mittels Nanostring (nCounter DNA CodeSet, HuV1 Karyotype CSO, NanoString Technologies) und wurde von Elisabeth Krämer (Mitarbeiterin des IEPT) am Gerät „nCounter SPRINT“ (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) durchgeführt (Schulz et al., 2023).

#### 2.5.5 Western Blot

Für die Untersuchung der PITX2-Proteinexpression mittels Western Blot wurden ausschließlich aEHTs verwendet, welche in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert wurden. Als Positivkontrolle zum PITX2-Nachweis diente menschliches linkes Vorhofgewebe („Herzohr“), welches während herzchirurgischer Eingriffe entnommen worden war. Zur Herstellung eines Protein-Lysats wurden die aEHTs in 100 µl „Tissue Protein Extraction Reagent“ (Thermo Fisher Scientific) und „cComplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail“ (Roche Diagnostics) aufgelöst und 1x-Laemmli Puffer (Tris-Glycin-Puffer, siehe Anhang **Tabelle S3**) hinzugefügt. Danach wurde der Lysat-Mix auf 95 °C für 5 Minuten erhitzt und anschließend mit Hilfe von Acrylamid/Bisacrylamid (12%, 29:1, BioRad Laboratories) aufgetrennt. Die Durchführung der Western Blots erfolgte mit Nitrozellulose- oder Polyvinyliden-Membranen, TBS-Tween (0,1%) zum Waschen und 5% Magermilchpulver als „Blocking-Puffer“. Nach dem Auftragen der Proteinproben auf die Membran erfolgte die Zugabe der primären Antikörper in TBS-Tween

(0,1%), welche für ca. 12-24 Stunden inkubierten (4 °C). Ein weiterer Inkubationsschritt für ca. 1 Stunde erfolgte nach Zugabe des sekundären Antikörpers. Die entsprechenden Banden wurden mit dem „ChemiDoc Imaging System“ (BioRad, Feldkirchen, Deutschland) dargestellt. Weitere Informationen zu den verwendeten Antikörpern sind dem Anhang zu entnehmen (**Tabelle S19** und **S20**, Schulz et al., 2023).

#### 2.5.6 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Pluripotenzbestimmung der hiPSC vor Differenzierungsbeginn erfolgte mittels Durchflusszytometrie (FACS; Schulz et al., 2023). Für die Pluripotenzkontrolle wurde die Expression des „Stage specific embryonic antigen 3“ (SSEA-3) untersucht. Dafür wurden ca. 500.000 hiPSC während der klonalen Expansionsphase für die FACS-Untersuchung entnommen. Die Zusammensetzung und Zugabe der FACS-Puffer, die Antikörper-Färbung und FACS-Durchführung erfolgte nach Breckwoltd et al. (2017). Alle FACS-Untersuchungen wurden am „FACSCanto II“-Gerät (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) durchgeführt. Die Bestimmung der SSEA-positiven hiPSCs erfolgte mit entsprechender Iso-Kontrolle.

#### 2.5.7 RNA-Sequenzierung

Die Durchführung der RNA-Sequenzierung erfolgte durch die „Core Facility Genomics“ in Münster (Medizinische Fakultät, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Deutschland). Die RNA wurde mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) aus gefrorenen aEHTs (Lagerung bei -80 °C) isoliert. Es wurden jeweils 3 aEHTs aus verschiedenen Differenzierungsläufen (Batch) pro Zelllinie untersucht (Batch 1-3 für isogene Kontrolle und PITX2<sup>-/-</sup>). Die Analyse der RNA-Qualität erfolgte mittels Agilent TapeStation 4200 (RIN value check). Nach der RNA-Polyadenylierung (NEBNext Poly(A) magnetic isolation module (NEB)) erfolgte die Vorbereitung der RNA für den Sequenzierungsanalyse mittels NEBNext Ultra II directional RNA Library Preparation (NEB). Nach einer erneuten Bestimmung der RNA-Qualität (Agilent TapeStation 4200) erfolgte die Messung der RNA-Konzentration (NEBNext Library Quant for Illumina, NEB) und anschließend wurde die Sequenzierung der äquimolaren RNA-Proben durchgeführt („Single Read Mode“, 72 Zyklen, NextSeq2000 System, Illumina; Schulz et al., 2023).

#### 2.5.8 Massenspektrometrie

Die Bestimmung der RA-Konzentration in den RA-Stammlösungen für die atriale Differenzierung erfolgte mittels Massenspektrometrie (LC-MS/MS) nach Morgenstern et al. (2021). Die RA-Stammlösung und der interne Standard (all-trans Retinolsäure -D5, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) wurden in DMSO gelöst (1 mg/ml). Die Kalibrierungskurven wurden von 10 ng/ml bis 1000 ng/ml in 5 Stufen durchgeführt. 20 µl der RA-Stammlösung bzw. der Kalibrierungs-Lösung wurden in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gefüllt und 20 µl des internen Standards (1000 ng/ml)

wurden hinzugefügt. Nach der Zugabe von 200 µl Acetonitril erfolgte die Zentrifugation für 10 Minuten bei 13.000 rpm. Danach wurden 100 µl des Überstands in eine 96-Well-Platte überführt. Die LC wurde nach folgendem Gradienten durchgeführt: 0,8 ml/min 25/75% (vol/vol%), A (0,1% Ameisensäure) und B (Acetonitril/Methanol, 50/50), auf 2/98% über einen Zeitraum von 170 Sekunden auf einer Luna™-Säule (5 µm C18 50x2,0 mm 100 A, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland). Die Analyse erfolgte mit einem Varian 1200 TSQ („positive electrospray ionisation mode“, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Die Konzentrationen von RA-Stammlösung und internem Standard wurden mit Hilfe des Maximum-Flächen-Verhältnis von Kalibrierungslösung und Probe berechnet.

## 2.6 Pharmaka

Die Substanzen 4-Aminopyridin (4-AP) und Carbachol (CCh) wurden beide bei Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bestellt. Zur Herstellung der 4-AP-Stammlösung (1 mol/l, Lagerung bei 4 °C) wurde die Substanz in Tyrode's-Lösung aufgelöst und anschließend wurde der pH-Wert auf 7,4 mit Salzsäure eingestellt. CCh wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich) gelöst und die CCh-Stammlösung (100 mmol/l) bei -20 °C gelagert. Alle Stammlösungen wurden vor den Experimenten exakt auf die gewünschte Zielkonzentration verdünnt (Schulz et al. 2023).

## 2.7 Aktionspotenzialmessung

Eine Übersicht der verwendeten elektrophysiologischen Geräte (**Tabelle S12**) und Laborsoftware (**Tabelle S21**) ist dem Anhang zu entnehmen. Die AP-Messungen erfolgten nach Schulz et al. 2023.

### 2.7.1 Grundprinzip der Messung

Bei der AP-Messung wird eine scharfe Mikroelektrode in das Gewebe eingestochen. Dabei gelangt das Ende der scharfen Glaspipette durch geringfügige Schädigung der Zellmembran in den Intrazellularraum. Die mit Kaliumchlorid (KCl, 2 mol/l) gefüllte Glaspipette ist über einen Silberchlorid-Draht mit einem Verstärker elektrisch leitend verbunden, sodass Potenzialänderungen abgeleitet werden können. Um die Potenzialänderungen quantifizieren zu können, wird an die Elektrode eine solch große elektrische Spannung angelegt, dass kein Strom fließen kann. Diese Anordnung folgt dem Prinzip der Stromklemme (Sonderfall:  $I=0$ ). Somit kann über die angelegte Spannung die intrazelluläre Potenzialänderung bestimmt werden (Hodgkin und Huxley, 1939). Die gemessenen sehr kleinen Spannungen werden über einen unmittelbar mit der Mikroelektrode verbundenen Vorverstärker an einen weiteren Verstärker weitergeleitet. Anschließend wird das Signal mit einer Abtastrate von 10 KHz digitalisiert und mittels einer Analyse-Software aufgezeichnet.



**Abbildung 2.4: Elektrophysiologischer Messstand.**

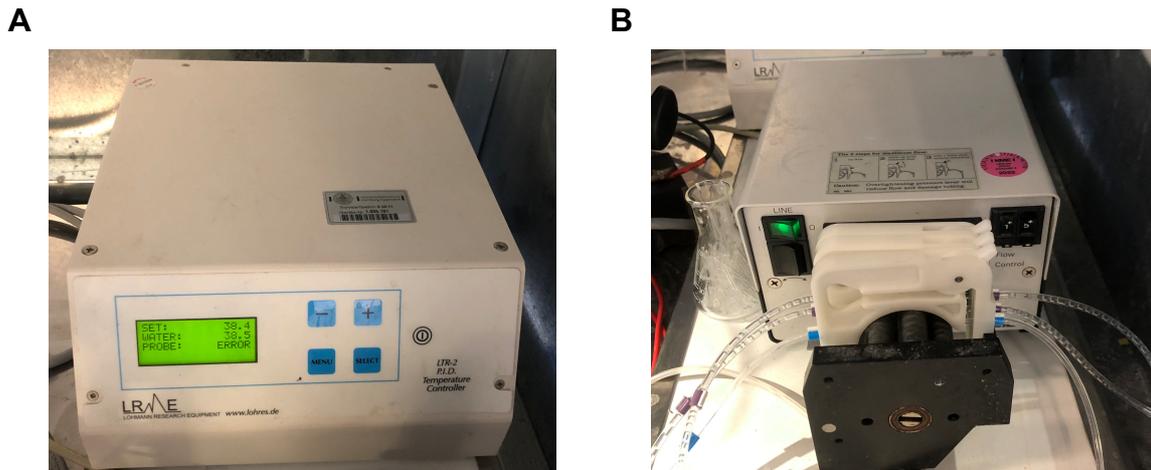
Ein Faraday-Käfig umgibt den Aufbau der elektrophysiologischen Geräte, um schwankende elektromagnetische Einflüsse auf die AP-Messungen abzuschirmen. Neben dem Versuchsaufbau befindet sich ein Computer mit einer Analyse-Software, sodass gemessene AP aufgezeichnet und umgehend ausgewertet werden können.

### 2.7.2 Messkammer

Zur AP-Messung wurden die aEHTs mit kleinen Nadeln am Boden der Silikon-Messkammer (Lohmann Research, Dortmund, Deutschland; **Abbildung 2.6**) fixiert. Dabei war es hilfreich, das EHT in „aufrechter“ Position in der Kammer zu fixieren, um das Einstechen mit der Mikroelektrode zu erleichtern. Die Spitze der Mikroelektrode lässt sich selbst durch das Mikroskop kaum erkennen. Bei einem „aufrecht“ positionierten aEHT ist jedoch das Risiko, am Gewebe vorbeizustechen, deutlich geringer, da die schräg nach hinten stehende Pipettenspitze beim Absenken scheinbar nach oben gleitet. Innerhalb der Kammer befand sich eine eingeklebte Grundelektrode aus gepresstem Graphit. Bei sehr starken Kontraktionen der aEHTs wurden zusätzliche Nadeln zur Fixierung verwendet. Dadurch konnten Kontraktionsartefakte während der AP-Messung auf ein Minimum reduziert werden. Von der rechten Unterseite aus wurde der Kammer kontinuierlich Tyrode's-Lösung zugeführt und über eine Absaugung am Oberrand der Kammer wieder entnommen.

### 2.7.3 Badlösung, Wasserbad, Schlauchsystem und Rollenpumpe

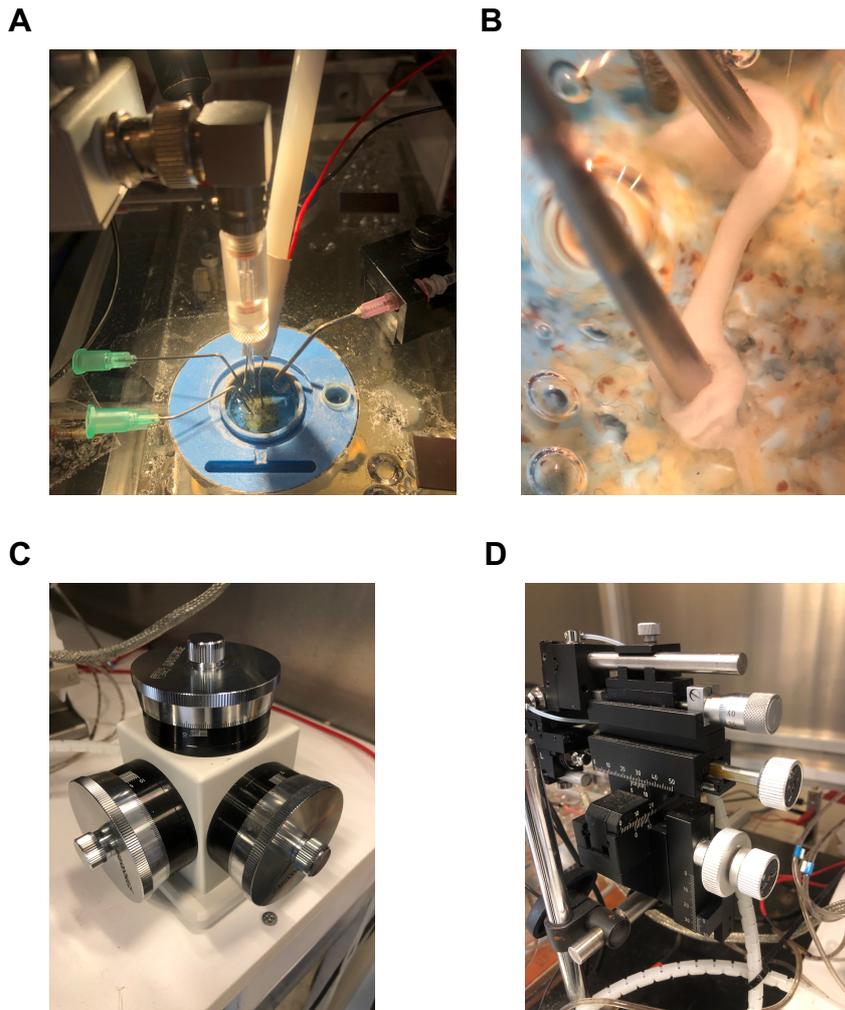
Unterhalb der Messkammer wurde über eine Heizung (37 °C; Lohmann Research Equipment LTR-2 P.I.D. Temperature Controller, Dortmund, Deutschland; **Abbildung 2.5**) ein Wasserbad konstant auf 37 °C erwärmt. Durch dieses Wasserbad konnte die Temperatur der Tyrode's -Lösung (siehe Anhang, **Tabelle S3**), welche dem Gewebe zugeführt wurde, konstant auf einer bestimmten Temperatur gehalten werden. Somit wurden Einflüsse einer schwankenden Temperatur auf die AP-Form verringert.



**Abbildung 2.5: Elektrophysiologische Geräte I.**

Die Heizkammer (A) erwärmt das Wasserbad unterhalb der Messkammer. Durch das erwärmte Wasserbad pumpt die Rollenpumpe (B) die Badlösung in die Messkammer. Somit werden schwankende Temperatureinflüsse auf die AP-Messung minimiert.

Für den Pumpvorgang wurde eine Rollenpumpe (Ismatec Rolling Pump, Wertheim, Deutschland; **Abbildung 2.5**) verwendet. Die abgesaugte Badlösung wurde entweder in das Reservoir zurückgeleitet oder konnte in ein weiteres Gefäß entsorgt werden, um das Präparat evtl. auszuwaschen. Der pH-Wert der Badlösung wurde über den Bikarbonat-Puffer der Tyrode's-Lösung und Begasung mit Carbogen (Gasgemisch: 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>) konstant gehalten.



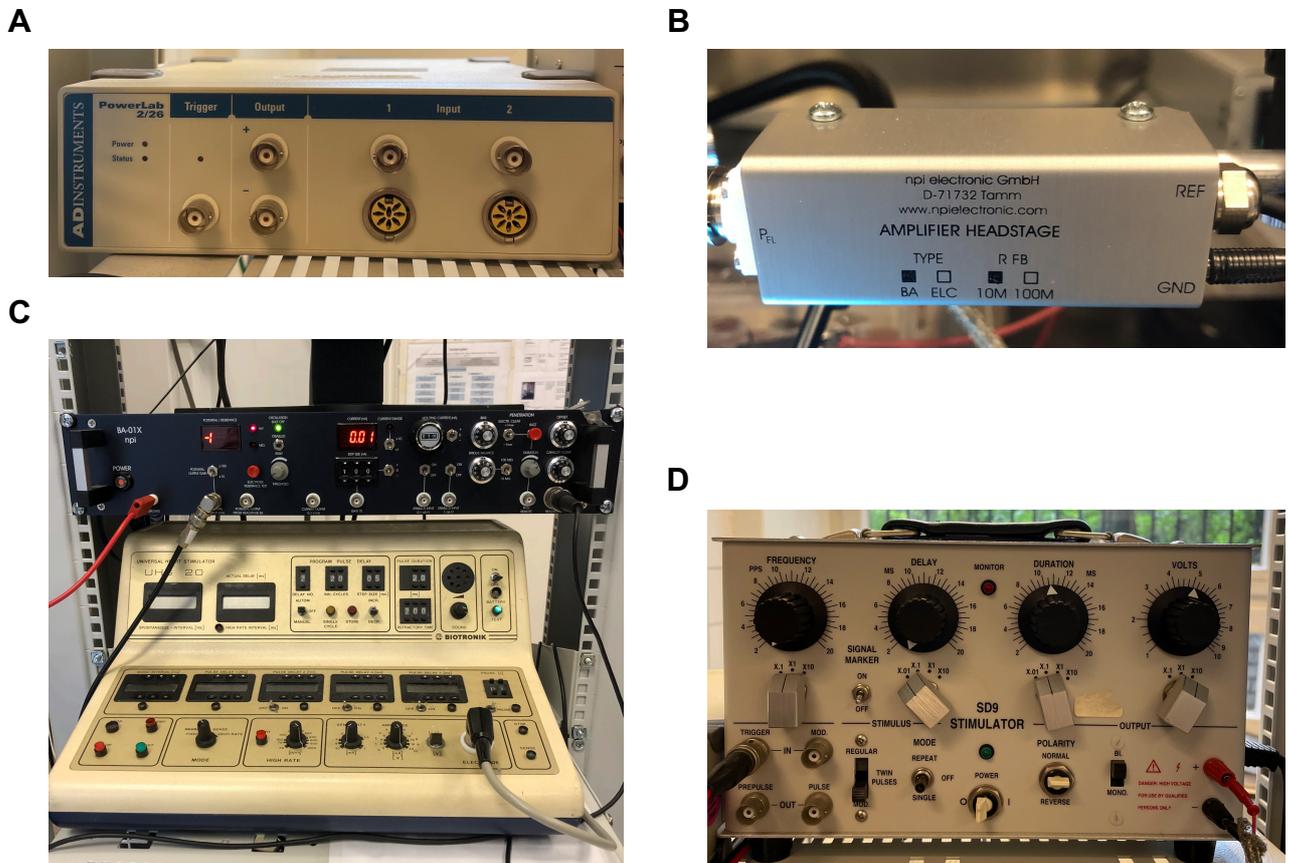
**Abbildung 2.6: Elektrophysiologische Geräte II.**

Innerhalb der Messkammer (A) befindet sich das aEHT und ist mit Nadeln fixiert. Direkt über der Messkammer steckt die scharfe Mikroelektrode im Elektrodenhalter und ist über den chlorierten Silberdraht mit dem Vorverstärker verbunden. Das aEHT wird mit Nadeln möglichst senkrecht innerhalb der Messkammer am oberen und unteren aEHT-Pol fixiert (B). Die scharfe Mikroelektrode wird über einen Mikromanipulator (C) und einen Grobtrieb (D) gesteuert.

#### 2.7.4 Vorverstärker, Verstärker und Analog-Digital-Wandler

Das abgeleitete Signal aus der scharfen Mikroelektrode wurde über einen drehbaren Winkelstecker zuerst zu einem Vorverstärker (npi Electronic, Tamm, Deutschland) weitergeleitet, der das Signal soweit verstärkte, dass es bis zum eigentlichen Verstärker (BA 1S/BA-01X, npi Electronic, Tamm, Deutschland) weitergeleitet werden konnte. Beide Verstärker sind in **Abbildung 2.7** dargestellt. Über einen kleinen Schalter am Verstärker konnte außerdem ein sogenannter „Buzz“-Stimulus an das Gewebe appliziert werden, der die Zellmembran aufriss und somit elektrischen Kontakt zum Gewebe herstellen konnte. Der Buzzer wurde auch gelegentlich während der Aufzeichnung benutzt, um die Qualität der Signale zu verbessern. Vom Hauptverstärker aus wurde das Signal

dann an den Analog-Digital-Wandler (AD-Wandler; ADInstruments Model ML 826 Powerlab 2/26, Dunedin, Neuseeland) weitergeleitet, um die aufgezeichneten Potenzialänderungen über die Analyse-Software am Computer auswerten zu können.



**Abbildung 2.7: Elektrophysiologische Geräte III.**

Das Signal der scharfen Mikroelektrode wird von Vorverstärker (B) und Verstärker (C, oben) verstärkt. Der Analog-Digital-Wandler (A) wandelt das analoge in ein digitales Signal um, sodass mit Hilfe der Analyse-Software Signale ausgewertet werden können. Über den UHS20-Stimulator (C, unten) konnte die Zeitfolge der Impulsabgabe des SD-9-Stimulator (D) gesteuert werden.

Die Mikroelektrode wurde mit 2 mol/l KCl-Lösung befüllt und in den Elektrodenhalter geklemmt. In der Pipette tauchte ein am Elektrodenhalter befestigter Silberchlorid-Draht ein, sodass Kontakt zwischen der KCl-Lösung und dem Vorverstärker hergestellt wurde. Zum Anbringen der Pipette in die Halterung konnte diese um ca. 45° nach vorne gekippt werden. Nach erfolgreicher Befestigung der Pipette wurde diese senkrecht, leicht nach hinten geneigt, mit dem kompletten Vorverstärker nach unten bewegt. Für die genaue Positionierung der Pipette in der Kammer standen zwei verschiedene Steuerungen zur Verfügung, mit denen die Pipette jeweils in allen drei Achsen gesteuert werden konnte. Der Zahnrad-vermittelte Grobtrieb (MM-3, Narishige Group, Tokyo, Japan; **Abbildung 2.6D**) wurde für größere Bewegungen der Pipette genutzt, wohingegen der hydraulische Feintrieb (MMO-203, Narishige Group, Tokyo, Japan; **Abbildung 2.6C**) dann

benutzt wurde, wenn sich die Pipettenspitze direkt am Gewebe befand. Mit Hilfe des Feintriebs konnte direkt an der Gewebegrenze die Pipettenposition so verändert werden, dass sich die entsprechenden Signale optimal ableiten ließen.

#### 2.7.5 Messtisch und Faraday'scher Käfig

Für optimale Messbedingungen mussten störende elektromagnetische Signale sorgfältig durch einen Faraday-Käfig (eigene Fertigung aus Aluminium; **Abbildung 2.4**) abgeschirmt werden. Innerhalb des Käfigs stand ein pneumatisch-gedämpfter Tisch (**Abbildung 2.4**), welcher mit Stickstoff-gefüllten Polstern betrieben wurde. Somit konnten störende Einflüsse durch Vibrationen auf die AP-Messung, wie z.B. Erschütterungen oder Bewegungen durch den Untersucher, minimiert werden. Auf dem Tisch stand ein Mikroskop (Olympus SZ61 SZ-STB1 Zoom Stereo Microscope, Tokyo, Japan; **Abbildung 2.4**), sodass die Position von aEHT und Pipette exakt kontrolliert werden konnte.

#### 2.7.6 Stimulationselektrode

Atriale EHTs schlagen spontan. Bei Bedarf wurden die aEHTs schneller als ihre Spontanfrequenz mittels Feldstimulation gereizt, sodass diese in einer bestimmten Frequenz kontrahierten. Somit konnte der Einfluss unterschiedlicher Schlagfrequenzen auf die elektrophysiologischen Parameter (bes. Aktionspotenzialdauer) reduziert werden. Ein SD9-Stimulator (Grass Technologies Product Group, Middleton, Wisconsin, USA) wurde zur exakten Anpassung von Dauer, Spannung und Polarität (normal oder „reverse“) der Reizpulse verwendet. Die exakte zeitliche Anordnung der Pulse erfolgte über einen UHS20-Stimulator (Biotronik, Berlin, Deutschland), wodurch Protokolle zur vorzeitigen Stimulation (Bestimmung der Refraktärzeit) angewendet werden konnten. Die beiden Stimulatoren und die selbst gefertigte Stimulationsgabel sind in **Abbildung 2.7C**, **Abbildung 2.7D** und **Abbildung 2.6A** dargestellt.

#### 2.7.7 Herstellung und Präparation der Glaspipetten

Die Glaspipetten wurden aus filamentierten Borosilikat-Glaskapillaren (KOLG1103227, Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland; **Abbildung 2.8**) selbst gefertigt. Die Glaskapillaren hatten einen Innendurchmesser von 0,87 mm und einen Außendurchmesser von 1,5 mm. Zunächst wurden mit Hilfe eines Glasschneiders kurze Glaskapillaren (ca. 15 cm) zugeschnitten. Anschließend wurden durch einen „Elektroden-Puller“ (Zeit DMZ-Universal Puller, München, Deutschland; **Abbildung 2.8**) aus jeweils einer Glaskapillare zwei scharfe Mikroelektroden gefertigt. Dabei konnten die Eigenschaften der Pipettenspitzen (Form, Länge, Widerstand) durch Änderung des Puller-Protokolls individuell angepasst werden.

**A****B**

**Abbildung 2.8: Herstellung der scharfen Mikroelektroden.** Die scharfen Mikroelektroden wurden durch einen Elektroden-Puller (A) aus Borosilikat-Glaskapillaren (B) gefertigt.

## 2.8 Ablauf der Messungen

### 2.8.1 Einschlusskriterien eines Aktionspotenzials

Für die Analyse der AP wurden ausschließlich AP mit einer Aktionspotenzialamplitude (APA) von über 75 mV eingeschlossen. Innerhalb eines aEHT wurde nur ein Aktionspotenzial an einem einzigen Einstichort aufgezeichnet, sodass nicht mehrere verschiedene Aktionspotenziale aus einem aEHT in die Gesamtauswertung eingingen.

### 2.8.2 Kontrollmessungen

Zunächst wurden alle aEHTs spontan-schlagend gemessen. Sobald ein stabiles AP gemessen werden konnte, wurden anschließend mindestens 30 Minuten APs aufgezeichnet, sodass sichergestellt werden konnte, dass es sich um stabile Ableitungsbedingungen handelte. Zur Analyse der Kontrollwerte wurden die jeweils letzten 100 APs vor Zugabe einer Substanz herangezogen.

### 2.8.3 Zugabe von Pharmaka

Vor Beginn der Experimente wurde das Volumen bestimmt, welches sich in den Schläuchen und der Kammer befand (5,2 ml). Dieses Volumen wurde beim Ansetzen der gewünschten Substanzkonzentration stets berücksichtigt. Zusätzlich lief die Pumpe bei konstanter Pumpgeschwindigkeit, sodass die Zeit, die die Rollenpumpe benötigt, um die Substanz-Lösung vom Ausgangsgefäß in die Messkammer zu pumpen, bestimmt werden konnte (2 min). Somit wurde der Zeitpunkt der Substanzzugabe zum aEHT bei jedem Experiment im digitalen Logbuch vermerkt.

### 2.8.4 4-Aminopyridin-Protokoll

4-AP wurde ausschließlich in einer Konzentration von 50  $\mu\text{mol/l}$  verwendet. Diese relativ niedrige Konzentration sollte vorwiegend den  $I_{\text{Kur}}$  blockieren (Wettwer et al., 2004). Die verwendete 4-AP-

Lösung wurde am Tag des Experiments aus einer Stamm-Lösung hergestellt. Nach Zugabe von 4-AP wurden die APs kontinuierlich aufgezeichnet. Der Zeitpunkt der Auswertung war genau 15 Minuten nach Gabe von 4-AP und zur Auswertung wurden 100 zusammenhängende APs mit einbezogen. Vor Beginn der 4-AP-Gabe war es besonders wichtig darauf zu achten, dass die EHTs ausreichend in der Messkammer mit Nadeln fixiert waren, weil die Stärke der aEHT-Kontraktionen aufgrund des durch 4-AP vermittelten Effekts zunahm, sodass es leicht zu störenden Kontraktionsartefakten kommen konnte.

#### 2.8.5 Carbachol-Protokoll

CCh wurde in zwei unterschiedlichen Konzentrationen verwendet (10  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol/l}$ ), welche am Tag des jeweiligen Experiments frisch aus einer Stamm-Lösung hergestellt wurden. Experimente mit 100  $\mu\text{mol/l}$  CCh wurden ausschließlich an isogenen Kontrollen durchgeführt, wohingegen 10  $\mu\text{mol/l}$  CCh an beiden aEHT-Typen angewendet wurden. Der Carbachol-Effekt ist transient, d.h. er verändert sich rasch über die Zeit. Deshalb erfolgte die Auswertung zu einem genau festgelegten Zeitpunkt nach CCh-Zugabe (1,5 Minuten). Daher wurden für die Auswertung des CCh-Effekts nur 20 aufeinander folgende APs verwendet.

#### 2.8.6 Einfrieren und Aufbewahrung der EHTs

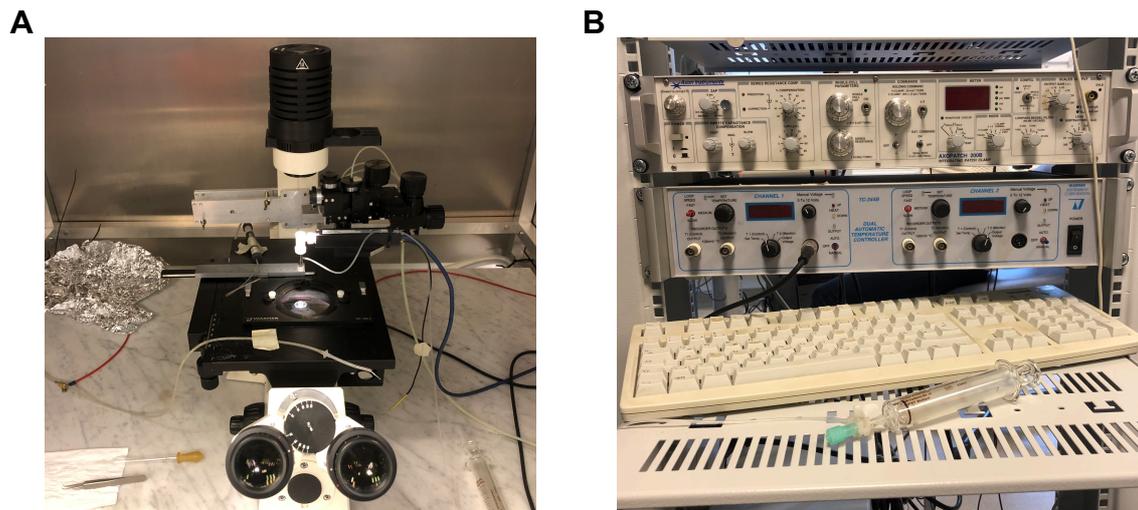
Nach vollendeter AP-Messung wurden die aEHTs ca. 30 Minuten mit reiner Tyrode's-Lösung ausgewaschen und anschließend in einem 2 ml Eppendorf-Röhrchen in Flüssigstickstoff schockgefroren. Für nachfolgende Protein- oder Expressionsanalysen wurden die EHTs danach bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.9 Patch-Clamp

Sämtliche in dieser Arbeit gezeigten Patch-Clamp-Versuche wurden von Frau Anna Steenpaß (Mitarbeiterin des IEPT) durchgeführt und ausgewertet. Calcium- und Kaliumströme in den aEHTs wurden mittels Patch-Clamp-Technik untersucht. Alle Messungen wurden bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in isolierten Zellen („whole-cell configuration“) mit einem Axopatch 200B Verstärker (Axon Instruments, Foster City, CA, USA; **Abbildung 2.9B**) durchgeführt. Für die Datenaufzeichnung und -analyse wurde die ISO 2 Software (MFK, Niedernhausen, Deutschland) genutzt. Die Pipetten wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren (KOLG1103227, Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland; **Abbildung 2.8**) gefertigt. Diese wurden zuerst mit Hilfe eines Glasschneiders in kleinere Einzelkapillaren zerlegt und anschließend mit einem „Puller“ (Zeitz DMZ-Universal Puller, München, Deutschland; **Abbildung 2.8**) durch Hitze poliert („Heat-polished protocol“). Der Pipettenwiderstand betrug zwischen 2,5 und 5  $\text{M}\Omega$  und der „seal“-Widerstand zwischen 3-6  $\text{G}\Omega$ . Die Zellkapazität ( $C_m$ ) berechnete sich aus dem Stromintegral während eines depolarisierenden Impulses (1V/s) von -40 bis -35 mV. Die Aktivierung der Calciumströme erfolgte mit Testimpulsen (0,5 Hz) von -80 auf

+10 mV und die extrazelluläre Calcium-Konzentration betrug ca. 2 mmol/l. Während der Messungen befanden sich die Zellen in einer Messkammer, die kontinuierlich mit einer Natrium-freien Badlösung durchflossen wurde (Tetraethylammoniumchlorid 120 mmol/l, CsCl 10 mmol/l, HEPES 10 mmol/l, CaCl<sub>2</sub> 2 mmol/l, MgCl<sub>2</sub> 1 mmol/l, Glukose 20 mmol/l; pH=7,4). Um eine Störung der Messungen durch andere Ströme zu verhindern, wurde die Zusammensetzung der Badlösung so verändert, dass K<sup>+</sup>-Ionen durch Cs<sup>+</sup>-Ionen und Na<sup>+</sup>-Ionen durch Tetraethylammoniumchlorid ersetzt wurden. Der I<sub>Ca,L</sub> wurde als Nifedipin (10 µM)-sensitiver Anteil des Calciumstroms bestimmt.

Die Pipetten-Lösung setzte sich aus den folgenden Substanzen zusammen: Caesiummethanesulfonat 90 mmol/l, CsCl 20 mmol/l, HEPES 10 mmol/l, Mg-ATP 4 mmol/l, Tris-GTP 0,4 mmol/l, EGTA 10 mmol/l und CaCl<sub>2</sub> 3 mmol/l (pH=7,2). Über ein invertiertes Mikroskop (Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan) konnten einzelne Zellen innerhalb der Kammer gezielt angesteuert werden. Die Steuerung der Pipetten erfolgte über Mikromanipulatoren (MMO-203, Narishige Group, Tokyo, Japan; **Abbildung 2.6C**).



**Abbildung 2.9: Aufbau der Patch-Clamp-Experimente.**

Ein invertiertes Mikroskop (A) ermöglicht das gezielte Ansteuern und Messungen in ganzen Zellen. Ein Axopatch 200B-Verstärker (B) vergrößert gemessene Signale, sodass diese aufgezeichnet und ausgewertet werden können.

Für die Messung von I<sub>K,ACH</sub> und I<sub>K1</sub> setzte sich die Badlösung wie folgt zusammen: DL-Aspartat Kaliumsalz 80 mmol/l, KCl 40 mmol/l, NaCl 8 mmol/l, HEPES 10 mmol/l, Mg-ATP 5 mmol/l, Tris-GTP 0,1 mmol/l, EGTA 5 mmol/l und CaCl<sub>2</sub>; pH=7,4). Störende Calcium-Ströme wurden durch Nifedipin (10 µmol/l, selektiver L-Typ Calcium-Kanalblocker) unterdrückt. Ströme bei -100 mV wurden dabei als einwärtsgerichtete Ströme definiert. Für die Aktivierung von I<sub>K,ACH</sub> wurde der muskarinerge Agonist CCh (2 µmol/l) verwendet.

## 2.10 Datenanalyse und Statistische Auswertung

Die Auswertung der AP-Messungen wurde mit der Lab-Chart Software (Version 5, Spechbach, Deutschland) durchgeführt. Für die spätere Auswertung wurden wichtige Zeitpunkte des Versuchs mit Kommentaren in der Versuchsdatei beschriftet. Die Software wertete nach vorher festgelegten Kriterien Aktionspotenziale aus (APA Mindesthöhe  $>60$  mV, minimale Dauer des Signals bei der Hälfte der APA  $>11$  ms). Zur Charakterisierung der AP wurden folgende Parameter bestimmt: Ruhemembranpotenzial (RMP), Aktionspotenzialamplitude (APA), maximale Aufstrichgeschwindigkeit ( $dV/dt_{\max}$ ), Aktionspotenzialdauer bei 10-90% Repolarisation (APD<sub>10</sub>, APD<sub>20</sub>, APD<sub>30</sub>, APD<sub>40</sub>, APD<sub>50</sub>, APD<sub>60</sub>, APD<sub>70</sub>, APD<sub>80</sub>, APD<sub>90</sub>), Plateauspannung ( $V_{\text{Plateau}}$ ; für die Definition der  $V_{\text{Plateau}}$  siehe **Abbildung S1** im Anhang) und Zykluslänge (CL). Schlagfrequenz bzw. Frequenz der aEHT-Kontraktionen wurden aus der entsprechenden CL berechnet. Das maximale diastolische Potenzial (MDP) wurde manuell mit Hilfe der „Data Pad“-Funktion der Lab Chart Software ausgewertet.

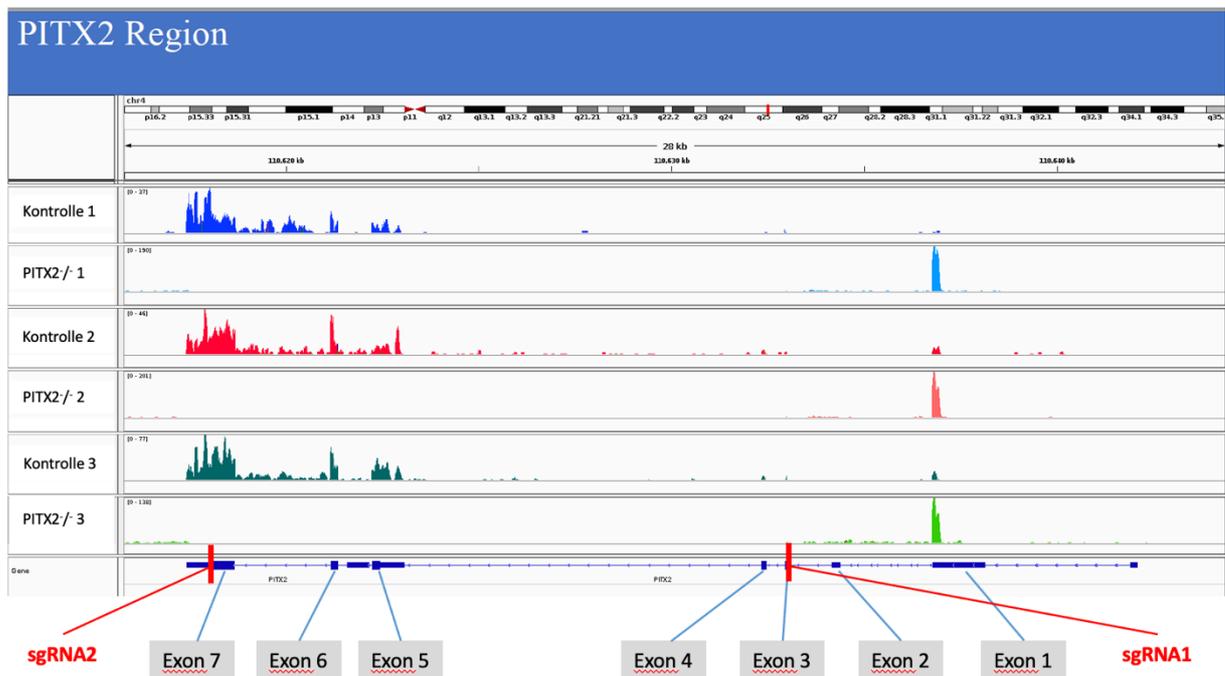
Alle ausgewerteten Parameter wurden anschließend mit Microsoft Excel weiterbearbeitet. Die graphische Auswertung und Darstellung wurde mit GraphPad Prism (Version 6, San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt. Für den Vergleich der Datengruppen wurden entweder ein ungepaarter bzw. gepaarter t-Test oder eine „nested“-Analyse (Eisner, 2021) durchgeführt. Dabei wurde eine statistische Signifikanz ab einem  $p < 0,05$  angenommen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Erfolgreicher PITX2-Knockout in hiPSC

##### 3.1.1 Erfolgreiches Ausschneiden der Protein-kodierenden DNA-Sequenz

Der PITX2-Knockout in hiPSC mittels CRISPR/Cas9 wurde nach dem im **Kapitel 2.2.2** beschriebenen Protokoll durchgeführt. Nach Beendigung der CRISPR/Cas9-Experimente wurden die als homozygot eingestuft Klone für die DNA-Sequenzierung zu Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) geschickt. Zusätzlich erfolgte die Kontrolle des Knockouts mittels RNA-Sequenzierung. Das Ergebnis der RNA-Sequenzierung von 3 PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs und 3 isogenen Kontroll-aEHTs ist in **Abbildung 3.1** dargestellt. Die PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs zeigten eine fehlende PITX2-mRNA-Transkription im Bereich der Knockoutregion. Im Gegensatz dazu wurde die PITX2-mRNA der isogenen Kontroll-aEHTs regelrecht exprimiert.

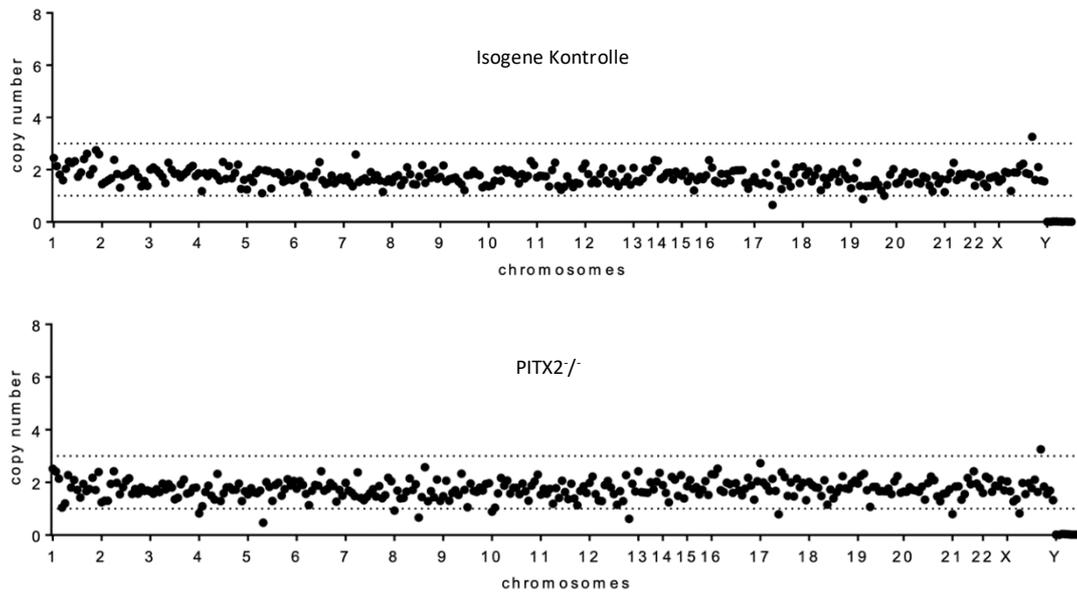


**Abbildung 3.1: Fehlende PITX2-mRNA-Expression in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT.**

Untersuchung der Expression der PITX2-mRNA in PITX2<sup>-/-</sup>- und isogenen Kontroll-aEHTs mittels RNA-Sequenzierung. Im oberen Teil der Abbildung ist eine Übersicht der Abschnitte des Chromosom 4 dargestellt. Unterhalb davon ist die Anzahl der Transkripte („Reads“) der PITX2-mRNA für 3 Kontroll- und 3 PITX2<sup>-/-</sup>-Proben gezeigt. Die für die RNA-Sequenzierung verwendete RNA wurde aus intakten aEHTs isoliert. Im unteren Abschnitt sind die Exons des PITX2-Gens und die Schnittstellen der CRISPR/Cas9-Enzyme (rot; sgRNA1 und sgRNA2) dargestellt. Abbildung entnommen aus Schulz et al. (2023).

### 3.1.2 PITX2<sup>-/-</sup>-hiPSC zeigen einen unauffälligen Karyotyp und erhaltene Pluripotenz

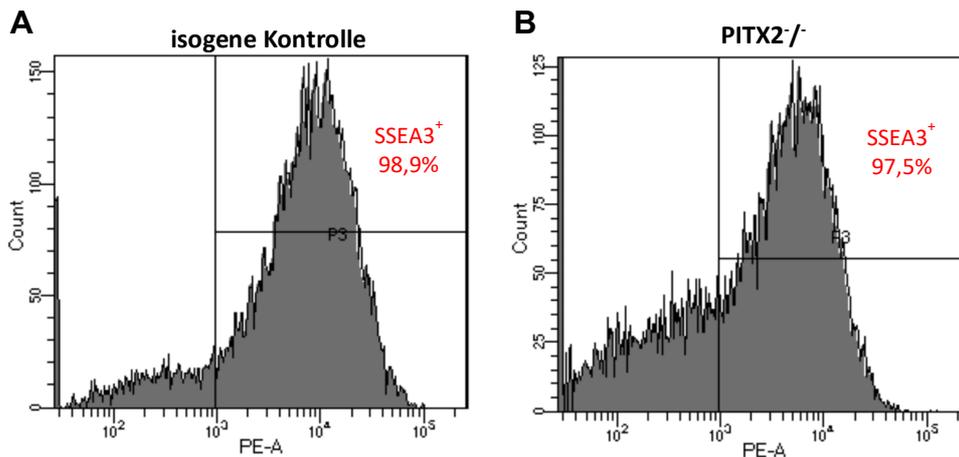
Die Untersuchung des Karyotyps wurde mittels Nanostring untersucht. Das Ergebnis der Karyotypisierung zeigte einen unauffälligen Befund für beide Zelllinien (**Abbildung 3.2**).



**Abbildung 3.2: Karyotyp von PITX2<sup>-/-</sup> und isogener Kontrolle.**

Dargestellt ist die jeweilige Anzahl der Kopien bestimmter Allele für die Chromosomen der isogenen Kontrolle (oben) und PITX2<sup>-/-</sup> (unten) dargestellt. Beide Chromosomenanalysen zeigen einen unauffälligen Karyotyp. Man beachte die erwarteten zwei Kopien in allen Fällen inklusive der Allele des X-Chromosoms (weiblicher Spender) sowie das Fehlen der Allele des Y-Chromosoms. Die Nanostring-Analyse wurde mit hiPSC-DNA durchgeführt. Abbildung verändert nach Schulz et al. (2023).

Vor Beginn der atrialen Differenzierung wurden die PITX2<sup>-/-</sup>- und isogenen Kontroll-hiPSC mittels SSEA3-FACS auf das Vorhandensein des pluripotenten Phänotyps untersucht. Dabei waren 97,5% der PITX2<sup>-/-</sup>- und 98,9% der isogenen Kontroll-hiPSC positiv für SSEA3 (**Abbildung 3.3**).



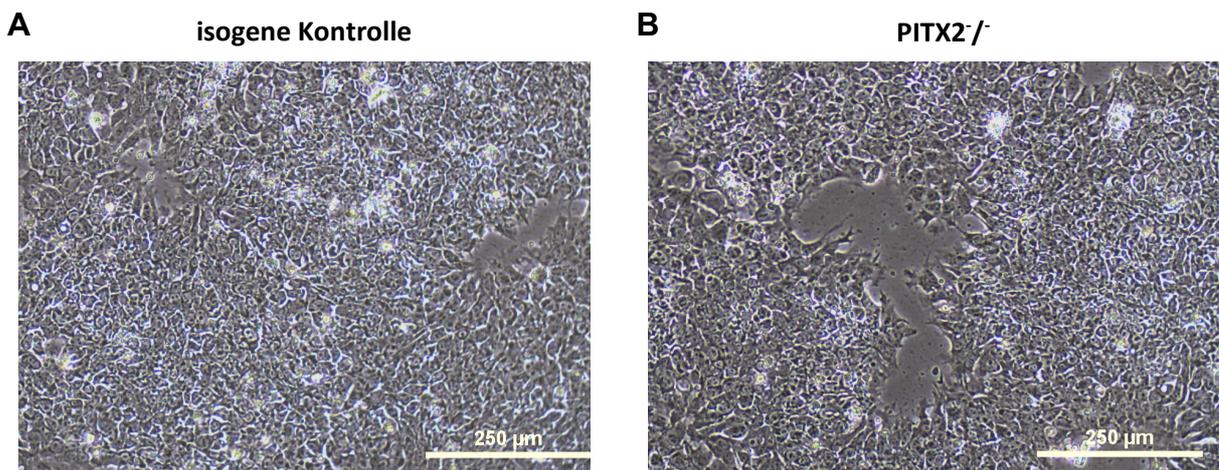
**Abbildung 3.3: PITX2<sup>-/-</sup>-hiPSC zeigen pluripotenten Phänotyp.**

Die Expression des “Stage-specific embryonic antigen 3” (SSEA3) wurde mittels FACS-Analyse in hiPSC (500.000 pro Gruppe) von isogener Kontrolle (A) und PITX2<sup>-/-</sup> (B) untersucht. Die Messung der SSEA3<sup>+</sup>-Zellen fand mit entsprechender Iso-Kontrolle statt. Für die Messung wurden pro Gruppe ca. 500.000 hiPSC entnommen und für die Iso-Kontrolle und SSEA3-Messung aufgeteilt.

### 3.2 Erfolgreiche atriale Differenzierung der PITX2<sup>-/-</sup>-hiPSC

#### 3.2.1 PITX2<sup>-/-</sup>-hiPSC zeigen normales Zellwachstum

Die PITX2<sup>-/-</sup>- und Kontroll-hiPSC wurden vor jedem Differenzierungslauf klonal expandiert. Dabei zeigte sich in der 2D-Stammzellkultur kein morphologischer Unterschied zwischen beiden Zelllinien (Abbildung 3.4).

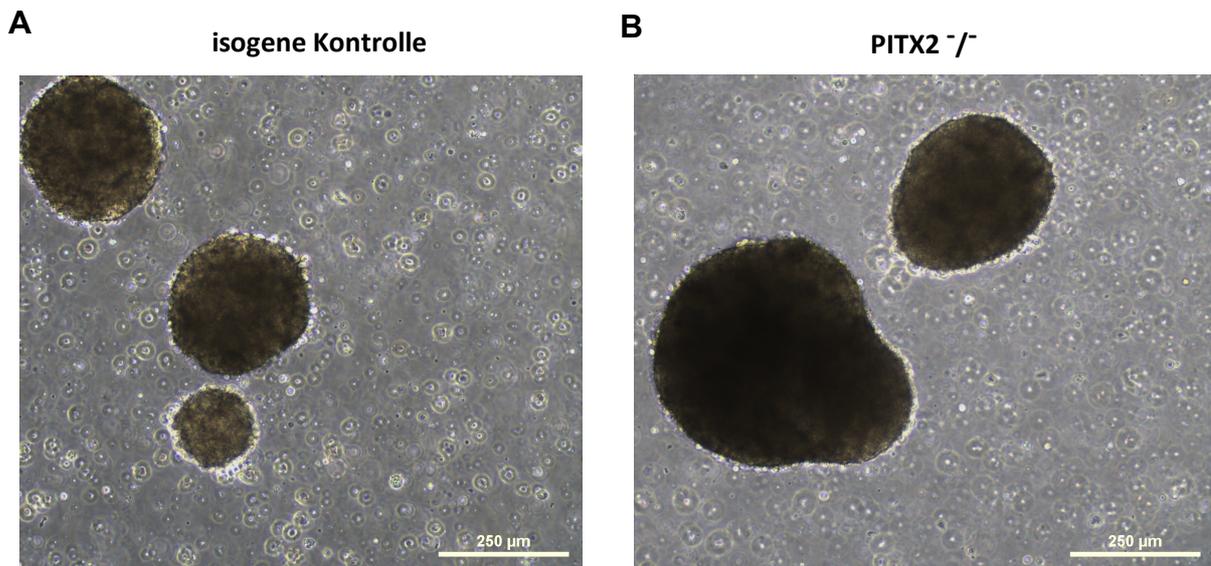


**Abbildung 3.4: PITX2<sup>-/-</sup> hiPSC zeigen keine auffällige Morphologie.**

Foto-Aufnahmen der hiPSC von isogener Kontrolle (A) und PITX2<sup>-/-</sup>-Klon (B) während der klonalen Expansionsphase (10x-Vergrößerung). Die hiPSC befanden sich in Geltrex-beschichteten T75-Flaschen. Beide hiPSC-Gruppen wurden zwei Tage vor der Aufnahme in gleicher Zellanzahl (6,5 Mio. Zellen pro T75-Flasche) ausgesät.

### 3.2.2 PITX2<sup>-/-</sup>-EBs beginnen später zu kontrahieren

Insgesamt wurden drei atriale Differenzierungsläufe von PITX2<sup>-/-</sup> und vier Differenzierungsläufe von isogenen Kontroll-hiPSC durchgeführt. Während der Differenzierung zeigten sich keine morphologischen Unterschiede zwischen den EBs beider Zelllinien (**Abbildung 3.5**). Jedoch fingen die PITX2<sup>-/-</sup>-EBs ca. 5 Tage ( $17\pm 0,6$  vs.  $12\pm 0,6$  Tage,  $n=3$  vs.  $n=4$ , PITX2<sup>-/-</sup> vs. isogene Kontrolle;  $p<0,05$ , ungepaarter t-Test) später an zu schlagen.



**Abbildung 3.5: PITX2-Knockout hat keinen Einfluss auf die EB-Morphologie.**

Embryoidkörperchen (EB) von isogener Kontrolle (A) und PITX2<sup>-/-</sup> (B) jeweils in Stage 1 der atrialen Differenzierung.

### 3.2.3 PITX2<sup>-/-</sup>-hiPSC-aCM exprimieren Vorhof-spezifische Proteine

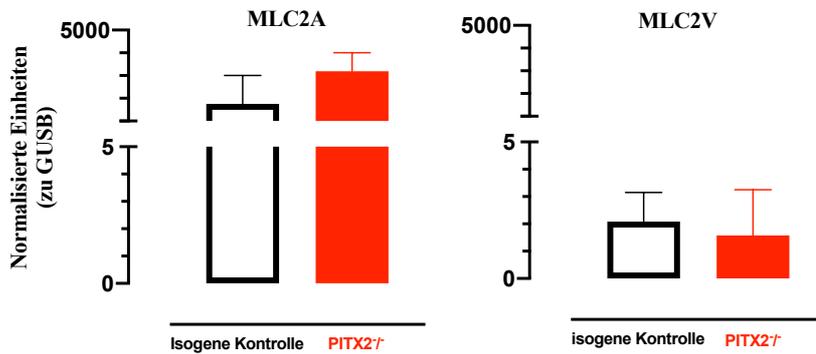
Die Auswertung der RT-qPCR zeigte für PITX2<sup>-/-</sup> und isogene Kontrolle eine hohe Expression eines präferentiell im Vorhof exprimierten Proteins (MLC2A) und eine geringe Expression eines ventrikulären Markers (MLC2V). Dabei war das Verhältnis von MLC2A zu MLC2V 1376:1 (isogene Kontrolle) und 2019:1 (PITX2<sup>-/-</sup>). Die qPCR-Daten sind in **Abbildung 3.6** dargestellt.

#### 3.2.1 Fehlende PITX2-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene in PITX2<sup>-/-</sup>

Nach erfolgreich durchgeführter atrialer Differenzierung wurde die PITX2-Expression auf mRNA-Ebene in PITX2<sup>-/-</sup>- und isogenen Kontroll-hiPSC-aCM mittels RT-qPCR untersucht. Die Kontrollgruppe zeigte eine deutlich nachweisbare PITX2-mRNA-Expression, wohingegen in der PITX2<sup>-/-</sup>-Gruppe keine PITX2-mRNA nachweisbar war (**Abbildung 3.7**).

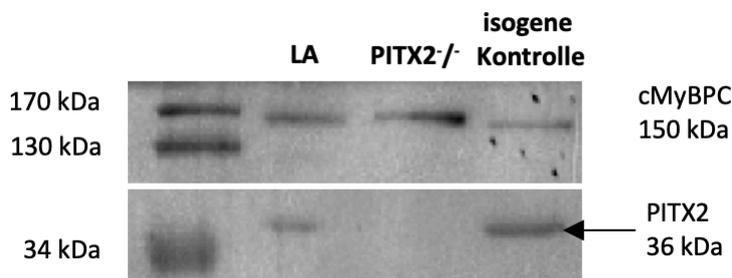
Auch die Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot zeigte eine fehlende PITX2-Expression in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT. Im Gegensatz dazu konnte in Kontroll-aEHT eine ähnliche

Expression des PITX2-Proteins wie in humanem linken Vorhofgewebe nachgewiesen werden (Abbildung 3.8).



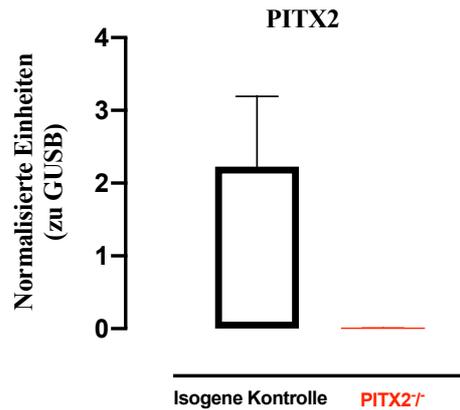
**Abbildung 3.6: Kein Unterschied in der Expression von MLC2A und MLC2V zwischen PITX2<sup>-/-</sup> und isogener Kontrolle.**

Genexpression mittels RT-qPCR eines atrialen (MLC2A) sowie eines ventrikulären (MLC2V) Proteins in hiPSC-aCM von isogener Kontrolle (schwarz) sowie PITX2<sup>-/-</sup> (rot). Die Ct-Werte der untersuchten Gene wurden zum Ct-Wert des „Housekeeping-Gens“ (*GUSB*) normalisiert. Abbildung verändert nach Schulz et al. (2023).



**Abbildung 3.7: Keine PITX2-mRNA-Expression in PITX2<sup>-/-</sup>-hiPSC-aCM.**

PITX2-mRNA-Expression von isogener Kontrolle (schwarz) und PITX2<sup>-/-</sup> (rot). Die Ct-Werte von PITX2 wurden zu den Ct-Werten des „Housekeeping-Gens“ (*Gusb*) normalisiert. Abbildung verändert nach Schulz et al. (2023).



**Abbildung 3.8: Fehlendes PITX2-Protein in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT.**

Die PITX2-Proteinexpression wurde mittels Western Blot (WB) untersucht. Für die Durchführung des WB wurde Proteinlysate aus gefrorenen aEHTs von PITX2<sup>-/-</sup> und Kontrolle gewonnen. Als Positivkontrolle diente humanes Vorhofgewebe (linker Vorhof, LA). Die primären und sekundären Antikörper sind in **Tabelle S19** und **S20** aufgelistet. Die WBs wurden auf 10% SDS-PAGE Gel durchgeführt. Abbildung verändert nach Schulz et al. (2023).

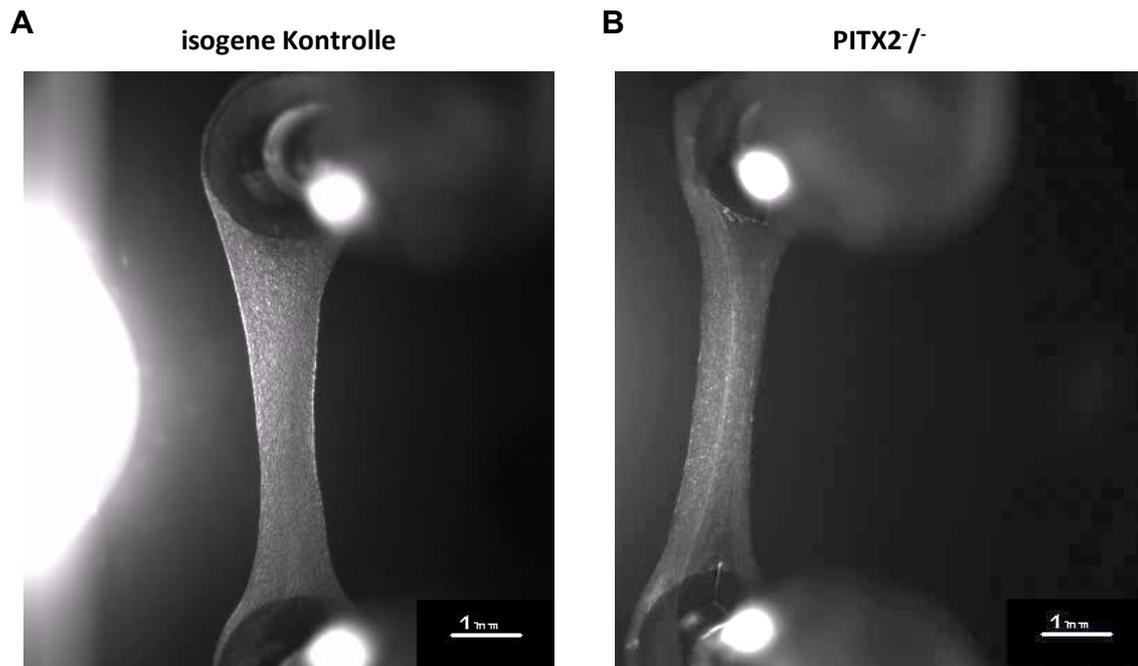
### 3.3 Verringerte Kraft in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT

#### 3.3.1 Erfolgreiche Herstellung von PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT

Atriale EHTs der PITX2<sup>-/-</sup>- und isogenen Kontroll-Gruppe wurden nach dem beschriebenen Protokoll gefertigt (**Kapitel 2.4.1**). Jedes aEHT wurde täglich auf Morphologie und Kontraktionen untersucht. Dabei zeigten sich keine groben morphologischen Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

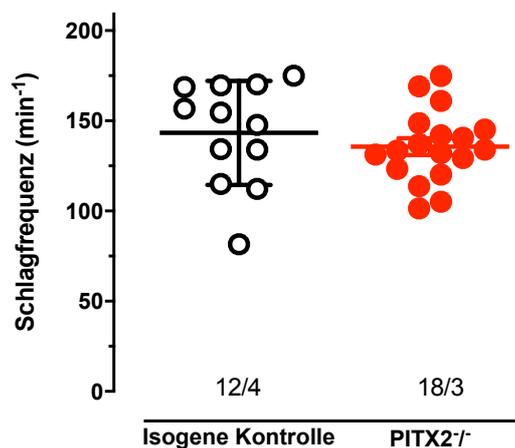
#### 3.3.1 PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs beginnen später zu kontrahieren

Ähnlich wie die EBs fingen auch die PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs ca. 4 Tage später an zu kontrahieren als die isogene Kontrollgruppe (16±1 vs. 12±1 Tage, n=28/3 vs. n=28/4, PITX2<sup>-/-</sup> vs. isogene Kontrolle; p<0,05, ungepaarter t-Test). Nach 33 Tagen Kultur zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Schlagfrequenz (137±4,6 vs. 143±8,3 min<sup>-1</sup>, n=19/3 vs. n=12/4, PITX2<sup>-/-</sup> vs. isogene Kontrolle; **Abbildung 3.10**).



**Abbildung 3.9: aEHT-Morphologie von PITX2-Knockout und Kontrolle.**

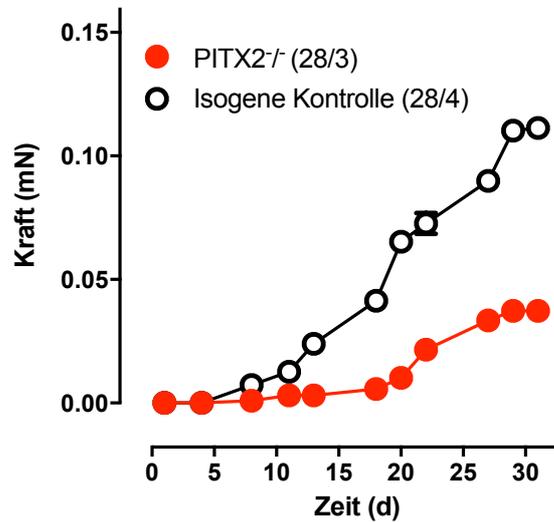
Isogene Kontroll- (A) und PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT (B) jeweils 7 Tage nach der Herstellung. Die aEHTs hängen zwischen zwei „Silikon-Posts“. Beide Aufnahmen erfolgten mit einem video-optischen Analysesystem (EHT Technologies).



**Abbildung 3.10: Kein Unterschied in der spontanen Schlagfrequenz zwischen PITX2<sup>-/-</sup> und isogener Kontrolle.**

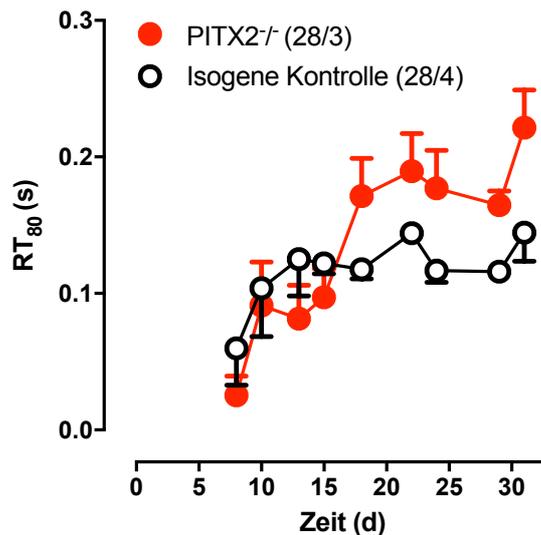
Spontane Schlagfrequenz (Mittelwerte±SEM) nach 33 Tagen aEHT-Kultur von isogener Kontrolle (schwarz; 143±8,3, n=12/4) und PITX2<sup>-/-</sup> (rot; 137±4,6, n=18/3). Die Analyse der Schlagfrequenz erfolgte bei der AP-Messung in Tyrode's-Lösung mittels scharfer Mikroelektrode (37 °C). N/N entspricht der Anzahl aEHTs/Anzahl der Differenzierungen.

Die Kraft der EHTs wurde bis zum Beginn der Aktionspotenzialmessungen aufgezeichnet und analysiert. Dabei zeigte sich nach 30 Tagen eine 59,5% geringere Kraft in den PITX2<sup>-/-</sup> aEHT (0,053±0,015 vs. 0,131±0,017 mN, n=28/3 vs. n=28/4, PITX2<sup>-/-</sup> vs. isogene Kontrolle; p<0,05, nested t-Test). Der Zeitverlauf der Kraftentwicklung ab Tag 1 ist in **Abbildung 3.11** dargestellt.



**Abbildung 3.11: Geringere Kraftentwicklung in PITX2<sup>-/-</sup>.**

Mittelwerte±SEM der Kontraktionskraft in PITX2<sup>-/-</sup> (n=28/3) und Kontroll-aEHTs (n=28/4) von Tag 1-35. Die Kraftmessungen erfolgten jeweils 2-3 h nach Wechsel des EHT-Kulturmediums. N/N entspricht der Anzahl aEHTs/Anzahl der Differenzierungen. Abbildung verändert nach Schulz et al. (2023).



**Abbildung 3.12: PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs relaxieren langsamer.**

Mittelwerte±SEM der Zeit bis 80% Relaxation (RT<sub>80</sub>) von Tag 1-33 für PITX2<sup>-/-</sup> (rot, n=28/3) und Kontroll-aEHT (schwarz, n=28/4) dargestellt. N/N entspricht der Anzahl aEHTs/Anzahl der Differenzierungen. Abbildung verändert nach Schulz et al. (2023).

### 3.3.1 PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs relaxieren langsamer

Die Zeit bis 80% Relaxation (RT<sub>80</sub>) war nach 33 Tagen in PITX2<sup>-/-</sup> länger als in der Kontrollgruppe (0,22±0,01 vs. 0,13±0,03 s, n=28/3 vs. n=28/4, PITX2<sup>-/-</sup> vs. isogene Kontrolle; p<0,05, nested t-Test). Der Verlauf der RT<sub>80</sub> ab Tag sieben ist in **Abbildung 3.12** dargestellt.

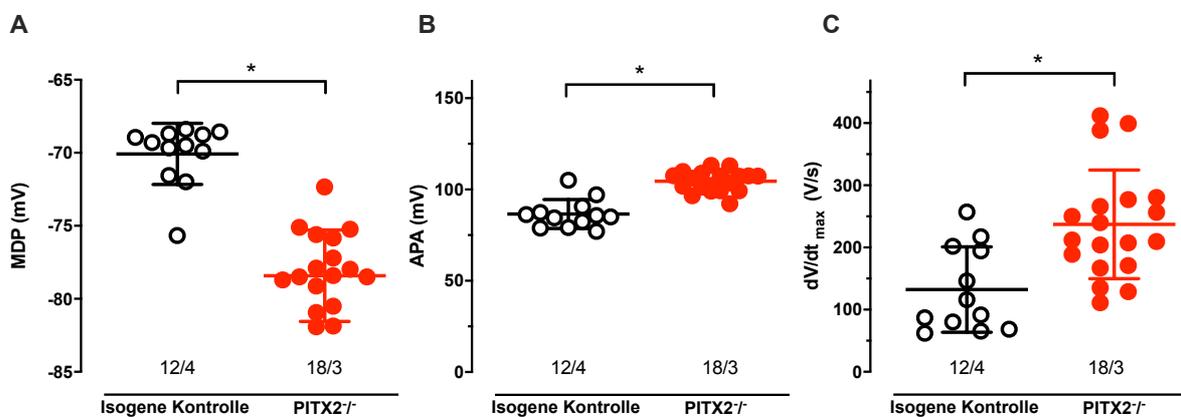
### 3.4 PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs zeigen ein verändertes AP

Insgesamt wurden in 18 PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs (aus 3 aEHT-Generationen) und 12 Kontroll-aEHTs (aus 4 aEHT-Generationen) AP gemessen.

#### 3.4.1 Negativeres MDP sowie höhere APA und höhere dV/dt<sub>max</sub> in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs

Das MDP war in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT stärker negativ (-78,3±0,7 vs. -69,7±0,6 mV, n=18/3 vs. n=12/4, PITX2<sup>-/-</sup> vs. isogene Kontrolle; p<0,05, nested t-Test) als in der isogenen Kontrolle. Darüber hinaus war sowohl die APA (104,6±1,3 vs. 86,6 ±2,3 mV, n=18/3 vs. n=12/4, PITX2<sup>-/-</sup> vs. isogene Kontrolle; p<0,05, nested t-Test) als auch die dV/dt<sub>max</sub> (237,1±20,1 vs. 132,3±19,8 V/s, n=18/3 vs. n=12/4,

PITX2<sup>-/-</sup> vs. isogene Kontrolle; p<0,05, nested t-Test) größer in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT. Die genannten Parameter sind in **Abbildung 3.13** dargestellt.



**Abbildung 3.13: Auswirkungen des PITX2-Knockouts auf MDP, APA und dV/dt<sub>max</sub>.**

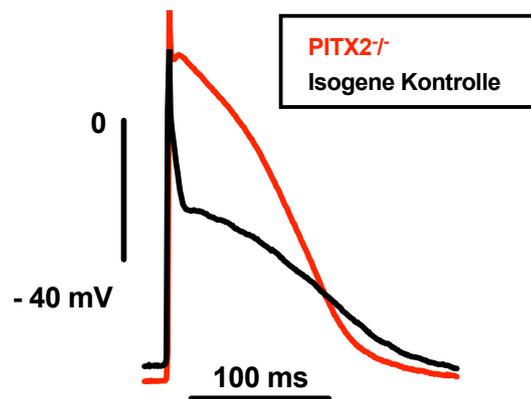
Individuelle Datenpunkte sowie Mittelwerte±SEM für maximales diastolisches Potenzial (MDP; **A**), Aktionspotenzialamplitude (APA; **B**) und maximale Aufstrichgeschwindigkeit (dV/dt<sub>max</sub>; **C**) von PITX2<sup>-/-</sup>-(rot) und isogenen Kontroll-aEHTs (schwarz). N/N entspricht der Anzahl aEHTs/Anzahl der Differenzierungen. \* p<0,05, nested t-Test. Abbildung verändert nach Schulz et al. (2023).

#### 3.4.2 PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs zeigen triangulierte AP

AP-Originale von PITX2<sup>-/-</sup> und isogener Kontrolle sind in **Abbildung 3.14** dargestellt. Die Schlagfrequenz der EHT-Gruppen zeigt keinen signifikanten Unterschied (siehe **Kapitel 3.3.2**),

sodass die APD ohne externe festfrequente Stimulation verglichen werden konnte. Das AP der isogenen Kontrollen zeigte die für den menschlichen Vorhof charakteristische starke initiale Repolarisation, auf die ein Plateau von deutlich unter 0 mV folgt. Demgegenüber zeigten die AP der PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs eine monotone Repolarisation, die zu einer triangulierten Form führte.

Die APD<sub>20</sub> war in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT deutlich länger (45,5±3,6 vs. 10,6±2,4 ms, n=18/3 vs. n=12/4, PITX2<sup>-/-</sup> vs. isogene Kontrolle; p<0,05, nested t-Test). Im Gegensatz dazu war die APD<sub>90</sub> in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs tendenziell eher kürzer (144±3,1) als in den Kontrollen (156,8±8,5), jedoch ohne signifikanten Unterschied. Beide Parameter sind in **Abbildung 3.15** dargestellt.

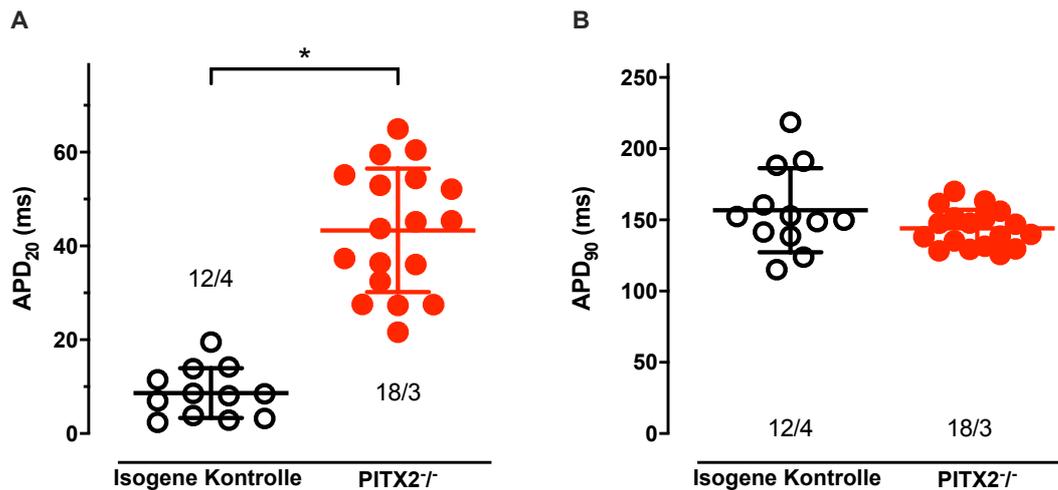


**Abbildung 3.14: Trianguliertes Aktionspotenzial in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs.**

Originale-AP von einem PITX2<sup>-/-</sup> (rot) und einem Kontroll-aEHT (schwarz). Die Messungen wurden in 33 Tage alten aEHTs unter spontanen Eigenkontraktionen durchgeführt (Tyrode's-Lösung, 37 °C). Abbildung verändert nach Schulz et al. (2023).

#### 3.4.1 Einfluss des PITX2-Knockouts auf den Block Vorhof-selektiver K<sup>+</sup>-Kanäle

Im menschlichen Vorhof wird die AP-Form v.a. bestimmt durch den „ultrapidly activating“ Kaliumstrom (I<sub>Kur</sub>) und den transienten Auswärtsstrom (I<sub>to</sub>), die auch als transiente Kaliumauswärtsströme bezeichnet werden. Um den Beitrag des I<sub>Kur</sub> zum AP zu bestimmen, wurde der Blocker 4-AP in einer Konzentration verwendet, die selektiv I<sub>Kur</sub> blockiert (50 µmol/l; Wettwer et al., 2004). Es wurden mit 4-AP 18 Versuche (aus 3 EHT-Generationen) in PITX2<sup>-/-</sup> und 12 Versuche (aus 4 EHT-Generationen) in isogenen Kontroll-aEHTs durchgeführt. Um den 4-AP-Effekt zu quantifizieren, wurde pro Parameter für beide Gruppen die Differenz aus dem Effekt mit 4-AP und dem Ausgangswert (Kontrollwert) berechnet (z.B. ΔAPD<sub>20</sub>). 4-AP hatte in beiden aEHT-Gruppen keinen Einfluss auf die Schlagfrequenz.



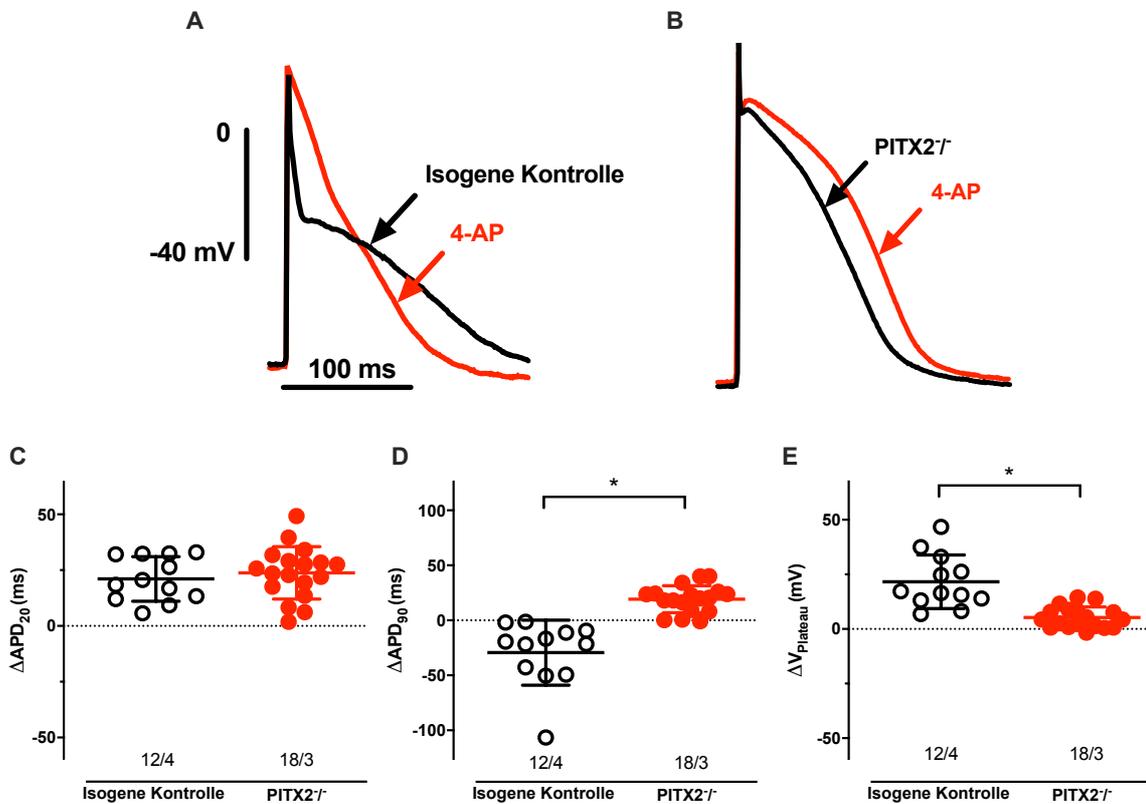
**Abbildung 3.15: Effekt des PITX2-Knockouts auf die APD.**

Individuelle Datenpunkte sowie Mittelwerte $\pm$ SEM für Aktionspotenzialdauer bis 20% Repolarisation (APD<sub>20</sub>; **A**) und Aktionspotenzialdauer bei 90% Repolarisation (APD<sub>90</sub>; **B**) für PITX2<sup>-/-</sup> (rot) und isogene Kontrollen (schwarz). Die AP-Messungen erfolgten in aEHTs (Tyrode's-Lösung, 37°C) unter spontanen Eigenkontraktionen. N/N entspricht der Anzahl aEHTs/Anzahl der Differenzierungen. \* p<0,05, nested t-Test. Abbildung verändert nach Schulz et al. (2023).

In den Kontroll-aEHTs bewirkte 4-AP eine drastische Veränderung der AP-Form (**Abbildung 3.16A**). Die initiale Repolarisation wurde deutlich verlangsamt und das Plateau um fast 20 mV zu positiveren Werten verschoben. Letzteres zeigte sich v.a. durch eine Zunahme der  $V_{\text{plateau}}$  (von  $-19,4\pm 3,3$  auf  $2,4\pm 10,4$  mV, n=12/4; p<0,05, gepaarter t-Test; **Abbildung 3.16E**). Des Weiteren bewirkte 4-AP eine Verlängerung der APD<sub>20</sub> (von  $10,2\pm 4,4$  auf  $31,7\pm 9,3$  ms, n=12/4; p<0,05, gepaarter t-Test; **Abbildung 3.16C**) und eine Verkürzung der APD<sub>90</sub> (von  $157,8\pm 33,8$  auf  $127,5\pm 4,3$  ms, n=12/4; p<0,05, gepaarter t-Test; **Abbildung 3.16D**).

Im Vergleich dazu hatte 4-AP in den PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs nur einen geringen Einfluss auf die AP-Form (**Abbildung 3.16B**). 4-AP bewirkte in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT ebenfalls eine Verlängerung der APD<sub>20</sub> (von  $49,5\pm 7,9$  auf  $69,7\pm 5,9$  ms, n=18/3, p<0,05, gepaarter t-Test; **Abbildung 3.16C**), allerdings ausgehend von deutlich größeren Ausgangswerten. Die relative Verlängerung der APD<sub>20</sub> war damit in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT deutlich geringer (relative Verlängerung um  $167\pm 55\%$  der Kontrollwerte vs.  $338\pm 157\%$  in isogener Kontrolle; p<0,05, nested t-Test) als in den isogenen Kontrollen. Ähnlich wie in den isogenen Kontrollen verschob 4-AP die  $V_{\text{plateau}}$  in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs zu stärker positiven Werten (von  $4,8\pm 1,3$  auf  $10,5\pm 1,1$  mV, n=18/3; p<0,05, gepaarter t-Test; **Abbildung 3.16E**). Dieser Effekt war jedoch in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs deutlich geringer ausgeprägt ( $\Delta V_{\text{plateau}}$ :  $5,2\pm 1,1$  vs.  $21,6\pm 3,5$  mV, n=18/3 vs. n=12/4, PITX2<sup>-/-</sup> vs. isogene Kontrolle; p<0,05, nested t-Test). Völlig

gegenteilig zu den isogenen Kontrollen verlängerte 4-AP in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT die APD<sub>90</sub> (von 158,8±23,3 auf 169,5±18,2 ms, n=18/3; p<0,05, gepaarter t-Test; **Abbildung 3.16D**).



**Abbildung 3.16: Effekte von 4-AP auf AP-Parameter in PITX2<sup>-/-</sup> und Kontrolle.**

AP-Originale vor und nach 4-Aminopyridin-Gabe (50 μM, 4-AP) in einem Kontroll- (A) sowie einem PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT (B). Individuelle Datenpunkte und Mittelwerte±SEM für die durch 4-AP induzierten Veränderungen (Δ-Wert) sind für die Aktionspotenzialdauer bis 20% (APD<sub>20</sub>; C) und bis 90% Repolarisation (APD<sub>90</sub>; D) und die Plateauspannung (V<sub>plateau</sub>; E) dargestellt. N/N entspricht der Anzahl aEHTs/Anzahl der Differenzierungen. \* p<0.05, nested t-Test. Abbildung verändert nach Schulz et al. (2023).

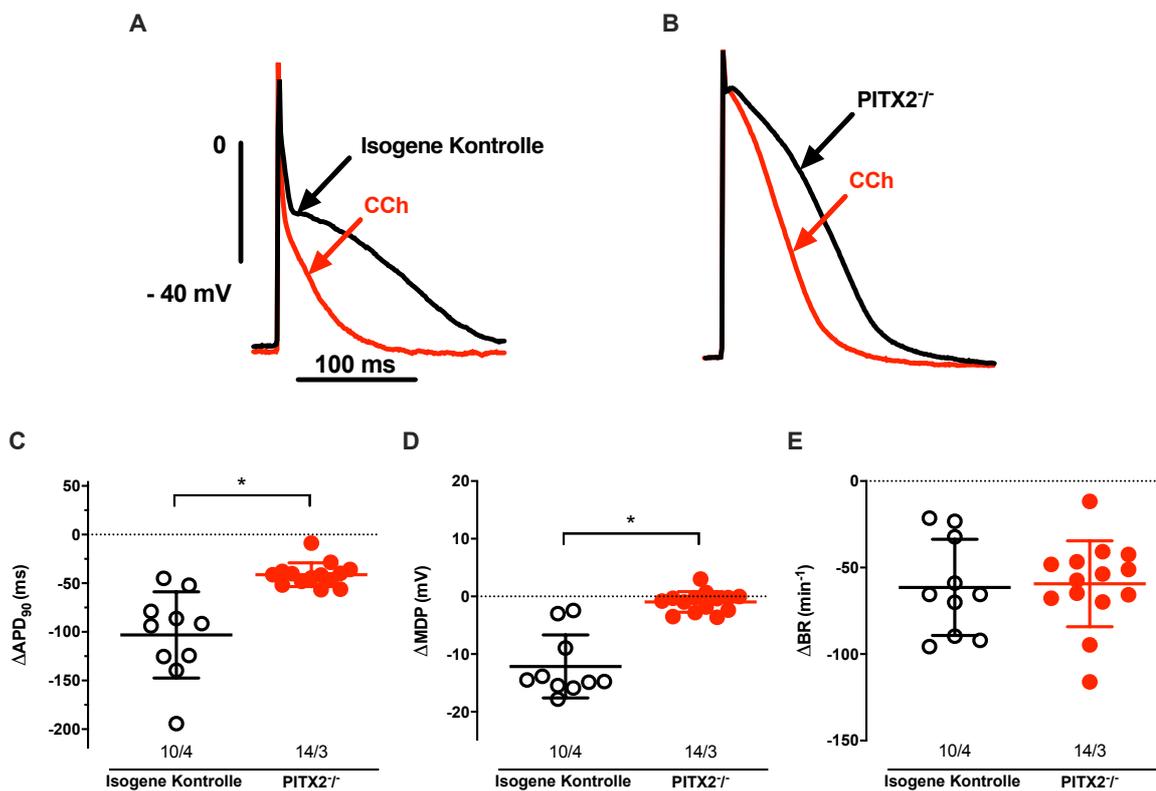
### 3.4.2 Aktivierung muskarinergere Rezeptoren verkürzt APD ohne Hyperpolarisation des MDP in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs

Für die Aktivierung muskarinergere Rezeptoren wurde der synthetische Agonist Carbachol (CCh) verwendet. Insgesamt wurden 16 Versuche (aus 3 aEHT-Generationen) in der PITX2<sup>-/-</sup>-Gruppe und 10 Versuche (aus 4 aEHT Generationen) in der isogenen Kontrollgruppe durchgeführt. Um den CCh-Effekt zu quantifizieren, wurde für jeden untersuchten Parameter die Differenz aus dem Effekt mit CCh und dem Ausgangswert (Kontrollwert) berechnet (z.B. ΔAPD<sub>90</sub>).

Der Einfluss von CCh auf die AP-Form ist exemplarisch in **Abbildung 3.17A** für isogene Kontroll-aEHTs und in **Abbildung 3.17B** für PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs dargestellt. In isogenen Kontroll-aEHTs bewirkte CCh wie erwartet eine Verkürzung der APD<sub>90</sub> (von 156.6±11 auf 82.7±1 ms, n=10/4; p<0,05, gepaarter t-Test; **Abbildung 3.17C**) und eine Verschiebung des MDP zu stärker negativen Werten (von -70±0.6 auf -82.8±2.2 mV, n=10/4; p<0,05, gepaarter t-Test; **Abbildung 3.17D**).

In PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs bewirkt CCh ebenfalls eine Verkürzung der APD<sub>90</sub> (von 152.4±13.1 auf 101.8±16 ms, n=14/3; p<0,05, gepaarter t-Test; **Abbildung 3.17D**), jedoch zeigte sich keine Hyperpolarisation des MDP.

CCh bewirkte in PITX2<sup>-/-</sup> (von 137,1±4.6 auf 77,1±3,9 min<sup>-1</sup>, n=14/3; p<0,05, gepaarter t-Test; **Abbildung 3.17E**) und Kontroll-aEHT (von 148,1±14,9 auf 81,8±12,9 min<sup>-1</sup>, n=10/4; p<0,05, gepaarter t-Test; **Abbildung 3.17E**) eine drastische Reduktion der Schlagfrequenz (BR).

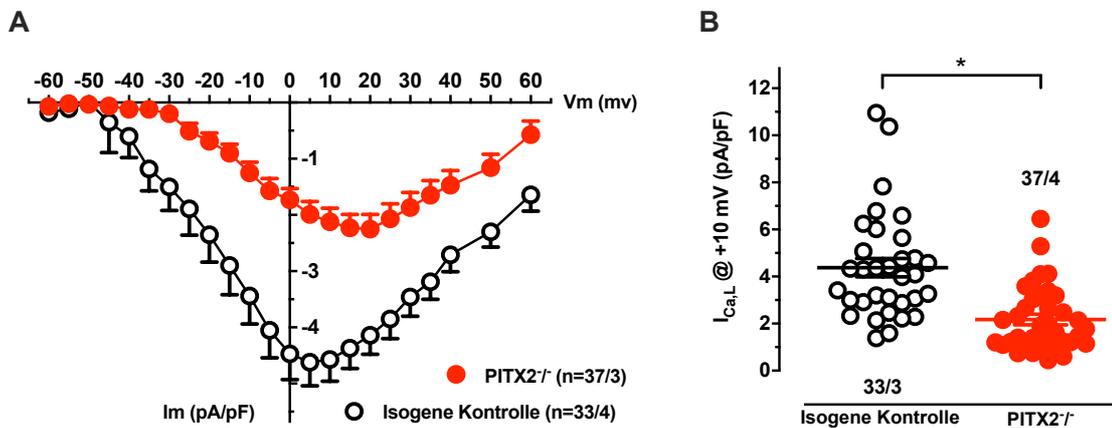


**Abbildung 3.17: CCh-Effekte auf PITX2<sup>-/-</sup> und Kontrolle.**

Effekte von Carbachol (CCh) auf die AP-Form von isogener Kontrolle (A) und PITX2<sup>-/-</sup> (B). Individuelle Datenpunkte und Mittelwerte±SEM für die Differenz ( $\Delta$ -Wert) aus Werten in Gegenwart von CCh und Ausgangswert sind für die Aktionspotenzialdauer bis 90% Repolarisation (APD<sub>90</sub>; C), maximal diastolisches Potenzial (MDP; D) und die Schlagfrequenz (BR; E) dargestellt. N/N entspricht der Anzahl aEHTs/Anzahl der Differenzierungen. \* p<0.05, nested t-Test. Abbildung verändert nach Schulz et al. (2023).

### 3.5 Verringerter $\text{Ca}^{2+}$ -Strom in $\text{PITX2}^{-/-}$

Im menschlichen Vorhof ist bei VHF die Kontraktionskraft verringert. Diese Verringerung der Kontraktionskraft ist mit einer Verringerung des Calciumstroms assoziiert. Um zu überprüfen, ob die Verringerung der Kontraktionskraft der  $\text{PITX2}^{-/-}$ -aEHTs ebenfalls mit einer Verringerung des Calciumstroms einhergeht, wurden von Frau Anna Steenpaß (Mitarbeiterin des IEPT) Patch-Clamp-Messungen in hiPSC-aCM von  $\text{PITX2}^{-/-}$  und isogener Kontrolle durchgeführt. Dabei waren  $\text{PITX2}^{-/-}$ -aCM kleiner als die Kontrollen (Zellgröße, gemessen als Kapazität der Zellmembran ( $C_m$ );  $25,7 \pm 8,1$  vs.  $37,4 \pm 17$  pF,  $n=139/3$  vs.  $n=143/3$ ,  $\text{PITX2}^{-/-}$  vs. isogene Kontrolle;  $p < 0,05$ , nested t-Test). Die Stromstärke des L-Typ-Calciumstroms ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) war geringer in den  $\text{PITX2}^{-/-}$ -aCM als in den isogenen Kontroll-aCM ( $2,2 \pm 1,4$  vs.  $3,6 \pm 2,3$  pA/pF,  $n=37/3$  vs.  $n=33/3$ ,  $\text{PITX2}^{-/-}$  vs. isogene Kontrolle;  $p < 0,05$ , nested t-Test). Die Ergebnisse der Patch-Clamp-Messungen sind in **Abbildung 3.18** gezeigt.



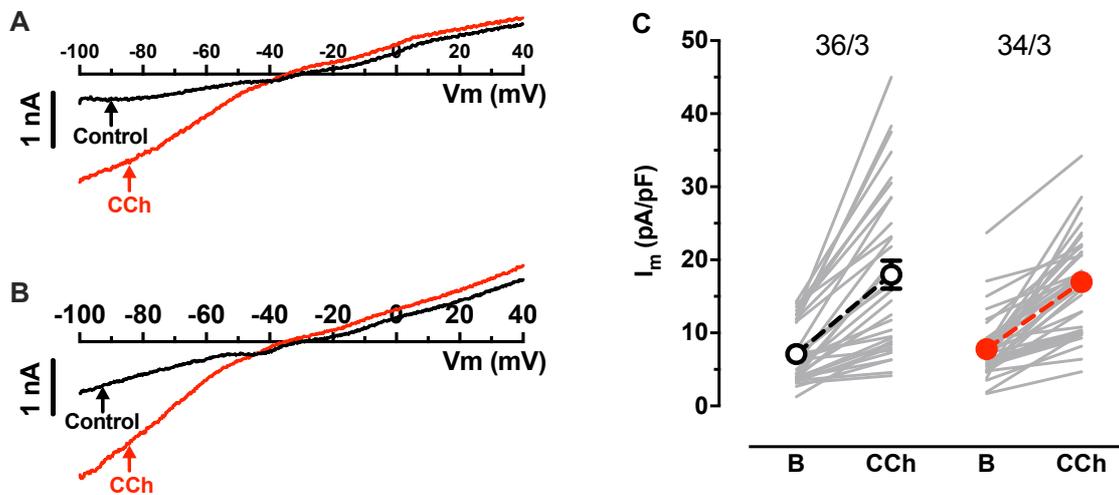
**Abbildung 3.18: Verringerter  $I_{\text{Ca,L}}$  in  $\text{PITX2}^{-/-}$ .**

Stromdichte ( $I_m$ ) des  $I_{\text{Ca,L}}$  in Abhängigkeit der Testpulsspannung ( $V_m$ ) (A) für isogene Kontrolle und  $\text{PITX2}^{-/-}$  (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Individuelle Datenpunkte und Mittelwerte  $\pm$  SEM (B) des  $I_{\text{Ca,L}}$  (bestimmt bei einer Testpulsspannung von +10 mV). N/N entspricht der Anzahl aEHTs/Anzahl der Differenzierungen. \*  $p < 0,05$ , nested t-Test nach log-Transformation der Daten. Abbildung verändert nach Schulz et al. (2023).

### 3.6 Stärker negatives MDP in $\text{PITX2}^{-/-}$ ist nicht mit größerem $I_{\text{K1}}$ assoziiert

Für die Ausbildung und Stabilisierung des RMP ist der einwärtsgerichtete Kaliumstrom  $I_{\text{K1}}$  von entscheidender Bedeutung. Daher wurde der  $I_{\text{K1}}$  in  $\text{PITX2}^{-/-}$  und isogener Kontrolle mittels Patch-Clamp untersucht. Überraschenderweise war der  $I_{\text{K1}}$  in  $\text{PITX2}^{-/-}$  nicht größer als in den isogenen Kontrollen (**Abbildung 3.19**). Um abzuschätzen, wie viel mehr  $I_{\text{K1}}$  nötig wäre, um den beobachteten Unterschied im MDP von 9 mV zu erklären, wurde eine Computer-basierte Modellierung für AP im humanen Vorhof durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass ein ca. vierfach

höherer  $I_{K1}$  nötig wäre, falls die Unterschiede im MDP auf Unterschieden im  $I_{K1}$  beruhen sollten (Abbildung 4.5).

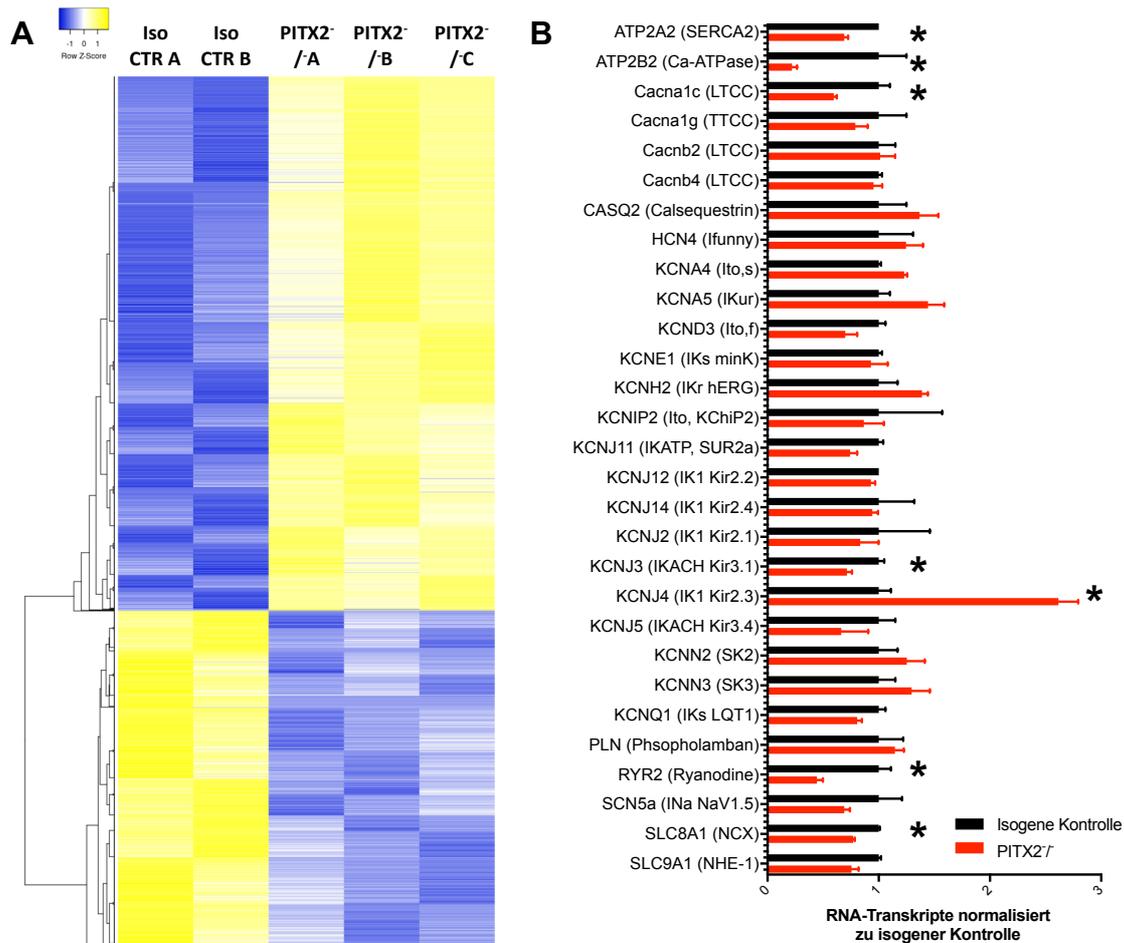


**Abbildung 3.19: Kein Unterschied im  $I_{K1}$  zwischen PITX2<sup>-/-</sup> und isogener Kontrolle.**

Originalstromspuren in isogener Kontrolle (A) und PITX2<sup>-/-</sup> (B) jeweils vor (Control) und nach Carbachol-Gabe (2  $\mu$ M; CCh). Individuelle Datenpunkte und Mittelwerte $\pm$ SEM für  $I_{K1}$  bei -100 mV jeweils vor (B=Basal) und nach CCh-Gabe. N/N entspricht der Anzahl aEHTs/Anzahl der Differenzierungen. Abbildung wurde entnommen aus Schulz et al. (2023).

### 3.7 Expressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung

Bei der Expressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierungen konnten 2234 Transkripte bestimmt werden, die im Vergleich zwischen PITX2<sup>-/-</sup> und isogener Kontrolle signifikant unterschiedlich exprimiert wurden (842 Transkripte vermehrt, 1349 Transkripte vermindert exprimiert in PITX2<sup>-/-</sup>; **Abbildung 3.19A**). Eine Auswahl an 29 Genen, die für Ionenkanäle und Transporter kodieren und zur Entstehung des atrialen AP beitragen, ist in **Abbildung 3.19B** dargestellt. Passend zum verminderten  $I_{Ca,L}$  in den PITX2<sup>-/-</sup>-aCM und der verringerten Kontraktionskraft der PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs zeigte sich eine verringerte Expression von Genen der Calcium-Homöostase, wie *CACNA1C* ( $I_{Ca,L}$ ), *ATP2A2* (SERCA2), *ATP2B2* (membranständige  $Ca^{2+}$ -ATPase), *RYR2* (Ryanodinrezeptor) und *SLC8A1* ( $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Austauscher). Eine Untereinheit des  $I_{K1}$  (*KCNJ4*) war verstärkt exprimiert im PITX2<sup>-/-</sup>, wohingegen alle anderen Untereinheiten (*KCNJ12*, *KCNJ14*, *KCNJ2*) nicht unterschiedlich exprimiert wurden. Die dritte isogene Kontrollprobe (Iso-CTR C) musste aufgrund einer mangelhaften Sequenzierungsqualität ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.20: Unterschiedlich exprimierte Gene in PITX2<sup>-/-</sup>.**

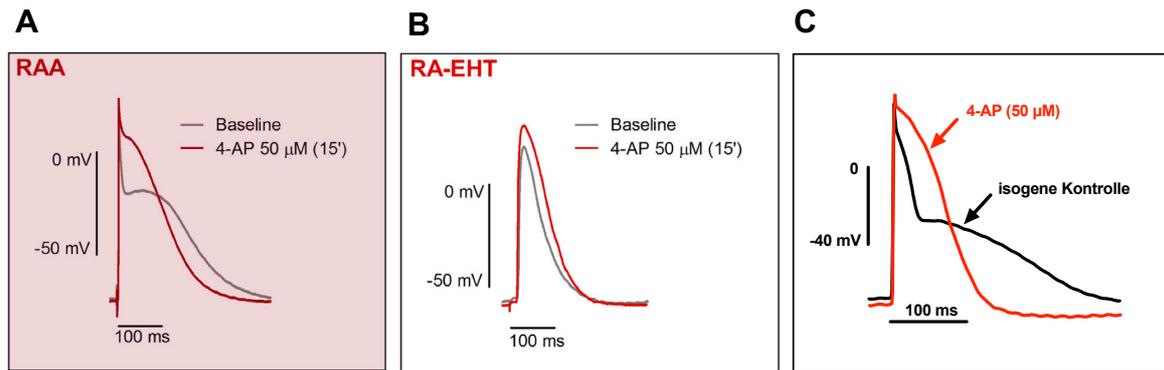
Heatmap aller in der RNA-Sequenzierung signifikant ( $p < 0.05$ ) unterschiedlich exprimierten Gene (**A**) in aEHTs von isogener Kontrolle (IsoCTR;  $n=2$ ) vs. PITX2<sup>-/-</sup> ( $n=3$ ). Die Heatmap-Anordnung erfolgte nach „Spearman Rank Order“. Relative RNA-Expression (Mittelwerte $\pm$ SEM) bestimmter atrialer Ionenkanäle (**B**) in PITX2<sup>-/-</sup> ( $n=3$ ) im Vergleich zu isogener Kontrolle ( $n=2$ ). Iso-CTR C wurde aufgrund einer mangelhaften Sequenzierungsqualität ausgeschlossen. \* adjustierter p-Wert  $< 0.05$ . Abbildung verändert nach Schulz et al. (2023).

## 4. Diskussion

### 4.1 Atriales EHT: ein Modell für die Elektrophysiologie des menschlichen Vorhofs

#### 4.1.1 Verbesserter atrialer Phänotyp der aEHTs

Die Grundlage für die Arbeit mit hiPSC-aCM bildet die Zugabe von RA während der kardialen Differenzierung, wodurch es zur vermehrten Expression von Vorhof-spezifischen Proteinen kommt (Cyganek et al., 2018; Devalla et al., 2015; Lee et al., 2017; Lemme et al., 2018). Bis heute wurden einige Studien durchgeführt, die es zum Ziel hatten, ein elektrophysiologisches Vorhofmodell auf hiPSC-Basis zu etablieren. Für elektrophysiologische Experimente ist jedoch neben der Vorhof-spezifischen Genexpression der hiPSC-aCM besonders die AP-Form von entscheidender Bedeutung. Trotz der hohen Expression Vorhof-spezifischer Proteine konnten die bisherigen hiPSC-basierten Vorhofmodelle nicht alle der für den menschlichen Vorhof typischen Charakteristika reproduzieren. Humane atriale AP zeigen eine typische „Spike and Dome“-Konfiguration bestehend aus einer sehr starken initialen Repolarisation, auf die eine Plateau-Phase folgt. Die starke initiale Repolarisation ist Folge des großen Beitrags des Vorhof-spezifischen Stroms  $I_{Kur}$ . Keines der bisherigen hiPSC-Vorhofmodelle (Cyganek et al., 2018; Devalla et al., 2015; Lee et al., 2017; Lemme et al., 2018) zeigte die typische initiale, schnelle Repolarisation mit einem darauffolgenden Plateau deutlich stärker negativ als 0 mV (Wettwer et al., 2004). Bei Experimenten mit RA-behandeltem EHT (RA-EHT) zeigte sich eine fehlende initiale, schnelle Repolarisation und eine  $V_{Plateau}$  von ca. 0 mV. Eine Ursache hierfür ist wohl, dass die Stärke des  $I_{Kur}$  in hiPSC-aCM deutlich geringer ist als in menschlichem Vorhofgewebe (Verkerk et al. 2020). Im Unterschied zu den bisherigen Vorhof-ähnlichen EHTs zeigten isogene Kontroll-aEHTs der vorliegenden Arbeit wichtige elektrophysiologische Charakteristika des menschlichen Vorhofs (Schulz et al., 2023). Neben der starken frühen Repolarisation ( $APD_{20}$ :  $8,6 \pm 2,4$  ms) zeigten die aEHTs eine  $V_{Plateau}$  von deutlich negativer als 0 mV ( $-19,2 \pm 6,7$ ). Insofern stellen die isogenen Kontroll-aEHTs dieser Arbeit eine Verbesserung des elektrophysiologischen Phänotyps unter Kontrollbedingungen dar.



**Abbildung 4.1: Effekt des  $I_{Kur}$ -Blocks auf die AP-Form von menschlichem Vorhofgewebe, RA-EHT und aEHT.**

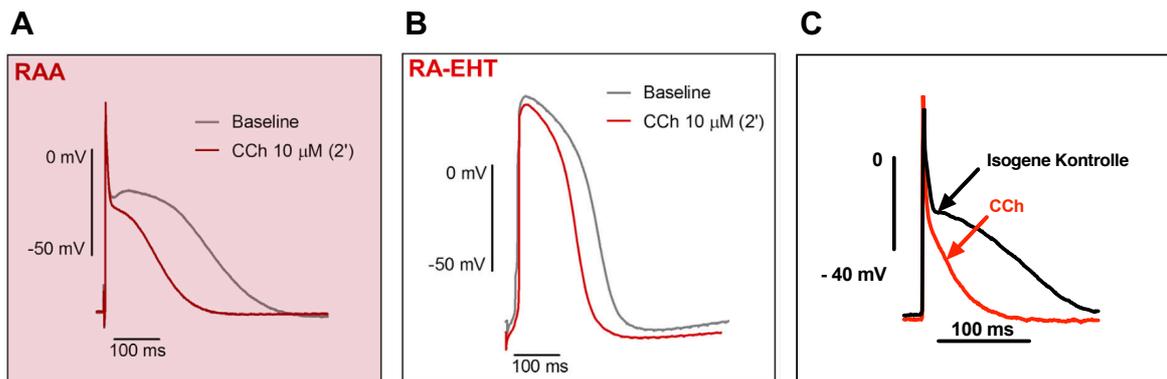
Effekte des  $I_{Kur}$ -Blocks mit 4-Aminopyridin (4-AP, 50  $\mu$ M) auf die Aktionspotenziale (AP) von menschlichem Gewebe aus dem rechten Vorhof (RAA; **A**), früher mit Retinolsäure (RA) behandeltem EHT (RA-EHT; **B**) und aktuellem aEHT (C). Abbildungen **A** und **B** sind verändert nach Lemme et al. (2018).

Im menschlichen Vorhof hat der Block von  $I_{Kur}$  starke Effekte. Die  $APD_{20}$  wird durch die Zugabe von 4-AP um ein Vielfaches verlängert und die  $V_{Plateau}$  um ca. 20 mV in Richtung stärker positive Werte verschoben (Wettwer et al. 2004). Diese Verschiebung bewirkt eine Veränderung der späten Repolarisation des Vorhof-AP. Der schnell aktivierende Anteil des „Delayed Rectifier“ ( $I_{Kr}$ ) wird bei stärker positiven Werten der  $V_{Plateau}$  stärker aktiviert und bewirkt eine schnellere späte Repolarisation. Diese schnellere Repolarisation resultiert in einer Abnahme der  $APD_{90}$  (Wettwer et al. 2004, Lemme et al. 2018; **Abbildung 4.1A**). Somit hat der Block von  $I_{Kur}$  im menschlichen Vorhof gegenläufige Auswirkungen auf die  $APD_{20}$  und  $APD_{90}$ . In einer ersten Arbeit aus dem IEPT führte der Block von  $I_{Kur}$  mittels 4-AP in RA-EHTs (Differenzierung mit steril-filtrierter RA) nur zu einem kleinen Effekt auf die  $V_{Plateau}$  und nur zu einer geringfügigen Verlängerung der  $APD_{20}$  (Lemme et al. 2018; **Abbildung 4.1B**). Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten im Vergleich dazu in aEHT (Differenzierung mit unfiltrierter RA) einen ähnlichen Effekt des  $I_{Kur}$ -Blocks wie in menschlichem Vorhofgewebe. Es zeigte sich eine starke Zunahme der  $APD_{20}$ , eine Verschiebung der  $V_{Plateau}$  um ca. 20 mV in Richtung stärker positive Werte und eine Abnahme der  $APD_{90}$  (**Abbildung 4.1C**). Die isogenen Kontroll-aEHTs dieser Arbeit erfüllten zwei wichtige Anforderungen an ein elektrophysiologisches Vorhofmodell: Zum einen besitzen aEHTs ein Vorhof-ähnliches AP mit der starken initialen Repolarisation und einem darauffolgenden Plateau. Zum anderen bewirkt der Block von  $I_{Kur}$  die genannten Vorhof-spezifischen Effekte (Schulz et al., 2023).

Eine weitere wichtige Voraussetzung eines Vorhofmodells ist die Verkürzung der APD und die Hyperpolarisation des RMP durch die Stimulation muskarinergere Rezeptoren. Beide Effekte werden über den Vorhof-spezifischen Strom  $I_{K_{ACh}}$  vermittelt. Untersuchungen in RA-EHTs zeigen, dass die Aktivierung muskarinergere Rezeptoren eine Verkürzung der  $APD_{90}$  (20%) bewirkt. Jedoch

ist diese im Vergleich zu humanem Vorhofgewebe deutlich geringer ausgeprägt (Lemme et al. 2018;

**Abbildung 4.2A und B).** Die isogenen Kontroll-aEHTs dieser Arbeit zeigten eine drastische Verkürzung der APD<sub>90</sub> (50%), sodass die für den menschlichen Vorhof typische Verkürzung der APD<sub>90</sub> bei Aktivierung von I<sub>K,ACh</sub> gut reproduziert werden konnte (**Abbildung 4.2C;** Schulz et al. 2023).



**Abbildung 4.2: Muskarinerge Effekte auf AP von menschlichem Vorhofgewebe, RA-EHT und aEHT.**

Effekte von Carbachol (CCh, 10 µM) auf die Aktionspotenziale (AP) von menschlichem Gewebe aus dem rechten Vorhof (RAA; **A**), früherem mit Retinolsäure (RA) behandeltem EHT (RA-EHT; **B**) und aktuellem aEHT (**C**). Abbildungen **A** und **B** sind verändert nach Lemme et al. (2018). Abbildung **C** verändert nach Schulz et al. (2023).

#### 4.1.2 Ursache des verbesserten atrialen Phänotyps

Was ist der Grund für die verbesserte atriale Differenzierung? Für die atriale Differenzierung in dieser Arbeit wurde ein verändertes Protokoll zur Herstellung der RA-Lösung verwendet. Bisher wurde die RA als Pulver zuerst in DMSO gelöst und danach für die Anwendung in der Stammzellkultur steril filtriert. Nach erfolgter Filtration zeigte sich eine veränderte Farbe der RA-Lösung. Vor der Filtration erschien die RA grün-gelb, wohingegen die Lösung nach Filtration farblos war. Die in dieser Arbeit verwendete RA-Lösung wurde unter sterilen Bedingungen in DMSO gelöst, ohne nachfolgende sterile Filtration. Dabei blieb die grün-gelbe Farbe der RA-Lösung erhalten. Aufgrund des verbesserten atrialen Phänotyps der aEHTs vermuteten wir, dass es während des Filtrierens zu einer Veränderung der RA-Lösung kommt, wodurch die atriale Differenzierung negativ beeinflusst wird. Massenspektrometrische Messungen bestätigten diese Annahme (siehe **Kapitel 2.5.8**). Die RA-Konzentration in der steril-filtrierte Lösung (Lemme et al., 2018) war bis zu 1000-fach geringer als in der nicht-filtrierte RA-Lösung (Daten nicht aufgeführt; Schulz et al., 2023). Insofern ist die Annahme gerechtfertigt, dass die Verbesserung des

atrialen Phänotyps bei gleicher verwendeter Zelllinie im gleichen Labor auf die veränderte Zubereitung der RA-Lösung zurückzuführen ist. Zukünftige Versuche sollten diese Hypothese durch einen direkten Vergleich der RA Konzentrationen überprüfen.

Zusammenfassend repräsentierten die isogenen Kontroll-aEHTs wichtige elektrophysiologische Eigenschaften des menschlichen Vorhofs und eignen sich daher als elektrophysiologisches Vorhofmodell (Schulz et al., 2023).

#### **4.2 Vollständiger Knockout des PITX2-Gens ist möglich in hiPSC**

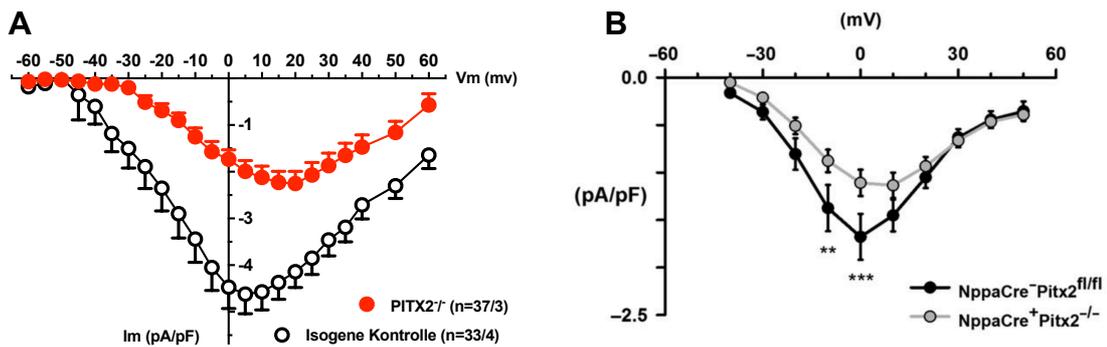
PITX2 ist ein Transkriptionsfaktor, der während der Embryonalentwicklung entscheidend zur Entwicklung von Herz, Augen und Rumpf beiträgt. Bisherige Untersuchungen eines homozygoten PITX2-Knockouts auf Keimbahnebene im Mausmodell zeigten, dass diese Knockout-Mäuse nicht überlebensfähig sind (Lin et al., 1999). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es zum einen möglich ist, PITX2<sup>-/-</sup>-hiPSC zu kultivieren. Zum anderen bestand kein morphologischer Unterschied zwischen PITX2<sup>-/-</sup>- und isogenen Kontroll-hiPSC. Im nächsten Schritt konnte gezeigt werden, dass PITX2<sup>-/-</sup>-hiPSC atrial differenziert werden können. Die Analyse der Genexpression zeigt sowohl für PITX2<sup>-/-</sup>-, als auch für die isogenen Kontrollzellen einen atrialen Phänotyp. Somit haben hiPSC-aCM nicht nur den Vorteil gegenüber konventionellen Mausmodellen, dass es sich um humane Zellen handelt. Vielmehr ist es möglich, den Transkriptionsfaktor PITX2 homozygot auf DNA-Ebene auszuschalten. Insofern sollten hiPSC-aCM ein nützliches Modell darstellen, um die Auswirkungen verringerter PITX2-Konzentrationen in humanem Gewebe untersuchen zu können (Schulz et al., 2023).

#### **4.3 Verringerter I<sub>Ca,L</sub> und verringerte Kraft in PITX2<sup>-/-</sup> und persistierendem VHF**

Bei persistierendem VHF ist die Kontraktionskraft (Christ et al., 2014; Schotten et al., 2001) und der I<sub>Ca,L</sub> (Christ et al., 2004; Christ et al., 2014; Van Wagoner et al., 1999) im Vorhof verringert. Dabei ist es unklar, ob der verringerte Calciumstrom und die verringerte Kontraktionskraft Ursache und/oder Folge von VHF sind. Untersuchungen im Mausmodell mit PITX2-Knockout zeigen, dass der I<sub>Ca,L</sub> im linken Vorhof ebenfalls verringert ist (Lonzano-Velasco et al.; **Abbildung 4.3B**). Jedoch fehlen bis heute Messungen der Kontraktionskraft unter verringerten PITX2-Konzentrationen (Schulz et al., 2023).

In PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT war der I<sub>Ca,L</sub> ebenfalls verringert, sodass die Ergebnisse des Mausmodells in dieser Arbeit mit hiPSC-aCM bestätigt wurden. Ebenso war die Kontraktionskraft in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT verringert. Aufgrund dieser Beobachtungen besteht Grund zu der Annahme, dass verringerte PITX2-Konzentrationen zu einer Verringerung des I<sub>Ca,L</sub> führten, die in der Abnahme der Kontraktionskraft resultierte. Zudem wurde die Untereinheit *CACNA1C* des L-Typ Calcium-Kanals (LTCC) in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT verringert exprimiert. Somit hat der Transkriptionsfaktor PITX2

vermutlich einen entscheidenden Einfluss auf die regelrechte Expression und Funktion des LTCC (Schulz et al., 2023). Auch in persistierendem VHF zeigt sich ein verringerter  $I_{Ca,L}$  und die verringerte Kontraktionskraft. Deshalb lässt sich zusammenfassend sagen, dass bei Fehlen des Transkriptionsfaktors PITX2 in aEHT wesentliche funktionelle Merkmale auftraten, wie sie bei persistierendem VHF vorliegen. Allerdings kam es in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT zu diesen Veränderungen in der Abwesenheit von schnellen elektrischen Erregungen, was für einen primären Effekt der PITX2-Deletion spricht.



**Abbildung 4.3: Verringerter  $I_{Ca,L}$  bei verringerten PITX2-Konzentrationen.**

Stromstärke (I) in Abhängigkeit der Spannung (V) des L-Typ-Calciumstroms ( $I_{Ca,L}$ ) im Vergleich zwischen Kontrolle (schwarz) und verringerten PITX2-Konzentrationen (A: rot, B: grau) in aEHT (A) und humanen Vorhofmyozyten (B). Abbildung A wurde verändert nach Schulz et al. (2023). Abbildung B wurde entnommen aus Lozano-Velasco et al. (2016).

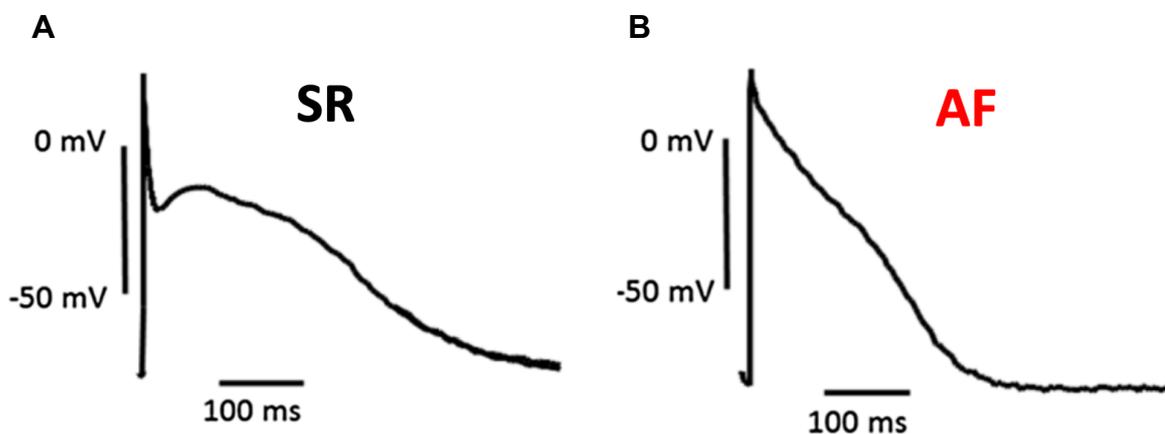
#### 4.4 Effekt des PITX2-Knockouts auf die Frequenzabhängigkeit der APD bleibt unklar

Die APD<sub>90</sub>, gemessen bei 1 Hz, ist bei persistierendem VHF verkürzt (Franz et al., 1997). Darüber hinaus ist aber auch die Anpassung der APD an höhere Frequenzen bei persistierendem VHF weitgehend verloren, sodass die Verkürzung der APD<sub>90</sub> nur bei niedrigen Stimulationsfrequenzen (1-2 Hz) nachweisbar ist (Franz et al., 1997). Mäuse mit PITX2-Knockout zeigten ebenfalls eine verringerte APD, jedoch ausschließlich bei sehr hohen Stimulationsfrequenzen (Kirchhof et al., 2011). In dieser Arbeit sahen wir keinen signifikanten Unterschied in der APD<sub>90</sub> zwischen PITX2<sup>-/-</sup> und isogener Kontrolle. Es zeigte sich lediglich eine Tendenz hin zu einer kürzeren APD<sub>90</sub> in PITX2<sup>-/-</sup> aEHT, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Bei der Messung der APD in aEHT ergab sich das Problem, dass aEHTs mit einer spontanen Eigenfrequenz von ca. 140 Schlägen pro Minute schlagen. Bei solch hohen Frequenzen nimmt die atriale APD im SR bereits stark ab, sodass mögliche Unterschiede der APD bei niedriger Frequenz nicht gemessen werden konnten. Mit Ivabradin kann die spontane Schlagfrequenz ventrikulärer EHTs sehr effektiv weit unter 60 bpm reduziert werden. Die gleiche Intervention ist unwirksam bei aEHT. Stimulation von Muskarinrezeptoren verlangsamt die Schlagfrequenz von aEHT, hat aber drastische Effekte auf die APD und eignete sich daher nicht bei der Untersuchung der APD. Aus diesem Grund bleibt es

unklar, ob PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT eine verkürzte APD bei langsameren Frequenzen aufweist. Zukünftige Versuche könnten den Effekt einer Temperaturabsenkung auf die spontane Schlagfrequenz und APD<sub>90</sub> der aEHTs überprüfen.

#### 4.5 Verlangsamte frühe Repolarisation in PITX2<sup>-/-</sup> ähnelt elektrischem „Remodeling“ bei persistierendem VHF

Zu den wichtigen Charakteristika des elektrischen „Remodeling“ bei persistierendem VHF gehört nicht nur die Verkürzung der APD<sub>90</sub>, sondern auch die Verlängerung der APD<sub>20</sub>. Die verlängerte APD<sub>20</sub> resultiert aus einer abgeschwächten initialen Repolarisation und führt über eine monotone Repolarisation zu einer triangulierten Form des AP (**Abbildung 4.4**). Die PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs zeigten ebenfalls eine verlängerte APD<sub>20</sub> und eine triangulierte AP-Form. Grund für die abgeschwächte initiale Repolarisation bei VHF ist eine verringerte Aktivität von I<sub>to</sub> und I<sub>Kur</sub>. Die Verlängerung der APD<sub>20</sub> bei VHF ist im Gegensatz zur Verkürzung der APD<sub>90</sub> auch bei hohen Stimulationsfrequenzen erhalten (Ford et al., 2016). Die triangulierte AP-Form, die verlängerte APD<sub>20</sub> und verkürzte APD<sub>90</sub> sind charakteristisch für Gewebe von VHF-Patienten, bei denen es dauerhaft im Vorhof zu schnellen elektrischen Erregungen kommt. Dabei ist unklar, ob die elektrophysiologischen Veränderungen Ursache und/oder Folge von VHF sind (Schulz et al., 2023).



**Abbildung 4.4: AP-Form in Sinusrhythmus und Vorhofflimmern.**

AP-Originale gemessen in humanen Gewebeproben von Patienten mit Sinusrhythmus (SR; **A**) und Vorhofflimmern („atrial fibrillation“, AF; **B**). Abbildung entnommen aus Ravens et al. (2015).

Die kontrovers diskutierte Assoziation zwischen verringerten PITX2-Konzentrationen und dem Auftreten von VHF lässt vermuten, dass verringerte PITX2-Konzentrationen zur Entstehung von VHF beitragen könnten. In dieser Arbeit sahen wir, ähnlich wie bei VHF, eine Verlängerung der APD<sub>20</sub> in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT. Zudem war das AP der PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs im Vergleich zur isogenen Kontrolle deutlich trianguliert. Somit zeigten PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs zwei wichtige Merkmale des elektrischen „Remodeling“ bei VHF, ohne dass es zu schnellen elektrischen Erregungen

gekommen wäre. Daraus resultiert die Annahme, dass verringerte PITX2-Konzentrationen im menschlichen Vorhof zu VHF-ähnlichen elektrophysiologischen Veränderungen führen könnten und damit die Entstehung von VHF begünstigen könnten.

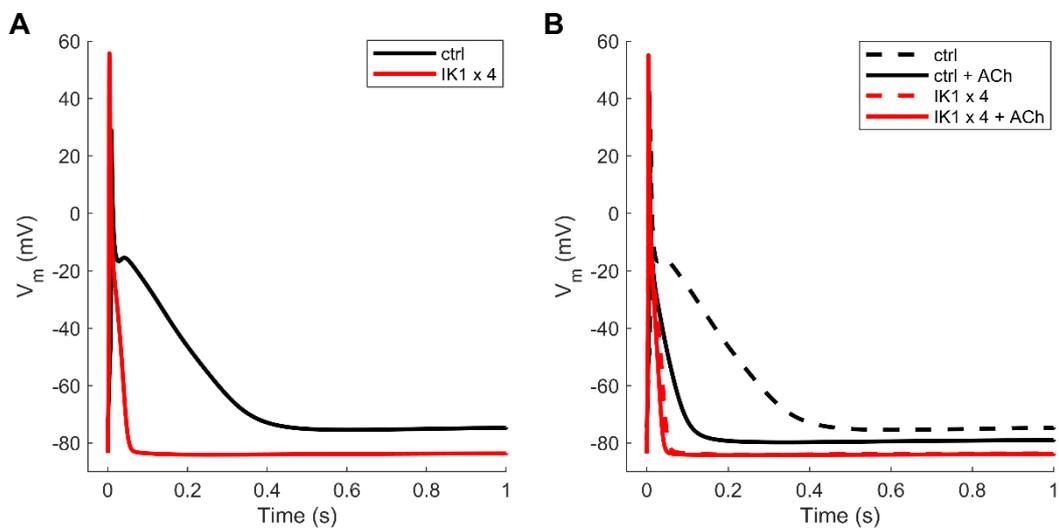
Erblich bedingtes VHF ist sehr selten. Zu den möglichen genetischen Ursachen für VHF gehören u.a. *KCNA5*-Mutationen, welche zu einer verringerten Aktivität des  $I_{Kur}$  führen (Olson et al., 2006; Christophersen et al., 2013). Somit erhöht die verringerte Aktivität des  $I_{Kur}$  das Risiko für das Auftreten von VHF. Die Quantifizierung des  $I_{Kur}$ -Stroms in isogener Kontrolle und PITX2<sup>-/-</sup> mittels Patch-Clamp war kein Teil dieser Arbeit, sondern ist Gegenstand aktueller Untersuchungen im IEPT. Deshalb können wir nur annehmen, dass die verlängerte APD<sub>20</sub> in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT auf eine Verringerung des  $I_{Kur}$  zurückzuführen ist. Die Assoziation zwischen verringerten PITX2-Konzentrationen und VHF tritt jedoch um ein Vielfaches häufiger auf als Mutationen im *KCNA5*-Gen. Daher ist es schwer, das Risiko beider Faktoren miteinander zu vergleichen. Die verringerte initiale Repolarisation könnte jedoch das Risiko für das Auftreten von VHF bei Patienten mit verringerten PITX2-Konzentrationen wesentlich erhöhen (Schulz et al, 2023).

#### **4.6 Mögliche Erklärungen für das stärker negative MDP in PITX2<sup>-/-</sup>**

AP-Messungen in PITX2-Knockout-Mäusen zeigen ein weniger negatives RMP. Diese Verschiebung des RMP zu positiveren Werten lässt eine größere Wirkung von Natriumkanal-Blockern bei verringerten PITX2-Konzentrationen erwarten (Holmes et al., 2021; Syeda et al., 2016). Gegenteilig verhält es sich bei Vorhofgewebe von VHF-Patienten. Hier zeigt sich ein stärker negatives RMP (Ravens et al., 2015). Als Ursache hierfür kommt die bei persistierendem VHF erhöhte Aktivität des  $I_{K1}$  in Betracht (Dobrev et al., 2001). In PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT war das MDP deutlich stärker negativ als in Kontroll-aEHT (ca. 9 mV). Eine erhöhte Aktivität von  $I_{K1}$  als Ursache für das stärker negative MDP in PITX2<sup>-/-</sup> konnte in dieser Arbeit allerdings nicht gezeigt werden. Die RNA-Sequenzierung zeigte keine ausreichend veränderte Expression von Untereinheiten des  $I_{K1}$ , die eine drastische Zunahme der  $I_{K1}$ -Aktivität erklären könnte. Zudem zeigte sich auch kein quantitativer Unterschied in der Stärke des  $I_{K1}$  in Patch-Clamp-Messungen.

Computersimulationen, die von Dr. Koivumäki (Tampere University, Tampere, Finnland) durchgeführt wurden, zeigen, dass der  $I_{K1}$ -Strom auf das Vierfache ansteigen müsste, um einen Unterschied im MDP von ca. 8 mV allein auf den  $I_{K1}$  zurückführen zu können (**Abbildung 4.5**). Eine solch drastische Zunahme sollte in Patch-Clamp-Untersuchungen auffallen. Außerdem sollte eine solche Zunahme des  $I_{K1}$  auch eine sehr deutliche Verkürzung der APD nach sich ziehen. Daher würden wir andere ursächliche Mechanismen für das negativere MDP vermuten (Schulz et al, 2023). Eine Möglichkeit könnte die Expression eines Herz-unspezifischen Ionenkanals sein. PITX2 ist ein Transkriptionsfaktor, der entscheidend zur regelrechten kardialen Entwicklung beiträgt. Insofern wäre eine verringerte Effizienz der atrialen Differenzierung aufgrund der

vollständigen PITX2-Defizienz in PITX2<sup>-/-</sup>-hiPSC durchaus denkbar. Somit könnten auch Herz-unspezifische Ionenkanäle in hiPSC-aCM exprimiert werden und zur Entstehung von kardial-untypischen Strömen beitragen. Gegen diese Vermutung spricht zum einen eine fehlende Expression derartiger Ströme in der RNA-Sequenzierung. Zum anderen zeigten die PITX2<sup>-/-</sup>-aEHTs in der qPCR eine sehr hohe Expression atrialer Markerproteine. Insofern könnten neben der beeinträchtigten Differenzierung auch grundlegende biophysikalische Unterschiede in PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT als mögliche Erklärung in Frage kommen. Denkbar wäre eine Veränderung der Ionenselektivität einzelner kardialer Kanäle, sodass es aufgrund der veränderten Leitfähigkeit auch zur Veränderung des MDP kommen könnte.



**Abbildung 4.5: Simulierter Effekt eines verstärkten  $I_{K1}$ -Stroms und  $I_{K,ACh}$ -Aktivierung auf das MDP.**

Computersimulation eines 4-fach erhöhten  $I_{K1}$ -Stroms zeigt ein stärker negatives maximales diastolisches Potenzial (MDP) von -8,6 mV (A). Bei bereits 4-fach erhöhtem  $I_{K1}$  bewirkt die Aktivierung des durch Acetylcholin aktivierbaren Kaliumstroms ( $I_{K,ACh}$ ) nur eine geringfügige Hyperpolarisation des MDP um -0,2 mV (B, rote Linien), wohingegen unter Kontrollbedingungen die Aktivierung von  $I_{K,ACh}$  eine Hyperpolarisation des MDP um -4,3 mV bewirkt (B, schwarze Linien). Abbildung entnommen aus Schulz et al. (2023).

#### 4.7 Limitationen

In dieser Arbeit wurden hiPSC genutzt, um daraus hiPSC-aCM zu differenzieren. Während des Differenzierungsvorgangs kann es durch äußere Einflüsse dazu kommen, dass vereinzelt Zellen von der kardialen Differenzierung abweichen oder ganze Differenzierungsläufe keinen ausreichenden kardialen Differenzierungsgrad erreichen. Durch die wiederholte Auswertung mehrerer Differenzierungsläufe von PITX2<sup>-/-</sup> und isogener Kontrolle wurde versucht, dieses Problem zu minimieren.

Atriale EHTs wurden nach einem festgelegten und standardisierten Protokoll hergestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle dafür benötigten Substanzen frisch zubereitet waren. Um den Einfluss der aEHT-Herstellung auf die kontraktile Eigenschaften und elektrophysiologischen Parameter möglichst gering zu halten, wurden für jedes aEHT-„Batch“ immer isogene Kontrolle und PITX2<sup>-/-</sup> am selben Tag hergestellt.

Die AP-Messung mit der scharfen Mikroelektrode ist eine Methode, die sehr anfällig für Störfaktoren ist. Die Herstellung der Glaspipetten erfolgte stets an demselben Gerät, sodass Unterschiede der Herstellung weitgehend ausgeschlossen werden konnten. Das für die Herstellung benötigte Filament des „Elektroden-Pullers“ wurde nach einem festgelegten Protokoll alle 6 Wochen ausgetauscht und die Programmeinstellungen des „Elektroden-Pullers“ anschließend kontrolliert. Alle AP-Messungen wurden mit Tyrode's-Lösung durchgeführt, die am Tag des Experiments frisch angesetzt wurde. Um den Einfluss von Substanzresten in der Messkammer auf die AP-Messungen zu verringern, wurde vor und nach jedem Experiment die Kammer für 30 Minuten ausgespült. AP-Parameter sind sehr anfällig für äußere Störfaktoren, wie z.B. Temperatur oder pH-Wert. Aus diesem Grund wurde das Wärmebad bereits vor Beginn der AP-Messungen auf die benötigte Betriebstemperatur vorgewärmt. Bei der Auswertung der AP-Parameter wurden bei jedem Versuch mindestens 30 AP in die Auswertung miteinbezogen, um den Einfluss einzelner AP auf die Gesamtauswertung zu verringern.

Die AP-Messungen in aEHTs von isogener Kontrolle und PITX2<sup>-/-</sup> erfolgten erst nach 30 Tagen EHT-Kultur und Video-optischer Kontraktilitäts-Analyse, damit die aEHTs einen ausreichenden Reifungsgrad für die elektrophysiologischen Untersuchungen aufwiesen. Alle gemessenen aEHTs hatten ein Alter zwischen 30-38 Tagen. Ein weiterer Aspekt ist die hohe Eigenfrequenz der aEHTs. Bisherige Versuche zur Verringerung der Frequenz schlugen fehl. Somit war die Untersuchung der APD nur begrenzt möglich und es bleibt unklar, ob eine vollständige PITX2-Defizienz Auswirkungen auf die APD in aEHT hat.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der vollständigen PITX2-Defizienz in aEHT zu untersuchen. Bei der fraglichen Assoziation zwischen VHF und verringerten PITX2 spielen jedoch verringerte PITX2-Konzentrationen eine Rolle, sodass eine Restaktivität von PITX2 bestehen bleibt. Insofern sind die Ergebnisse dieser Arbeit nur begrenzt auf das Szenario bei VHF

übertragbar. Ein Defekt des PITX2-Proteins in Patienten hat deutlich drastischere Auswirkungen (komplexe Herzfehler, Skelettanomalien, etc.) als die Entstehung von VHF, sodass die klinische Aussagekraft dieser Arbeit sehr begrenzt ist.

In den GWAS zeigte sich eine starke Assoziation zwischen SNPs in der Nähe des PITX2-Gens und VHF. Die Frage, inwiefern die SNPs zur Entstehung von VHF beitragen und welche Mechanismen der Entstehung zugrunde liegen, bleibt weiterhin ungeklärt. Die Beantwortung dieser Frage war nicht das Ziel dieser Arbeit. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass fehlende PITX2-Konzentrationen elektrophysiologische Veränderungen bewirken können, die ähnlich zu den Veränderungen bei persistierendem VHF sind und die zur Entstehung von VHF beitragen könnten.

## 5. Ausblick

Das elektrische „Remodeling“ bei Patienten mit VHF wird oft auf die schnelle elektrische Aktivierung des Vorhofmyokards zurückgeführt. Dabei ist unklar, ob diese elektrophysiologischen Veränderungen die Ursache und/oder Folge von VHF sind. In dieser Arbeit werden wichtige elektrophysiologische Merkmale von persistierendem VHF in Abwesenheit von schneller elektrischer Aktivierung präsentiert. Dabei scheint ein vollständiges Fehlen des Transkriptionsfaktors PITX2 in aEHT ein ähnliches elektrisches „Remodeling“ wie bei VHF zu verursachen. Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern die These, dass verringerte PITX2-Konzentrationen zum elektrischen „Remodeling“ bei VHF beitragen und sogar das Auftreten von VHF begünstigen könnten. Es bleibt unklar, inwiefern ein vollständiges Fehlen von PITX2 klinisch relevant ist, denn bei VHF-Patienten bleibt eine bestimmte Restaktivität von PITX2 bestehen. Die Untersuchung der Genvarianten in der Nähe des PITX2-Gens wäre ein wichtiger nächster Schritt. Dabei gilt es herauszufinden, inwiefern diese SNPs möglicherweise Einfluss auf Gene in direkter Nachbarschaft von PITX2 nehmen könnten. Dazu zählen u.a. die beiden Gene *ENPEP* und *PANCR*, die zusammen mit PITX2 ein komplexes regulatorisches Netzwerk bilden könnten und bei einem möglichen Ungleichgewicht zur Entstehung von VHF beitragen könnten. Störungen dieses Netzwerkes könnten u.a. in hiPSC-aCM-basierten Knockout-Modellen oder in der PITX2<sup>-/-</sup>-Zelllinie dieser Arbeit modelliert werden.

Ein weiterer Ansatz könnte dabei die Herstellung einer spezifischen hiPSC-Linie sein, die von einem Patienten/Probanden ohne VHF stammt, dessen Genom genau die SNPs in der Nähe des PITX2-Gens aufweist. Mittels CRISPR/Cas9 könnte eine dazugehörige isogene hiPS-Kontrollzelllinie hergestellt werden. Elektrophysiologische Untersuchungen dieser hiPSC-Linien im aEHT-Format sollten zeigen können, ob die Genvarianten zur Entstehung von VHF beitragen.

## 6. Zusammenfassung der Dissertation

### 6.1 Deutsche Zusammenfassung

**Hintergrund:** Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste kardiale Arrhythmie des Menschen. Aufgrund der hohen kardiovaskulären Morbidität und Mortalität von Patienten mit VHF ist besonders die Entstehung von VHF Gegenstand aktueller Forschung. Neben ursächlichen kardiovaskulären Erkrankungen spielen auch genetische Faktoren bei der Entstehung von VHF eine entscheidende Rolle. In den „Genome-wide association studies“ zeigt sich eine starke Assoziation zwischen Genvarianten in der Nähe des *PITX2*-Gens („Paired-like homeodomain transcription factor 2“) und VHF. Verringerte *PITX2*-Konzentrationen im linken Vorhof werden als Ursache für diese Assoziation angenommen. Bis heute bleibt es jedoch unklar, wie verringerte *PITX2*-Konzentrationen zur Entstehung von VHF beitragen können. In dieser Arbeit sollen die Auswirkungen einer vollständigen *PITX2*-Deletion in humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC), in aus hiPSC differenzierten atrialen Kardiomyozyten (hiPSC-aCM) und atrialem „Engineered Heart Tissue“ (aEHT) untersucht werden.

**Methoden:** Der Protein-kodierende Anteil des *PITX2*-Gens wurde mittels CRISPR/Cas9 aus einer gesunden Kontrollzelllinie entfernt, sodass eine *PITX2*-defiziente hiPSC-Linie (*PITX2*<sup>-/-</sup>) entstand. Die Kontrollzelllinie (isogene Kontrolle) und die *PITX2*<sup>-/-</sup>-hiPSC wurden durch ein Retinolsäure (RA)-enthaltendes Differenzierungsprotokoll zu hiPSC-aCM differenziert und in aEHT kultiviert. Es erfolgte die Messung von Kraft, Kontraktilität und Aktionspotenzialen (AP) in aEHT und Patch-Clamp in einzelnen hiPSC-aCM. Die Expressionsanalyse wurde mittels quantitativer PCR (qPCR) und RNA-Sequenzierung durchgeführt.

**Ergebnisse:** *PITX2*<sup>-/-</sup>-aEHTs zeigten eine geringere Kontraktionskraft und eine verringerte Expression (CACNA1C) und Stromdichte des L-Typ-Calciumstroms (LTCC, *I*<sub>Ca,L</sub>). Darüber hinaus zeigten *PITX2*<sup>-/-</sup>-aEHTs eine schwächere frühe Repolarisation und ein stärker negatives maximales diastolisches Potenzial (MDP). Die isogenen Kontroll-aEHTs zeigten eine starke initiale Repolarisation gefolgt von einer stark ausgeprägten Plateauphase. Darüber hinaus zeigten sie eine ähnliche Antwort auf den Block des Vorhof-spezifischen Kanals *I*<sub>Kur</sub> (mit 4-Aminopyridin) und ähnliche muskarinerge Effekte (mit Carbachol) wie intaktes humanes Vorhofgewebe.

**Schlussfolgerung:** Isogene Kontroll-aEHTs zeigen wichtige elektrophysiologische Charakteristika des menschlichen Vorhofs und stellen eine Verbesserung bei der Entwicklung von elektrophysiologischen Vorhofmodellen dar. Atriale EHTs mit vollständiger *PITX2*-Defizienz zeigen elektrophysiologische Veränderungen, die sehr ähnlich sind zum elektrischen „Remodeling“ bei persistierendem VHF. Somit könnten verringerte *PITX2*-Konzentrationen elektrophysiologische Veränderungen verursachen, die ähnlich sind zu denen bei persistierendem VHF, jedoch in Abwesenheit von schneller elektrischer Aktivierung.

## 6.1 Englische Zusammenfassung

**Background:** Atrial fibrillation (AF) is the most common cardiac arrhythmia. AF patients often suffer from high cardiovascular morbidity and mortality and therefore the origin for the occurrence of AF is a big field of cardiovascular research. Besides cardiac diseases, there are genetic causes predisposing to AF. The Genome-wide association studies (GWAS) show a strong association of gene variants next to the gene of the transcription factor PITX2 (paired-like homeodomain transcription factor 2) and AF. Moreover, a significant number of AF-patients show low PITX2-levels in the left atria. However, the question of the connection between low PITX2-levels and AF remains unclear. This study investigates the electrophysiological impacts of complete PITX2 ablation in human induced pluripotent stem cells (hiPSC), hiPSC-derived atrial cardiomyocytes (hiPSC-aCM) and atrial engineered heart tissue (aEHT).

**Methods:** For this reason, the *PITX2* gene was deleted by CRISPR/Cas9 treatment in a healthy control cell line (isogenic control) to generate a homozygous PITX2-deficient hiPSC line (PITX2<sup>-/-</sup>). The isogenic control and PITX2<sup>-/-</sup> hiPSC were differentiated into hiPSC-aCM by treatment with retinoic acid (RA) and were cultured in aEHT. Force and contractility parameters were monitored, action potential (AP) recordings and ion current measurements were performed in aEHT. Expression analysis was performed by RNA sequencing

**Results:** PITX2<sup>-/-</sup>-aEHT showed lower force which was associated with lower expression of L-type calcium channel (LTCC, subunit CACNA1C) and lower I<sub>Ca,L</sub> density. Early repolarisation was weaker and maximum diastolic potential (MDP) was more negative in PITX2<sup>-/-</sup>. The isogenic control aEHTs showed atrial-like AP shape consisting of strong early repolarisation followed by a plateau below 0 mV. Additionally, isogenic control aEHT showed similar response to the block of I<sub>Kur</sub> (by 4-aminopyridine) and similar muscarinic effects (by carbachol) as seen in human atrial tissue.

**Conclusions:** In summary, isogenic control aEHT represents important electrophysiological characteristics of the human atrium. Atrial EHT with complete *PITX2* deletion shows similar characteristics to the electrical remodeling in AF but in the absence of fast beating. This study gives evidence for an association of low (complete missing) PITX2 levels and electrophysiological characteristics similar to AF remodeling which may enhance the risk for the occurrence AF.

## 7. Literaturverzeichnis

- Bassand, J. P., Accetta, G., Camm, A. J., Cools, F., Fitzmaurice, D. A., Fox, K. A. A., Goldhaber, S. Z., Goto, S., Haas, S., Hacke, W., Kayani, G., Mantovani, L. G., Misselwitz, F., Ten Cate, H., Turpie, A. G. G., Verheugt, F. W. A., Kakkar, A. K., Pieper, K. S., Gersh, B. J., ... Worthy, V. (2016). Two-year outcomes of patients with newly diagnosed atrial fibrillation: Results from GARFIELD-AF. *European Heart Journal*, *37*(38), 2882–2889. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw233>
- Blomstrom Lundqvist, C., Lip, G. Y. H., & Kirchhof, P. (2011). What are the costs of atrial fibrillation? *Europace*, *13*(SUPPL. 2), 9–12. <https://doi.org/10.1093/europace/eur087>
- Breckwoldt, K., Letuffe-Brenière, D., Mannhardt, I., Schulze, T., Ulmer, B., Werner, T., Benzin, A., Klampe, B., Reinsch, M. C., Laufer, S., Shibamiya, A., Prondzynski, M., Mearini, G., Schade, D., Fuchs, S., Neuber, C., Krämer, E., Saleem, U., Schulze, M. L., Hansen, A. (2017). Differentiation of cardiomyocytes and generation of human engineered heart tissue. *Nature Protocols*, *12*(6), 1177–1197. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.033>
- Chinchilla, A., Daimi, H., Lozano-Velasco, E., Dominguez, J. N., Caballero, R., Delpón, E., Tamargo, J., Cinca, J., Hove-Madsen, L., Aranega, A. E., & Franco, D. (2011). PITX2 insufficiency leads to atrial electrical and structural remodeling linked to arrhythmogenesis. *Circulation. Cardiovascular Genetics*, *4*(3), 269–279. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.110.958116>
- Choe, W. S., Kang, J. H., Choi, E. K., Shin, S. Y., Lubitz, S. A., Ellinor, P. T., Oh, S., & Lim, H. E. (2019). A genetic risk score for atrial fibrillation predicts the response to catheter ablation. *Korean Circulation Journal*, *49*(4), 338–349. <https://doi.org/10.4070/kcj.2018.0161>
- Christ, T., Boknik, P., Wöhrle, S., Wettwer, E., Graf, E. M., Bosch, R. F., Knaut, M., Schmitz, W., Ravens, U., & Dobrev, D. (2004). L-type Ca<sup>2+</sup> current downregulation in chronic human atrial fibrillation is associated with increased activity of protein phosphatases. *Circulation*, *110*(17), 2651–2657. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000145659.80212.6A>
- Christ, Torsten, Rozmaritsa, N., Engel, A., Berk, E., Knaut, M., Metzner, K., Canteras, M., Ravens, U., & Kaumann, A. (2014). Arrhythmias, elicited by catecholamines and serotonin, vanish in human chronic atrial fibrillation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(30), 11193–11198. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324132111>
- Christophersen, I. E., Olesen, M. S., Liang, B., Andersen, M. N., Larsen, A. P., Nielsen, J. B., Haunsø, S., Olesen, S.-P., Tveit, A., Svendsen, J. H., & Schmitt, N. (2013). Genetic variation in KCNA5: impact on the atrial-specific potassium current I<sub>Kur</sub> in patients with lone atrial fibrillation. *European Heart Journal*, *34*(20), 1517–1525. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs442>

- Christophersen, I. E., Rienstra, M., Roselli, C., Yin, X., Geelhoed, B., Barnard, J., Lin, H., Arking, D. E., Smith, A. V., Albert, C. M., Chaffin, M., Tucker, N. R., Li, M., Klarin, D., Bihlmeyer, N. A., Low, S.-K., Weeke, P. E., Müller-Nurasyid, M., Smith, J. G., ... Ellinor, P. T. (2017). Large-scale analyses of common and rare variants identify 12 new loci associated with atrial fibrillation. *Nature Genetics*, *49*(6), 946–952. <https://doi.org/10.1038/ng.3843>
- Concordet, J. P., & Haeussler, M. (2018). CRISPOR: Intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gky354>
- Cox, C. J., Espinoza, H. M., McWilliams, B., Chappell, K., Morton, L., Hjalt, T. A., Semina, E. V., & Amendt, B. A. (2002). Differential regulation of gene expression by PITX2 isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(28), 25001–25010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201737200>
- Cyganek, L., Tiburcy, M., Sekeres, K., Gerstenberg, K., Bohnenberger, H., Lenz, C., Henze, S., Stauske, M., Salinas, G., Zimmermann, W. H., Hasenfuss, G., & Guan, K. (2018). Deep phenotyping of human induced pluripotent stem cell-derived atrial and ventricular cardiomyocytes. *JCI Insight*, *3*(12). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99941>
- Darbar, D., Herron, K. J., Ballew, J. D., Jahangir, A., Gersh, B. J., Shen, W. K., Hammill, S. C., Packer, D. L., & Olson, T. M. (2003). Familial atrial fibrillation is a genetically heterogeneous disorder. *Journal of the American College of Cardiology*, *41*(12), 2185–2192. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(03\)00465-0](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(03)00465-0)
- De Masi, C., Spitalieri, P., Murdocca, M., Novelli, G., & Sangiuolo, F. (2020). Application of CRISPR/Cas9 to human-induced pluripotent stem cells: From gene editing to drug discovery. *Human Genomics*, *14*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40246-020-00276-2>
- Denayer, T., Stöhrn, T., & Van Roy, M. (2014). Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons in Translational Medicine*, *2*(1), 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.nhtm.2014.08.001>
- Devalla, H. D., Schwach, V., Ford, J. W., Milnes, J. T., El-Haou, S., Jackson, C., Gkatzis, K., Elliott, D. A., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Mummery, C. L., Verkerk, A. O., & Passier, R. (2015). Atrial-like cardiomyocytes from human pluripotent stem cells are a robust preclinical model for assessing atrial-selective pharmacology. *EMBO Molecular Medicine*, *7*(4), 394–410. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404757>
- Dhingra, R. C., Rosen, K. M., & Rahimtoola, S. H. (1973). Normal conduction intervals and responses in sixty one patients using His bundle recording and atrial pacing. *Chest*, *64*(1), 55–59. <https://doi.org/10.1378/chest.64.1.55>
- Dobrev, D., Graf, E., Wettwer, E., Himmel, H. M., Hála, O., Doerfel, C., Christ, T., Schüler, S., & Ravens, U. (2001). Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying K(+) current (I(K,ACh) in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced I(K,ACh) and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation*, *104*(21), 2551–2557. <https://doi.org/10.1161/hc4601.099466>

- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Eckardt, L., & Wasmer, K. (2017). [Not Available]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, 142(20), 1520–1524. <https://doi.org/10.1055/s-0043-100641>
- Eisner, D. A. (2021). Pseudoreplication in physiology: More means less. *The Journal of General Physiology*, 153(2). <https://doi.org/10.1085/jgp.202012826>
- Ford, J., Milnes, J., El Haou, S., Wettwer, E., Loose, S., Matschke, K., Tyl, B., Round, P., & Ravens, U. (2016). The positive frequency-dependent electrophysiological effects of the IKur inhibitor XEN-D0103 are desirable for the treatment of atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, 13(2), 555–564. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2015.10.003>
- Franz, M. R., Karasik, P. L., Li, C., Moubarak, J., & Chavez, M. (1997). Electrical remodeling of the human atrium: similar effects in patients with chronic atrial fibrillation and atrial flutter. *Journal of the American College of Cardiology*, 30(7), 1785–1792. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(97\)00385-9](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(97)00385-9)
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (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. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 85(8), 348–362. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.348>
- Gage, P. J., Suh, H., & Camper, S. A. (1999). Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development*, 126(20), 4643–4651.
- Gore-Panter, S. R., Hsu, J., Hanna, P., Gillinov, A. M., Pettersson, G., Newton, D. W., Moravec, C. S., Van Wagoner, D. R., Chung, M. K., Barnard, J., & Smith, J. D. (2014). Atrial Fibrillation associated chromosome 4q25 variants are not associated with PITX2c expression in human adult left atrial appendages. *PloS One*, 9(1), e86245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086245>
- Hansen, A., Eder, A., Bönstrup, M., Flato, M., Mewe, M., Schaaf, S., Aksehirlioglu, B., Schwoerer, A. P., Uebeler, J., & Eschenhagen, T. (2010). Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circulation Research*, 107(1), 35–44. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.211458>
- He, J., Zhu, W., Yu, Y., Hu, J., & Hong, K. (2018). Variant rs2200733 and rs10033464 on chromosome 4q25 are associated with increased risk of atrial fibrillation after catheter ablation: Evidence from a meta-analysis. *Cardiology Journal*, 25(5), 628–638. <https://doi.org/10.5603/CJ.a2017.0143>
- Hinson, J. T., Chopra, A., Nafissi, N., Polacheck, W. J., Benson, C. C., Swist, S., Gorham, J., Yang, L., Schafer, S., Sheng, C. C., Haghighi, A., Homsy, J., Hubner, N., Church, G., Cook, S. A., Linke, W. A., Chen, C. S., Seidman, J. G., & Seidman, C. E. (2015). HEART DISEASE. Titin mutations in iPS cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy. *Science (New York, N.Y.)*, 349(6251), 982–986. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5458>

- Hjalt, T. A., & Semina, E. V. (2005). Current molecular understanding of Axenfeld-Rieger syndrome. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 7(25), 1–17. <https://doi.org/10.1017/S1462399405010082>
- HODGKIN, A. L., & HUXLEY, A. F. (1939). Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. *Nature*, 144(3651), 710–711. <https://doi.org/10.1038/144710a0>
- Holmes, A. P., Saxena, P., Kabir, S. N., O’Shea, C., Kuhlmann, S. M., Gupta, S., Fobian, D., Apicella, C., O’Reilly, M., Syeda, F., Reyat, J. S., Smith, G. L., Workman, A. J., Pavlovic, D., Fabritz, L., & Kirchhof, P. (2021). Atrial resting membrane potential confers sodium current sensitivity to propafenone, flecainide and dronedarone. *Heart Rhythm*, 18(7), 1212–1220. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2021.03.016>
- Kalantarian, S., & Ruskin, J. N. (2013). Cognitive impairment associated with atrial fibrillation--in response. In *Annals of internal medicine* (Vol. 158, Issue 11, p. 849). <https://doi.org/10.7326/0003-4819-158-11-201306040-00016>
- Karakikes, I., Ameen, M., Termglinchan, V., & Wu, J. C. (2015). Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: insights into molecular, cellular, and functional phenotypes. *Circulation Research*, 117(1), 80–88. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.305365>
- Kirchhof, P., Kahr, P. C., Kaese, S., Piccini, I., Vokshi, I., Scheld, H. H., Rotering, H., Fortmueller, L., Laakmann, S., Verheule, S., Schotten, U., Fabritz, L., & Brown, N. A. (2011). PITX2c is expressed in the adult left atrium, and reducing Pitx2c expression promotes atrial fibrillation inducibility and complex changes in gene expression. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 4(2), 123–133. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.110.958058>
- Krijthe, B. P., Kunst, A., Benjamin, E. J., Lip, G. Y. H., Franco, O. H., Hofman, A., Witteman, J. C. M., Stricker, B. H., & Heeringa, J. (2013). Projections on the number of individuals with atrial fibrillation in the European Union, from 2000 to 2060. *European Heart Journal*, 34(35), 2746–2751. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh280>
- Kwok, C. S., Loke, Y. K., Hale, R., Potter, J. F., & Myint, P. K. (2011). Atrial fibrillation and incidence of dementia: a systematic review and meta-analysis. *Neurology*, 76(10), 914–922. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31820f2e38>
- Lee, J. H., Protze, S. I., Laksman, Z., Backx, P. H., & Keller, G. M. (2017). Human Pluripotent Stem Cell-Derived Atrial and Ventricular Cardiomyocytes Develop from Distinct Mesoderm Populations. *Cell Stem Cell*, 21(2), 179-194.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.07.003>
- Lemme, M., Ulmer, B. M., Lemoine, M. D., Zech, A. T. L., Flenner, F., Ravens, U., Reichenspurner, H., Rol-Garcia, M., Smith, G., Hansen, A., Christ, T., & Eschenhagen, T. (2018). Atrial-like Engineered Heart Tissue: An In Vitro Model of the Human Atrium. *Stem Cell Reports*, 11(6), 1378–1390. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.10.008>

- Lemoine, M. D., Mannhardt, I., Breckwoltd, K., Prondzynski, M., Flenner, F., Ulmer, B., Hirt, M. N., Neuber, C., Horváth, A., Kloth, B., Reichenspurner, H., Willems, S., Hansen, A., Eschenhagen, T., & Christ, T. (2017). Human iPSC-derived cardiomyocytes cultured in 3D engineered heart tissue show physiological upstroke velocity and sodium current density. *Scientific Reports*, 7(1), 5464. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05600-w>
- Lin, C. R., Kioussi, C., O'Connell, S., Briata, P., Szeto, D., Liu, F., Izpisua-Belmonte, J. C., & Rosenfeld, M. G. (1999). Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature*, 401(6750), 279–282. <https://doi.org/10.1038/45803>
- Lippi, G., Sanchis-Gomar, F., & Cervellin, G. (2021). Global epidemiology of atrial fibrillation: An increasing epidemic and public health challenge. *International Journal of Stroke : Official Journal of the International Stroke Society*, 16(2), 217–221. <https://doi.org/10.1177/1747493019897870>
- Lozano-Velasco, E., Hernández-Torres, F., Daimi, H., Serra, S. A., Herraiz, A., Hove-Madsen, L., Aránega, A., & Franco, D. (2016). Pitx2 impairs calcium handling in a dose-dependent manner by modulating Wnt signalling. *Cardiovascular Research*, 109(1), 55–66. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv207>
- Magnussen, C., Niiranen, T. J., Ojeda, F. M., Gianfagna, F., Blankenberg, S., Njølstad, I., Vartiainen, E., Sans, S., Pasterkamp, G., Hughes, M., Costanzo, S., Donati, M. B., Jousilahti, P., Linneberg, A., Palosaari, T., de Gaetano, G., Bobak, M., den Ruijter, H. M., Mathiesen, E., ... Schnabel, R. B. (2017). Sex Differences and Similarities in Atrial Fibrillation Epidemiology, Risk Factors, and Mortality in Community Cohorts: Results From the BiomarCaRE Consortium (Biomarker for Cardiovascular Risk Assessment in Europe). *Circulation*, 136(17), 1588–1597. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028981>
- Mannhardt, I., Saleem, U., Mosqueira, D., Loos, M. F., Ulmer, B. M., Lemoine, M. D., Larsson, C., Améen, C., de Korte, T., Vlaming, M. L. H., Harris, K., Clements, P., Denning, C., Hansen, A., & Eschenhagen, T. (2020). Comparison of 10 Control hPSC Lines for Drug Screening in an Engineered Heart Tissue Format. *Stem Cell Reports*, 15(4), 983–998. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.09.002>
- Mommersteeg, M. T. M., Brown, N. A., Prall, O. W. J., de Gier-de Vries, C., Harvey, R. P., Moorman, A. F. M., & Christoffels, V. M. (2007). Pitx2c and Nkx2-5 are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium. *Circulation Research*, 101(9), 902–909. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.161182>
- Morgenstern, J., Fleming, T., Kliemank, E., Brune, M., Nawroth, P., & Fischer, A. (2021). Quantification of All-Trans Retinoic Acid by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Association with Lipid Profile in Patients with Type 2 Diabetes. *Metabolites*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/metabo11010060>

- Nadadur, R. D., Broman, M. T., Boukens, B., Mazurek, S. R., Yang, X., van den Boogaard, M., Bekeny, J., Gadek, M., Ward, T., Zhang, M., Qiao, Y., Martin, J. F., Seidman, C. E., Seidman, J., Christoffels, V., Efimov, I. R., McNally, E. M., Weber, C. R., & Moskowitz, I. P. (2016). Pitx2 modulates a Tbx5-dependent gene regulatory network to maintain atrial rhythm. *Science Translational Medicine*, 8(354), 354ra115. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf4891>
- Olson, T. M., Alekseev, A. E., Liu, X. K., Park, S., Zingman, L. V., Bienengraeber, M., Sattiraju, S., Ballew, J. D., Jahangir, A., & Terzic, A. (2006). Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation. *Human Molecular Genetics*, 15(14), 2185–2191. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl143>
- Qin, D., Mansour, M. C., Ruskin, J. N., & Heist, E. K. (2019). Atrial Fibrillation-Mediated Cardiomyopathy. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 12(12), 1–13. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.119.007809>
- Ravens, U., Katircioglu-Öztürk, D., Wettwer, E., Christ, T., Dobrev, D., Voigt, N., Poulet, C., Loose, S., Simon, J., Stein, A., Matschke, K., Knaut, M., Oto, E., Oto, A., & Güvenir, H. A. (2015). Application of the RIMARC algorithm to a large data set of action potentials and clinical parameters for risk prediction of atrial fibrillation. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 53(3), 263–273. <https://doi.org/10.1007/s11517-014-1232-0>
- Ruddox, V., Sandven, I., Munkhaugen, J., Skattebu, J., Edvardsen, T., & Otterstad, J. E. (2017). Atrial fibrillation and the risk for myocardial infarction, all-cause mortality and heart failure: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Preventive Cardiology*, 24(14), 1555–1566. <https://doi.org/10.1177/2047487317715769>
- Savio-Galimberti, E., & Darbar, D. (2014). Atrial Fibrillation and SCN5A Variants. *Cardiac Electrophysiology Clinics*, 6(4), 741–748. <https://doi.org/10.1016/j.ccep.2014.07.006>
- Schaaf, S., Shibamiya, A., Mewe, M., Eder, A., Stöhr, A., Hirt, M. N., Rau, T., Zimmermann, W.-H., Conradi, L., Eschenhagen, T., & Hansen, A. (2011). Human engineered heart tissue as a versatile tool in basic research and preclinical toxicology. *PloS One*, 6(10), e26397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026397>
- Schotten, U., Ausma, J., Stellbrink, C., Sabatschus, I., Vogel, M., Frechen, D., Schoendube, F., Hanrath, P., & Allessie, M. A. (2001). Cellular mechanisms of depressed atrial contractility in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation*, 103(5), 691–698. <https://doi.org/10.1161/01.cir.103.5.691>
- Schulz, C., Lemoine, M. D., Mearini, G., Koivumäki, J., Sani, J., Schwedhelm, E., Kirchhof, P., Ghalawinji, A., Stoll, M., Hansen, A., Eschenhagen, T., & Christ, T. (2023). PITX2 Knockout Induces Key Findings of Electrical Remodeling as Seen in Persistent Atrial Fibrillation. *Circulation. Arrhythmia and Electrophysiology*, e011602. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.122.011602>
- Sun, Y.-M., Wang, J., Qiu, X.-B., Yuan, F., Xu, Y.-J., Li, R.-G., Qu, X.-K., Huang, R.-T., Xue, S., & Yang, Y.-Q. (2016). PITX2 loss-of-function mutation contributes to tetralogy of Fallot. *Gene*, 577(2), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.001>

- Syeda, F., Holmes, A. P., Yu, T. Y., Tull, S., Kuhlmann, S. M., Pavlovic, D., Betney, D., Riley, G., Kucera, J. P., Jousset, F., de Groot, J. R., Rohr, S., Brown, N. A., Fabritz, L., & Kirchhof, P. (2016). PITX2 Modulates Atrial Membrane Potential and the Antiarrhythmic Effects of Sodium-Channel Blockers. *Journal of the American College of Cardiology*, *68*(17), 1881–1894. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.07.766>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, *131*(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Timmis, A., Townsend, N., Gale, C. P., Torbica, A., Lettino, M., Petersen, S. E., Mossialos, E. A., Maggioni, A. P., Kazakiewicz, D., May, H. T., De Smedt, D., Flather, M., Zuhlke, L., Beltrame, J. F., Huculeci, R., Tavazzi, L., Hindricks, G., Bax, J., Casadei, B., ... Bardin, I. (2020). European society of cardiology: Cardiovascular disease statistics 2019. *European Heart Journal*, *41*(1), 12–85. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz859>
- Tsai, C. T., Lai, L. P., Hwang, J. J., Lin, J. L., & Chiang, F. T. (2008). Molecular Genetics of Atrial Fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*, *52*(4), 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.02.072>
- Van Wagoner, D. R., Pond, A. L., Lamorgese, M., Rossie, S. S., McCarthy, P. M., & Nerbonne, J. M. (1999). Atrial L-type Ca<sup>2+</sup> currents and human atrial fibrillation. *Circulation Research*, *85*(5), 428–436. <https://doi.org/10.1161/01.res.85.5.428>
- Wang, J., Bai, Y., Li, N., Ye, W., Zhang, M., Greene, S. B., Tao, Y., Chen, Y., Wehrens, X. H. T., & Martin, J. F. (2014). Pitx2-microRNA pathway that delimits sinoatrial node development and inhibits predisposition to atrial fibrillation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(25), 9181–9186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405411111>
- Wang, J., Klysis, E., Sood, S., Johnson, R. L., Wehrens, X. H. T., & Martin, J. F. (2010). Pitx2 prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(21), 9753–9758. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912585107>
- Wazni, O. M., Dandamudi, G., Sood, N., Hoyt, R., Tyler, J., Durrani, S., Niebauer, M., Makati, K., Halperin, B., Gauri, A., Morales, G., Shao, M., Cerkenvenik, J., Kaplon, R. E., & Nissen, S. E. (2021). Cryoballoon Ablation as Initial Therapy for Atrial Fibrillation. *The New England Journal of Medicine*, *384*(4), 316–324. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2029554>
- Weinberger, F., Mannhardt, I., & Eschenhagen, T. (2017). Engineering Cardiac Muscle Tissue: A Maturing Field of Research. *Circulation Research*, *120*(9), 1487–1500. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310738>

- Wettwer, E., Hála, O., Christ, T., Heubach, J. F., Dobrev, D., Knaut, M., Varró, A., & Ravens, U. (2004). Role of IKur in controlling action potential shape and contractility in the human atrium: influence of chronic atrial fibrillation. *Circulation*, *110*(16), 2299–2306. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000145155.60288.71>
- Yang, Y., Li, J., Lin, X., Yang, Y., Hong, K., Wang, L., Liu, J., Li, L., Yan, D., Liang, D., Xiao, J., Jin, H., Wu, J., Zhang, Y., & Chen, Y.-H. (2009). Novel KCNA5 loss-of-function mutations responsible for atrial fibrillation. *Journal of Human Genetics*, *54*(5), 277–283. <https://doi.org/10.1038/jhg.2009.26>
- Ye, Jian, Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, *13*, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Ye, Jiangchuan, Tucker, N. R., Weng, L. C., Clauss, S., Lubitz, S. A., & Ellinor, P. T. (2016). A Functional Variant Associated with Atrial Fibrillation Regulates PITX2c Expression through TFAP2a. *American Journal of Human Genetics*, *99*(6), 1281–1291. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.10.001>
- Zhao, Z., Lan, H., El-Battrawy, I., Li, X., Buljubasic, F., Sattler, K., Yücel, G., Lang, S., Tiburcy, M., Zimmermann, W.-H., Cyganek, L., Utikal, J., Wieland, T., Borggrefe, M., Zhou, X.-B., & Akin, I. (2018). Ion Channel Expression and Characterization in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells International*, *2018*, 6067096. <https://doi.org/10.1155/2018/6067096>

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ACh	Acetylcholin
AF	„Atrial fibrillation“, Vorhofflimmern
aEHT	atriales „Engineered Heart Tissue“
AP	Aktionspotenzial
APA	Aktionspotenzialamplitude
APD	Aktionspotenzialdauer
bFGF	„Basic Fibroblast Growth Factor“
BMP-4	„Bone-morphogenetic Protein 4“
cDNA	komplementäre DNA
Ct	„Threshold Cycle“
cTnT	kardiales Troponin T
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
$dV/dt_{max}$	maximale Aufstrichgeschwindigkeit
EB	„Embryoid Body“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHT	„Engineered Heart Tissue“
FACS	Durchflusszytometrie
FCS	Fetales Kälberserum
FTDA	bFGF, TGF- $\beta$ 1, Dorsomorphin und Activin a basiertes Stammzellkultur-Medium
Gusb	$\beta$ -Glucuronidase
GRS	„Genomic Risk Score“
GWAS	„Genome-wide Association Study“
h	Stunde
hiPSC	Humane induzierte pluripotente Stammzellen
hiPSC-CM	aus hiPSC differenzierte Kardiomyozyten
hiPSC-aCM	atrial-differenzierte hiPSC-CM
hERG	human Ether-a-go-go Related Gene
Hz	Hertz

IEPT	Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie
I <sub>Ca</sub>	Calcium-Strom
I <sub>K</sub>	Kalium-Strom
I <sub>K ACh</sub>	durch Acetylcholin aktivierbarer Kaliumkanal
I <sub>Kur</sub>	sehr schnell aktivierender, einwärtsgerichteter Kaliumstrom
iPSC	induzierte pluripotente Stammzellen
LA	Linker Vorhof
LV	Linker Ventrikel
LTCC	L-Typ Calciumkanal
MDP	Maximales diastolisches Potenzial
min	Minute
ml	Milliliter
MLC2A	regulatorische Myosinleichkette, atriale Isoform
MLC2V	regulatorische Myosinleichkette, ventrikuläre Isoform
mm	Millimeter
mN	Millinewton
mRNA	„Messenger“-RNA
NaOH	Natriumhydroxid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PITX2	„Paired-like Homeodomain Transcription Factor 2“
PTFE	Polytetrafluorethylen
PV	Pulmonalvenen
RT-qPCR/ qPCR	Quantitative “real time” PCR
RA	Retinolsäure
RMP	Ruhemembranpotenzial
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SR	Sinusrhythmus
TBS	„Tris-buffered saline“ (Salzpuffer)
TGF-β1	„Transforming Growth Factor β1“
Tm	Schmelzpunkt

U	Unit
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
V	Volt
V <sub>Plateau</sub>	Plateauspannung
WB	Western Blot
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
% vol	Volumenprozent

## 8.2 Materialien, Substanzen und Lösungen

### Tabelle S1: Verwendete Substanzen und Hersteller

Alphabetisch geordnete Substanzliste mit Hersteller-Angabe und Produktnummer.

Substanz	Hersteller, Produktnummer
4-Aminopyridin	Sigma-Aldrich, 275875
Accutase Zelldissoziationsreagenz	Sigma-Aldrich, A6964
Activin A	R&D Systems, 338-AC
Agarose	Invitrogen, 15510-027
all-trans Retinolsäure-D5	Cayman Chemical
Aprotinin	Sigma-Aldrich, A1153
bFGF	PeproTech, 100-18B
B27 + Insulin	Gibco, 17504-044
BMP4	R&D Systems, 314-BP
BTS	TCI, B3082-25G
Carbachol	Sigma Aldrich, Y0000113
Collagenase II	Worthington, LS004176
cOmplete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor	Roche, 11836153001
DMEM	Biochrom, F0415
DMSO	Sigma-Aldrich, D4540
DNase	Sigma-Aldrich, D8764
Dorsomorphin	Tocris, 3093
DPBS	Gibco, 14040-133
EDTA	Roth, 8043.2
Ethanol (unverdünnt)	Chemsolute, 2246.1000

Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, E1510
Fetales Kälberserum	Biochrom, S0615
Fibrinogen	Sigma-Aldrich, F8630
Geltrex	Gibco, A1413302
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, SM0243
HBSS (ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	Gibco, 14175-053
HEPES	Roth, 9105.4
Humanes Serumalbumin	Biological Industries, 05-720-1B
Humanes rekombinantes Insulin	Sigma-Aldrich, I9278
Ivabradin	Sigma-Aldrich, SML0281
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, 1.04936
L-Glutamin	Gibco, 25030-081
Lipid-Mix	Sigma-Aldrich, L5146
Matrigel	Corning, 354234
Maxima SYBR Green/ROX	Thermo Scientific, K0243
Milchpulver	Roth, T145.2
mTeSR Plus	STEMCELL Technologies, 100-0276
Natriumazid	Sigma-Aldrich, 71290
Natriumchlorid (NaCl)	JT Baker, 7647-14-5
Penicillin/Streptomycin	Gibco, 15140
Phosphoascorbat	Sigma-Aldrich, 49752
Proteinase K	Thermo Scientific, 17916
Retinolsäure (RA)	Sigma-Aldrich, R2625
RPMI 1640	Gibco, 21875
Saponin	Sigma-Aldrich, 47036
Selen	Sigma, S5261
TGF-β1	Peptotech, 100-21
Thrombin	Sigma-Aldrich, T7513; Biopur, BP11-10-1104
Transferrin	Sigma-Aldrich, T8158
Tryptanblau	Biochrom, L 6323
XAV-939	Tocris, 3748
Y-27632	Biaffin, PKI-Y27632-010

**Tabelle S2: Zellkultur-Materialien**

Alphabetisch geordnete Verbrauchsmaterialien für die hiSPC- und aEHT-Kultur inklusive Hersteller-Angabe und Produktnummer.

Produkt	Hersteller, Produktnummer
Aspirationspipette 2 ml	Sarstedt, 86.1252.011
FACS-Röhrchen	Sarstedt, 55.1579
Neubauer-Zählkammer	Karl-Hecht KG
Nuclefektions-Küvette	Lonza, AXP-1003
Pipettenspitzen (mit/ ohne Filter)	Sarstedt
Reaktions-Röhrchen („Falcon“) 15/ 50 ml	Sarstedt
Reaktions-Röhrchen „Safe Lock“ 0,2-2 ml	Eppendorf
„Red-Cap“ Zellkultur-Röhrchen	Sarstedt, 62.554.100
„Silikon-Post Racks“ (EHT)	Spezialanfertigung
Serologische Pipetten 1/ 2/ 5/ 10/ 25/ 50 ml	Sarstedt
Spinner-Flaschen 500/ 1000 ml	Integra Biosciences, 182101/ 182051
Teflon Spacer (EHT-Herstellung)	EHT Technologies, C0002
Zellkultur-Flasche T75	Sarstedt, 83.3911.002
Zellkultur-Flasche T175 (Suspensionskultur)	Sarstedt, 83.3912.500
Zellkultur-Platte 6/ 12/ 24/ 48 „Well“	ThermoFisher Scientific
500 ml Vakuum-Filter („Filtermax“)	TPP, 99500

**Tabelle S3: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen**

Alphabetische Anordnung der verwendeten Puffer und Lösungen inklusive Hersteller-Angabe und Produktnummer.

Puffer und Lösungen	Hersteller, Produktnummer
Aprotinin	33 mg/ml Aprotinin (gelöst in sterilem Wasser)
Block-Lösung	TBS 0,05 mol/l 1% BSA 1% FCS 0,5% Triton X-100
„Blotting“-Puffer (5x)	125 mmol/l Trizma base 950 mmol/l Glycin destilliertes Wasser

„Blotting“-Puffer (1x)	20% vol 5x „Blotting“-Puffer 20% vol Methanol 60% vol destilliertes Wasser
BTS-Lösung	BTS (in DMSO gelöst)
Dissoziations-Puffer	HBSS (ohne $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ ) 200 U/ml Kollagenase II 1 mmol/l HEPES (pH 7,4) 30 $\mu\text{mol/l}$ BTS 10 $\mu\text{mol/l}$ Y-27632
DNase-Lösung	100 mg DNase II (gelöst in 50 ml PBS)
EDTA	0,5 mmol/l EDTA in PBS
FACS-Puffer	PBS 5% FCS 0,5% vol Saponin 0,05% vol Natriumazid
Fibrinogen	200 g/l Fibrinogen (gelöst in 0,9% NaCl-Lösung) 33 g/l Aprotinin (Endkonzentration 100 $\mu\text{g/ml}$ )
HEPES Stammlösung	1 mol/l HEPES in PBS (pH 7,4)
Tris-Glycin-Puffer (1x)	0,2 g SDS 1 mg Bromphenolblau 1 g Glycerin 0,2 ml Tris (0,5 mol/l, pH 6,8) 0,155 g DTT (Dithiothreitol) destilliertes Wasser
Polyvinylalkohol (50x)	20 g Polyvinylalkohol (gelöst in 100 ml destilliertes Wasser)
Thrombin	100 U/ml Thrombin (gelöst in 60% vol PBS und 40% sterilem Wasser)
Transferrin-Selen	100 mg Transferrin (gelöst in 2 ml Natriumselenit, 382 $\mu\text{mol/l}$ )
Tris 0,5 mol/l (pH 6,8)	60,6 g „Trizma Base“ 1 l destilliertes Wasser
Tris 1,5 mol/l (pH 8,8)	181,8 g „Trizma Base“

	1 l destilliertes Wasser
Tyrode's -Lösung	120 mmol/l NaCl 5,4 mmol/l KCL 1 mmol/l MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O 22,6 mmol/l NaHCO <sub>3</sub> 5 mmol/l Glucose 0,1-10 mmol/l CaCl <sub>2</sub> 0,4 mmol/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 mmol/l Na <sub>2</sub> EDTA destilliertes Wasser

### 8.3 Kultur- und Differenzierungsmedien

#### Tabelle S4: Stammzell-Kulturmedium (FTDA)

Zusammensetzung des FTDA-Mediums für die Kultur der Stammzellen (hiPSC). Das Medium wurde wöchentlich in der benötigten Menge frisch angesetzt. Der Mediumwechsel erfolgte 1-2 mal täglich in Abhängigkeit von der Zelldichte.

Bestandteil	Menge/ Zielkonzentration
DMEM/F-12 (ohne Glutamin)	500 ml
L-Glutamin	2 mmol/l
Lipid Mix	1:1000
Transferrin	5 mg/l
Selen	µg/l
Humanes Serumalbumin (HSA)	0,1% vol
Humanes rekombinantes Insulin	5 µg/ml
Activin A	2,5 ng/ml
bFGF	30 ng/ml
Dorsomorphin	50 nmol/l
TGF-β1	0,5 ng/ml

**Tabelle S5: Stage 0-Medium**

Die Herstellung des Stage 0-Mediums erfolgte an Tag 0 der Differenzierung auf Basis des Stammzell-Kulturmediums FTDA.

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge/ Zielkonzentration</b>
FTDA	
Polyvinylalkohol	4 mg/ml
Y-27632	10 $\mu$ mol/l

**Tabelle S6: Stage 1-Medium**

Zusammensetzung des Stage 1-Mediums für die mesodermale Induktion der humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC).

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge/ Zielkonzentration</b>
RPMI 1640	
Polyvinylalkohol	4 mg/ml
HEPES	10 $\mu$ mol/l
HSA	0,05% vol
Phosphoascorbat	250 $\mu$ mol/l
L-Transferrin	5 mg/l
Selen	5 $\mu$ g/l
Lipid-Mix	1:1000
Y-27632	10 $\mu$ mol/l
Activin A	3 ng/ml
BMP-4	10 ng/ml
bFGF	5 ng/ml

**Tabelle S7: FDM-Medium**

Zusammensetzung des FDM-Mediums (I. Kardiales Differenzierungsmedium).

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge/ Zielkonzentration</b>
RPMI 1640	
HEPES	10 mmol/l (pH 7,4)
HSA	0,05% vol
Phosphoascorbat	250 µmol/l
L-Transferrin	5 mg/l
Selen	5 µg/l
Lipid-Mix	1:1000
Y-27632	10 µmol/l
XAV-939	1 µmol/l
Penicillin/Streptomycin	0,5% vol
Retinolsäure	1 µmol/l

**Tabelle S8: Stage 2-Medium**

Zusammensetzung des Stage 2-Mediums (II. Kardiales Differenzierungsmedium).

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge/ Zielkonzentration</b>
RPMI 1640	
HEPES	10 mmol/l (pH 7,4)
B27 mit Insulin	2% vol
Y-27632	10 µmol/l
XAV-939	1 µmol/l
Penicillin/Streptomycin	0,5% vol
1-Thioglycerol	500 µmol/l

**Tabelle S9: RDM-Medium**

Zusammensetzung des RDM-Mediums (III. Kardiales Differenzierungsmedium).

Bestandteil	Menge/ Zielkonzentration
RPMI 1640	
HEPES	10 mmol/l (pH 7,4)
B27 mit Insulin	2% vol
Y-27632	10 $\mu$ mol/l
Penicillin/Streptomycin	0,5% vol
1-Thioglycerol	500 $\mu$ mol/l

**Tabelle S10: EHT-Kulturmedium**

Die Herstellung des EHT-Kulturmediums erfolgte jeweils am Tag des Mediumwechsels. Die aEHTs wurden Montags, Mittwochs und Freitags gefüttert.

Bestandteil	Menge/ Zielkonzentration
DMEM	
Penicillin/Streptomycin	1% vol
Pferdeserum	10% vol
Aprotinin	33 $\mu$ g/ml
Humanes rekombinantes Insulin	10 $\mu$ g/ml

**Tabelle S11: Medium für die aEHT-Herstellung**

Zusammensetzung des Mediums für die EHT-Herstellung. Das Medium wurde am Tag der aEHT-Herstellung frisch angesetzt.

Bestandteil	Menge/ Zielkonzentration
DMEM	
Penicillin/Streptomycin	1% vol
Hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum	10% vol
L-Glutamin	2 mmol/l

## 8.4 Elektrophysiologische Geräte

**Tabelle S12: Elektrophysiologische Geräte und deren Hersteller**

Alphabetisch geordnete Geräte (inkl. Hersteller), die für die AP-Messungen verwendet worden sind.

Produkt	Hersteller
Analog-Digital-Wandler	ADInstruments Model ML 826 Powerlab 2/26, Dunedin, Neuseeland
Faraday-Käfig	Selbst gebaut
Feintrieb (Mikromanipulator)	MMO-203, Narishige Group, Tokyo, Japan
Glaselektrode/ scharfe Mikroelektrode	HILG1103227, Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland
Grobtrieb (Makromanipulator)	MMO-3, Narishige Group, Tokyo, Japan
Heizung	Lohmann Research Equipment LTR-2 P.I.D. Temperature Controller, Dortmund, Deutschland
Mikroskop	Olympus SZ61 SZSTB1 Zoom Stereo Microscope, Tokyo, Japan
Rollenpumpe	Ismatec Rolling Pump, Wertheim, Deutschland
Silikon-Messkammer	Lohmann Research, Dortmund, Deutschland
Stimulator 1	SD9 Stimulator Grass Product Group, West Warwick, USA
Stimulator 2	UHS20 Biotronik, Berlin, Deutschland
Universal Puller	Zeitz DMZ-Universal Puller, München, Deutschland
Verstärker	BA 1S/BA-01X, npi electronic, Tamm, Deutschland
Vorverstärker	npi electronic, Tamm, Deutschland

## 8.5 Kits

### Tabelle S13: Übersicht der verwendeten Kits

Die verwendeten Kits, deren Hersteller und Produktnummer. Die Anwendungen der Kits erfolgte nach dem angegebenen Hersteller-Protokoll.

Kit	Hersteller, Produktnummer
AmpliTaq Gold 360 DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, 4398813
CytoTune Reprogramming Kit	Life Technologies, A16517
DNeasy Blood and Tissue Kit	QUIAGEN, 69506
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applies Biosystems, 4368813
nCounter DNA CodeSet, HuV1 Karyotype CSO	NanoString Technologies,
RNeasy Plus Mini Kit	QUIAGEN, 74134

## 8.6 CRISPR/Cas9-Experimente

### Tabelle S14: Sequenzen der sgRNA1 und sgRNA2

Die Sequenzen der sgRNA1 und sgRNA2 wurden mit Hilfe des CRISPOR-Programms geplant. Die Herstellung der CRISPR/Cas9-Enzyme erfolgte durch IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA). Tabelle verändert nach Schulz et al. (2023).

sgRNA	Sequenz
sgRNA1	GTTTACCGAGCTCCA ACTAA
sgRNA2	TTGTACGAAATGTTATACAC

### Tabelle S15: Primer-Sequenzen für die Genotypisierung

Primer-Sequenzen für die Genotypisierungs-PCR mit externen Primern. Das dazugehörige PCR-Produkt wurde im Anschluss an die PCR mittels Sanger-Sequenzierung (Eurofins Genomics Germany) analysiert. Tabelle verändert nach Schulz et al. (2023).

Primer	Sequenz
Forward	TCTAACCTCTCAACCCCTGAGTTC
Reverse	AATGGCCGGGTTAGTATCTCTAGG

**Tabelle S16: Off-Target-Analyse der sgRNA1**

Off-Target-Score und die zugehörige Off-Target-Sequenz sind nach absteigender Wahrscheinlichkeit gezeigt. Für jedes Off-Target sind die Sequenzen der verwendeten Primer-Paare und die Größe des amplifizierten PCR-Produkts angegeben. Tabelle verändert nach Schulz et al. (2023).

Off-Target-Score	OT-Sequenz	Primer Forward/ Primer Reverse	PCR Produktgröße
1	AATTACAGATCTCCAATAA	CTGCTGCCCCGCTTAACTTTC CGCTGCACTCATTTCCTTGG	817
2	TTTGACTGAGCCCCAATAA	CTAGCAGGTGGGCAGATGAG GGTTCCCCAGTGAGAGTGTG	987
3	TTCTACCCAGCTCCAATAA	GGTTGTAGCCCTGCCAATTTT TAAGCCATAGGACCAGATAACACC	778
4	GCTTGCCCAGCTTCCAATAA	CCCAGCCAGGGTACAACATT CCTCTCCAGTAGCTGGGTCT	894
5	GTCTTCCCAGCTACAATAA	TAGCTGGGTCTCCATGTTGG AGGAGGAGGCTCAGGAGAAA	855
6	TTATACAGAGCTTCCAATAA	AATAGACACCTCCAAGGTCTGC GAGGCCAGGAAAGGTAGTGAG	985
7	GTTGACCAAGC-CCAATAA	GCAGGACCTAGACCAAACCC GGGCCAAACATCAGCAAAGG	818
8	CTTTCCAGAGCTCCAATAA	TTAACCTTCAAGGCATCAAAGACT TGTCAAAGCACTGCCTACATATTGA	976
9	CTTTCCAGAGCTCCAATAA	TTTGCCTCAGTTCTAAATTAACCT GTGCAAAGCACTGCCTACATA	994
10	TATTACCTACCTCCAATAA	GGCGTCGTTCTACCAAAGA CGGCTCATTGGAGTTGTCCT	1000

**Tabelle S17: Off-Target-Analyse der sgRNA2**

Off-Target-Score und die zugehörige Off-Target-Sequenz sind nach absteigender Wahrscheinlichkeit gezeigt. Für jedes Off-Target sind die Sequenzen der verwendeten Primer-Paare und die Größe des amplifizierten PCR-Produkts angegeben. Tabelle verändert nach Schulz et al. (2023).

Off-Target-Score	OT-Sequenz	Primer Forward/ Primer Reverse	PCR Produktgröße
1	TTGAACAAAAAGTTATACAC	AAGGAAGGAAACTGGAGGAACATT AAAGACAACCGTCAGCTCTCAA	998
2	TTGTGCTGAGTGTTATACAC	CACTTCATCACCAGGGCTGT CAGCCAGGTGTTGGGATGAT	931
3	GTTTACAAAATGTTATACAC	ACCTTCCAGCTGTGTAAGCC CATGTTGGTCAGGCTGGTCT	783
4	TTGTACAAAAAGTTATACAA	TGAAGGGATGTAAGCCCAGTG TGAAGTTATTGTGCCAAGTATGC	844
5	TTGGA-GAAATGTTATACTC	TCCCATAGCGTAACGTGCTC AGCCTCTGCCTTCACACTTC	945
6	CTGTACATATGTTATACAC	TACCCTGTGTGTAGTGGACAGT AATGGAGCTAACAGTCTGGCAA	641
7	TTGAAAAATGTTATACAC	CCAGTGGGCATGGAGTTTCT TGGAGACAGAGAGGGTCTGG	812
8	TTGTTTGAAAGTTATACAC	ACTAGGTGCCAGTGGTTAGC ACTTCTTGAGGGGTGGGGTA	900
9	TTGTAC-TAATGTTATACAA	TGTACTTCCAAAGCGATTCCTAC AGGCCGTTTCAGACCATCATA	1094
10	TTGTAC-TAATGTTATACAA	GCAACTACCTAACAGTAGAAGTCTG AGTAGCAGTGGAAACTCATGGA	1008

### Tabelle S18: 50 µl PCR-Ansatz

Die Zusammensetzung eines 50 µl-PCR-Ansatzes besteht aus den aufgeführten Komponenten. Die benötigte Menge an DNA ist abhängig von der DNA-Konzentration.

Substanz	Menge (µl)
10x PCR Gold Buffer	5
MgCl <sub>2</sub>	3
dNTP (10 mM)	1
Primer Forward (10 mM)	1
Primer Reverse (10 mM)	1
DNA 50 ng/µl	2,5
AmpliTaQ Polymerase	0,5
H <sub>2</sub> O	36

### 8.7 Western Blot

#### Tabelle S19: Primärantikörper

Western Blot-Primärantikörper mit Hersteller, Produktnummer und Anwendungshinweisen. Tabelle verändert nach Schulz et al. (2023).

Antikörper	Hersteller, Produktnummer	Anwendung	Informationen
Anti-PITX2	Invitrogen, PA5-11479	WB (1:250)	Kaninchen, Polyklonales IgG
Anti-α-Actinin2	Sigma-Aldrich, A7811	WB (1:10000)	Maus, Monoklonales IgM, Klon EA-53

#### Tabelle S20: Sekundärantikörper

Western Blot-Sekundärantikörper mit Hersteller, Produktnummer und Anwendungshinweisen. Tabelle verändert nach Schulz et al. (2023).

Antikörper	Hersteller, Produktnummer	Anwendung
Anti-Kaninchen IgG „Peroxidase-conjugated“	Sigma Aldrich, A0545	WB (1:10000)
Anti-Maus IgG „Peroxidase-conjugated“	Sigma Aldrich, A9044	WB (1:5000)

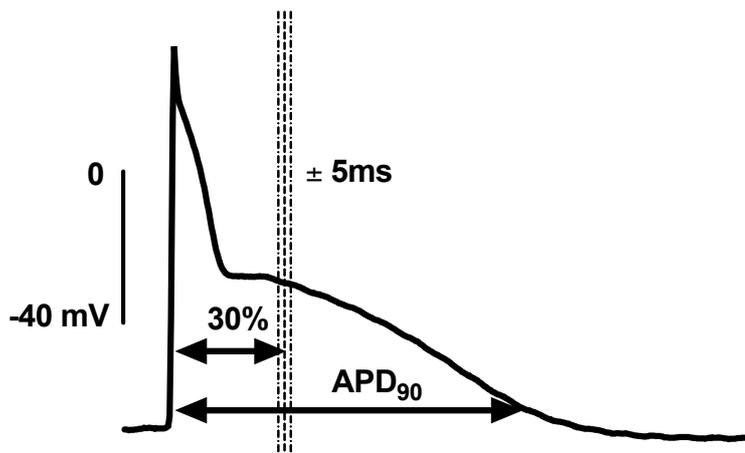
## 8.8 Labor-Software

**Tabelle S21: Übersicht der verwendeten Laborsoftware**

Alphabetische Reihenfolge der verwendeten Software und Angabe des Herstellers.

Software	Hersteller
CTMV	Proprietary Software
FACSDiva	BD Bioscience
GraphPad Prism 6.0 / 8.0	GraphPad Software
LabChart Version 5	ADInstruments
SnapGene	SnapGene
SnapGene Viewer	SnapGene
SDS (Version 2.4.1.)	Applied Biosystems

## 8.9 Plateau-Spannung



**Abbildung S1: Definition der Plateau-Spannung**

Die Plateauspannung ist definiert als der Mittelwert der Spannung bei 30% der APD<sub>90</sub> ± 5 ms. Abbildung entnommen aus Schulz et al. (2023).

## 8. Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Thomas Eschenhagen bedanken für seine Expertise und große Unterstützung bei meinem Projekt. Sie haben sich für meine Fragen und Probleme stets viel Zeit genommen und mich durch viele fruchtbare Gespräche und Anregungen unterstützt. Dafür bin Ihnen sehr dankbar.

Der größte Dank geht an meinen Doktorvater PD Dr. Torsten Christ, der mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses außergewöhnliche Projekt im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit umzusetzen. Seine große Unterstützung und sein schier unermüdlicher Optimismus haben dafür gesorgt, dass ich trotz einiger Rückschläge dieses Projekt beenden konnte. Neben seiner fachlichen Expertise möchte ich mich auch für die schönen zwei Jahre bedanken. Die schönen Nachmittage im IEPT und die lustigen Abende beim Griechen sorgten stets für den nötigen Ausgleich zur experimentellen Arbeit.

Ich bedanke mich bei Anna Steenpaß nicht nur für die Hilfe bei den RNA- und Patch-Clamp-Experimenten. Vielmehr möchte ich mich für die gemeinsame Zeit bedanken und dafür, dass du für mich da warst und mir geholfen hast auch in Zeiten, in denen nicht immer alles auf Anhieb funktioniert hat. Ich danke dir vor allem für deine Hilfsbereitschaft und Geduld in der Zeit des Lockdowns während der Corona-Pandemie.

Ich bedanke mich bei meinem Mentor Prof. Dr. Alex Schwörer für die große Hilfe bei der Suche nach einem geeigneten Promotionsthema und für viele Anregungen und produktive Gespräche, die mich während meiner Arbeit sehr beeinflusst haben.

Ich möchte mich bei Jascha Sani bedanken, der mich zu Beginn meiner Zeit im Labor eingearbeitet hat und von dem ich viel gelernt habe. Weiterer Dank geht an Malte Loos für die große Hilfe bei den CRISPR-Experimenten. Birgit Klampe und Thomas Schulze danke ich für die geduldige Einarbeitung und Unterstützung bei der Stammzell-Kultur. Ich möchte mich bei Julia Krause bedanken für die Einführung in die atriale Differenzierung. Elisabeth Krämer und Nils Pietsch danke ich für die Durchführung der Nanostring-Analysen und die Hilfe bei den FACS-Untersuchungen.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Arne Hansen, der bei Problemen mit den hiPSC immer ein offenes Ohr hatte. Mit seinen Ideen und Anregungen gab er mir stets positive Impulse und war damit eine enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Ich danke Dr. Marc Lemoine für die Unterstützung als Betreuer meiner Doktorarbeit. Darüber hinaus bedanke ich mich für die Hilfe bei Problemen mit dem „Set up“ und für die gute Zusammenarbeit am PITX2-Manuskript.

Ich danke meiner Freundin Katrin, die mich während der Zeit als Doktorand im IEPT jederzeit unterstützt hat. Für deine uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung danke ich dir sehr. Darüber hinaus möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die immer hinter mir steht und zu mir hält. Ich möchte mich außerdem bei Christopher Kosub bedanken, der nicht nur der beste Freund, sondern auch ein echter Experte auf dem Gebiet der Western Blots ist.

Ich danke dem CVRC („Cardiovascular Research Centre“) unter der Leitung von Prof. Dr. Lucie Carrier, Prof. Dr. Renate Schnabel, Prof. Dr. Tanja Zeller und Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev für die Organisation und Unterstützung im Rahmen des CVRC-Graduiertenkollegs.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem DZHK (Deutsches Zentrum für Herz-Kreislaufforschung; „Postdoc Strat-up Grant“ 81X3710108 von Dr. Marc Lemoine) und dem CVRC („Cardiovascular Research Centre“; Projektnummer 81Z0710110).

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name:	Carl Otto Schulz
Wohnort:	Hamburg
Geburtsdatum:	20.01.1998
Geburtsort:	Leipzig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Konfession:	römisch-katholisch

### Schulbildung

2004-2012	Evangelisches Schulzentrum Leipzig
2012-2014	Sportgymnasium Leipzig
2014-2016	Evangelisches Schulzentrum Leipzig (Abitur)

### Studium

seit 2016	Studium Humanmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)
seit 2017	Teilnehmer des Mentoring-Programms für exzellente Studierende (Mentor: Prof. Dr. Alexander Schwörer)
2018	Erster Abschnitt ärztliche Prüfung (Note: Sehr gut)
2022	Zweites Staatsexamen (Note: Gut)

### Famulaturen

2018	Famulatur Kindernotfallzentrum Leipzig
2019	Famulatur Chirurgische Notaufnahme, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München
2019	Famulatur Wirbelsäulenchirurgie UKE
2021	Famulatur Herzchirurgie UKE
2021	Famulatur Hals-Nasen-Ohren-Klinik UKE

### Dissertation

Seit September 2019 Doktorand am Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf), Institutsdirektor Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen;

Doktorvater und Betreuer: Priv.-Doz. Dr. med. Torsten Christ,  
weiterer Betreuer: Dr. med. Marc Lemoine;

Arbeitsgruppe: Zelluläre Elektrophysiologie;

Titel: „PITX2-Knockout in atrialem Engineered Heart Tissue zeigt ähnliche elektrophysiologische Veränderungen wie bei persistierendem Vorhofflimmern“

Förderung der Dissertation mittels Stipendiums durch das CVRC („Cardiovascular Research Center“) Graduiertenkolleg

## Studentische Jobs

Seit 2018

Studentische Aushilfe Zentrale Notaufnahme UKE

## Publikationen

DGK Herbsttagung 2021, Arrhythmien und Kanalopathien

“PITX2 knockout induces key findings of electrical remodelling as seen in persistent atrial fibrillation” (Poster-Vortrag)

EWGCCE Meeting, Toledo 2022

„Retinoic acid concentration is crucial to recapitulate repolarization pattern in atrial hiPSC-CM like in human atrium“ (Poster Vortrag)

Petersen J, Castro L, Bengaard AKP, Pecha S, Ismaili D, Schulz C, Sahni J, Steenpass A, Meier C, Reichenspurner H, Jespersen T, Eschenhagen T, Christ T. Muscarinic Receptor Activation Reduces Force and Arrhythmias in Human Atria Independent of IK<sub>ACh</sub>. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2022 May 1;79(5):678-686. doi: 10.1097/FJC.0000000000001237.

Ismaili D, Gurr K, Horváth A, Yuan L, Lemoine MD, Schulz C, Sani J, Petersen J, Reichenspurner H, Kirchhof P, Jespersen T, Eschenhagen T, Hansen A, Koivumäki JT, Christ T. Regulation of APD and Force by the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Engineered Heart Tissue. *Cells.* 2022 Aug 5;11(15):2424. doi: 10.3390/cells11152424.

Ismaili D, Schulz C, Horváth A, Koivumäki J, Mika D, Hansen A, Eschenhagen T, Christ T. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as an electrophysiological model: Opportunities and challenges—The Hamburg perspective. *Frontiers in Physiology.* 2023 Feb 16; 14p: 1132165. doi: 10.3389/fphys.2023.1132165.

Schulz C, Lemoine MD, Mearini G, Koivumäki J, Sani J, Schwedhelm E, Kirchhof P, Ghalawinji A, Stoll M, Hansen A, Eschenhagen T, Christ T. *PITX2* Knockout Induces Key Findings of Electrical Remodeling as Seen in Persistent Atrial Fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2023 Feb 10;e011602. doi: 10.1161/CIRCEP.122.011602.

## 10. Veröffentlichungen

Inhalte dieser Arbeit sind Teil von Manuskripten, die bereits publiziert worden sind (Stand: Februar 2023).

Zu diesen Manuskripten gehören:

1. Schulz C, Lemoine MD, Mearini G, Koivumäki J, Sani J, Schwedhelm E, Kirchhof P, Ghalawinji A, Stoll M, Hansen A, Eschenhagen T, Christ T. *PITX2* Knockout Induces Key Findings of Electrical Remodeling as Seen in Persistent Atrial Fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2023 Feb 10:e011602. doi: 10.1161/CIRCEP.122.011602. Epub ahead of print.

Inhalte dieser Arbeit sind Teil von Manuskripten, die derzeit zur Publikation eingereicht sind (Stand: Februar 2023).

Zu diesen Manuskripten gehören:

1. „A critical role of retinoic acid concentration for the induction of a fully human-like atrial phenotype in hiPSC-CM“ (Schulz et al.)

## **11. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....