

AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR HERZCHIRURGIE

DIREKTOR (K): PROF. DR. MED. CHRISTIAN D. ETZ

MRNA ALS REPROGRAMMIERUNGSWERKZEUG FÜR DIE
GENERIERUNG KARDIALER SCHRITTMACHERZELLEN

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER MEDIZIN

DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON

FELICIA KÜHNEL | GEB. AM 29.12.1996 IN WASSERBURG AM INN

AUS BERLIN

ROSTOCK | 02.10.2022

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004457

DEKAN: PROF. DR. MED. UNIV. EMIL C. REISINGER

ERSTGUTACHTER: PROF. DR. RER. NAT. ROBERT DAVID

EINRICHTUNG: UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK, KLINIK UND POLIKLINIK FÜR HERZCHIRURGIE

ZWEITGUTACHTER: PD DR. RER. NAT. KIRSTEN PETERS

EINRICHTUNG: UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK, ARBEITSBEREICH ZELLBIOLOGIE

DRITTGUTACHTER: PROF. DR. MED. STEFAN BRUNNER

EINRICHTUNG: LMU KLINIKUM MÜNCHEN, MUSKULOSKELETTALES UNIVERSITÄTSSZENTRUM

JAHR DER EINREICHUNG: 2022

DATUM DER ÖFFENTLICHEN VERTEIDIGUNG: 15.08.2023

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Kardiales Reizleitungssystem	1
1.1.1 Struktur und Funktionen.....	1
1.1.2 Embryonale Genese des Sinusknoten	3
1.1.3 Erkrankungen des Reizleitungssystems	4
1.1.4 Künstliche Herzschrittmacher	5
1.2 Induzierte pluripotente Stammzellen	7
1.2.1 Definition	7
1.2.2 Generierung.....	8
1.2.3 Stammzellen in der regenerativen Medizin.....	9
1.3 Programmierungsstrategien.....	10
1.3.1 Generierung von Schrittmacherzellen aus hiPSCs.....	10
1.3.2 Reprogrammierung von terminal differenzierten Zellen.....	11
1.3.3 mRNA als Programmierungswerkzeug.....	12
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.2 Methoden	20
2.2.1 Zelllinien	20
2.2.2 Zellkultur.....	20
2.2.2.1 Einfrieren und Auftauen.....	20
2.2.2.2 Isolation neonataler Herzen.....	21
2.2.2.3 Kultivierung hiPSC	22

2.2.2.4	Differenzierung	22
2.2.3	mRNA-Transfektion.....	25
2.2.4	Bestimmung der Schlagfrequenz.....	26
2.2.5	Molekularbiologie	27
2.2.5.1	Isolation der Gesamt-RNA.....	27
2.2.5.2	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration.....	27
2.2.5.3	cDNA-Synthese.....	27
2.2.5.4	Quantitative Real-Time-PCR mittels TaqMan TM -PCR- Technologie.....	28
2.2.5.5	Relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode.....	30
2.2.5.6	Mikroarray-Analyse	31
2.2.6	Immunhistochemie	31
2.2.6.1	Fixierung	31
2.2.6.2	Immunfärbung.....	32
2.2.7	Statistische Analyse.....	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Bestimmung der optimalen Transfektionsparameter	34
3.1.1	mRNA-Konzentration	34
3.1.2	Transfektionsintervall.....	35
3.1.3	mRNA-induzierte Proteinexpression	37
3.2	Morphologische Veränderungen im Verlauf der mRNA Transfektion	39
3.3	Frequenzanalyse.....	43
3.4	Genexpression kardialer und schrittmacherspezifischer Marker	45
3.4.1	PCR	45
3.4.2	Mikroarray-Analyse	51
3.5	Proteinexpression des schrittmacherspezifischen HCN4-Kanals	57
4	Diskussion	59
4.1	Einfluss der mRNA-Transfektion auf die Gen-und Proteinexpression	60

4.1.1	TBX18-mRNA induziert verstärkte SHOX2-Expression	60
4.1.2	SHOX2-mRNA induziert TBX3-Expression.....	61
4.1.3	Forcierte Überexpression von SHOX2, TBX3 und TBX18 bedingt kein verändertes Expressionsmuster schrittmacherspezifischer Marker.....	62
4.1.4	SHOX2-mRNA zeigt stärksten Einfluss auf Signalwege der kardialen Entwicklung	63
4.2	mRNA-Transfektion induziert unreifen, schrittmacherzellähnlichen Phänotyp.....	64
4.3	mRNA-Transfektion von SHOX2 und TBX3 beeinflusst die Schlagfrequenz in murinen neonatalen Kardiomyozyten	65
4.4	Limitationen und Ausblick.....	66
5	Thesen	69
	Literaturverzeichnis	70
	Eidesstattliche Versicherung	84
	Danksagung	85
	Lebenslauf	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Organisation des humanen Reizleitungssystems	1
Abbildung 2: Schematische Abbildung für die hiPSC-basierte Zelltherapie.....	9
Abbildung 3: Zeitlicher Ablauf & Stadien der kardialen Differenzierung	23
Abbildung 4: Bestimmung der optimalen mRNA-Konzentration	35
Abbildung 5: Bestimmung des optimalen Transfektionsintervalls	36
Abbildung 6: Expressionsnachweis der Proteine SHOX2, TBX3 & TBX18 nach mRNA-Transfektion.....	37
Abbildung 7: SHOX2 & TBX3 Proteinexpression nach Transfektion von SHOX2-mRNA ..	38
Abbildung 8: Morphologie CTR hiPSC-derivierten Kardiomyozyten nach Vereinzelung	39
Abbildung 9: Morphologische Veränderungen nach der ersten Transfektion	40
Abbildung 10: Morphologische Veränderungen nach der zweiten Transfektion	41
Abbildung 11: Morphologische Veränderungen nach der dritten Transfektion	42
Abbildung 12: Bestimmung der Schlagfrequenz der murinen neonatalen Kardiomyozyten...	44
Abbildung 13: Einfluss der mRNA-Transfektion auf die schrittmacherspezifische Genexpression in CTR	46
Abbildung 14: Einfluss der mRNA-Transfektion auf die schrittmacherspezifische Genexpression in ChiPS.....	49
Abbildung 15: Einfluss der kombinierten Transfektion von SHOX2- & TBX3-mRNA auf die schrittmacherspezifische Genexpression in murinen neonatalen Kardiomyozyten.....	50
Abbildung 16: Transkriptom-basierter Vergleich von mit mRNA transfizierten & untransfizierten Kardiomyozyten.....	52
Abbildung 17: Anzahl der differentiell exprimierte Transkripte im Vergleich zwischen den mRNAs	53
Abbildung 18: Vergleich zwischen vermehrt & vermindert exprimierten Transkripten	55
Abbildung 19: Einfluss der mRNA-Transfektion auf Signalwege der kardialen Differenzierung	56
Abbildung 20: Einfluss der mRNA-Transfektion auf die HCN4 Proteinexpression	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien, Medien, mRNA-Transfektion, Chemikalien, Kits.....	19
Tabelle 2: Geräte & Software.....	19
Tabelle 3: Zusammensetzung der für die kardiale Differenzierung benötigten Medien.....	24
Tabelle 4: Komponenten der mRNA-Transfektion für ein Gesamtvolumen von 1000 µl.....	26
Tabelle 5: mRNA-Mengen für die Transfektion bei einer 24-Well-Platte	26
Tabelle 6: Zusammensetzung Reverse-Transkriptions-Mastermix für cDNA-Synthese.....	28
Tabelle 7: Liste der verwendeten TaqMan TM Assays	30
Tabelle 8: TaqMan TM -PCR-Ansatz.....	30
Tabelle 9: Liste der verwendeten primären Antikörper	33
Tabelle 10: Liste der verwendeten sekundären Antikörper	33

Abkürzungsverzeichnis

AP Aktionspotential
AV-Block Atrioventrikulärer Block
AV-Knoten Atrioventrikularknoten
BSA Rinderserumalbumin
cDNA komplementäre DNA
Cx30.2 Connexin 30.2
Cx31.9 Connexin 31.9
Cx43 Connexin 43
Cx45 Connexin 45
DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindol
ESC embryonale Stammzellen
FBS Fötale Kälberserum
GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP grün fluoreszierendes Protein
HBSS Hank's-Salzlösung
HCN4 hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4
hiPSC humane induzierte pluripotente Stammzelle
iPSC induzierte pluripotente Stammzelle
ISL1 ISL LIM Homeobox 1
KM Kardiomyozyten
mRNA messenger-RNA
MRT Magnetresonanztomograph
NKX2.5 Homeobox -Protein Nkx-2.5
PBS Phosphat- gepufferte Salzlösung
PCA Principal Component Analyse
qRT-PCR quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
ROCK Rho-associated kinase
RyR2 Ryanodinrezeptor 2
SAN Sinusknoten
SHOX2 Short Stature Homeobox 2
SSS Sick-Sinus-Syndrom
TBX18 T-Box 18
TBX3 T-Box 3
TBX5 T-Box 5
TNNI3 kardiales Troponin TNNI3
UTR untranslatierte Regionen

1 Einleitung

1.1 Kardiales Reizleitungssystem

1.1.1 Struktur und Funktionen

Das kardiale Reizleitungssystem ist ein Netzwerk bestehend aus speziellen reizleitenden Zellen, welche in Form von Knoten und Bündeln im Herz organisiert sind. Die Zellen des Reizleitungssystems sind für die Initiierung und Koordinierung der Herzkontraktion verantwortlich. Die Hauptkomponenten des Reizleitungssystems bilden der Sinusknoten (SAN), der Atrioventrikularknoten (AV-Knoten), das His-Bündel und die Purkinje-Fasern. Jede Komponente spielt eine entscheidende Rolle im Ablauf der Reizweiterleitung und trägt zur intakten Herzkontraktion bei.

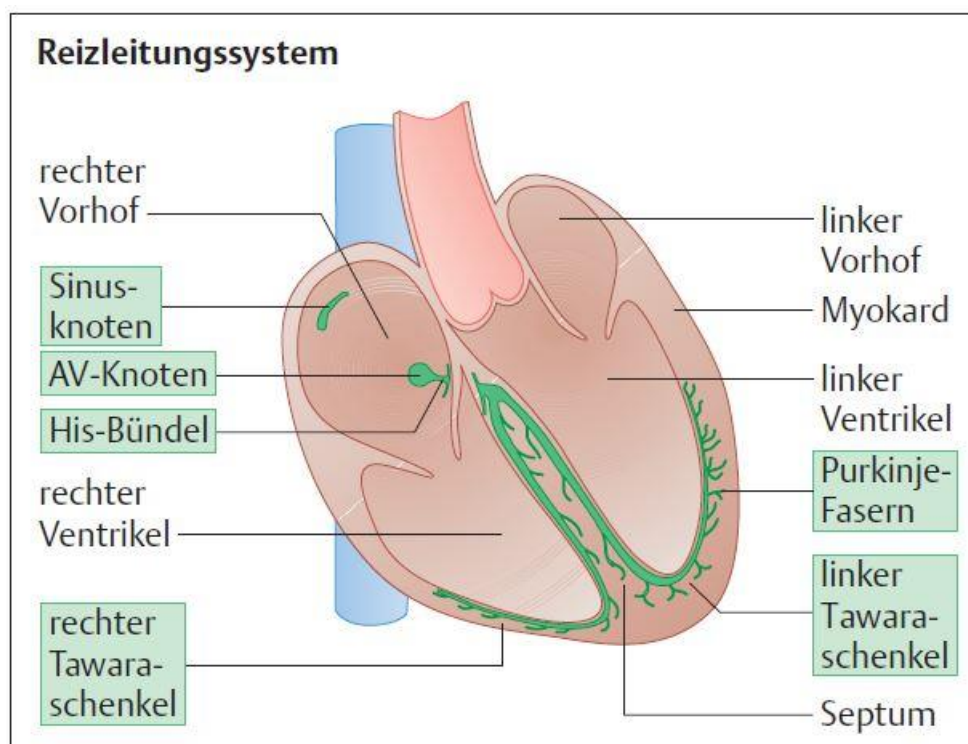


Abbildung 1: Organisation des humanen Reizleitungssystems

Der im Sinusknoten generierte elektrische Impuls wird über die Vorhöfe zum Atrioventrikularknoten weitergeleitet. Von dort erfolgt die Impulsweiterleitung über das His-Bündel, den rechten bzw. linken Tawara-Schenkel bis zu den Purkinje-Fasern. Hier erfolgt die Erregung des ventrikulären Myokards. Abbildung aus Thiemes Innere Medizin TIM, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1999, S.1226, Abb.5.133, ISBN: 3-13-112361-3)

Der Beginn der Herzerregung liegt im Sinusknoten. Der Sinusknoten ist im rechten Vorhof, im Bereich der Mündung der *Vena cava superior*, lokalisiert. Er enthält hoch spezialisierte Zellen, welche elektrische Impulse spontan generieren können. Die spontan generierten Impulse sind gekennzeichnet durch eine langsame intrinsische Anstiegsgeschwindigkeit des Aktionspotentials und werden über Gap Junction- Proteine an benachbarte Kardiomyozyten (KM) weitergeleitet. Dies bedingt die atriale Kontraktion (Mikawa und Hurtado 2007). Über internodale Leitungsbündel gelangt das im Sinusknoten generierte Aktionspotential (AP) zum AV-Knoten. Der AV-Knoten befindet sich im Bereich zwischen dem rechten Vorhof und dem rechten Ventrikel. Die Weiterleitung des Aktionspotentials wird im AV-Knoten verzögert, um eine vorzeitige Kontraktion der Ventrikel zu verhindern. Die Verzögerung der Impulsweiterleitung ist ein wesentliches Merkmal des AV-Knotens zur Herstellung der atrioventrikulären Synchronität und einer damit einhergehenden rhythmischen Herzkontraktion, welche deutlich langsamer ist als die elektrische Aktivität des Herzens (Chi et al. 2008; Kennedy et al. 2016). Ausgehend vom AV-Knoten erfolgt eine schnelle Ausbreitung des elektrischen Impulses über das His-Bündel, welches sich im membranösen Abschnitt des Kammerseptums befindet. Das His-Bündel teilt sich in den linken und rechten Tawara-Schenkel auf, welche den linken bzw. rechten Ventrikel durchdringen und mit elektrischen Impulsen versorgen. Der linke Tawara-Schenkel verzweigt sich wiederum in einen *anterioren* und einen *posterioren* Faszikel. Die Endaufzweigungen der Tawara-Schenkel bilden die Purkinje-Fasern, welche sich im Endokard der Ventrikel befinden. Ausgehend von der Herzspitze erfolgt die Kontraktion in Richtung der Klappenebene.

Eines der charakteristischsten Merkmale des kardialen Reizleitungssystems ist die intrinsische Aktivität (Automatie) seiner Schrittmacherzellen, die in der Lage sind, elektrische Aktivität spontan, ohne Intervention des zentralen Nervensystems, zu initiieren und weiterzuleiten und dadurch rhythmische Kontraktionen des Herzens zu generieren (Mangoni und Nargeot 2008; Grant 2009). Der Sinusknoten bildet den Hauptschrittmacher des menschlichen Herzens und wird daher als primärer Impulsgeber bezeichnet. Er erzeugt ca. 60-80 Erregungen pro Minute. Der SAN unterliegt jedoch den Einflüssen des autonomen Nervensystems, sodass z.B. bei körperlicher Belastung oder in psychischen Stresssituationen eine Anpassung der Schlagfrequenz erfolgen kann. Im Falle einer Dysfunktion des Sinusknoten oder bei atrioventrikulären Überleitungsstörungen erfolgt die Generierung eines Ersatzrhythmus im sekundären oder tertiären Schrittmacher, dem AV-Knoten bzw. dem His-Purkinje-System. Da die intrinsische Rate der spontanen Depolarisation mit Entfernung vom SAN abnimmt, liegt die Eigenfrequenz des sekundären bzw. tertiären Schrittmachers deutlich unter dem des SAN. Der

AV-Knoten erzeugt einen Rhythmus mit einer Frequenz von ca. 40-50 Eigenerrregungen pro Minute. Die Eigenfrequenz des His-Purkinje-System liegt hier bei 20-30 Erregungen pro Minute (Hafeez und Grossman 2022). Folglich kommt es zum Abfall des Blutdrucks und einer Minderversorgung des Organismus mit Sauerstoff. Obwohl die angrenzenden Regionen in der Schrittmacherhierarchie des kardialen Reizleitungssystems die Annahme einer taktgebenden Funktion zulassen, bleibt der SAN immer noch die führende Stimulationsstruktur, dessen ungestörte Aktivität für einen stabilen und nachhaltigen Herzrhythmus entscheidend ist (Kennedy et al. 2016).

1.1.2 Embryonale Genese des Sinusknoten

Der SAN bildet das primäre Schrittmacherzentrum im Säugetierherz und ist im rechten Vorhof lokalisiert. In den letzten Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass das Herz aus unterschiedlichen Vorläuferzellen gebildet wird. Es werden zwei Populationen von Zellen, basierend auf dem Zeitpunkt ihrer Differenzierung, unterschieden (Kelly und Buckingham 2002). Die erste Zellpopulation bildet das primäre Herzfeld. Aus den Myozyten des primären Herzfeldes bildet sich zu Beginn zunächst ein linearer Schlauch mit weitestgehend homogenem Myokard. Die zweite Zellpopulation bildet das sekundäre Herzfeld. Das Wachstum des linearen Herzschlauchs erfolgt durch sukzessives Hinzufügen von Myozyten aus dem umgebenden sekundären Herzfeld. Am kaudalen Pol des Herzschlauchs bildet sich der *Sinus venosus* aus Zellen des sekundären Herzfeldes. Dieser bildet sich zunehmend als Schrittmacherzentrum aus, da die hier lokalisierten KM den schnellsten Zyklus elektrischer Aktivität generieren können. Dies bedingt eine gerichtete peristaltische Kontraktion des Herzschlauchs (van Mierop 1967). Ursächlich hierfür ist vermutlich die Expression des SAN-Kanals, welcher eine entscheidende Rolle in der Elektrophysiologie der Schrittmacherzellen spielt (Marionneau et al. 2005; Yasui et al. 2001). Die zunehmende Akquirierung der Schrittmacherfunktion am kaudalen Pol des Herzschlauchs wird im adulten Herzen von Strukturen wie dem SAN oder dem AV-Knoten übernommen. Diese Strukturen unterscheiden sich sowohl phänotypisch wie auch genotypisch von Zellen des Arbeitsmyokards (Kamino et al. 1981). Das Myokard des primären Herzschlauchs weist überwiegend das Vorhandensein von langsam leitenden Gap Junction-Proteinen aus, was eine geringe elektrische Kopplung und langsame Erregungsleitung bedingt (Joyner und van Capelle 1986; Jong et al. 1992). Im Verlauf der Herzentwicklung folgt eine Schleifenbildung des primären Herzschlauchs und Bildung der Herzkammern. Im Rahmen dieser Schleifenbildung kommt es zu einer Proliferation des späteren atrialen und ventrikulären Arbeitsmyokards in bestimmten Regionen des Herzschlauchs, wodurch das langsam

proliferierende primäre Myokard auf einzelne Regionen beschränkt wird. Die Regionen, welche weiterhin das primäre Myokard enthalten, bilden die Ausgangsstrukturen für die Strukturen des Reizleitungssystems (Moorman und Christoffels 2003). Die späteren Strukturen des Reizleitungssystems weisen, bis auf das His-Bündel und die Purkinjefasern, ähnliche Eigenschaften wie die des primären Myokards auf. Dazu gehören unter anderem der hohe Automatismus, die geringe Leitungsfähigkeit und die geringe Kontraktilität (Jong et al. 1992; DEHAAN 1961). Während der Schleifenbildung geht die Expression des HCN4-Kanals im Arbeitsmyokard der Atrien und Ventrikel verloren, bleibt jedoch in den Regionen der zukünftigen Schrittmacherzentren erhalten (Sizarov et al. 2011; Liang et al. 2013).

Das Gewebe des *Sinus venosus* zeigt zudem deutliche Unterschiede des Expressionsmusters im Vergleich zum Arbeitsmyokard. Es exprimiert unter anderem die Transkriptionsfaktoren T-Box 18 (TBX18), Short Stature Homeobox 2 (SHOX2), T-Box 3 (TBX3) (Hoogaars et al. 2007; Blaschke et al. 2007; Christoffels et al. 2006) und zeigt sich in den frühen Entwicklungsstadien NKX2.5 negativ (Christoffels et al. 2006). In einer Subpopulation des *Sinus venosus* bildet sich durch Proliferation von TBX3-exprimierenden Zellen ein SAN-Primordium. TBX3 verhindert die Differenzierung der Myozyten in Richtung Arbeitsmyokard (Christoffels et al. 2004; Hoogaars et al. 2007; Mommersteeg et al. 2007). SHOX2 unterdrückt ebenfalls die Differenzierung in Richtung Arbeitsmyokard durch direkte Repression von NKX2.5 (Espinoza-Lewis et al. 2009) und fördert indirekt die Expression von HCN4 und TBX3 (Espinoza-Lewis et al. 2011). Zudem ist SHOX2 in Zusammenspiel mit TBX18 verantwortlich für das Wachstum des SAN durch Proliferation mesenchymaler Vorläuferzellen und die korrekte Morphogenese (Christoffels et al. 2006; Wiese et al. 2009). Im Vorhof liegende spezialisierte Gewebestränge mit deutlicher Expression von TBX3 und HCN4 bilden die internodalen Leitungen zwischen SAN und AV-Knoten (Yi et al. 2012).

1.1.3 Erkrankungen des Reizleitungssystems

Anomalien oder Störungen der Generierung des elektrischen Impulses sowie die gestörte Erregungsleitung innerhalb des Herzens können Herzrhythmusstörungen verursachen. Es gibt zahlreiche kardiale, aber auch extrakardiale Grunderkrankungen, welche zu Herzrhythmusstörungen führen können. Besonders die Dysfunktion des Sinusknotens als primärer Schrittmacher kann zu lebensgefährlichen Zuständen führen.

Zu den kardialen Grunderkrankungen, die häufig mit einer gestörten Reizweiterleitung assoziiert sind, zählen unter anderem die Myokardischämie bzw. der Myokardinfarkt, die Myokarditis, die Herzinsuffizienz und die Kardiomyopathie (Casini et al. 2017). Ein relativ

häufiges Krankheitsbild im Rahmen dieser kardialen Grunderkrankungen ist der atrioventrikuläre Block (AV-Block). Hierbei liegt eine Blockierung der Überleitung des elektrischen Impulses in einem Abschnitt entlang des Reizleitungssystems vor. Klinisch zeigt sich bei Einsetzen eines Ersatzrhythmus des sekundären bzw. tertiären Schrittmacherzentrums eine reduzierte Herzfrequenz. Ein hochgradiger, weit distal lokalisierter AV-Block kann potentiell letal enden, da die Erregungsleitung vollständig unterbrochen ist und die Vorhöfe und Ventrikel unabhängig kontrahieren. Eine anormale ventrikuläre Frequenz kann dazu führen, dass physiologische Anforderungen nicht mehr erfüllt werden können, insbesondere in Stresssituationen und bei körperlicher Aktivität.

Eine Reihe von Erkrankungen des Sinusknotens werden unter dem Sick-Sinus-Syndrom zusammengefasst. Es umfasst das periodische Auftreten von Sinusbradykardien, intermittierenden Sinusarresten und das Tachykardie-Bradykardie-Syndrom. Das Sick-Sinus-Syndrom (SSS) kann unter anderem infolge der oben genannten kardialen Grunderkrankungen auftreten, aber auch infolge einer idiopathischen, degenerativen Fibrose des Sinusknotens oder Mutationen bestimmter Ionenkanäle (Demoulin und Kulbertus 1978; Holm et al. 2011; Benson et al. 2003). Als Folge des SSS kann es zu einer Minderversorgung der Endorgane kommen. Das SSS ist die häufigste Indikation für die Implantation eines elektronischen Schrittmachers (Mond und Proclemer 2011).

Zusätzlich sind inzwischen einige Genmutationen bekannt, welche eine abnormale Ionenkanalaktivität, Transporterdysfunktionen oder Störungen der Regulationswege bedingen und folglich proarrhythmische Zustände im kardialen Reizleitungssystem induzieren (Abriel et al. 2015).

Neben den kardialen Ursachen für Herzrhythmusstörungen gibt es noch einige extrakardiale Ursachen. Hierzu gehören unter anderem Elektrolytstörungen, Funktionsstörungen der Schilddrüse, Intoxikationen durch Medikamente, Genussmittel und Bluthochdruck (Mangrum und DiMarco 2000).

1.1.4 Künstliche Herzschrittmacher

Herzrhythmusstörungen werden abhängig von der Genese und der Beeinträchtigung des alltäglichen Lebens symptomatisch mittels medikamentöser Therapie behandelt oder kausal durch Elektrotherapie. Bei spezifischen angeborenen Störungen der Reizleitung kann eine Katheterablation spezifischer Abschnitte des Reizleitungssystems kausal angewandt werden. Vor allem bei höhergradigen AV-Blocks oder aber auch beim SSS werden elektronische Schrittmacher erfolgreich zur Therapie eingesetzt. Hierbei können temporäre von permanenten

Schrittmachern unterschieden werden. Temporäre Schrittmacher finden ihre Anwendung vor allem in der Notfall- und Intensivmedizin, z.B. bei Asystolie oder symptomatischer Bradykardie. Aber auch bei Infektionen im Bereich des Herzens kann ein temporärer Schrittmacher zur Überbrückung genutzt werden, bis ein permanenter Schrittmacher nach Abheilung eingesetzt werden kann. Im Jahr 2018 wurden in Deutschland über 75.000 elektronische Schrittmacher implantiert (Markewitz 2021). Das SSS gehört zu einer der Hauptindikationen für die Implantation eines elektronischen Schrittmachers (Gregoratos 2005). Die Implantation eines Schrittmachers gehört im klinischen Einsatz zu einem Routineeingriff und wird als hocheffektives und sicheres Verfahren beschrieben (Kusumoto und Goldschlager 1996). Darüber hinaus verbessert sich die Schrittmachertherapie zunehmend durch kontinuierliche Fortschritte im Bereich der Implantation und Handhabung, z.B. durch die Einführung von leitungslosen Schrittmachern, die verkleinerten Impulsgeneratoren und die Nutzung von transkutanen Stromquellen zum Wiederaufladen des Schrittmacheraggregats (Crozier und Smith 2012).

Bei der Verwendung von elektronischen Schrittmachern müssen jedoch auch einige wichtige Nachteile bedacht werden. Hierzu gehört unter anderem die begrenzte Lebensdauer der Akkumulatoren im Schrittmacheraggregat, implantationsassoziierte Infektionen, Elektrodenbrüche und Materialdefekte, sowie eingeschränkte Verwendbarkeit bei pädiatrischen Patienten (Kurtz et al. 2010). Der Sinusknoten unterliegt normalerweise dem autonomen Nervensystem, wodurch eine Anpassung der Herzfrequenz in den unterschiedlichsten Lebenslagen erfolgen kann. Der elektronische Schrittmacher zeigt nur eine unzureichende autonome Reaktionsfähigkeit. Ältere Schrittmachermodelle zeigten eine hohe elektromagnetische Interferenz, sodass Untersuchungen im Magnetresonanztomographen (MRT) streng kontraindiziert waren, da hierdurch die Funktion des Schrittmachers teilweise erheblich beeinträchtigt wurde. Neuere Schrittmachermodelle sind hingegen meist MRT-kompatibel, sodass unter besonderen Sicherheitsmaßnahmen auch bei vorhandenem Schrittmacheraggregat eine MRT-Untersuchung möglich ist (Beitzke 2019).

Durch das zunehmend bessere Verständnis der endogenen Schrittmacherfunktion und die Verfügbarkeit von modernen Gen- und Zelltherapien stellen biologische Schrittmacher in Zukunft wohlmöglich eine attraktive Alternative zu elektronischen Schrittmacheraggregaten dar (Rosen et al. 2011). Die biologisch generierten kardialen Schrittmacher sollten, wie die *in vivo* vorkommenden Sinusknotenzellen, ein physiologisches, nicht-arrhythmogenes Verhalten zeigen und die Fähigkeit besitzen, eine stabile und spontane Stimulationsfrequenz zu erzeugen, welche der autonomen Regulation unterliegt (Valentinuzzi 2019). Bisher konnten biologisch

generierte Schrittmacherzellen bereits im Rahmen von Tierversuchen in die Atrien und Ventrikel injiziert werden. Im Rahmen dessen konnte die stimulierende Wirkung auf angrenzende KM bestätigt werden. Allerdings befinden sich die verschiedenen Ansätze der Generierung von Schrittmacherzellen weiterhin im präklinischen Stadium. Klinische Studien am Menschen wurden hierzu noch nicht durchgeführt. Im Erfolgsfall könnten die aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) Schrittmacherzellen die oben genannten Nachteile des elektronischen Schrittmachers überwinden. Des Weiteren könnten die generierten Schrittmacherzellen für die *in vitro* Testung von Arzneimitteln zur Behandlung von Rhythmusstörungen genutzt werden und den Anteil an Tierversuchen minimieren. In bisherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass aus hiPSCs differenzierte KM ein großes Potential für die *in vitro* Testung von Antiarrhythmika aufweisen und somit erheblich zur Arzneimittelsicherheit beitragen können (Niehoff et al. 2019). Zudem könnte sich in Zukunft die Möglichkeit der patientenspezifischen Generierung von Schrittmacherzellen und der daraus folgenden Möglichkeit des personalisierten Arzneimittelscreenings ergeben (Mordwinkin et al. 2013).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Generierung biologischer Schrittmacher unter Verwendung der hiPSCs-Technologie von großer Bedeutung ist. Hieraus ergeben sich neue Ansätze für die Therapie von Störungen der Reizbildung und Reizweiterleitung. Das SSS könnte mittels Zellersatztherapie behandelt werden. Zudem bildet der Forschungsansatz einen vielversprechenden Ausgangspunkt für die personalisierte Arzneimitteltestung.

1.2 Induzierte pluripotente Stammzellen

1.2.1 Definition

Eine pluripotente Stammzelle ist eine Stammzelle, welche sich in alle Zelltypen der drei Keimblätter differenzieren kann. Die drei Keimblätter bilden sich im Rahmen der Embryogenese und von ihnen leiten sich alle Strukturen des menschlichen Organismus ab. Die drei Keimblätter umfassen das Entoderm, das Mesoderm und das Ektoderm. Aus dem Entoderm bilden sich unter anderem der Gastrointestinaltrakt und der Respirationstrakt. Aus dem Mesoderm entstehen unter anderem die Knochen, die Muskulatur, das Herz und das Blut. Das Ektoderm bildet die Grundlage für die Entwicklung des Nervensystems und der Sinnesorgane sowie der Haut (Wobus und Boheler 2005; Ferretti und Hadjantonakis 2019; Thomson et al. 1998).

Die pluripotente Stammzelle besitzt eine endlose Teilungsfähigkeit, wobei die entstehenden Tochterzellen die gleichen Eigenschaften der Vorläuferzelle besitzen (Evans und Kaufman 1981; Martin 1981). Es existieren mehrere Arten pluripotenter Stammzellen. Die prominentesten Arten sind die embryonalen Stammzellen (ESC) und die induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC). ESC treten nur im Rahmen der frühen Phase der Embryonalentwicklung auf, nämlich im Stadium der Blastozyste. Sie befinden sich in der inneren Zellschicht der Blastozyste, dem Embryoblast (Evans und Kaufman 1981). Im adulten Organismus sind keine ESC mehr vorhanden. Die Gewinnung der ESC erfolgt durch die Entnahme dieser aus tierischen oder humanen Embryonen. Die Embryonen gehen hierbei zu Grunde. Aufgrund großer ethischer Bedenken bei der Gewinnung und Verwendung von humanen Embryos verbietet das Embryonenschutzgesetz in Deutschland die Gewinnung von humanen ESCs. iPSCs hingegen werden aus somatischen Zellen durch genetische Reprogrammierungsprozesse hergestellt. 2007 wurden die ersten hiPSCs von Takahashi und Yamanka aus somatischen Zellen generiert. Die somatischen Zellen wurden hierbei in den Stammzellzustand zurückversetzt und wiesen ESC-ähnliche Eigenschaften auf (Takahashi et al. 2007; Wernig et al. 2007). Seitdem hat sich die iPSC-Technologie rasant weiter entwickelt und bildet die Grundlage für weitere interessante Forschungsansätze, vor allem im Bereich der regenerativen Medizin, der Organsynthese und Transplantation sowie der Arzneimittelforschung (Abou-Saleh et al. 2018; Smith et al. 2017; Takebe et al. 2013).

1.2.2 Generierung

Im Jahr 2007 wurden erstmal hiPSCs aus somatischen Zellen hergestellt. Humane Fibroblasten wurden hierbei durch retrovirale Einführung von vier Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, c-Myc und Klf4 in einen undifferenzierten Zustand reprogrammiert (Takahashi et al. 2007). Auch durch die Kombination von Transkriptionsfaktoren bestehend aus Sox2, Oct4, Nanog und LIN28 konnten somatische Zellen in hiPSC umprogrammiert werden, welche die wesentlichen Eigenschaften der ESC ebenfalls aufweisen (Yu et al. 2007). Für die Reprogrammierung der somatischen Zellen wurden zunächst retrovirale oder lentivirale Vektoren verwendet. Retroviren und Lentiviren können allerdings eine Insertionsmutagenese verursachen, die durch eine zufällige retrovirale bzw. lentivirale Integration verursacht wird. Auch über größere Entfernung im Genom können Protoonkogene aktiviert oder Tumorsuppressorgene inaktiviert werden, was zu einer bösartigen Erkrankung führen kann (Hacein-Bey-Abina et al. 2003). Zudem kann das Einbringen der Transkriptionsfaktoren über einen retroviralen Vektor die hiPSCs immunogen machen (Zhao et al. 2011). Um die Langzeitsicherheit bei der

Transplantation von hiPSCs und den aus ihnen generierten Zellen zu gewährleisten, mussten Reprogrammierungsstrategien ohne Vektorintegration in das Wirtsgenom entwickelt werden. Die neueren integrationsfreien Verfahren umfassen unter anderem Plasmide, synthetisierte RNAs, Adenoviren und Proteine (Okita et al. 2008; Kim et al. 2009; Warren et al. 2010; Stadtfeld et al. 2008). Aufgrund der Einfachheit der Methodik und der Reproduzierbarkeit werden vor allem Plasmide routinemäßig in vielen Labors eingesetzt (Yamanaka 2012).

In dieser Arbeit wurden zwei hiPSC-Zelllinien verwendet. Die kommerziell erhältliche Zelllinie ChiPSC22 (Takara Bio) wurde mittels retroviralem Vektor und die nicht kommerzielle Zelllinie der CTR wurde mittels Sendai-Virus hergestellt.

1.2.3 Stammzellen in der regenerativen Medizin

In der regenerativen Medizin spielt die iPSC-Technologie mit ihrer Möglichkeit der Generierung von verschiedensten Gewebetypen eine wichtige Rolle. Das generierte Gewebe kann für endogene Regenerationsprozesse, aber auch für exogene Transplantationsansätze verwendet werden.

Die erste klinische Studie mit aus hiPSC-abgeleiteten Zellen wurde 2014 durchgeführt. Hier wurden retinale Pigmentepithelzellen aus den hiPSC eines Patienten abgeleitet und zur Behandlung der Makuladegeneration bei demselben Patienten eingesetzt. Dies führte zu einer Verbesserung der Sehkraft des Patienten (Kimbrel und Lanza 2015; Shi et al. 2017).

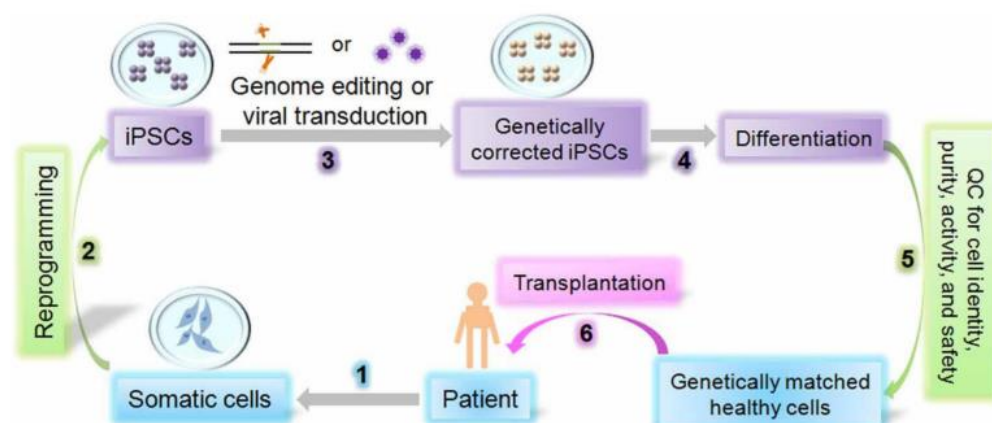


Abbildung 2: Schematische Abbildung für die hiPSC-basierte Zelltherapie

Für die hiPSC-basierte Zelltherapie werden dem Patienten zunächst somatische Zellen entnommen, welche anschließend in hiPSC reprogrammiert werden. Mittels viraler Transduktion oder Editierung des Genoms können die hiPSCs bei Bedarf entsprechend genetisch verändert werden. Anschließend erfolgt die Differenzierung der hiPSCs in den gewünschten passenden

Zelltyp. Nach Abschluss von Qualitätskontrollen der generierten Zellen erfolgt die Transplantation der auf den Patienten genetisch abgestimmten Zellen. Abbildung von Yanhong Shi, 2017

Für die weitere breite klinische Anwendung von hiPSCs müssen zunächst jedoch noch einige Herausforderungen im Zusammenhang mit der Therapie überwunden werden (Neofytou et al. 2015). Das wichtigste Sicherheitsproblem bei der *in vivo* Anwendung von hiPSC liegt im erhöhten Tumorrisiko. Aus hiPSC können sich sowohl gutartige Teratome bilden, aber auch bösartige Teratokarzinome (Lee et al. 2013; Cunningham et al. 2012). Die Tumorigenität resultiert aus der Heterogenität des Endprodukts, was während des Differenzierungsprozesses beobachtet wird. Dies ist meistens bedingt durch Kontamination mit undifferenzierten Zellen. Optimierte Differenzierungsprotokolle und Anstrengungen, die restlichen undifferenzierten Zellen zu entfernen, sind notwendig, um ein minimales Tumorrisiko sicherzustellen (Neofytou et al. 2015). Eine weitere Herausforderung liegt in der Vermeidung von immunologischen Reaktionen. Zelluläre Abstoßungsreaktionen können das Überleben der Stammzellen bzw. differenzierten Zellen verringern. Da hiPSC die Immunogenität *in vivo* fördern, erfordert der Einsatz von allogenen hiPSC eine lebenslange immunsuppressive Therapie (Almeida et al. 2013). Der Einsatz von autologen hiPSC wäre in dieser Hinsicht attraktiver, da hier keine Immunreaktion zu erwarten wäre und auf eine lebenslange Immunsuppression verzichtet werden könnte (Pearl et al. 2012; Neofytou et al. 2015). hiPSCs können in praktisch jeden somatischen Zelltyp differenziert werden und könnten daher eine Quelle für die personalisierte Bildung von Zellen zur Regeneration von Organen darstellen, aber auch für die personalisierte Testung von pharmakologischen Substanzen genutzt werden. Trotz vieler Jahre intensiver Forschung gibt es weiterhin einige Herausforderungen und Unklarheiten im Umgang mit hiPSCs, die es vor dem routinemäßigen Einsatz am Patienten zunächst zu beseitigen gilt.

1.3 Programmierungsstrategien

1.3.1 Generierung von Schrittmacherzellen aus hiPSCs

Bis heute wurde noch kein einheitliches Differenzierungsprotokoll zur effizienten Generierung von kardialen Schrittmacherzellen aus hiPSCs etabliert, welches in der Wissenschaft und Forschung als Standardverfahren allgemein anerkannt ist. Es gibt zwei Hauptstrategien für Vorwärtsprogrammierung von hiPSCs in KM. Die erste Methode basiert auf der stadienspezifischen und zeitabhängigen Anwendung von definierten chemischen Substanzen. Diese Substanzen fungieren als Liganden und verstärken spezifische Signalwege, die die

Differenzierung in den gewünschten Zelltyp fördern (Liu et al. 2020; Protze et al. 2017; Kadari et al. 2015). Aus Abbildung 3 kann der zeitliche Ablauf des in dieser Arbeit verwendeten Differenzierungsprotokolls von hiPSCs in reife KM entnommen werden. Alternativ hierzu kann durch Überexpression von spezifischen Transkriptionsfaktoren die Richtung der Differenzierung gelenkt werden. Wie bereits vorab beschrieben, spielen die Transkriptionsfaktoren SHOX2, TBX3 und TBX18 eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung des Herzens und des Sinusknotens. Die erzwungene Überexpression der Transkriptionsfaktoren kann z.B. durch Plasmide oder Retroviren erfolgen. In bisherigen Studien konnte eine Differenzierung in einen schrittmacherähnlichen Zelltyp nachgewiesen werden (Gorabi et al. 2019; Ionta et al. 2015; Jung et al. 2014). Hierbei ist die eingeschränkte Sicherheit aufgrund der Tumorigenität bei der Verwendung von Retroviren zu beachten (Hacein-Bey-Abina et al. 2003).

Mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR), immunhistochemischen Färbungen und Durchflusszytometrie kann der Erfolg und die Qualität der generierten Zellen beurteilt werden. Hierfür spielen vor allem die Expressionsniveaus von in Schrittmacherzellen angereicherten Markern, wie dem HCN4-Kanal, Connexin 30.2 (Cx30.2) bzw. Connexin 31.9 (Cx31.9) und dem Expressionsniveau vom Homeobox -Protein NKX-2.5 (NKX2.5) sowie dem Natrium-Kanal 1.5, welche nicht bzw. kaum im Sinusknoten exprimiert werden, eine wichtige Rolle. Zur eindeutigen Unterscheidung der kardialen Subtypen und der Identifizierung von Schrittmacherzellen ist die elektrophysiologische Untersuchung des Aktionspotentials die Methode der Wahl (Zhang et al. 2009; Yechikov et al. 2016).

1.3.2 Reprogrammierung von terminal differenzierten Zellen

Ein alternativer Ansatz der direkten Programmierung von hiPSC in den gewünschten Zelltyp ist die Reprogrammierung von terminal differenzierten somatischen Zellen. 1987 wurde erstmals das Potential einer Reprogrammierung von ausgereiften Zellen durch forcierte Überexpression spezifischer Transkriptionsfaktoren entdeckt. Durch Überexpression von MyoD konnten murine Fibroblasten in Skelettmuskelzellen umgewandelt werden (Davis et al. 1987). In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass kardiale Fibroblasten mittels einer Kombination kleiner Moleküle in kardiomyozytenähnliche Zellen umgewandelt werden konnten, welche hinsichtlich ihrer Morphologie und Elektrophysiologie humanen KM ähneln (Cao et al. 2016).

Auch bei der Reprogrammierung kommt den Transkriptionsfaktoren SHOX2, TBX3 und TBX18 eine wichtige Bedeutung zu. Kapoor et al. konnte in seiner Arbeit zeigen, dass die

adenovirale Überexpression von TBX18 in postnatalen ventrikulären KM der Ratte zu einem erhöhten Anteil an kontrahierenden Arealen und einer schrittmacherähnlichen Morphologie der KM führte (Kapoor et al. 2013). Die forcierte ektope Überexpression von TBX3 in atrialen KM im *in vivo* Modell zeigte eine selektive Regulation von atrialen und schrittmacherspezifischen Genen sowie die Bildung einer funktionellen ektopen Schrittmacheraktivität im Vorhof. Eine vollständige Reprogrammierung zu Schrittmacherzellen ist jedoch nicht erfolgt (Hoogaars et al. 2007). Hu et al. (2014) zeigten in einer *in vivo* Studie, dass der adenovirale Transfer von TBX18 in ventrikuläre KM bei Schweinen mit induziertem kompletten Schenkelblock zu ektopen autonomen Kontraktionen im Ventrikel führte. Allerdings hielt der Effekt der ektopen Schrittmacherbildung nur für einen begrenzten Zeitraum an, sodass von keiner dauerhaften Konversion in Schrittmacherzellen ausgegangen werden kann. Ein Reprogrammierungsansatz mittels Einbringen von mRNA oder Einbringen der fertigen Proteine der relevanten Transkriptionsfaktoren ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Dies stellt aufgrund der leichteren Handhabung und breiten Verfügbarkeit einen weiteren interessanten Ansatz dar, den es in dieser Arbeit zu untersuchen gilt. Insgesamt ist jedoch zu sagen, dass, obwohl die bisher beschriebenen Daten vielversprechend sind, das Erreichen solcher spezifizierten Zellen mit hoher Ausbeute und Reinheit noch weit davon entfernt ist, zuverlässig etabliert zu werden.

1.3.3 mRNA als Programmierungswerkzeug

Bis vor einigen Jahren waren die mRNA-basierten Therapeutika für die Arzneimittelforschung aufgrund der hohen Instabilität und potentiellen Immunogenität von geringerem Interesse (Wernig et al. 2007). Vor allem im Rahmen der COVID-19-Pandemie hat die Bedeutung der mRNA in der Wissenschaft einen neuen Stellenwert eingenommen. Im Jahr 2020 wurden erstmals mRNA-basierte Arzneimittel für die globale Anwendung zugelassen. Aber auch schon vor der Pandemie wurden Studien zu mRNA-basierten Therapieansätzen, z.B. zur Behandlung vom metastasierten Melanom, durchgeführt (Weide et al. 2008; Weide et al. 2009). In präklinischen Studien zur Behandlung von Proteinfunktionsstörungen, wie z.B. der Hämophilie A/B oder der von-Gierke-Krankheit, konnten durch Substitution der entsprechend codierenden mRNA ebenfalls erfolgsversprechende Ergebnisse erzielt werden (Ramaswamy et al. 2017; Roseman et al. 2018; Chen et al. 2020).

Die mRNA ist ein einzelsträngiges Molekül und wird während der Transkription im Zellkern hergestellt. Im menschlichen Organismus dient die mRNA als Matrize für die Proteinsynthese und codiert für ein spezifisches Protein. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, mRNA in den Organismus einzuschleusen und die Synthese des entsprechenden Proteins anzuregen. Da die

Proteinsynthese im Zytosol erfolgt, müssen mRNA-Therapeutika lediglich die Zellmembran überwinden, um ihre volle Wirkung zu entfalten. Eine Lokalisation der mRNA im Zellkern ist für die mRNA-vermittelte Proteinsynthese nicht erforderlich, womit Modifikationen an der Wirts-DNA ausgeschlossen sind (Kwon et al. 2018). Die im Rahmen der Transkription zunächst synthetisierte Vorläufer-mRNA durchläuft im Anschluss verschiedene, zum Teil umfangreiche Modifikationen, wie das Anfügen eines N7-methylierten Guanosin am 5'-Ende (5'-Cap) oder eines Poly(A)-Schwanzes (Shatkin und Manley 2000). Diese Modifikationen schützen unter anderem vor einem vorzeitigen Abbau durch Exonukleasen, bedingen eine höhere Stabilität, fördern den mRNA-Export aus dem Zellkern und die Translation der mRNA (Ramanathan et al. 2016; Sachs et al. 1997; Fuke und Ohno 2008). Im Gegensatz zu nativer zellulärer mRNA kann synthetisch hergestellte mRNA vom Wirtsorganismus als fremd wahrgenommen werden, welche der Organismus zu eliminieren versucht. Zudem weisen synthetische mRNAs eine hohe Instabilität auf sowie eine geringere Translationseffizienz mit reduzierter Halbwertszeit der entstehenden Proteine (Chabanovska et al. 2021). Mittels spezifischer chemischer Modifikationen können diese Probleme umgangen werden. Durch Optimierung der Länge des 3'-Poly(A)-Schwanzes sowie durch Auswahl von untranslatierten Regionen am 3'-Ende (UTR) aus humanen mRNAs mit höherer Stabilität, wie z.B. α - und β -Globin, kann die Translationseffizienz und die Potenz der synthetischen mRNA positiv beeinflusst werden (Holtkamp et al. 2006). Die UTR werden nicht in ein Protein übersetzt, übernehmen aber regulatorische Funktionen, wie z.B. die Molekülstabilisierung oder die Kontrolle der Translationseffizienz (Hinnebusch et al. 2016; Schuster und Hsieh 2019; Mayr 2019). Die 5'-Cap ist auch bei den *in vitro* synthetisierten mRNAs von entscheidender Bedeutung, da mRNAs ohne 5'-Cap das humane antivirale Abwehrsystem stimulieren und die folgende Entzündungsreaktion den RNA-Abbau bedingt (Hornung et al. 2006; Patel et al. 2019). Das eigentlich wichtigste Merkmal der synthetisch hergestellten mRNA ist die Verwendung von modifizierten Basenderivaten. Die native zelluläre mRNA besteht aus den Ribonukleosidbasen Adenosin, Guanosin, Cytidin und Uridin (Patel et al. 2019). Durch Substitution einer Base durch eine äquivalente, modifizierte Base, z.B. 5-Methyluridin, 5-Methylcytidin, innerhalb der gesamten Sequenz, kann die durch *in vitro* generierte mRNA Immunaktivierung vermindert und die Halbwertszeit und Stabilität der mRNA verbessert werden (Karikó et al. 2005; Karikó et al. 2008). Die chemischen Modifizierungen entsprechen natürlich vorkommenden transkriptionellen Vorgängen, sodass die endogene ribosomale Translation der *in vitro* generierten mRNAs nicht vermindert wird (Zhao et al. 2017). Hausburg et al. (2015) konnten im Rahmen ihrer Arbeit zeigen, dass durch spezifische Modifizierungen

der Basen innerhalb der mRNA die Expression des entsprechenden Proteins gesteigert werden kann und dass die optimale Modifizierung zelltypabhängig ist.

Im Gegensatz zu viralen Vektoren, bei denen ein Einbau der viralen DNA in das Wirtsgenom erfolgen kann, ist ein Einbau der mRNA in das Wirtsgenom nicht möglich. Die Gefahr der Mutagenese kann hierdurch minimiert werden (Chabanovska et al. 2021). Zudem ist die mRNA ein kurzlebiges Molekül und wird vollständig über physiologische Prozesse abgebaut. Ein weiterer Vorteil ist, dass die mRNA-Herstellung mittels *in vitro* Transkription einen relativ kostengünstigen und einfachen Prozess darstellt und prinzipiell für jedes Protein die entsprechend codierende mRNA produziert werden kann, sodass dies in Zukunft einen individualisierte spezifische Therapieansatz darstellen kann (Weng et al. 2020).

Neben bereits genannten Möglichkeiten des Einsatzes von mRNA als Therapiemöglichkeit spielt mRNA auch eine zunehmend wichtigere Rolle im Bereich der regenerativen Medizin. Im Jahr 2010 wurden erstmals iPSCs durch mRNA *in vitro* generiert. Hierfür wurden humane Fibroblasten mit mRNAs, welche für die Yamanka-Faktoren Oct3/4, Sox2, Klf4 und c-Myc codieren, transfiziert (Yakubov et al. 2010). Neben der Generierung von iPSCs unterstreichen einige Studien das Potential der mRNA, eine gezielte Differenzierung von iPSC in einen anderen Zelltypen zu induzieren. So konnte beispielsweise Wang et al. (2020) zeigen, dass hiPSCs durch Transfektion von mRNA, die für den Transkriptionsfaktor ETC2 codiert, hoch effizient in Endothelzellen differenziert wurden. Auch die Transfektion von aus Fettgewebe isolierten mesenchymalen Stammzellen mit synthetischen mRNAs, codierend für die Transkriptionsfaktoren Gata4, Mef2C, T-Box 5 (TBX5) und Mesp1, zeigte einen noch nicht voll ausgereiften, aber vielversprechenden Ansatz für die Generierung von Kardiomyozyten (Mueller et al. 2020).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchen wir das Potential der mRNA als Programmierungswerkzeug und suchen nach einer effizienten Möglichkeit, eine direkte Reprogrammierung von hiPSC-derivierten Kardiomyozyten und murinen neonatalen Kardiomyozyten in kardiale Schrittmacherzellen durch gezielte Überexpression von Schlüsselfaktoren durchzuführen. Die Schlüsselfaktoren wurden anhand ihrer entscheidenden Rolle bei der Bildung des Schrittmachers während der embryonalen Kardiogenese ausgewählt. Die hiPSC-derivierten Kardiomyozyten werden anhand eines Standard-Differenzierungsprotokolls generiert und im Anschluss mit modifizierter messenger-RNA

(mRNA) der Transkriptionsfaktoren TBX3, TBX18 und SHOX2 transfiziert. Der Einfluss der mRNA-Konzentration, des Transfektionsintervalls sowie der Kombinationen von Transkriptionsfaktoren auf die Schrittmacherpopulation werden untersucht. Ziel ist es, zu zeigen, ob mRNA generell zur Programmierung eingesetzt werden kann und ob mittels mRNA eine gezielte Reprogrammierung in kardiale Schrittmacherzellen durchgeführt werden kann. Es sollen die optimalen Parameter für die direkte Reprogrammierung der Kardiomyozyten identifiziert sowie ein entsprechendes Transfektionsprotokoll etabliert werden. Die Erfolge der mRNA-Transfektion werden mittels mikroskopischer Analyse, qRT-PCR und Mikroarray-Analyse verifiziert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Geräte sind den folgenden Tabellen zu entnehmen. Verbrauchsmaterialien, Medien und Zusätze, mRNA-Transfektionen und Chemikalien sind in Tabelle 1 dargestellt. Verwendete Geräte und Software können der Tabelle 2 entnommen werden.

Produkt	Hersteller	Katalognummer
Verbrauchsmaterialien		
Cell Counting Slides for TC10 TM /TC20 TM Cell Counter	Bio-Rad Laboratories, Inc. München, DE	1450011
Deckgläser Ø 13mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, DE	0115000
Filter Tips, steril 20µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE	70.1114.210
MicroAmp TM Optical Adhesive Film	Applied Biosystems Waltham, US	4311971
MultiGuard Barrier TM Pipet Tips 1000 µl	Sorenson Bioscience Inc., Salt Lake City, USA	35260
Multiwellplatten Cellstar [®] 6-Well, 24-Well, 48-Well	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, DE	657160, 662160, 677180
Nagellack Top-coat transparent	Rival de Loop Kosmetik GmbH, Berlin, DE	-
Histobond [®] adhesive Objektträger (76x26x1 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, DE	1000000
PCR FastGene 96-Well-Platte	Nippon Genetics Europe GmbH Düren, DE	FG-03890
PCR tube 0,2 ml	Nerbe plus GmbH & Co. KG Winsen (Luhe), DE	04-012-1130
Pipettenspitzen Biosphere [®] Filter Tips 0,5 -20 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE	701114210
Pipettenspitzen Filter Tip PP 0- 100 µl, 100- 1000 µl	Nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen (Luhe), DE	076428300, 076938300
Pipettenspitzen 10- 100 µl, 100- 1000 µl	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, DE	685290, 740296
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	TPP Techno Plastic Products AG Trasadingen, CH	94005, 94010, 94205

PCR FastGene 96-Well-Platte	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, DE	FG-03890
PCR tube 0,2 ml	Nerbe plus GmbH Winsen, DE	04-012-1130
Reaktionsgefäße Safe-Lock Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, DE	0030121023, 0010120159, 0030120094
Zellkulturflasche (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, DE	690950, 658950
Zentrifugenröhrchen Cellstar® 15ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, DE	188262, 210261
Medien und Zusätze		
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A8960
Activin A	Miltenyi Biotec B.V.& Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-115-013
bFGF	Miltenyi Biotec B.V.& Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-093-841
BMP-4	Miltenyi Biotec B.V.& Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland	130-111-164
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A7906-100G
B27 supplement mit Insulin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	17504044
B27 supplement ohne Insulin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	A1895601
Gibco™ DMEM/F-12	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	11320033
Gibco™ Fötale Kälberserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	10082147
Gibco™ Recovery cell culture freezing medium	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	12648010
IWP2	Tocris Bioscience, Bristol, UK	3533
Natriumlaktat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	L7900
Natriumpyruvat	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	11360070
Penicillin/ Streptomycin	PAN- Biotech GmbH, Aidenbach, DE	P06-07100
RPMI 1640, ohne Glukose	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	11879020
RPMI 1640, Glutamax	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	61870-010
StemMACS™ iPS-Brew XF, human	Miltenyi Biotec B.V.& Co. KG, Bergisch Gladbach, DE	130-104-368

StemMACS™ CHIR99021	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, DE	130-103-926
Zellshield	Minerva Biolabs GmbH, Berlin, DE	13-0150
2-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	31350-010
mRNA-Transfektion		
SHOX2 mRNA	TriLink BioTechnologies, Inc., San Diego, USA	U285-A06A
TBX18 mRNA	TriLink BioTechnologies, Inc., San Diego, USA	WOTL18662
TBX3 mRNA	TriLink BioTechnologies, Inc., San Diego, USA	U285-A07A
Viromer RED®	BioNTech Delivery Technologies GmbH, Halle (Saale), DE	VR-01LB-01
Chemikalien		
Accutase	Merck KGaA, Darmstadt, DE	SCR005
Ethanol 100%ig	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	BP2818-500
CellAdhere™ Laminin- 521	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, CA	77004
Fluoroshield™ mit DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	F0657
Gelatine (aus Haut von Kaltwasserfischen, 40-50 % in H ₂ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	G7765
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	035K1609
PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺	PAN- Biotech GmbH, Aidenbach, DE	P04-35500
PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	PAN- Biotech GmbH, Aidenbach, DE	P04-36500
Rho-associated-kinase (ROCK)-Inhibitor	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	130-103-922
STEMdiff™ Cardiomyocyte Dissociation Medium	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, CA	05026
Trypan Blue Stain 0,4 %	Life Technologies, Waltham, USA	15250-061
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	035K0166
TaqMan™ Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Waltham, USA	4304437
Kits		
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Waltham, USA	4368814
NucleoSpin™ RNA, Mini Kit for RNA purification	Machery-Nagel, Düren, DE	740955.250

Pierce™ Primary Cardiomyocyte Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	88281
---	---	-------

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien, Medien, mRNA-Transfektion, Chemikalien, Kits

Produkt	Hersteller
Automated cell counter TC20	Bio-Rad Laboratories, Inc., München, DE
CO ₂ -Inkubator CB 150	Binder GmbH, Tuttlingen, DE
Eppendorf Reference® Pipette 0,5- 10 µl, 10- 100 µl, 100- 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Heraeus Multifuge 1 S-R	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 780 mit ELYRA PS.1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Laminar flow cabinet- Clean Air EF/S	Telstar® – Life Science Solutions, Berna, CH
Lichtmikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, DE
Microsoft Office Word 2013	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Office Excel 2013	Microsoft, Redmon, USA
MJ Mini 48-Well Personal Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
NanoDrop® ND-1000 V3.7.1	NanoDrop Technologies LLC, Wilmington, Delaware, USA
Thermo Scientific™ Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PIPETBOY acu 2	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, DE
Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 780 mit ELYRA PS.1	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, DE
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham, USA
StepOne™ Software (Version 2)	Applied Biosystems by life technologies, Darmstadt, DE
Transcriptome Analysis Console Software (Version 4.0)	Applied Biosystems, Waltham, USA
IBM® SPSS® Statistics (Version 28.0.1.1)	IBM®, Armonk, New York, USA
Vacusafe	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, DE
Vortex- Genie® 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA
ZEN 2.5 lite (Blue Edition, Version 2.5.75.0)	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, DE

Tabelle 2: Geräte & Software

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien

Für die Versuche wurden sowohl humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs) verwendet, als auch neonatale Kardiomyozyten der Maus. Die Cellartis® human iPS Cell Line 22 (ChiPSC22) wurde bei TaKaRa Bio Europe AB (Göteborg, Schweden) käuflich erworben. Die CTR hiPSCs wurden uns freundlicher Weise von Prof. Alessandra Moretti von der TU München zur Verfügung gestellt. Die murinen Kardiomyozyten stammen von NMRI-Mäusen im Alter zwischen 1-3 Tagen, welche uns vom Institut für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock zur Verfügung gestellt worden sind.

2.2.2 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter sterilen Laminar-Airflow Werkbank. Die Einmalartikel und verbrauchsfertigen Zellkulturmedien wurden steril vom Hersteller erworben. Vor Einbringen unter die sterile Laminar-Airflow-Werkbank wurden diese mit 70%igem Ethanol sterilisiert. Hitzebeständige Materialien aus Plastik oder Glas sowie Flüssigkeiten wurden bei 121 °C für 15 min (Flüssigkeiten) oder 30 min (Festkörper) autoklaviert.

2.2.2.1 Einfrieren und Auftauen

Die Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff ermöglicht die langfristige Lagerung von Stammzellen für mehrere Jahre. Hierfür wurde nach Vereinzelung der Zellen die Gesamtzellzahl bestimmt und die entsprechenden Kryotubes bei Raumtemperatur jeweils mit 1 Millionen Zellen in 1 ml Recovery™-Cell Culture Freezing Medium befüllt. Anschließend erfolgte die Lagerung der Kryotubes in einem Freezing Container bei -80 °C. Nach 24 h wurden die Kryotubes in den Tank aus flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen erfolgte die Entnahme der Kryoröhren aus dem flüssigen Stickstoff und Lagerung auf Eis. In 5 ml des auf 37 °C vorgewärmten Zellkulturmediums wurden die Zellen in ein 15 ml-Tube aufgenommen und bei Raumtemperatur für 5 min mit 300 g (=300 x 9,81m/s²) zentrifugiert. Das Zellpellet setzte sich am Boden des Tubes ab, der Überstand wurde verworfen. Anschließend konnte das Zellpellet in 5 ml des Kultivierungsmediums resuspendiert und in eine 25 cm² mit Laminin 521 beschichtete Zellkulturflasche ausgesät werden.

2.2.2.2 Isolation neonataler Herzen

Nach Dekapitation erfolgte die komplette Eröffnung des Thorax mithilfe einer Schere. Anschließend wurde das Herz in seiner Gesamtheit entfernt und bis zur weiteren Aufbereitung in Hank's-Salzlösung (HBSS) (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) auf Eis gelagert. Zur weiteren Aufbereitung wurde das Pierce Primary Cardiomyocyte Isolation Kit verwendet. Jeweils 5 Herzen wurden in ein 1,5 ml-Eppendorf Tube gegeben und 500 μl HBSS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) hinzugefügt. Die Herzen wurden mithilfe einer Schere in 1-3 mm^3 Stücke zerkleinert, erneut mit 500 μl HBSS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen und zentrifugiert. Das restliche HBSS wurde vollständig entfernt, 200 μl des Enzym I und 10 μl des Enzym II hinzugegeben und anschließend bei 37 °C für 30 min inkubiert. Während der Inkubation wurde der Tube alle 5 min leicht geschüttelt. Dies führte zur enzymatischen Zersetzungsreaktion des Herzmuskelgewebes, welche nach Ablauf der Inkubationszeit durch Hinzufügen von 1 ml complete DMEM (mit 10 % FBS, 1 % Streptomycin) beendet werden konnte. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mittels einer 1 ml-Pipette konnte der Gewebeverbund aufgelöst werden. Anschließend wurde das Zellgemisch in einer T75-Kulturflasche in 7 ml complete DMEM ausgesät und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Während der Inkubation adhärten die nicht-kardialen Zellen, wie z.B. Fibroblasten. Die nicht adhärenen KM in der Zellsuspension wurden nach Ablauf der Inkubationszeit in ein 15 ml-Tube überführt und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 2 ml complete DMEM resuspendiert und zur Bestimmung der Gesamtzahl der lebenden Zellen innerhalb der Zellsuspension eine Färbung mittels Trypanblau durchgeführt. Trypanblau dient zur Unterscheidung zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen, indem es die Zellmembran abgestorbener Zellen durchdringt und diese blau anfärbt. Hierfür wurden 20 μl der Zellsuspension in einen separaten 0,5 ml-Tube überführt und diese im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau-Lösung verdünnt. Anschließend erfolgte die Zellzählung und Bestimmung der Vitalität der Zellen mittels eines automatischen Zellzählers (Bio-Rad). Der Anteil der lebenden Zellen sollte bei 50-70 % liegen. Die Aussaat der KM erfolgte entsprechend Bedarf auf mit Gelatine beschichteten 12-Well-Platten (1×10^6 Zellen pro Well) oder 24-Well-Platten ($0,5 \times 10^6$ Zellen pro Well). Die weitere Kultivierung erfolgt bei 37 °C und 5 % CO_2 . 24 h nach Aussaat wurde das Kulturmedium ausgetauscht und frisches complete DMEM mit Cardiomyocyte-Supplement (1:1000), welches die Proliferation von Fibroblasten hemmt, hinzugefügt. Anschließend erfolgte der Mediumwechsel alle 48 h.

2.2.2.3 Kultivierung hiPSC

Die undifferenzierten Zellen wurden in Laminin 521- beschichteten Zellkulturflaschen in 5 ml iPS-Brew-Medium (bei T25) mit zusätzlich 1 % antibiotischem Zellshield bei 37 °C, 5 % CO₂, 20 % O₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Der Wechsel des Kultivierungsmediums und das Entfernen abgestorbener Zellen mittels Phosphat- gepufferter Salzlösung (PBS) ohne Ca²⁺/Mg²⁺ wurde täglich durchgeführt. Bei einer Zelldichte von 70-80 % erfolgte die Zelldissoziation mittels Accutase. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit ROCK-Inhibitor im Verhältnis 1:1000 für 1 h inkubiert. Der ROCK-Inhibitor ist ein selektiver, ATP-kompetitiver Inhibitor der Rho-assoziierten Proteinkinase. Durch die Inkubation mit dem ROCK-Inhibitor wird die dissoziationsinduzierte Apoptose in den kultivierten Zellen reduziert, was die Überlebensrate während der Zelldissoziation mittels Accutase erhöht (Watanabe et al. 2007). Nach Inkubation wurde das Medium mit ROCK-Inhibitor entfernt und die iPSCs mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen. Anschließend wurden 1,5 ml (für T25-Zellkulturflasche) oder 3 ml (für T75-Zellkulturflasche) der auf 37 °C vorgewärmten Accutase hinzugefügt und erneut bei 37 °C für 5 min inkubiert. Accutase ist ein Dissoziationsreagenz mit proteolytischer und kollagenolytischer Enzymaktivität und dient zur Ablösung von Zellen von Standard-Kunststoffartikeln für die Gewebekultur. Nach Ablauf der 5 min konnte die proteolytische und kollagenolytische Reaktion durch Hinzugabe von iPS-Brew mit Rock-Inhibitor gestoppt werden. Die abgelösten Zellen konnten nun in ein 12 ml- Tube überführt und bei 300 g für 5 min zentrifugiert werden. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Zellpellet in 3 ml frischem iPS-Brew und Rock-Inhibitor resuspendiert. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Vitalität innerhalb der Zellsuspension wurde eine Trypanblau- Färbung durchgeführt. In Abhängigkeit der weiteren Nutzung erfolgte die Aussaat in entsprechender Dichte in mit Laminin 521-beschichteten Zellkulturflaschen oder Well-Platten mit frischem iPS-Brew und Rock-Inhibitor. Die weitere Inkubation erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 20 % O₂.

2.2.2.4 Differenzierung

Die Differenzierung von hiPSCs in KM wird in vier grundlegende Abschnitte eingeteilt: mesodermale Induktion, kardiale Induktion, kardiale Selektion und die Erhaltung der erzeugten KM. Die Induktion der einzelnen Abschnitte erfolgt durch die Zugabe unterschiedlicher, für die jeweilige Phase spezifische Substanzen. Ein Überblick über die verwendeten Medien, Zusätze, Materialien und Geräte geben Tabelle 1 und Tabelle 2.

Je nach Zelllinie erfolgte zunächst die Aussaat der hiPSC mit einer Zelldichte von 60.000/cm² (CTR iPSC) oder 100.000/cm² (ChiPS 22) in einer 6-Well-Platte in 4 ml iPSC-Brew (mit ROCK-Inhibitor) und die anschließende Inkubation bei 37 °C. In Abhängigkeit vom verwendeten Zelltyp konnte in der Regel 2 Tage (CTR iPSC) bzw. 5 Tage (ChiPS 22) nach Aussaat eine ausreichende Zelldichte erreicht werden, sodass mit der Differenzierung begonnen werden konnte. Bis zum Start der Differenzierung erfolgte ein täglicher Wechsel des iPSC-Brew. Die mesodermale Induktionsphase begann an Tag 0 bei ausreichender Zelldichte. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 4 ml basalem serumfreiem Medium ohne Insulin (RPMI 1640, Glutamax) mit 1 µM CHIR99021, 5 ng/ml BMP4, 5 ng/ml bFGF und 9 ng/ml Activin A. Die Phase der mesodermalen Induktion wurde insgesamt für 3 Tage durch täglichen Mediumwechsel aufrechterhalten. An Tag 3 folgte die Einleitung der kardialen Differenzierung. Hierfür wurde zunächst das alte Medium entfernt und die Zellen mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen. Anschließend wurden pro Well 4 ml basales serumfreies Medium mit Insulin und 5 µM IWP2 hinzugegeben. IWP2 ist ein Inhibitor des Int-Signalwegs. Die Phase der kardialen Induktion dauerte insgesamt 7 Tage an. In dieser Zeit wurde das Medium täglich gewechselt. Zwischen Tag 10 und Tag 12 erfolgte nach dem Waschen mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) die Zugabe von basalem serumfreiem Medium mit Insulin ohne den Zusatz von IWP2 und ein anschließend täglicher Wechsel des Mediums. Zwischen Tag 13 und Tag 16 fand die metabolische Selektion kardialer Zellen statt. Hierfür fügte man nach dem Waschen mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) das Selektionsmedium, bestehend aus RPMI 1640 ohne Glucose mit 1 % Zellshield, 2,3 mM Natriumlactat und 100 µM 2-Mercaptoethanol, hinzu. Das Medium wurde täglich gewechselt. An Tag 17 fand der Übergang in die letzte Phase, die Erhaltungsphase, statt. Die Erhaltung der erzeugten KM konnte mittels basalen serumfreien Mediums mit Insulin und ohne weitere Zusätze erreicht werden.

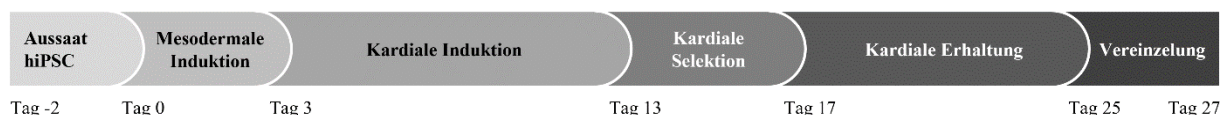


Abbildung 3: Zeitlicher Ablauf & Stadien der kardialen Differenzierung

Die Differenzierung von hiPSCs in reife Kardiomyozyten verläuft in 4 Phasen, welche durch die zeitabhängige Zugabe spezifischer Substanzen eingeleitet und aufrechterhalten werden.

	Finale Konzentration	Volumen (in ml)
Basal serum free medium		
RPMI 1640, Glutamax	-	480 ml
Zellshield	1 %	5 ml
Natriumpyruvat	1 %	5 ml
B27 supplement (+/- Insulin)	2 %	10 ml
Ascorbinsäure	200 µM	0,5 ml
Mesodermale Induktion		
Basal serum free medium (+ Insulin)		12 ml
CHIR	1 µM	2,4 µl
BMP4	5 ng/ml	0,6 µl
bFGF	5 ng/ml	0,6 µl
Activin A	9 ng/ml	1,08 µl
Kardiale Induktion		
Basal serum free medium (- Insulin)	-	12 ml
IWP2	5 µM	12 µl
Kardiale Selektion		
RPMI 1640, ohne Glukose	-	12 ml
Zellshield	1 %	120 µl
Natriumpyruvat	2,3 mM	69 µl
2-Mercaptoethanol	100 µM	24 µl
Kardiale Erhaltung		
Basal serum free medium (+ Insulin)	-	12 ml

Tabelle 3: Zusammensetzung der für die kardiale Differenzierung benötigten Medien

Die Vereinzelung der Zellen mittels Kardiomyozyten-Dissoziation-Kit (StemDiff) und Aussaat auf entsprechende Well-Platten für die weiteren Experimente wurde an Tag 25 durchgeführt. Entsprechend der Herstellerangaben wurden die Zellen mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen und mit je 1 ml/Well des Dissoziationsmediums für 10 min bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurden je 2 ml/Well des Kulturmediums hinzugefügt und die KM durch Auf- und Abpipettieren mechanisch gelöst. Die sich in Lösung befindenden Zellen wurden in ein Röhrchen überführt und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellepellet in 2 ml basalem, serumfreiem Medium mit Insulin resuspendiert. Mittels Trypanblau-Färbung konnte die Zellzahl bestimmt werden. Im Anschluss erfolgte entsprechend der weiteren Verwendung die Aussaat der Einzelzellen auf mit Laminin 521-beschichteten 48- oder 24-Well-Platten und die Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO_2 .

2.2.3 mRNA-Transfektion

Die verwendeten, modifizierten mRNAs kodieren für die Transkriptionsfaktoren SHOX2, TBX3 und TBX18, welche als positive Modulatoren der Schrittmacherzellentwicklung eine entscheidende Rolle in der embryonalen Genese spielen (Wiese et al. 2009; Espinoza-Lewis et al. 2009). Die verwendeten mRNAs sind vollständig mit 5-Methyl-Cytosin und Pseudo-Uracil (TBX3 und SHOX2) oder mit 5-Methoxy-Uracil (TBX18) substituiert und 5'-gecappt. Für den initialen Versuchsaufbau wurde eGFP-mRNA verwendet, welche für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) mit einem Emissionspeak bei 509 nm kodiert. Die eGFP-mRNA ist ebenfalls vollständig mit 5-Methyl-Cytosin und Pseudo-Uracil substituiert und 5'-gecappt.

Die Transfektion wurde mit Hilfe des Transfektionsreagenz von Viromer RED[®] durchgeführt. Viromer RED[®] ist ein polymerbasiertes Transfektionsreagenz, welches unter anderem für die *in vitro* mRNA-Transfektion genutzt werden kann. Das Transfektionsreagenz bildet mit der entsprechenden mRNA einen Transfektionskomplex, welcher mittels Endozytose in die KM aufgenommen wird. Durch die Ansäuerung innerhalb der Endosomen kann das Transfektionskonstrukt Membranen durchdringen und den lysosomalen Abbauprozess durch Wanderung in das Zytosol verlassen. Im Zytosol kommt es zur Dissoziation der mRNA vom Transfektionskomplex.

Mit der mRNA-Transfektion wurde an Tag 27, zwei Tage nach Vereinzelung der reifen KM, begonnen. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen. Anschließend wurden 2 ml (24-Well-Platten) bzw. 1 ml (48-Well-Platten) des vorgewärmten basalem serumfreien Mediums mit Insulin hinzugegeben. Das Transfektionsreagenz, bestehend aus mRNA, Viromer und Buffer, wurde nach Angaben des Herstellers angefertigt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden entsprechende Volumina des Transfektionsansatzes in das Basalmedium der KM hinzugefügt. Die transfizierte mRNA-Menge wurde anhand des transfizierten Volumens des Transfektionsreagenz bestimmt. Um den möglichen Effekt von mRNA-Kombinationen zu untersuchen, wurde ein Transfektionsreagenz bestehend aus zwei mRNAs, Viromer und Buffer, ebenfalls nach Herstellerangaben, angefertigt. Das Mengenverhältnis zwischen Gesamt-mRNA, Viromer und Buffer blieb erhalten. Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 20 % O₂ inkubiert. Nach etwa 24 h erfolgte der Austausch des Kulturmediums ohne Zusatz des Transfektionsreagenz und das Waschen der Zellen mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺), sowie anschließender Inkubation bei 37 °C für weitere 24 h. In Intervallen von jeweils 48 h wurden erneute Transfektionen nach oben genanntem Schema durchgeführt. Die mRNA-Transfektionen erfolgte immer nach gleichem Schema mit entsprechendem Mediumwechsel 24 h nach der Transfektion und einem

ransfektionsfreiem Intervall von 24 h. Pro Well wurde immer die gleiche mRNA bzw. mRNA-Kombination sowie die gleiche Menge an mRNA transfiziert. Die Menge der transfizierten mRNA wird nachfolgend immer im Vielfachen der Standardkonzentration (1,0-fach) angegeben. Die Standardkonzentration wird vom Hersteller des Transfektionsreagens mit 500 ng bei einer 24-Well-Platte angesetzt. Insgesamt wurden die Transfektionen 3- bis 5-mal durchgeführt.

Die Volumina der einzelnen Komponenten der mRNA-Transfektion sowie die transfizierten Gesamtmengen an mRNA können Tabelle 5 bzw. Tabelle 6 entnommen werden.

Komponenten		Volumen
Viomer		4 μ l
Buffer	SHOX2, TBX3, eGFP	986 μ l
	TBX18	984,5 μ l
mRNA	TBX3, SHOX2, eGFP (Stock 1 mg/ml)	11,5 μ l
	TBX18 (Stock 0,872 mg/ml)	10 μ l

Tabelle 4: Komponenten der mRNA-Transfektion für ein Gesamtvolumen von 1000 μ l

	Volumen Transfektionsreagenz	Gesamtmenge mRNA	Menge mRNA pro cm^2
4,0	200 μ l	2000 ng	1052,8 ng/cm^2
2,0	100 μ l	1000 ng	526,4 ng/cm^2
1,0	50 μ l	500 ng	263,2 ng/cm^2
0,5	25 μ l	250 ng	131,6 ng/cm^2
0,2	10 μ l	100 ng	52,6 ng/cm^2
0,1	5 μ l	50 ng	26,3 ng/cm^2

Tabelle 5: mRNA-Mengen für die Transfektion bei einer 24-Well-Platte

2.2.4 Bestimmung der Schlagfrequenz

Die Bestimmung der Schlagfrequenz erfolgte jeweils 24 h nach der letzten mRNA-Transfektion. Hierfür wurden Videos der KM aufgenommen (800 Bilder/ 40 s; exposure time: 0,5 ms) und mit Hilfe der Software ZEN 2.5 lite pro Well 5 spontan kontrahierende Zellcluster aufgesucht und deren manuell Schlagfrequenz bestimmt.

2.2.5 Molekularbiologie

2.2.5.1 Isolation der Gesamt-RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte 24 h nach der letzten mRNA-Transfektion mit dem NucleoSpin[®] RNA-Kit von Macherey-Nagel. Die Aufbereitung der Zellen und die Isolation wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst durch Zugabe von Lysepuffer RA1 und β -Mercaptoethanol (1:100) lysiert und im Anschluss mittels Vortex homogenisiert. Der NucleoSpin[®]-Filter wurde in einen 2 ml-Tube platziert und das Lysat durch den Filter bei 11000 g für 1 min zentrifugiert. Für die Optimierung der RNA-Bindungsstellen wurde 70 %-iger Ethanol zum Lysat hinzugefügt. Anschließend wurde das Lysat auf eine NucleoSpin[®] RNA-Säule pipettiert und diese bei 11000 g für 30 s zentrifugiert. Hierdurch konnte die RNA innerhalb der NucleoSpin[®] RNA-Säule gebunden werden. Mittels Entsalzungspuffer konnten die Salze der Silika-Membran in der Säule entfernt werden, wodurch eine effektivere Wirkung der rDNase ermöglicht wurde. Danach wurde der rDNase-Reaktionsansatz, bestehend aus rDNase und Reaktionspuffer, auf die Silikamembran gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte die dreimalige Waschung mit Waschpuffern RAW2 und RA3 und die RNA wurde in 40 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Im Anschluss wurden die Proben bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.5.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der Konzentration an RNA und deren Reinheit erfolgte eine photometrische Messung mittels dem NanoDrop[®] ND- 1000 Spektrophotometer. Das Verhältnis der Extinktion der jeweiligen Probe bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm dient zur Beurteilung der Reinheit der RNA. Ein Verhältnis von ~ 2 wird als „rein“ akzeptiert. Bei Werten deutlich unter 2 spricht dies für das Vorhandensein von Proteinen, Phenolen oder anderen Verunreinigungen in der Probe. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 230 nm gilt als Maß für die Reinheit der Probe. Mittels der Extinktion bei 260 nm kann die RNA-Konzentration in ng/ μ l der jeweiligen Probe bestimmt werden.

2.2.5.3 cDNA-Synthese

Zur Erzeugung von einzelsträngiger komplementärer DNA (cDNA) aus der isolierten RNA wurde das High Capacity cDNA Reverse Transkriptions-Kit von Thermo Fisher verwendet.

Die hier angewandte Random-Priming-Methode wird zu Initiierung der cDNA-Synthese genutzt und stellt sicher, dass die Erststrangsynthese mit allen vorhandenen Arten von RNA-Molekülen, einschließlich mRNA und rRNA, effizient abläuft. Um einen vorzeitigen Abbau der RNA zu verhindern, wurden alle Schritte auf Eis und unter möglichst RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurden pro Probe 20 µl Reaktionsgemisch hergestellt. Dieses Reaktionsgemisch ergibt sich aus 10 µl RNA und 10 µl Reverse-Transkription-Mastermix. Die Zusammensetzung des Reverse-Transkription-Mastermix kann Tabelle 7 entnommen werden. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben in den Thermocycler gestellt. Folgende Programmbedingungen wurden für den Thermocycler gewählt: 25 °C für 10 min → 37 °C für 120 min → 85 °C für 5 min → 4 °C für ∞. Die cDNA wurde im Anschluss bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Komponente	Menge in 20 µl Ansatz
RNA	10 µl
Nuklease-freies Wasser	4,2 µl
RT Buffer	2 µl
dNTP Mix	0,8 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
RT Random Primers	2 µl

Tabelle 6: Zusammensetzung Reverse-Transkriptions-Mastermix für cDNA-Synthese

2.2.5.4 Quantitative Real-Time-PCR mittels TaqMan™-PCR-Technologie

Für die Untersuchung der Genexpression von kardialen und schrittmacherzellspezifischen Markern wurde unter anderem die qRT-PCR angewandt. Mittels der qRT-PCR ist es möglich, bereits geringe Mengen von Nukleinsäuren *in vitro* zu vervielfältigen und zu quantifizieren. Um bereits während der Reaktion die gebildete Menge an Nukleinsäuren zu erfassen, wurde die TaqMan™-PCR-Technologie angewandt. Hier enthält der Assay neben der zu amplifizierenden cDNA, einem Primerpaar, der thermostabilen DNA-Polymerase, einer Pufferlösung und den Nukleotiden auch noch ein weiteres sequenzspezifisches Oligonukleotid. Dieses sequenzspezifische Oligonukleotid wird als Sonde bezeichnet und bindet während der Annealing-Phase zwischen den anderen beiden Primern. Die Sonde besitzt am 5'-Ende ein Reporterfluorchrom, welches Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert, und am 3'-Ende einen nicht-fluoreszierenden Quencher. Solange sowohl das 5'-Ende, als auch das 3'-Ende an

der Sonde vorliegen, unterdrückt der Quencher das fluoreszierende Signal des Reporterfluorchroms. Grundlage hierfür ist der Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) (Theodor Förster, 1946). Hierbei wird die Energie des angeregten Reporterfluorchroms strahlungsfrei auf den Quencher übertragen.

Der Ablauf der PCR beginnt mit der Denaturierung. Durch Erhöhung der Temperatur auf 94- 95 °C kommt es zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Doppelsträngen und zur Trennung des DNA-Doppelstrangs. In der sich anschließenden Annealing-Phase können die Primer und Sonden durch Absenkung der Reaktionstemperatur an die jeweilige Zielsequenz spezifisch binden. In der Phase der Elongation bindet die DNA-Polymerase an den angelagerten Forward-Primer und beginnt an dessen 3'-Ende mit der Vervollständigung des Einzelstranges zu einem Doppelstrang durch ihre 5'-3'-Polymeraseaktivität. Trifft die *Taq*-DNA-Polymerase während dieses Vorgangs auf eine TaqMan-Sonde, so wird die Sonde durch die 5'-Nukleaseaktivität der DNA-Polymerase geschnitten. Das Reporterfluorchrom am 5'-Ende und der Quencher am 3'-Ende werden dadurch dauerhaft voneinander getrennt. Daraus resultierend fällt der strahlungsfreie Energietransfer von Reporterfluorchrom auf Quencher weg und das Fluoreszenzsignal des Reporterfluorchroms ist nachweisbar. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zur Menge der synthetisierten Nukleinsäure und nimmt mit jedem PCR-Zyklus zu. Tabelle 7 zeigt die Gene, die auf ihre Expression hin untersucht wurden.

Für die Amplifikationsreaktion wurden pro Probe je 20 µl TaqManTM-PCR-Ansatz hergestellt. Dieser TaqManTM-PCR-Ansatz bestand aus 10 µl TaqManTM Universal PCR Master Mix, 1 µl TaqManTM Assay und 9 µl cDNA (30 ng) und wurde in eine 96-Well-Platte überführt. Der TaqManTM-PCR-Ansatz pro Well ist Tabelle 8 zu entnehmen. Neben den Zielproben wurden je zwei Kontrollen aus DNase/RNase-freiem Wasser (20 µl) und Kontrollen der TaqManTM, bestehend aus 1 µl TaqManTM, 9 µl DNase/RNase-freiem Wasser, 10 µl TaqManTM Universal PCR Mastermix, in die 96-Well-Platte gegeben, um die Reinheit von Wasser und Master Mix mit TaqManTM zu gewährleisten. Anschließend wurde die 96-Well-Platte mit einer entsprechenden Klebefolie (MicroAmpTM R Optical Adhesive Film) verschlossen, gevortext und zentrifugiert. Die Platte wurde nun in das Real-Time-PCR-Gerät (StepOnePlusTM Real-Time PCR-System) eingebracht und mit Standard-Versuchseinstellung für 50 Zyklen gestartet.

Gen / Assay-ID	Name	Hersteller	Katalognummer
mHCN4	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel 4	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	4331182
Mm0176086_m1			
hHCN4	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel 4	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	4331182
Hs00975492_m1			
hRyR2	Ryanodin-Rezeptor 2	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	4331182
Hs00261880_m1			
hTbx3	T-box3	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	4331182
Hs00255591_m1			
hTbx18	T-box18	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	4331182
Hs01385457_m1			
hShox2	Short-stature homeobox2	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	4331182
Hs00243202_m1			
mGAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	4331182
Mm99999915_g1			
hGAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	4331182
Hs02786624_g1			
hGJC1	Connexin 45	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	4331182
Hs00271416_s1			

Tabelle 7: Liste der verwendeten TaqMan™ Assays

Komponente	Menge im 20 µl Ansatz
cDNA	9 µl (= 30 ng cDNA)
TaqMan® Assay	1 µl
TaqMan® Universal PCR Master Mix	10 µl

Tabelle 8: TaqMan™-PCR-Ansatz

2.2.5.5 Relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Für die relative Quantifizierung wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewandt. Hierbei wird die Expression der kardialen Zielgene im relativen Verhältnis zu nicht regulierten, homogen exprimierten Genen - sogenannte Housekeeping Genen (Referenzgenen) - bestimmt. Hierdurch wird die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert. In dieser Arbeit dienen als Referenzgene hGAPDH bzw. mGAPDH. Hierfür erfolgt zunächst die Normierung durch Subtraktion des C_t -Wertes des Referenzgens vom C_t -Wert des Zielgens für jede Probe (I.). Anschließend subtrahiert man von ΔC_t der behandelten Probe ΔC_t der Kontrollprobe. Dies entspricht dem $\Delta\Delta C_t$ -Wert (II.). Der relative Expressionsunterschied (Ratio) zwischen Kontrolle und behandelter Probe ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (III.) (Livak und Schmittgen 2001).

- I. $\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen}$
- II. $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ behandelte Probe} - \Delta C_t \text{ Kontrolle}$
- III. $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$

2.2.5.6 Mikroarray-Analyse

Die RNA-Integrität wurde unter Verwendung des Agilent Bioanalyzer 2100 mit dem RNA-Pico-Chip-Kit (Agilent Technologies) von Dr. Dirk Koczan (Core facility) analysiert. 200 ng der isolierten RNAs wurden einer Microarray-Hybridisierung unterzogen. Der genaue Ablauf wird von Koczan et al. (2018) beschrieben. Die Hybridisierung wurde auf Affymetrix Clariom™ D Arrays (ThermoFisher) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Analyse der Microarray-Daten erfolgte mit der bereitgestellten Transcriptome Analysis Console Software. Die Analyse umfasste eine Qualitätskontrolle, Datennormalisierung und statistische Tests auf differenzielle Expression. Transkripte wurden als signifikant exprimiert angesehen mit einer Änderung der Expression von mehr als 2 oder weniger als -2 und $p < 0,05$. Die Analyse der Signalwege wurde auf Grundlage einer Gene-Set-Enrichment-Analyse unter Verwendung von Fisher's Exact Test in der Wiki-Pathway-Datenbank durchgeführt. Es wurden nur signifikante Signalwege ausgewählt.

2.2.6 Immunhistochemie

Zur Untersuchung der Proteinexpression erfolgte die immunhistochemische Färbung relevanter kardialer Zielgene. Hierfür erfolgte nach entsprechender Vereinzelnung der erzeugten KM die Aussaat in eine 48-Well-Platte auf mit Laminin 521- beschichteten Deckgläsern. Die mRNA-Transfektion erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.3 beschrieben.

2.2.6.1 Fixierung

Die Fixierung erfolgte etwa 24 h nach der letzten mRNA-Transfektion. Zur Fixierung der Zellen wurde 2 %iges Paraformaldehyd verwendet, welches zunächst auf 37 °C erwärmt wurde. Das Kultivierungsmedium wurde abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Darauf folgend wurden 200 µl zur Fixierung in das Well gegeben und für 15 min inkubiert. Paraformaldehyd bildet intermolekulare Brücken zwischen den eigenen Aldehydgruppen und den Aminogruppen der Zellproteine aus und dient zur Aufrechterhaltung

des Proteinstatus. Nach der Inkubation wurde das Paraformaldehyd entfernt und die Zellen zweimal mit 200 µl PBS für jeweils 5 min gewaschen.

Zur Lagerung der fixierten Zellen wurden 500 µl PBS auf die Zellen gegeben und die Well-Platte anschließend mittels Parafilm verschlossen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.2.6.2 Immunfärbung

Die Immunfärbung dient zum Nachweis von intrazellulären Proteinen und erfolgt nach dem Prinzip der indirekten Immunofluoreszenz. Für die Färbung wurde das PBS entfernt und die Zellen für 5 min mittels 0,2 % Triton X-100 permeabilisiert. Durch die Permeabilisierung wurden große Zellmembranlipide entfernt, sodass die Antikörper die Zellmembran besser durchdringen konnten. Die Tritonlösung wurde durch zweimaliges Waschen von je 5 min mit 0,2 % Rinderserumalbumin (BSA) entfernt. Durch Zugabe von 1 %igem BSA und Inkubation für 45-60 min wurden unspezifische Bindungsstellen des primären Antikörpers blockiert. Die anschließende Inkubation mit dem primären Antikörper (in 1 % BSA und 0,15 % Triton X-100) erfolgte für 45-60 min. Der primäre Antikörper bindet direkt das Ziel-Antigen in der Probe. Der überschüssige primäre Antikörper wurde durch 3-minütiges Waschen mit 0,2 % BSA für 3 min entfernt. Der im Anschluss hinzugefügte sekundäre Antikörper enthält den Fluoreszenzfarbstoff und bindet den primären Antikörper. Die Inkubation des sekundären Antikörpers (in 1 % BSA und 0,15 % Triton X-100) erfolgte für 30-45 min. Durch zweimaliges Waschen mit 0,2 % BSA für je 3 min und mit PBS für weitere 3 min wurde der überschüssige sekundäre Antikörper entfernt. Die Deckgläser wurden kurz in Aqua dest. geschwenkt und mittels Mounting-Medium auf einem Objektträger fixiert. Das Mounting-Medium enthält 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher DNA markiert. Nach 8-10 h war das Mounting-Medium vollständig getrocknet. Durch Abdichten der Deckgläseränder mit handelsüblichem Nagellack wurde das Austrocknen der Zellen verhindert und die Haltbarkeit der Färbung verlängert. Tabelle 9 und Tabelle 10 können die für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten primären bzw. sekundären Antikörper entnommen werden.

Primärer Antikörper	Hersteller	Katalognummer	Verdünnung in BSA 1% + Triton 0,15%
Anti-HCN4 (Kaninchen, polyklonal)	AlomoneLabs Jerusalem, IL	APC-052	1:200
α-Aktinin (Maus, monoklonal)	Abcam, Cambridge, UK	ab9465	1:200

Anti-TBX3 (Kaninchen, polyklonal)	Abcam Cambridge, UK	ab99302	1:100
Anti-TBX18 (Kaninchen, polyklonal)	Abcam Cambridge, UK	ab115262	1:100
Anti-SHOX2 (Maus, Monoclonal)	Abcam Cambridge, UK	ab55740	1:100

Tabelle 9: Liste der verwendeten primären Antikörper

Sekundärer Antikörper	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung in BSA 1% + Triton 0,15%
Alexa Fluor® 568 Ziege Anti-Kaninchen IgG	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	A11036	1:300
Alexa Fluor® 488 Ziege Anti-Maus IgG	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	A11001	1:300

Tabelle 10: Liste der verwendeten sekundären Antikörper

2.2.7 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit Hilfe der Software IBM® SPSS® Statistics (Version 28.0.1.1) durchgeführt. Bei der Auswertung der Daten der qRT-PCR wurden die Expressionsverhältnisse für das jeweilige Zielgen (z.B. SHOX2) im Verhältnis zum Referenzgen (GAPDH) als Mittelwert der relativen Veränderung ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) zusammengefasst. Die Standardabweichung wurde für die Fehlerbalken verwendet. Bei vorhandener Varianzheterogenität der vorliegenden Daten wurde eine Welch-ANOVA, einschließlich Post-hoc-Test von Games-Howell verwendet, um die statistische Signifikanz von Proben $n > 1$ zu bestimmen. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

Das Ziel der Arbeit war es zunächst zu zeigen, ob mRNA generell als Reprogrammierungswerkzeug genutzt werden kann. Darauf aufbauend sollte untersucht werden, ob durch Transfektion von mRNAs eine gezielte Reprogrammierung reifer Kardiomyozyten in kardiale Schrittmacherzellen möglich ist und ein entsprechendes Transfektionsprotokoll hierfür etabliert werden kann. Die verwendeten mRNAs codieren für spezifische Transkriptionsfaktoren, welche eine bedeutende Rolle in der Embryonalentwicklung des Herzens spielen und unter anderem positive Regulatoren der HCN4-Expression darstellen.

3.1 Bestimmung der optimalen Transfektionsparameter

3.1.1 mRNA-Konzentration

Zu Beginn wurde untersucht, ob die mRNA von den KM aufgenommen wird. Anschließend wurde die Effizienz der mRNA-Transfektion und -Translation bestimmt. Hierfür wurden die KM einmalig mit eGFP-mRNA transfiziert, welche für ein grün fluoreszierendes Protein kodiert. Hierdurch konnte wiederum bestimmt werden, welche Menge an mRNA zu einer starken Expression des Proteins führt, zeitgleich aber minimale zytotoxische Effekte aufweist. Das gemessene Fluoreszenzsignal korreliert mit der Expression des codierten Proteins. Abbildungen 4A und 4B zeigen das Fluoreszenzsignal nach Transfektion von murinen neonatalen KM mit 250 ng (Abb. 4A) und 500 ng (Abb. 4B) eGFP-mRNA. Erkennbar ist ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal innerhalb der gesamten Zellen nach einmaliger Transfektion von 500 ng mRNA. Es zeigen sich keine vermehrten zytotoxischen Effekte nach mRNA-Transfektion. Um zu überprüfen, ob ähnliche Ergebnisse bei der Transfektion der CTR iPSC erzielt werden können, wurden diese ebenfalls mit eGFP-mRNA transfiziert (Abb. 4C, 4D). Auch hier zeigt sich ein proportional zur transfizierten mRNA-Menge verhaltendes Fluoreszenzsignal. Nach Transfektion von 500 ng mRNA (Abb. 4D) zeigt sich ein deutlich intensiveres Fluoreszenzsignal im Bereich des Zellkerns und der Zellmembran. Verstärkte zytotoxische Effekte können auch bei der höheren mRNA-Konzentration nicht beobachtet werden. Anhand der Färbungen lässt sich auf eine Translationseffizienz von ~70-80 % bei Transfektion von 500 ng mRNA schließen. Die Transfektion mit 500 ng mRNA (= 0,5) war

daher Ausgangspunkt für die weiteren Versuche und stellt in unseren Versuchen die Standardkonzentration dar.

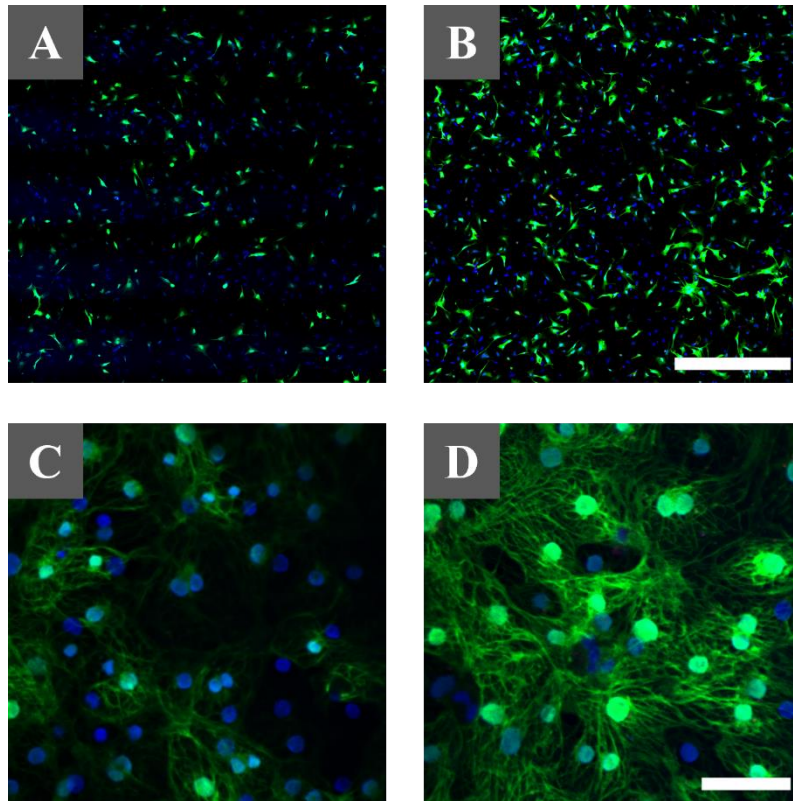


Abbildung 4: Bestimmung der optimalen mRNA-Konzentration

Transfektion der Kardiomyozyten mit eGFP-mRNA (grün) und Fixierung 24 h nach der Transfektion. Fluoreszenzsignal von murinen neonatalen Kardiomyozyten nach Transfektion von 250 ng eGFP-mRNA (A) bzw. 500 ng eGFP-mRNA (B). Fluoreszenzsignal von CTR hiPSC-derivierten Kardiomyozyten nach Transfektion von 250 ng eGFP-mRNA (C) bzw. 500 ng eGFP-mRNA (D). Maßstabsleiste (B): 500 μm gilt auch für Abb. 4A. Maßstabsleiste (D): 50 μm gilt auch für Abb. 4C

3.1.2 Transfektionsintervall

Da die Transfektion von mRNA keine permanente Änderung im zellulären Genom verursacht, sondern transiente Effekte erzeugt werden, wurde im Folgenden untersucht, wie lange diese Effekte andauern. In murinen neonatalen KM wurde untersucht, in welchen Zeitabständen die Transfektion mit mRNA zu erfolgen hat, um eine optimale Translation der mRNA zu erreichen. Hierfür wurde nach Isolation und Vereinzeln der neonatalen KM die Aussaat auf mit Gelatine beschichteten Deckgläschen durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen mit gleichen Mengen an eGFP-mRNA einmalig transfiziert, in den entsprechenden Zeitintervallen zwischen 24 h und 96 h nach mRNA-Transfektion fixiert und das eGFP-Fluoreszenzsignal detektiert.

Abbildung 5A und 5B zeigen das Fluoreszenzsignal 24 h bzw. 48 h nach mRNA-Transfektion. In diesen Abbildungen zeigt sich ein gleichmäßiges und intensives Fluoreszenzsignal innerhalb der KM. Unterschiede in der Intensität zwischen den Abbildungen 5A und 5B sind nicht erkennbar. Die deutlich abgeschwächten Fluoreszenzsignale nach 72 h und 96 h sind in Abbildungen 5C bzw. 5D zu erkennen.

Hieraus ergab sich, dass das optimale Intervall zwischen den mRNA-Transfektionen zwischen 24 h und 48 h liegt. Größere Zeitintervalle sind zu vermeiden, da es hier vermutlich bereits zu einem Abbau der mRNA innerhalb der Zellen kommt, welcher mit dem abnehmenden Fluoreszenzsignal korreliert. Eine tägliche mRNA-Transfektion erschien uns anhand dieser Ergebnisse als nicht notwendig, da keine Intensitätsunterschiede zwischen 24 h und 48 h erkennbar waren.

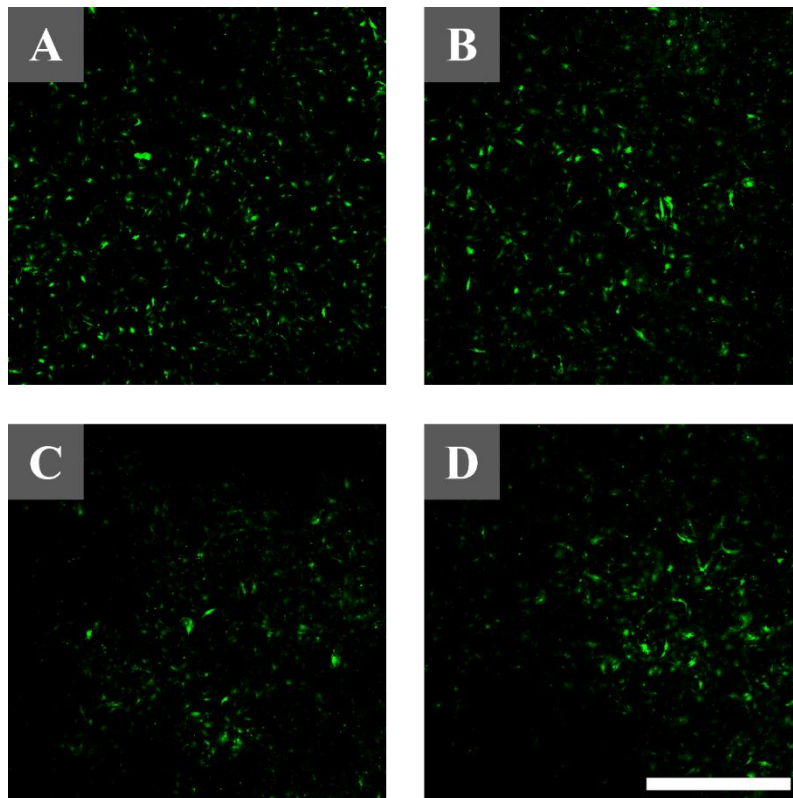


Abbildung 5: Bestimmung des optimalen Transfektionsintervalls

Transfektion der murinen neonatalen Kardiomyozyten mit 100 ng GFP-mRNA und anschließender Bestimmung des Fluoreszenzsignals nach 24 h (A), 48 h (B), 72 h (C) und 96 h (D). Maßstabsleiste: 1000 μm gilt für Abb.5 A-D

3.1.3 mRNA-induzierte Proteinexpression

Nachdem mittels GFP-mRNA die optimale mRNA-Konzentration und der optimale Zeitpunkt für die mRNA-Transfektion bestimmt worden ist, sollte untersucht werden, ob die mRNA-Transfektion zu einer verstärkten Expression der jeweiligen Proteine führt. Zum Nachweis der Überexpression der Transkriptionsfaktoren SHOX2, TBX3 und TBX18 nach mRNA-Transfektion, wurde eine immunhistochemische Färbung der entsprechenden Proteine durchgeführt. Nach Abschluss der Differenzierung der humanen iPSC wurden die KM vereinzelt und auf mit Laminin 521- beschichtete Deckgläschen ausgesät. Es erfolgte die Transfektion entsprechend dem Protokoll (siehe 2.2.3) und die anschließende Fixierung und Färbung (siehe 2.2.6.1 und 2.2.6.2).

Für die Visualisierung der Proteine wurde die Immunfluoreszenz durch einen entsprechenden Antikörper ausgenutzt.

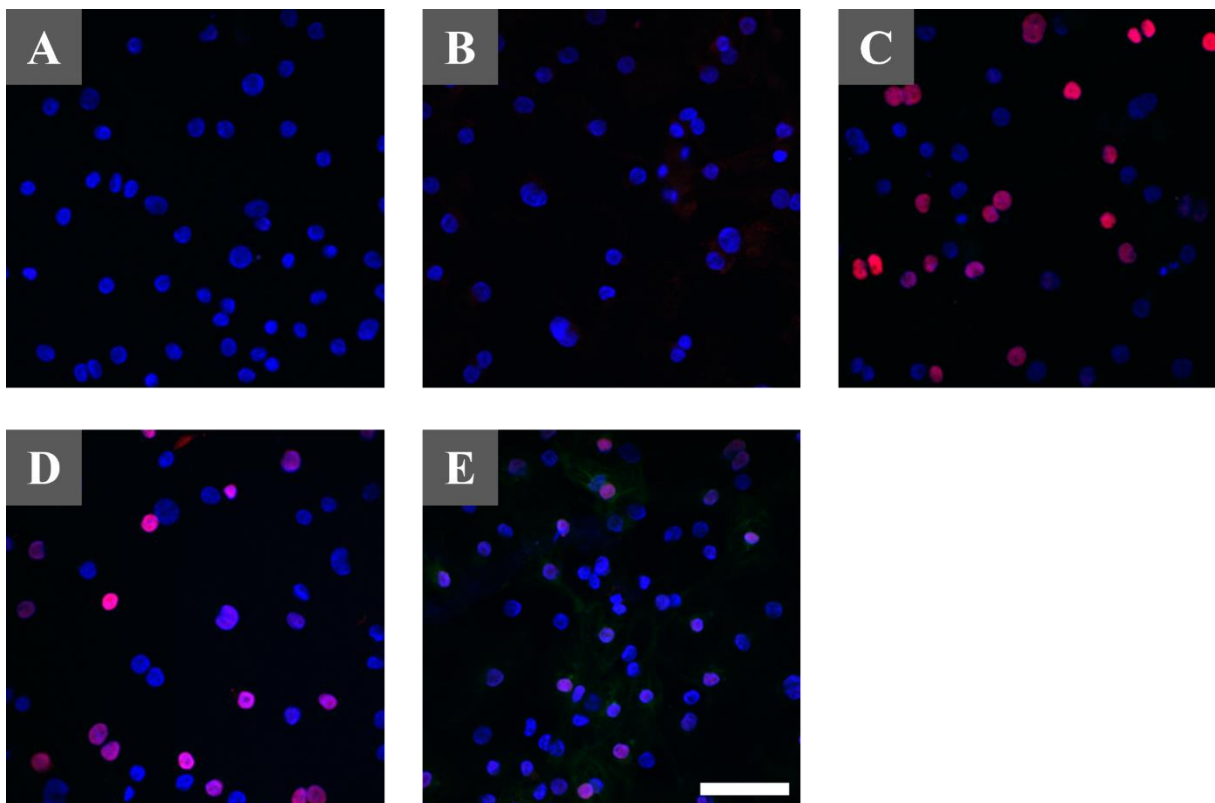


Abbildung 6: Expressionsnachweis der Proteine SHOX2, TBX3 & TBX18 nach mRNA-Transfektion

Fluoreszenzmikroskopische Bilder der CTR hiPSC-derivierten Kardiomyozyten, die mit SHOX2-, TBX3- und TBX18-mRNA in 0,5-facher Standardkonzentration transfiziert worden sind. Nach erfolgter mRNA-Transfektion der Kardiomyozyten wurde eine immunhistochemische Färbung mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI gefärbt (blau). Die untransfizierten Kardiomyozyten wurden mit Antikörpern gegen SHOX2 (grün) und TBX3 (rot) in (A) bzw. mit Antikörpern gegen SHOX2 (grün) und TBX18 (rot) in (B) angefärbt. Die mit TBX18 0,5 (C) transfizierten

Kardiomyozyten wurden mit den Antikörpern gegen SHOX2 (grün) und TBX18 (rot) gefärbt. Die mit TBX3 0,5 (D) oder mit SHOX2 0,5 (E) transfizierten Kardiomyozyten wurden mit den Antikörpern gegen SHOX2 (grün) und TBX3 (rot) gefärbt. Maßstabsleiste: 50 µm gilt für Abb.6 A-E

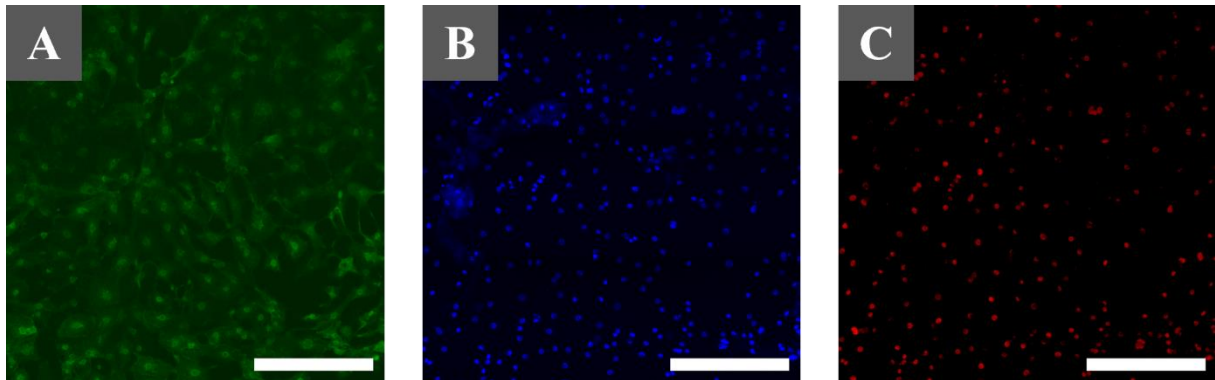


Abbildung 7: SHOX2 & TBX3 Proteinexpression nach Transfektion von SHOX2-mRNA

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der CTR hiPSC-derivierten Kardiomyozyten, die mit SHOX2- mRNA in 0,5-facher Standardkonzentration transfiziert worden sind. Die Zellkerne wurden mittels DAPI angefärbt (B). Nach Transfektion von SHOX2 0,5 zeigt sich ein verstärktes, im Kern lokalisiertes Fluoreszenzsignal (grün), welches für die Expression des SHOX2-Proteins im Zellkern spricht (A). Eine Expression des TBX3-Proteins im Zellkern ist ebenfalls anhand des im Kern lokalisierten Fluoreszenzsignals (rot) erkennbar (C). Maßstabsleiste: 200 µm gilt für Abb.7 A-C

Abbildung 6 zeigt die immunhistochemischen Färbungen mit den Antikörpern gegen die Proteine der jeweils transfizierten mRNA. Um die gegenseitige Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurden jeweils immer zwei Transkriptionsfaktoren gleichzeitig immunhistochemisch angefärbt. In der Mitte der Zellen kennzeichnet das blaue Signal das Vorhandensein eines großen Zellkerns. Die Transkriptionsfaktoren TBX3 und TBX18 sind in ihrer Expression nur auf den Zellkern beschränkt. Daher liegt das rote Signal dem blauen Signal des Zellkerns auf.

Abbildungen 6A und 6B zeigen die Färbungen der untransfizierten KM mit den Antikörpern gegen SHOX2, TBX3 und TBX18. Es ist nur das blaue Fluoreszenzsignal der Kernfärbung erkennbar. Ein rotes (TBX3 bzw. TBX18) und ein grünes (SHOX2) Fluoreszenzsignal sind nicht erkennbar. Die entsprechenden Proteine scheinen dementsprechend nicht vorzuliegen. Abbildungen 6C und 6D zeigen das im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 6A, 6B) vermehrte rote Fluoreszenzsignal im Bereich des Zellkerns nach Transfektion mit TBX18- bzw. TBX3-mRNA. Das entsprechende Protein wird dementsprechend nachweislich vermehrt exprimiert. Das Auftreten eines grünen Signals, welches für die Expression des SHOX2-Proteins sprechen würde, ist nicht sichtbar.

Bei der alleinigen Transfektion der KM mit SHOX2 ist es neben dem leicht grün fluoreszierenden Signal im Bereich des Zytoplasmas (Abb. 7A) auch eine Zunahme des rot fluoreszierenden Signals im Bereich einiger Zellkerne erkennbar (Abb. 7B). Das grüne Fluoreszenzsignal spricht für den Nachweis des SHOX2-Proteins, das rote Fluoreszenzsignal für den Nachweis des TBX3- Proteins innerhalb der Zellkerne.

Die Ergebnisse dieser immunhistochemischen Färbungen deuten auf eine Beeinflussung des Transkriptionsfaktors TBX3 durch SHOX2, sowie auf eine fehlende Interaktion zwischen den Transkriptionsfaktoren SHOX2 und TBX18 hin.

3.2 Morphologische Veränderungen im Verlauf der mRNA Transfektion

Um den Effekt der Transfektion auf die Zellmorphologie zu beurteilen, wurden die KM nach entsprechender Transfektion lichtmikroskopisch analysiert und die Bilder qualitativ bewertet. Dazu wurden die aus den CTR hiPSC differenzierten KM vereinzelt, auf Wellplatten ausgesät und in einem zeitlichen Abstand von 48 h mit der entsprechenden mRNA dreimal transfiziert.

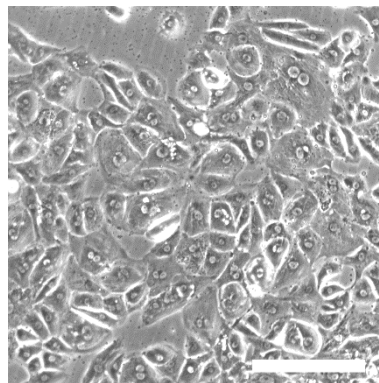


Abbildung 8: Morphologie CTR hiPSC-derivierten Kardiomyozyten nach Vereinzelung

Morphologische Beurteilung der CTR hiPSC -derivierten Kardiomyozyten nach Vereinzelung und Aussaat auf mit Laminin 527- beschichtete Wellplatten. Maßstabsleiste: 200 μ m

Abbildung 8 zeigt die typische Morphologie differenzierter KM nach Vereinzelung. Deutlich zu erkennen ist die Ausbildung eines homogenen Monolayers. Die Zellen zeichnen sich insgesamt durch eine flache Struktur mit rundlicher Morphologie aus. Nach ca. 24 h sind einzelne kontrahierende Areale innerhalb des Monolayers zu erkennen, deren Anzahl im weiteren zeitlichen Verlauf zunimmt.

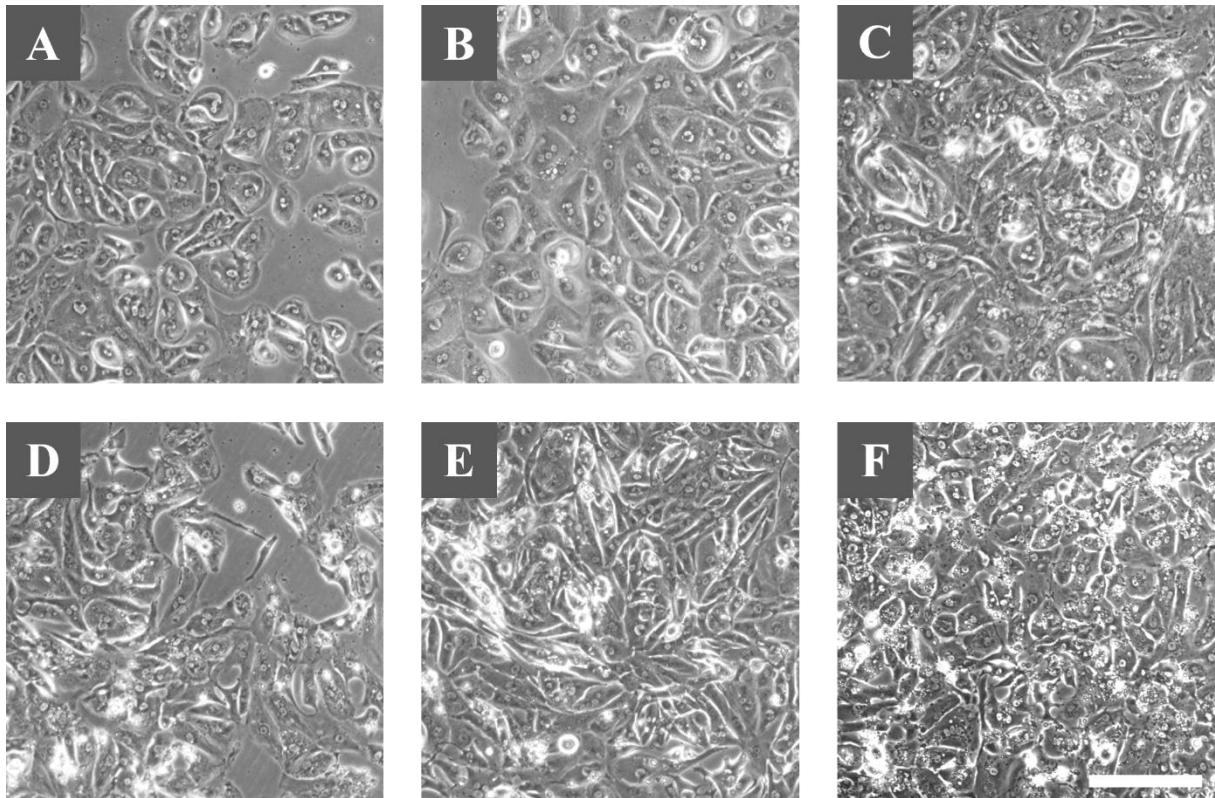


Abbildung 9: Morphologische Veränderungen nach der ersten Transfektion

Morphologische Beurteilung der CTR hiPSC -derivierten Kardiomyozyten 48 h nach der ersten mRNA- Transfektion bzw. nach der Inkubation alleinig mit dem Transfektionsreagenz (Viromer + Buffer) im Vergleich zu den untransfizierten Kardiomyozyten. Die Kardiomyozyten wurden mit dem 0,5-fachen der Standardkonzentration transfiziert. untransfiziert (A), Viromer + Buffer 0,5 (B), TBX3 0,5 (C), TBX18 0,5 (D), SHOX2 0,5 (E), TBX3 1,0 (F) Maßstabsleiste: 200 μm gilt für Abb.9 A- F

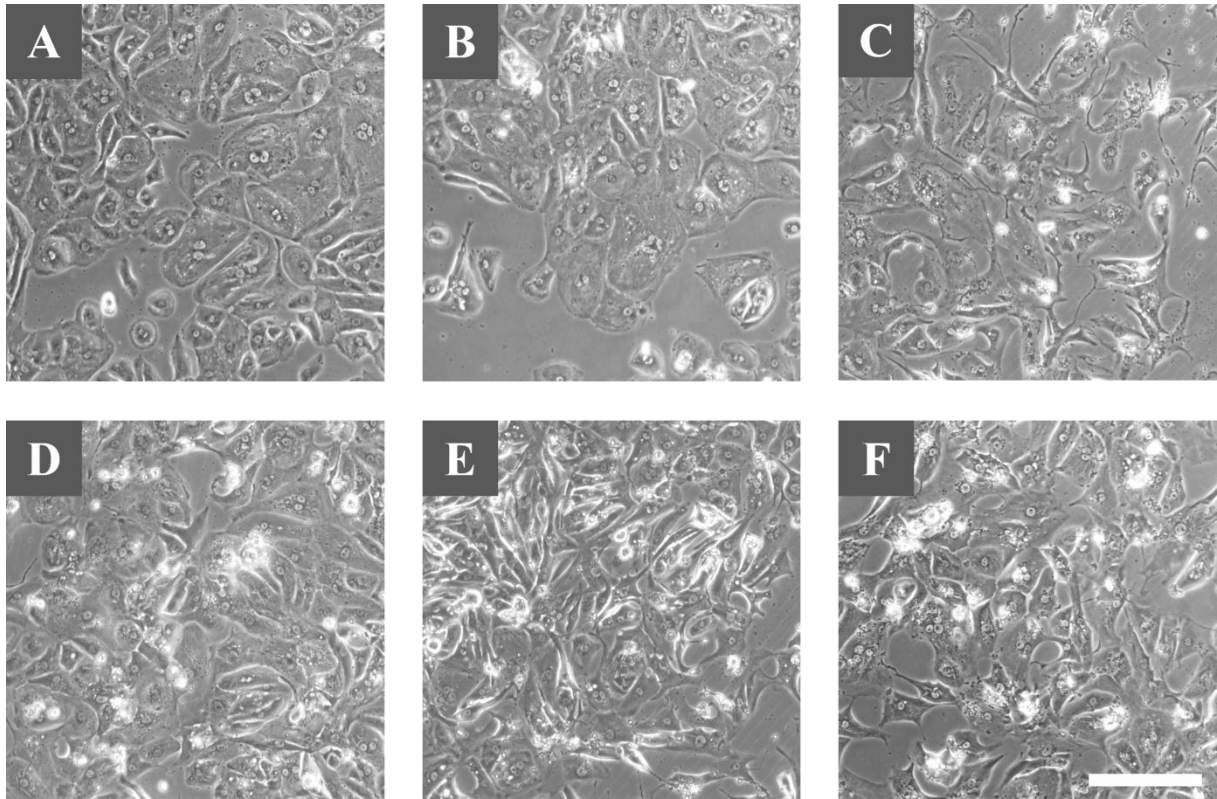


Abbildung 10: Morphologische Veränderungen nach der zweiten Transfektion

Morphologische Beurteilung der CTR hiPSC- derivierten Kardiomyozyten 48 h nach der zweiten mRNA- Transfektion bzw. nach der Inkubation alleinig mit dem Transfektionsreagenz (Viromer + Buffer) im Vergleich zu den untransfizierten Kardiomyozyten. Die Kardiomyozyten wurden mit dem 0,5-fachen der Standardkonzentration transfiziert. untransfiziert (A), Viromer + Buffer 0,5 (B), TBX3 0,5 (C), TBX18 0,5 (D), SHOX2 0,5 (E), TBX3 1,0 (F) Maßstabsleiste: 200 μ m gilt für Abb.10 A- F

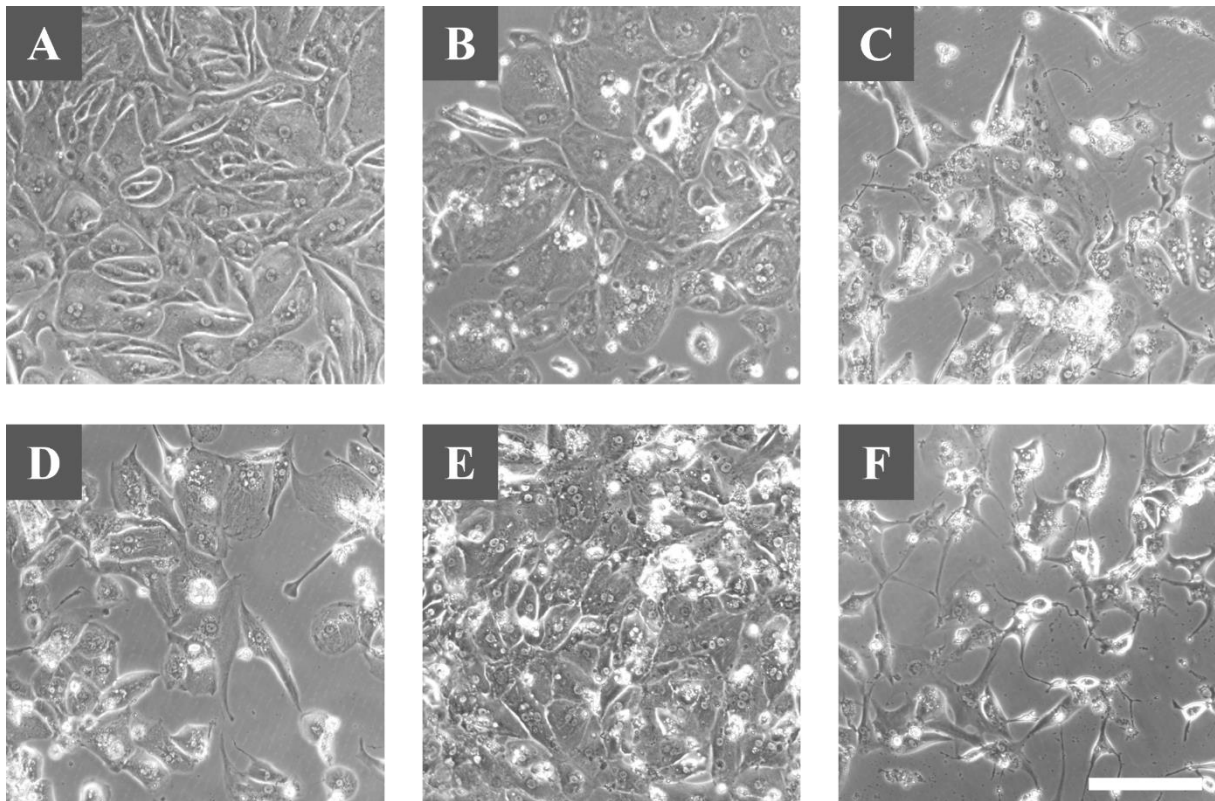


Abbildung 11: Morphologische Veränderungen nach der dritten Transfektion

Morphologische Beurteilung der CTR hiPSC- derivierten Kardiomyozyten 48 h nach der dritten mRNA- Transfektion bzw. nach der Inkubation alleinig mit dem Transfektionsreagenz (Viomer + Buffer) im Vergleich zu den untransfizierten Kardiomyozyten. Die Kardiomyozyten wurden mit dem 0,5-fachen der Standardkonzentration transfiziert. untransfiziert (A), Viomer + Buffer 0,5 (B), TBX3 0,5 (C), TBX18 0,5 (D), SHOX2 0,5 (E), TBX3 1,0 (F) Maßstabsleiste: 200 μ m gilt für Abb.11 A-F

Abbildung 9 zeigt die KM 48 h nach der ersten Transfektion mit TBX3-, TBX18- oder SHOX2-mRNA. Als Kontrollen dienen KM, welche nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert wurden.

Die untransfizierten KM zeigen im gesamten zeitlichen Verlauf stets ein gleichmäßiges Monolayer mit regelmäßig kontrahierenden Arealen (Abb. 9A, 10A, 11A). Abgekugelte, abgestorbene Zellen können nicht beobachtet werden. Kardiomyozytenkulturen, welche ausschließlich mit Viomer und Buffer inkubiert worden sind, behalten die Struktur des Monolayers auch im Verlauf bei. Im Vergleich zu den untransfizierten KM zeigen sich geringfügig mehr abgestorbene Zellen im Verlauf, was auf eine sehr geringe zytotoxische Wirkung des Transfektionsreagenz hindeutet (Abb. 11B).

Die Transfektion von SHOX2-mRNA bedingt nur geringfügige zytotoxische Effekte. Die KM zeigen auch nach der dritten Transfektion (Abb. 11E) ein gleichmäßiges Monolayer und regelmäßige Kontraktionen.

Die erste Transfektion mit TBX3-mRNA sowohl in geringer (0,5) als auch in doppelter mRNA-Standardkonzentration (1,0) wird von den KM gut toleriert und es zeigt sich hiernach ein gleichmäßig kontrahierender Monolayer (Abb. 9C). Die weiteren mRNA-Transfektionen führen allerdings zum Absterben von KM, sodass die Konfluenz des Monolayers nicht erhalten bleibt. Vor allem bei der höheren mRNA-Konzentration (1,0) zeigt sich nach der dritten Transfektion starke zytotoxische Effekte, sodass nur noch einzelne Zellen überleben. Diese weisen ein spindelförmiges Aussehen auf (Abb. 11F). Der massive Zellverlust mit Verlust der Zell-Zell-Kontakte könnte Ursache für die fehlenden Kontraktionen nach der letzten mRNA-Transfektion sein.

Die mehrmalige Transfektion von TBX18-mRNA bedingt kaum morphologische Veränderungen in den transfizierten KM. Nach der dritten Transfektion zeigen sich nur geringfügige zytotoxische Effekte mit Absterben einzelner KM. Die verbliebenden KM zeigen ein zunehmendes spindelförmiges Aussehen (Abb. 11D) und gleichmäßige Kontraktionen.

Insgesamt lässt sich aus den Beobachtungen schließen, dass sowohl die Anzahl der Transfektionen als auch die transfizierte mRNA-Menge einen Einfluss auf die Vitalität der KM haben. Bis zu einer Gesamtmenge an transfizierter mRNA von ca. 1000 ng wird diese unabhängig von der mRNA gut von den KM toleriert. Wird der jeweilige Schwellenwert allerdings überschritten, kommt es zu zytotoxischen Effekten und zum Absterben der KM. Bei der TBX3-mRNA wird dieser Schwellenwert bei der dritten Transfektion überschritten. Bei den anderen beiden mRNAs wird dieser Schwellenwert im Rahmen dieser Versuche nicht überschritten, da auch nach dreimaliger Transfektion kein starkes Absterben der Zellen zu beobachten ist. Unter den verwendeten mRNAs induziert die Transfektion mit SHOX2-mRNA die geringsten zytotoxischen Effekte. Es ist daher davon auszugehen, dass individuelle Schwellenwerte für die jeweiligen mRNAs existierten und dass dieser Schwellenwert bei der SHOX2-mRNA am höchsten ist.

3.3 Frequenzanalyse

Verglichen mit Arbeitsmyokardzellen zeichnen sich Schrittmacherzellen durch eine höhere Schlagfrequenz aus. Daher haben wir im weiteren Verlauf die Schlagfrequenz nach erfolgter mRNA-Transfektion bestimmt. Hierbei zeigen sich insgesamt große Unterschiede bezüglich der Regelmäßigkeit der Frequenz der KM-Cluster und zwischen den einzelnen Analysen.

Die Abbildung 12A zeigt die gemessenen Schlagfrequenzen der analysierten spontan kontrahierenden Areale in untransfizierten KM und der mit mRNA behandelten KM.

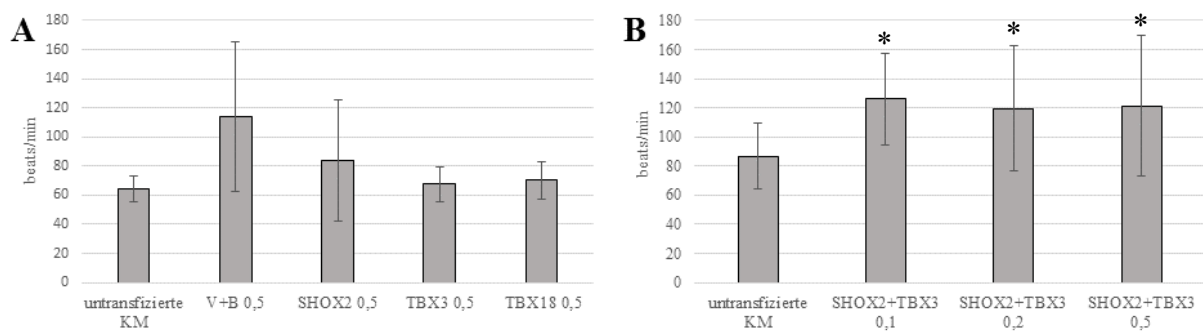


Abbildung 12: Bestimmung der Schlagfrequenz der murinen neonatalen Kardiomyozyten

Aufgezeichnet ist die Schlagfrequenz der spontan kontrahierenden Areale der mit einzelnen mRNAs (**A**) bzw. mit einer Kombination aus SHOX2- und TBX3-mRNA (**B**) transfizierten murinen neonatalen Kardiomyozyten im Vergleich zu den untransfizierten Kardiomyozyten. Die Kardiomyozyten wurden mit unterschiedlichen mRNA-Konzentrationen (0,1-/0,2-/0,5-fache der Standardkonzentration) transfiziert. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Schlagfrequenz bei Transfektion der Kombination von SHOX2- und TBX3-mRNA im Vergleich zu den untransfizierten Kardiomyozyten. $n = 2$ (A), $n = 3$ (B); *statistisch signifikant, da $p \leq 0,05$

Die untransfizierten KM zeigen eine durchschnittliche Schlagfrequenz von 64 Schlägen/min (StAbwN: 9). Die höchste Schlagfrequenz weisen die mit Viomer und Buffer inkubierten KM mit 114 Schlägen/Minute (StAbwN: 51) auf. Die mit mRNA transfizierten Zellen zeigen im Mittel eine niedrigere Schlagfrequenz auf (SHOX2 0,5: 84 Schläge/min; TBX3 0,5: 67 Schläge/min; TBX18 0,5: 70 Schläge/min).

In Hinblick auf die Transfektion der für verschiedene Transkriptionsfaktoren codierenden mRNAs, ist festzustellen, dass die mittlere Schlagfrequenz im Vergleich zu den untransfizierten Zellen nicht signifikant variiert. Bei alleiniger Zugabe des Transfektionsreagenz, bestehend aus Viomer und Buffer, ist ein erhöhter, jedoch nicht statistisch signifikanter Anstieg der Schlagfrequenz erfolgt.

Da die Transfektion einzelner Transkriptionsfaktoren zu keinem statistisch signifikanten Anstieg der Schlagfrequenz führte, untersuchten wir, ob eine Kombination aus Transkriptionsfaktoren zu einer erhöhten Schlagfrequenz führt. Abbildung 12B zeigt die Schlagfrequenz der mit einer Kombination aus SHOX2- und TBX3-mRNA, in unterschiedlichen Mengen, transfizierten KM. Es ist erkennbar, dass die Menge der transfizierten mRNA-Kombination nur einen geringfügigen Einfluss auf die Schlagfrequenz ausübt. Ihnen ist die relativ große Streuung der gemessenen Schlagfrequenzen gemeinsam, da sie sowohl niedrige Frequenzen (0,5: 50 Schläge/min; 0,2: 56 Schläge/min; 0,1: 86 Schläge/min), als auch sehr hohe Frequenzen (0,5: 187 Schläge/min; 0,2: 242 Schläge/min; 0,1:

224 Schläge/min) aufweisen. Im Mittel liegen die Schlagfrequenzen der transfizierten KM zwischen 120 und 126 Schlägen/min und zeigen damit einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den untransfizierten KM, welche eine durchschnittliche Frequenz von 87 Schlägen/min aufweisen.

Insgesamt lässt sich aus der Frequenzanalyse bei Transfektion einzelner mRNAs nur ein geringer Effekt auf die Schlagfrequenz nachweisen. Die Kombination aus SHOX2 und TBX3 zeigt hingegen einen deutlichen Effekt auf die Schlagfrequenz.

3.4 Genexpression kardialer und schrittmacherspezifischer Marker

Die immunhistochemischen Färbungen (Abb.6, Abb.7) zeigen eine verstärkte Proteinexpression nach Transfektion der KM mit der jeweiligen mRNA und zudem eine Beeinflussung von TBX3 durch SHOX2. Um tiefergehende Einblicke über die Effekte der mRNA-Transfektion und mögliche Wechselwirkungen der Transkriptionsfaktoren zu erhalten, wurden Analysen der Genexpression durchgeführt.

3.4.1 PCR

Für die Genexpressionsanalyse der transfizierten Zellen wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert (2.2.5.1), in cDNA umgeschrieben (2.2.5.3) und im Anschluss eine quantitative qRT-PCR durchgeführt (2.2.5.4). Die Berechnung der relativen Expression, normiert auf das Housekeeping-Gen GAPDH, im Vergleich zu den Kontrollen, erfolgte durch Anwendung der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (siehe 2.2.5.5). Es wurden verschiedene kardiale und für kardiale Schrittmacherzellen spezifische Marker untersucht.

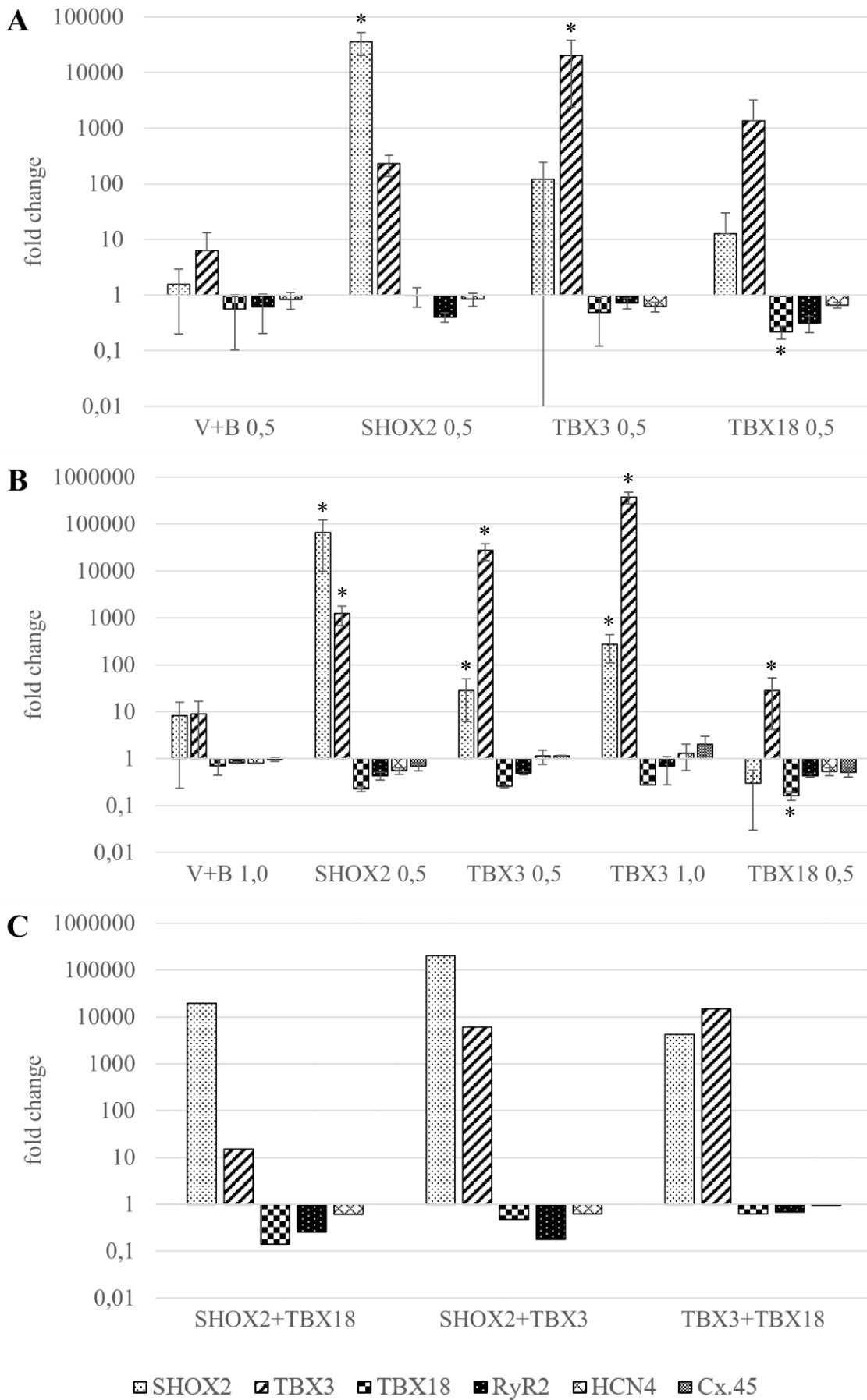


Abbildung 13: Einfluss der mRNA-Transfektion auf die schrittmacherspezifische Genexpression in CTR

Gezeigt ist die relative Expression verschiedener, für die kardiale Schrittmacherfunktion relevanter Gene der mit mRNA transfizierten Kardiomyozyten bzw. der ausschließlich mit dem Transfektionsreagenz (V+B) inkubierten Kardiomyozyten im Vergleich zu den untransfizierten Kardiomyozyten (relative Expression = 1). Die Kardiomyozyten wurden vorab aus den CTR hiPSC generiert. Die mRNA-Transfektion erfolgte zweimal (A) bzw. dreimal (B) im Abstand von je 48 h mit dem 0,5- bzw. 1-fachen der Standardkonzentration. Die Transfektion der Kombination aus TBX3-, TBX18 und SHOX2-mRNA erfolgte zweimal im Abstand von je 48 h mit dem 0,5-fachen der Standardkonzentration (C). n= 2 (A, B), n= 1 (C); * statistisch signifikant, da $p \leq 0,05$

Abbildung 13A zeigt die relative Genexpression der zweimal mit mRNA-transfizierten KM. Anhand der Grafik ist zu erkennen, dass bei alleiniger Inkubation der Zellen mit Viromer und Buffer ein verändertes Expressionsmuster nachweisbar ist. Die Expression von SHOX2 und TBX3 ist vermehrt, jedoch nicht statistisch signifikant. Die Expressionen von TBX18, RyR2 und HCN4 zeigen im Vergleich zu den untransfizierten KM keine Unterschiede. Die Transfektion von SHOX2-mRNA bedingt eine statistisch signifikant verstärkte Expression von SHOX2 und darüber hinaus eine verstärkte Expression von TBX3. Die Transfektion von TBX3-mRNA führt zu einer statistisch signifikant vermehrten Expression von TBX3 und einer erhöhten Expression von SHOX2. Das Expressionsmuster von TBX18 zeigt nach Transfektion von SHOX2-mRNA sowie von TBX3-mRNA kaum Veränderungen. Die Transfektion von TBX18-mRNA bewirkt hingegen eine statistisch signifikant verminderte Expression von TBX18 und zusätzlich eine im Vergleich zu den untransfizierten KM vermehrte Expression von SHOX2 und TBX3.

Darüber hinaus wurde der HCN4-Kanal als spezifischer Kanal der kardialen Schrittmacherzellen auf seine Expression hin untersucht. Hier kann jedoch bei keiner Probe ein signifikant verändertes Expressionsmuster nachgewiesen werden. Der Ryanodinrezeptor 2 (RyR2) kodiert für einen ligandenabhängigen Calciumkanal, welcher für die elektromechanische Kopplung in den Herzmuskelzellen verantwortlich ist und ebenfalls als kardialer Marker dient. Auch der RyR2 zeigt in allen Proben keine signifikant veränderte Expression.

Eine zweimalige mRNA-Transfektion führte zu keinem veränderten Expressionsmuster des HCN4-Kanals und des RyR2, sodass wir im Folgenden untersuchten, ob das Expressionsmuster durch die Anzahl der Transfektionen beeinflusst wird. Die Isolation und Analyse der Gesamt-RNA erfolgte daher nach dreimaliger mRNA-Transfektion der KM. Ergänzend wurde noch die Expression von Connexin 45 (Cx45), eine dominante Connexin-Isoform im SAN, untersucht sowie mögliche Effekte der mRNA-Konzentration durch Transfektion der doppelten Standardkonzentration von TBX3-mRNA (TBX3 1,0).

Abbildung 13B zeigt einen ähnlichen Verlauf wie Abbildung 13A. SHOX2 und TBX3 sind sowohl nach Transfektion von SHOX2-mRNA als auch nach Transfektion von TBX3-mRNA statistisch signifikant verstärkt exprimiert. Die Transfektion von TBX18-mRNA führt zu einer statistisch signifikant verringerten Expression von TBX18 und einer signifikant vermehrten Expression von TBX3. Das Expressionsmuster der kardialen Marker Cx45, RyR2 und HCN4 weist auch nach dreimaliger mRNA-Transfektion sowie bei doppelter Standardkonzentration der TBX3-mRNA keine statistisch signifikanten Veränderungen auf. Lediglich bei Transfektion von TBX3 kann eine leicht positive Regulation der HCN4- und Cx45-Expression nachgewiesen werden.

Insgesamt ist festzustellen, dass die Analysen in Abbildung 13A und in Abbildung 13B einen sehr ähnlichen Verlauf aufweisen. Bei dreimaliger Transfektion zeigt sich im Vergleich zur zweimaligen Transfektion eine deutlich stärkere Expression von SHOX2 und TBX3, allerdings kann durch eine höhere Anzahl an Transfektionen keine vermehrte Expression kardialer und schrittmacherspezifischer Marker erzielt werden.

Die positive Beeinflussung der Expression von TBX3 durch SHOX2-mRNA, welche bereits auf Proteinebene (Abb. 7) nachgewiesen wurde, konnte ebenfalls im Rahmen der qRT-PCR festgestellt werden. Die in der qRT-PCR nachweisbare Beeinflussung der SHOX2-Expression durch TBX3-Transfektion konnte hingegen in den immunhistochemischen Färbungen nicht gezeigt werden. Dies könnte in dem geringeren Expressionsniveau von SHOX2 begründet sein.

Da bei Transfektion einzelner mRNAs keine verstärkte Expression kardialer oder schrittmacherspezifischer Marker nachgewiesen werden konnte, wurden im Folgenden Kombinationen dieser mRNAs untersucht. Die Gesamt-RNA wurde nach zweifacher Transfektionen gewonnen und analysiert.

In Abbildung 13C ist zu erkennen, dass die Expression von SHOX2 und TBX3 sowohl bei Transfektion der jeweiligen mRNA in Kombination mit TBX18 als auch bei Transfektion von TBX18 und TBX3 bzw. TBX18 und SHOX2 positiv reguliert wird. Bei alleiniger Transfektion von SHOX2- und TBX18-mRNA zeigt sich ein ~10-facher Anstieg der TBX3-Expression. Die Expression von TBX18 wird auch nicht bei Transfektion der entsprechend codierenden mRNA in Kombination mit SHOX2- bzw. TBX3-mRNA positiv beeinflusst. Die fehlende positive Beeinflussung der TBX18-Expression durch die entsprechende mRNA konnte in den vorherigen Versuchen (Abb. 13A, 13B) ebenfalls gezeigt werden.

In der Analyse wurde nach mRNA-Transfektion keine verstärkte Expression der kardialen Marker HCN4 und RyR2 nachgewiesen. Die Kombination von SHOX2 mit TBX18 sowie die

Kombination mit TBX3 bedingt eine reduzierte Expression von HCN4 und RyR2, wohingegen die Kombination von TBX3- und TBX18-mRNA die geringsten Effekte auf die Expression von HCN4 und RyR2 zeigt.

Neben den CTR iPSCs wurde eine weitere iPSC Zelllinie, ChiPS, verwendet, um die mRNA-basierte Zellprogrammierung zu untersuchen. In Abbildung 14 ist die relative Genexpression nach mRNA-Transfektion der ChiPS-derivierten KM dargestellt.

Die KM, welche ausschließlich mit Viromer und Buffer inkubiert wurden, zeigen eine verringerte Expression von SHOX2, TBX3, HCN4 und RyR2. Die alleinige Transfektion von SHOX2-mRNA bedingt eine vermehrte Expression von SHOX2, aber auch von TBX3. Die Transfektion von TBX3 führt hingegen alleinig zu einer vermehrten Expression von TBX3. Die SHOX2-Expression wird durch TBX3 nicht beeinflusst. TBX18 zeigt sich auch nach Transfektion der entsprechenden mRNA nicht vermehrt exprimiert. Das Expressionsmuster von HCN4 und RyR2 wird durch die mRNA-Transfektion nicht positiv reguliert, sondern weist eine deutlich verminderte Expression im Vergleich zu den untransfizierten KM auf.

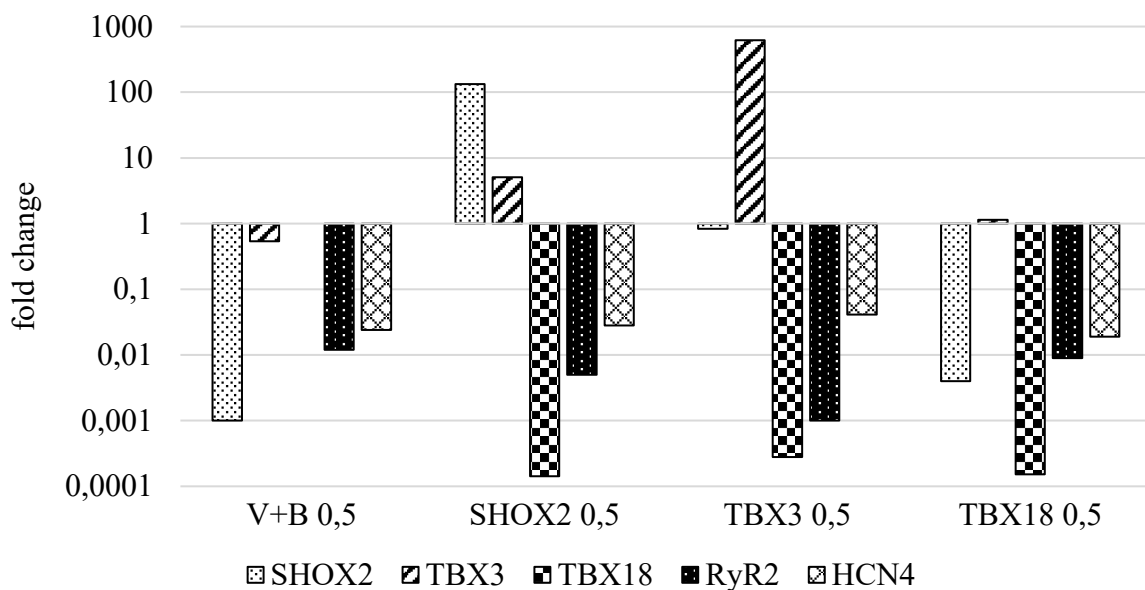


Abbildung 14: Einfluss der mRNA-Transfektion auf die schrittmacherspezifische Genexpression in ChiPS

Gezeigt ist die relative Expression verschiedener, für die kardiale Schrittmacherfunktion relevanter Gene der mit mRNA transfizierten Kardiomyozyten bzw. der ausschließlich mit dem Transfektionsreagenz (V+B) inkubierten Kardiomyozyten im Vergleich zu den untransfizierten Kardiomyozyten (relative Expression = 1). Die Kardiomyozyten wurden vorab aus ChiPS generiert. Die mRNA-Transfektion erfolgte dreimal im Abstand von je 48 h mit dem 0,5-fachen der Standardkonzentration. n= 1; nicht signifikant

Die Expressionsanalysen der ChiPS iPSC (Abb. 14) sowie der mit mRNA-Kombinationen transfizierten CTR iPSC (Abb. 13C) konnten aufgrund der COVID-19-Pandemie und der damit verbundenen Schließung des Labors nur einmalig durchgeführt werden. Hieraus ergibt sich, dass keine statistisch signifikanten Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Tendenzen aus diesen Analysen bestätigten aber in einigen Punkten die Ergebnisse aus den vorherigen Genexpressionsanalyse der CTR iPSC (Abb. 13A, 13B). Auch in diesen Analysen der CTR iPSC zeigt sich eine positive Regulation von TBX3 durch Transfektion von SHOX2-mRNA und eine fehlende positive Regulation von TBX18, HCN4 und RyR2. Für spezifischere Aussagen müsste die Expressionsanalyse erweitert werden.

Aufgrund der vorherigen Expressionsanalysen der hiPSCs ergab sich die Vermutung, dass besonders die Transkriptionsfaktoren SHOX2 und TBX3 Einfluss auf die Expression kardialer und schrittmacherspezifischer Marker haben könnten. Der Transkriptionsfaktor TBX18 hingegen führte zu keiner verstärkten Expression der kardialen und schrittmacherspezifischen Markergene. Um die Untersuchungen hinsichtlich eines weiteren Zelltyps zu erweitern, wurden neonatale KM der Maus mit der mRNA-Kombination aus SHOX2 und TBX3 transfiziert. Die Transfektion erfolgte insgesamt dreimal. Um den Einfluss der mRNA-Konzentration genauer zu analysieren, wurde der bisherige Versuchsaufbau um weitere mRNA-Konzentrationen ergänzt.

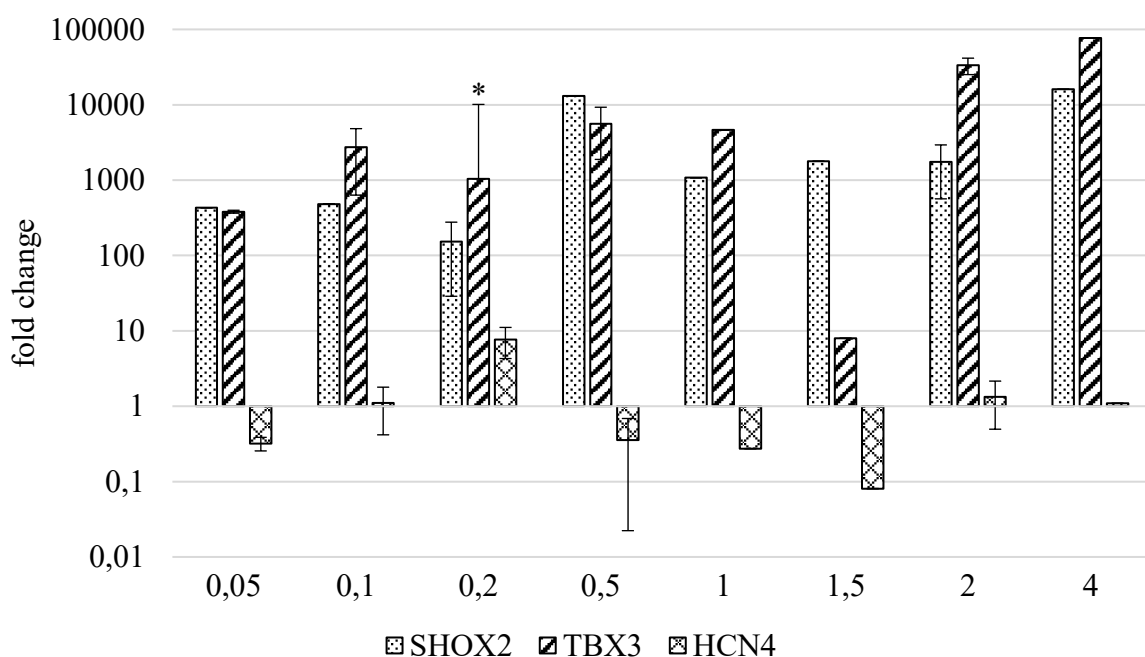


Abbildung 15: Einfluss der kombinierten Transfektion von SHOX2- & TBX3-mRNA auf die schrittmacherspezifische Genexpression in murinen neonatalen Kardiomyozyten

Aufgezeichnet ist die relative Expression der Transkripte von TBX3, SHOX2 und HCN4 in transfizierten murinen neonatalen Kardiomyozyten im Vergleich zu den untransfizierten Kardiomyozyten (relative Expression =1). Die Kardiomyozyten wurden mit einer Kombination aus SHOX2- und TBX3-mRNA in unterschiedlichen Konzentrationen (0,05- bis 4-fache der Standardkonzentration) transfiziert. Die Transfektion erfolgte insgesamt dreimal im Abstand von je 48 h. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der TBX3-Expression bei Transfektion der 0,2-fachen Standardkonzentration. $n = 1-3$; * statistisch signifikant, da $p \leq 0,05$

Abbildung 15 zeigt, dass die Transfektion der mRNA- Kombination aus TBX3 und SHOX2 zu einer vermehrten Expression der beiden Transkripte SHOX2 und TBX3 führt. Tendenziell nimmt die Expression beider Transkripte in den KM mit Erhöhung der transfizierten mRNA-Konzentration zu. Nur die Transfektion des 0,2-fachen der Standardkonzentration von SHOX2- und TBX3-mRNA führt zu einem statistisch signifikanten Anstieg der TBX3-Expression. Ein signifikanter Einfluss auf die Expression des schrittmacherspezifischen HCN4-Kanals lässt sich auch bei murinen neonatalen KM bei dieser mRNA-Kombination nicht nachweisen. Somit spiegeln die Ergebnisse dieser Expressionsanalyse der murinen neonatalen KM die Analysen der hiPSC wider.

3.4.2 Mikroarray-Analyse

In der qRT-PCR konnte keine vermehrte Expression kardialer oder schrittmacherspezifischer Gene nachgewiesen werden. Für ein tiefergreifendes Verständnis des Effekts der mRNA-Transfektion auf die Genexpression wurde eine Mikroarray-Analyse der mit mRNA transfizierten KM durchgeführt. Nach Normalisierung der auf den Mikroarrays detektierten Signalintensitäten weisen diese eine ähnliche Streuung auf. Dies deutet auf eine gute Datenqualität hin, welche für die nachfolgenden Analysen geeignet ist (Abb. 16A).

Abbildung 16B zeigt die Principal Component Analyse (PCA). Der PCA-Plot visualisiert die Unterschiede in der globalen Genexpression zwischen den behandelten Proben. Die breite Streuung im PCA-Plot spricht für eine hohe Variabilität der einzelnen Differenzierungen. Selbst die untransfizierten, nicht behandelten Zellen (blau) weisen eine große Streuung auf. Die Proben, welche mit TBX3-mRNA (violett) transfiziert wurden, sowie diejenigen, die mit TBX18-mRNA (grün) transfiziert wurden, zeigen im Vergleich eine geringere Streuung, woraus sich eine höhere Ähnlichkeit ihrer Transkriptionsprofile schlussfolgern lässt. Die behandlungsspezifischen Gruppen bleiben voneinander unterscheidbar.

Für die Mikroarrayanalyse wurden Grenzwerte von p -value $< 0,05$ und fold change $> 2 / < -2$ festgesetzt und als signifikante Annäherung gewertet.

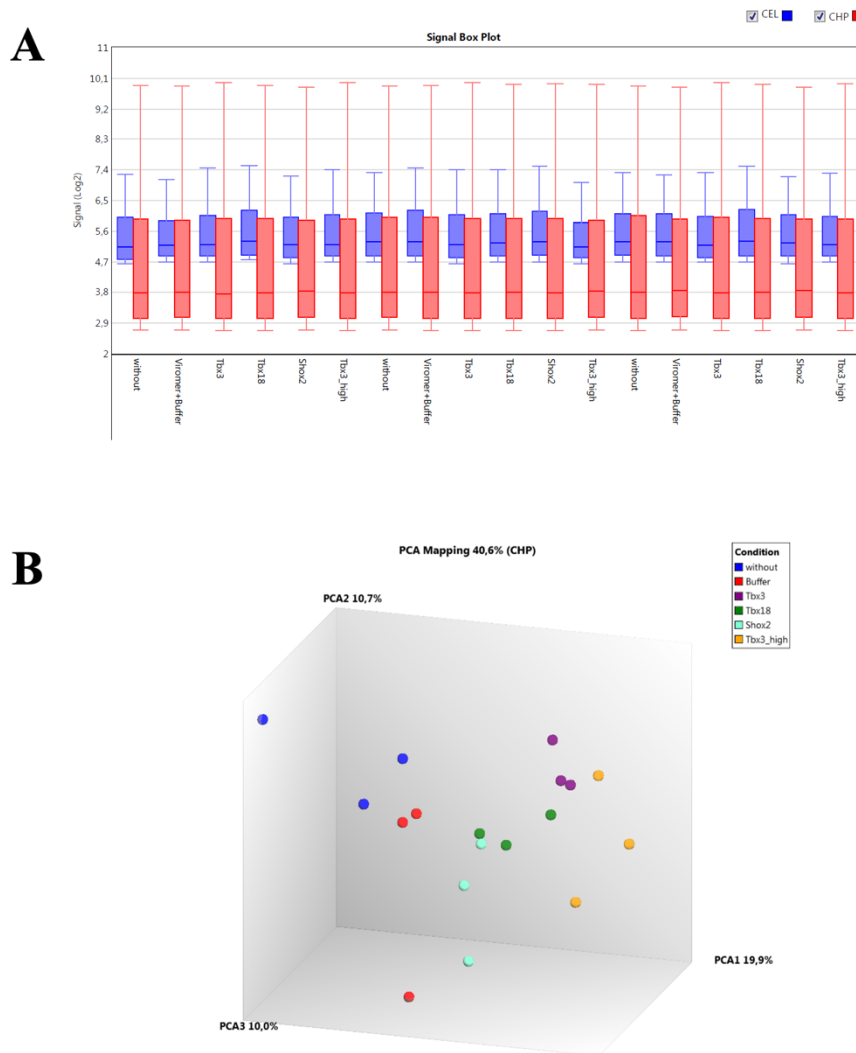


Abbildung 16: Transkriptom-basierter Vergleich von mit mRNA transfizierten & untransfizierten Kardiomyozyten

Transkriptom-basierter Vergleich von mit mRNA transfizierten und untransfizierten CTR hiPSC-derivierten Kardiomyozyten. (A) Qualitätskontrolle der Mikroarray-Daten. Boxplot der Signalintensitäten der durchgeführten Mikroarrayanalyse auf .cel- (blau) und .chp- Datennormalisierung (rot) bestätigen gute Datenqualität. (B) Die Principal component- Analyse (PCA) zeigt die Clusterbildung der behandelten Gruppen und zeigt zum Teil deutliche Auswirkungen der jeweiligen mRNA-Transfektionen auf das Transkriptomprofil im Vergleich zu den untransfizierten Zellen (blau). Die behandelten Gruppen bleiben unterscheidbar.

Die Anzahl der durch mRNA-Transfektion hoch- und herunterregulierten Transkripte ist in Abbildung 17 sichtbar. Abbildung 17 weist auf eine deutliche Veränderung der Genexpression durch die mRNA-Transfektion hin. Die höchste Anzahl an differenziell exprimierten Gene ist nach Transfektion von TBX3-mRNA in doppelter Standardkonzentration (TBX3 1,0) im Vergleich zu den untransfizierten KM festzustellen (4566 Transkripte). Insgesamt sind deutlich

mehr Gene herunterreguliert (3022 Transkripte) als hochreguliert (1544). In den ausschließlich mit Viomer und Buffer inkubierten KM konnte im Gegensatz hierzu eine geringere Anzahl an differenziell exprimierten Genen nachgewiesen werden (2485 Transkripte), wobei sich auch hier mehr Gene herunterreguliert (1418 Transkripte) als hochreguliert (1067 Transkripte) zeigen. Vergleicht man die Expressionsmuster der mit Viomer und Buffer inkubierten KM mit den untransfizierten KM, sind interessanterweise nur geringfügigere Unterschiede hinsichtlich der Genexpression (624 Transkripte) erkennbar. Hier zeigt sich ebenfalls eine stärkere negative Regulation der Genexpression. Ungefähr $\frac{2}{3}$ der Transkripte sind vermindert exprimiert (437 Transkripte) und nur etwa $\frac{1}{3}$ sind vermehrt exprimiert (187 Transkripte). Eine Beeinflussung der Genexpression wird scheinbar durch alleinige Zugabe von Viomer und Buffer erreicht, wobei die Zugabe von mRNA eine deutlich stärkere Änderung in der Genexpression bewirkt. Die Transfektion von TBX18-mRNA zeigt sowohl im Vergleich zu den untransfizierten KM (1805 Transkripte), als auch im Vergleich zu den mit Viomer und Buffer inkubierten KM (512 Transkripte), die geringsten Veränderungen der Genexpression. In beiden Vergleichen zeigt sich ebenfalls ein Überwiegen der negativen Regulation der Genexpression mit einem größeren Anteil an vermindert exprimierten Transkripten.

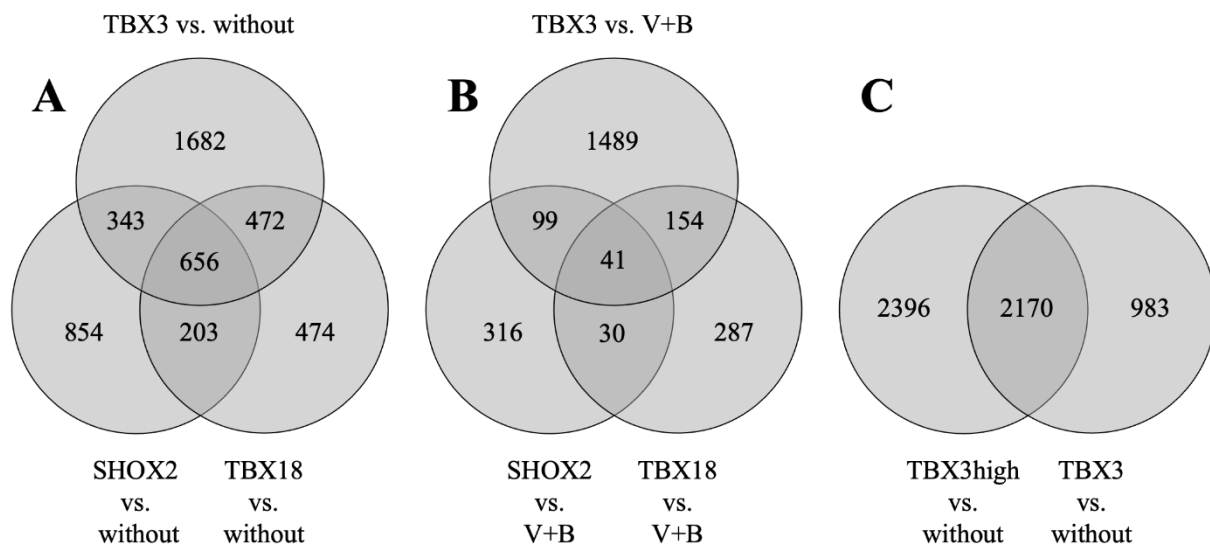


Abbildung 17: Anzahl der differenziell exprimierte Transkripte im Vergleich zwischen den mRNAs

Die Venn- Diagramme zeigen den Einfluss der mRNA-Transfektion auf die CTR hiPSC- derivierten Kardiomyozyten im Vergleich zu den untransfizierten Kardiomyozyten (**A**) und der nur mit Viomer und Buffer inkubierten Zellen (V+B) (**B**). Der größte Anteil an differenziell exprimierten Transkripten wird durch TBX3 reguliert. Die Anzahl der differenziell exprimierten Gene vergleichend nach TBX3-Transfektion in einfacher (TBX3) und doppelter Konzentration (TBX3 high) zeigt, dass bei höherer mRNA-Konzentration ein größerer Anteil an Transkripten differenziell reguliert wird (**C**).

Die entsprechenden Venn- Diagramme (Abb. 17A) vergleichen die exprimierten Gene der drei Transfektionsgruppen (SHOX2, TBX3, TBX18) in Relation zu den untransfizierten KM. Es zeigt sich, dass die größte Anzahl an Transkripten (1682 Transkripte, 35,9 %) allein durch die Zugabe von TBX3-mRNA reguliert wird. SHOX2-mRNA übt Einfluss auf eine geringere Anzahl an Transkripten aus und bildet damit den zweitgrößten Anteil (854 Transkripte, 18,2 %). Der Anteil an Transkripten, welcher durch alle drei mRNAs reguliert wird, bildet den drittgrößten Anteil (656 Transkripte, 14 %).

Abbildung 17B zeigt vergleichend die unterschiedlich exprimierten Gene der drei Transfektionsgruppen in Relation zu den KM, welche nur mit Viromer und Buffer inkubiert wurden. Hier wird die größte Menge an Transkripten ebenfalls durch TBX3 (1489 Transkripte, 61,6 %) reguliert. Ein deutlich geringerer Anteil an Transkripten wird durch SHOX2-mRNA reguliert (316 Transkripte, 13,1%). Der Anteil an Transkripten, welche durch alle drei mRNAs beeinflusst wird, liegt bei nur 1,7 % (41 Transkripte). Insgesamt zeigen sich die überlappenden Anteile deutlich geringer ausgeprägt als im Vergleich zu den untransfizierten KM (Abb. 17A). Aus Abbildung 17C ist die Anzahl der exprimierten Gene nach Transfektion von TBX3-mRNA in einfacher Konzentration und nach Transfektion der doppelten Standardkonzentration (TBX3 high), jeweils in Bezug zu den untransfizierten KM, zu entnehmen. Erkennbar ist, dass der größte Anteil der Transkripte (2396 Transkripte, 43,2 %) alleinig durch Transfektion der höheren mRNA-Konzentration reguliert wird. Allerdings bildet die Schnittmenge zwischen den beiden mRNA-Konzentrationen einen fast ähnlichen großen Anteil (2170 Transkripte, 39,1 %). Ein Anteil von 17,7 % der Transkripte (983 Transkripte) wird nur durch die geringere mRNA-Konzentration beeinflusst. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass auch die Menge der transfizierten mRNA einen Einfluss auf die Regulation der Genexpression hat. Einige Gene werden wohl erst bei höheren mRNA-Mengen beeinflusst, andere wiederum nur bei geringeren mRNA-Mengen.

Ein detaillierter Vergleich der hochregulierten (Abb. 18A) und herunterregulierten (Abb. 18B) Transkripte zwischen den unterschiedlichen Gruppen und den untransfizierten KM zeigt, dass ein großer Anteil an Transkripten alleinig durch TBX3 reguliert wird (775 hochregulierte Transkripte, 907 herunterregulierte Transkripte). Es zeigt sich, dass durch die Transfektion der einzelnen mRNAs mehr Transkripte herunterreguliert, als hochreguliert werden.

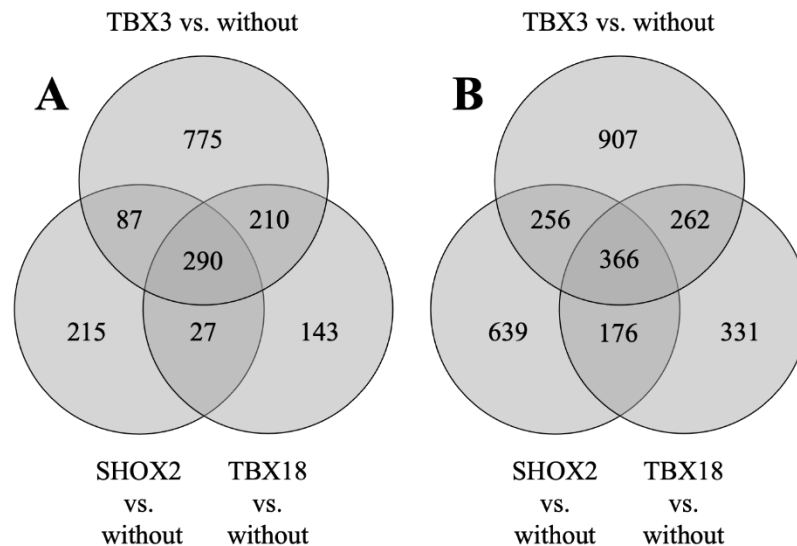


Abbildung 18: Vergleich zwischen vermehrt & vermindert exprimierten Transkripten

Detaillierter Vergleich gemeinsamer und unterschiedlicher hochregulierter (**A**) und herunterregulierter (**B**) Transkripte zwischen den drei transfizierten mRNAs in CTR hiPSC-derivierten Kardiomyozyten. Als Vergleich dienen die untransfizierten Kardiomyozyten (without). Durch die mRNA-Transfektion werden mehr Transkripte herunterreguliert als hochreguliert werden.

Zur Untersuchung des Einflusses der differenziell exprimierten Gene auf die Signalwege der Herzentwicklung wurden die Daten der Mikroarrayanalyse in die WikiPathway- Datenbank integriert und die signifikant angereicherten Signalwege für die Herzentwicklung und die kardiale Differenzierung von Vorläuferzellen identifiziert. Die Visualisierung der Signalwege zeigt, dass der Großteil der Proteine in die Herzentwicklung involviert ist. Die hoch- bzw. herunterregulierten Transkripte sind entsprechend rot bzw. grün/blau markiert.

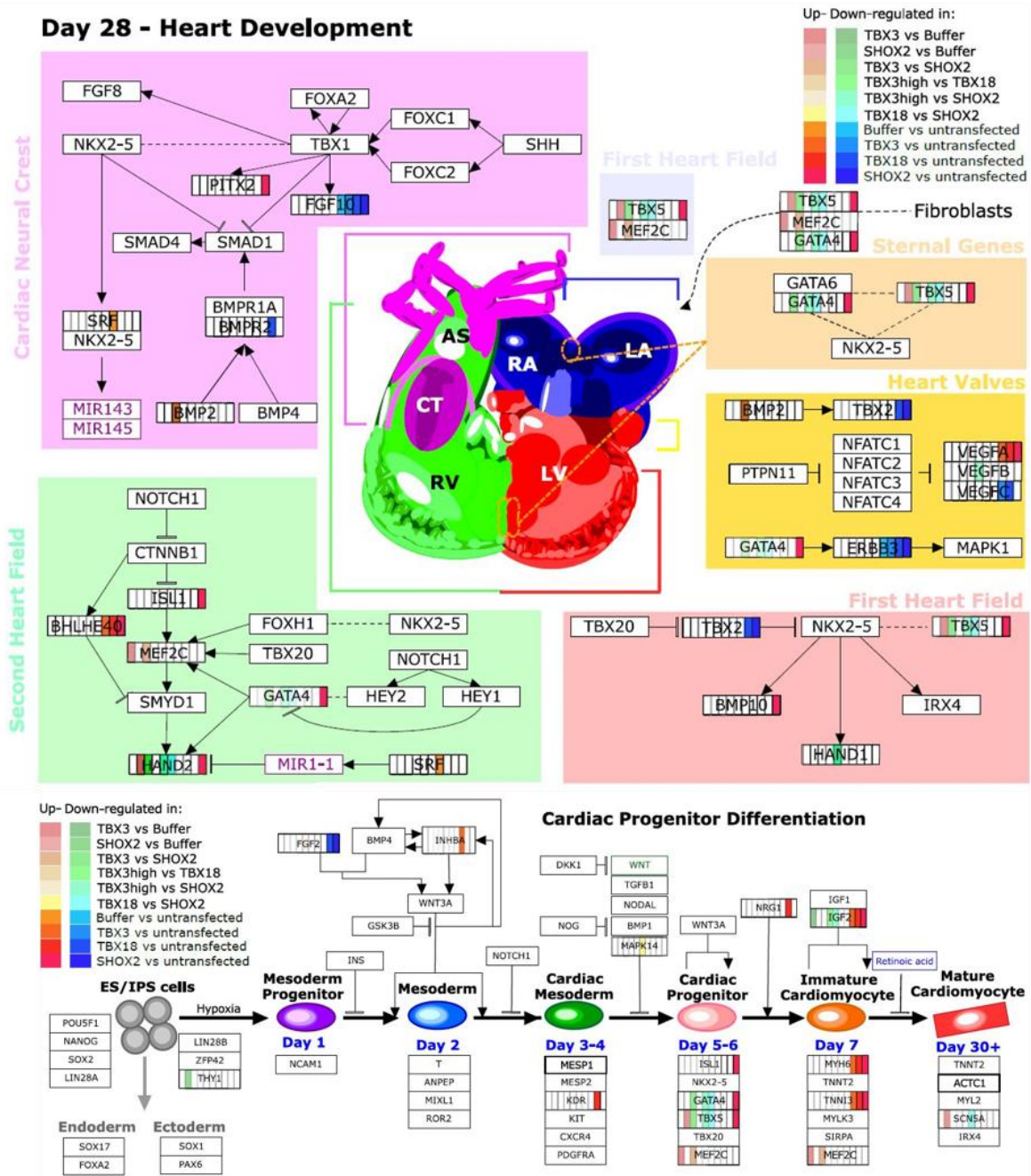


Abbildung 19: Einfluss der mRNA-Transfektion auf Signalwege der kardialen Differenzierung

Hochregulierte und herunterregulierte Transkripte der jeweiligen Reprogrammierungsbedingungen sind in roter bzw. grüner/blauer Farbe gekennzeichnet. Der stärkste Einfluss auf die Expression der Transkripte, die an der Herzentwicklung (Heart Development, Cardiac Progenitor Differentiation) beteiligt sind, wird durch SHOX2- und TBX18-mRNA bedingt. Signifikant angenähert sind die farblich unterlegten Abschnitte der einzelnen Gene. Wobei gilt: signifikante Annäherung bei $p \leq 0,05$ und fold change $> 2 / < -2$.

Es ist zu erkennen, dass die mRNA-Transfektion das Genexpressionsprofil mehrerer wichtiger Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle, die an der kardialen Differenzierung beteiligt sind,

beeinflusst. Hierzu gehören unter anderem GATA4, TBX5, HAND2, VEGF. Die meisten Veränderungen an den Genen der Signalwege wurden durch Transfektion von SHOX2- und TBX18-mRNA induziert. Allein die verstärkte Expression der einzelnen Gene innerhalb der Signalwege lässt keine definitiven Rückschlüsse auf eine gezielte Zelldifferenzierung in Richtung kardialer Schrittmacherzellen zu.

3.5 Proteinexpression des schrittmacherspezifischen HCN4-Kanals

Immunhistochemisch konnte bereits gezeigt werden, dass die mRNA-Transfektion zu einer Expression der jeweiligen Proteine führt (Abb. 6) und dass SHOX2-mRNA einen Einfluss auf die Proteinexpression von TBX3 hat (Abb.7). Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die mRNA-Transfektion auch Einfluss auf die Expression weiterer Proteine hat. Hierfür wurden die KM nach mRNA-Transfektion mittels immunhistochemischer Färbung auf die HCN4-Expression hin untersucht. HCN4 ist ein Kationenkanal, welcher als spezifischer Marker für kardiale Schrittmacherzellen gilt. Bei Expression des HCN4-Kanals ist ein fluoreszierendes Signal randständig im Bereich der Zellmembran zu erwarten. Weiterhin wurde das Aktinnetzwerk durch einen α -Aktinin- Antikörper angefärbt. Aktin stellt ein Strukturprotein innerhalb der Zelle dar, welches sich über die gesamte Zelle erstreckt. Besonders deutlich ist das Fluoreszenzsignal am Rand der Zellen erkennbar, so dass die Zellen trotz ihres Verbandes in einem Cluster sehr deutlich voneinander abgrenzbar sind. Die Abbildung 20 zeigt die Färbungen der KM mit dem HCN4-Antikörper und dem α -Aktinin-Antikörper nach Transfektion der verschiedenen mRNAs. Als Kontrolle dient die immunhistochemische Färbung der untransfizierten KM (20A).

Die Abbildungen 20B, 20C, 20D zeigen die immunhistochemischen Färbungen nach Transfektion der jeweiligen mRNAs. Das Aktin-Netzwerk der Zellen ist in allen Abbildungen erkennbar, wodurch die einzelnen Zellen innerhalb des Clusters differenzierbar sind. Unterschiede im Aufbau der Aktin-Netzwerke sind nicht sichtbar. Ein minimales zellmembranständiges, rotes Fluoreszenzsignal kann in allen Abbildungen detektiert werden, was auf eine geringe Expression des HCN4-Proteins hinweist. Nach mRNA-Transfektion ist jedoch kein verstärktes zellmembranständiges, rotes Fluoreszenzsignal nachweisbar, sodass die mRNA-Transfektion demnach keinen Einfluss auf die Expression des HCN4-Proteins ausübt. Auch in der qRT-PCR zeigt sich keine positive Beeinflussung des Expressionsniveaus des HCN4-Kanals durch Transfektion der verschiedenen mRNAs bzw. deren Kombinationen, sodass die Ergebnisse durch die durchgeführten Färbungen bestätigt werden können.

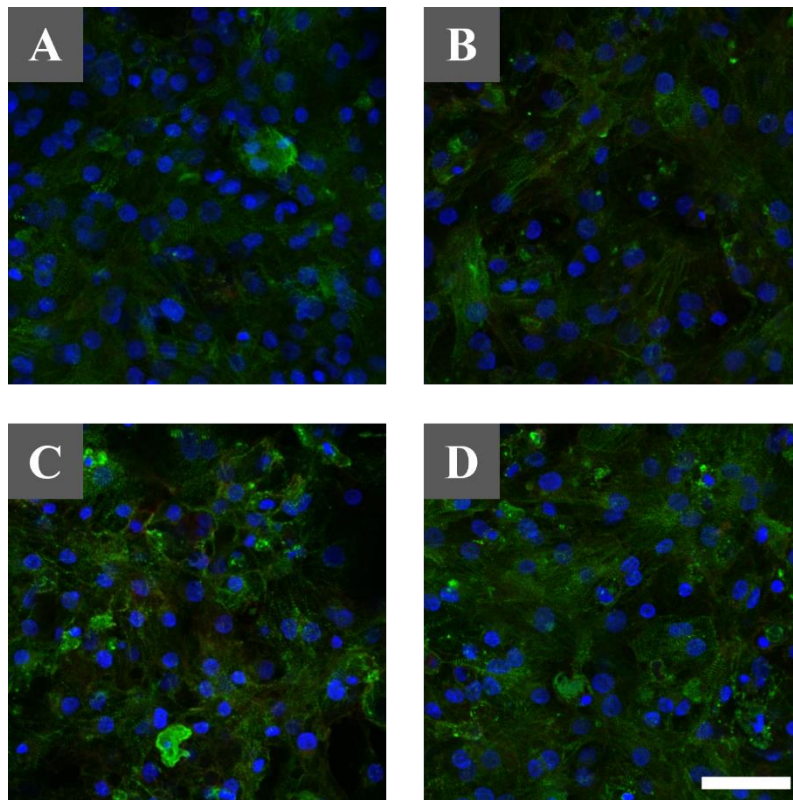


Abbildung 20: Einfluss der mRNA-Transfektion auf die HCN4 Proteinexpression

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der CTR hiPSC-derivierten Kardiomyozyten, die mit SHOX2-, TBX3- und TBX18-mRNA in jeweils 0,5-facher Standardkonzentration transfiziert worden sind. Die Zellkerne wurden mittels DAPI angefärbt (blau). Mittels α -Aktinin-Antikörper konnte das Aktinnetzwerk innerhalb der Zellen dargestellt werden (grün). Ein im Vergleich zu den untransfizierten Kardiomyozyten (A) verstärktes zellmembranständiges, rotes Signal würde für eine vermehrte Expression des HCN4-Proteins sprechen. SHOX2 0,5 (B), TBX3 0,5 (C), TBX18 0,5 (D); Maßstabsleiste: 50 μ m gilt für Abb.20 A- D

4 Diskussion

Elektronische Herzschrittmacher werden seit mehreren Jahrzehnten erfolgreich zur Behandlung verschiedener Herzrhythmusstörungen eingesetzt. Auch nach diesem Zeitraum der Anwendung und Weiterentwicklung der elektronischen Schrittmacher zeigen sich auch weiterhin noch Grenzen auf, welche einer Alternative bedürfen. Hieraus ergeben sich die Bestrebungen zur Generierung eines biologischen Schrittmachers, welcher als temporärer oder permanenter Ersatz des elektronischen Schrittmachers eingesetzt werden könnte. Dafür bieten sich humane Schrittmacherzellen des Sinusknoten an. Die Generierung humaner Schrittmacherzellen *in vitro* würde zudem Möglichkeiten der Testung pharmakologischer Substanzen z.B. im Rahmen der Arzneimittelentwicklung ermöglichen. Zu diesem Zweck ist die gezielte Programmierung von Stammzellen ein innovativer Forschungsansatz, um eine Zelldifferenzierung in Richtung des interessierenden Zelltyps zu ermöglichen. Im Rahmen der Generierung von KM aus induzierten pluripotenten Stammzellen liegt die Herausforderung vor allem in der gezielten Differenzierung in Richtung des Schrittmacher-Phänotyps und dem Erhalt einer möglichst reinen Zellpopulation. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit eine gezielte Generierung von Schrittmacherzellen aus bereits differenzierten KM, ohne erneutes Eintreten in den pluripotenten Zustand, erfolgen kann. Hierfür wurde durch exogene Überexpression spezifischer Transkriptionsfaktoren eine direkte Reprogrammierung der KM angestrebt. Als Transkriptionsfaktoren wurden TBX3, TBX18 und SHOX2 verwendet, da hierzu bereits wissenschaftliche Untersuchungen hinsichtlich ihrer wichtigen Rolle während der Schrittmacherentwicklung vorliegen. In der hier durchgeführten Arbeit konnte sowohl anhand immunhistochemischer Färbungen als auch anhand qRT-PCR- Analysen und Mikroarray-Analysen gezeigt werden, dass die exogen zugeführte mRNA in die KM aufgenommen wird und zu deutlichen Veränderungen des Expressionsmusters führt. Durch Anpassungen innerhalb des Versuchsaufbaus konnten einzelne Versuchsparameter, wie mRNA-Konzentration, Transfektionsintervall und Anzahl der mRNA-Transfektionen optimiert werden. Die im zeitlichen Verlauf beobachteten morphologischen Veränderungen der KM weisen Ähnlichkeiten zum Schrittmacher-Phänotyp auf. Ein Einfluss der mRNA-Transfektion auf die Expression schrittmacherspezifischer Markergene, wie HCN4 und RyR2, kann hingegen nicht beobachtet werden. Im Rahmen der Mikroarrayanalyse kann jedoch gezeigt werden, dass vor allem TBX18 und SHOX2 einen Einfluss auf die Signalwege der kardialen Entwicklung haben. Somit kann das Potential der exogenen Überexpression spezifischer Transkriptionsfaktoren mittels mRNA-Transfektion in dieser Arbeit dargelegt werden. Es

bedarf allerdings weiterer Optimierung, um eine vollständige Reprogrammierung von adulten KM in verschiedene Zelllinien erzielen zu können.

4.1 Einfluss der mRNA-Transfektion auf die Gen- und Protein-expression

Um die Funktionalität der mRNA-Transfektion zu beurteilen, wurde das Expressionsniveau einzelner Gene der verschiedenen Zelllinien untersucht. Von besonderem Interesse ist hierbei die Regulation der schrittmacherspezifischen Marker, wie dem HCN4-Kanal und dem RyR2 sowie Cx45.

In der Literatur wird bereits eine, wenn auch nicht vollständige, Reprogrammierung von kardialen Progenitorzellen, hiPSC, aber auch postnatalen ventrikulären KM in Zellen mit schrittmacherähnlichen Eigenschaften, unter anderem durch forcierte Expression der Transkriptionsfaktoren SHOX2, TBX3, TBX18 beschrieben. In diesen Studien erfolgte die Integration der Transkriptionsfaktoren jedoch mittels viralen Vektoren (Raghunathan et al. 2020; Gorabi et al. 2019; Bakker et al. 2012). Auch in Versuchen *in vivo* konnte beispielsweise festgestellt werden, dass eine forcierte Überexpression von TBX18 mittels adenoviralem Vektor eine Umwandlung von KM des Arbeitsmyokards in schrittmacherähnliche KM induzieren kann (Hu et al. 2014). Unseres Wissens nach wird über ein integrationsfreies Verfahren mittels mRNA-Transfektion in der Literatur bisher noch nicht berichtet.

In der von uns durchgeführten qRT-PCR wird ein signifikanter Anstieg der TBX3- und SHOX2-mRNA in den Zellen nachgewiesen, die mit den entsprechenden mRNAs transfiziert worden sind. Auch die immunhistochemischen Färbungen zeigen eine Expression des entsprechenden Proteins. Dies bestätigt die Gültigkeit des Transfektionsansatzes und die Aufnahme in die Zellen sowie die Translation der mRNAs innerhalb der Zellen. Bei der Transfektion von TBX18-mRNA zeigt sich hingegen eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der qRT-PCR und den immunhistochemischen Färbungen. Während das entsprechende Fluoreszenzsignal des TBX18-Proteins nach Transfektion nachweisbar ist, kann keine vermehrte Expression des Transkripts nachgewiesen werden. Dies könnte z.B. durch einen schnellen Abbau der mRNA innerhalb der Zellen bedingt sein.

4.1.1 TBX18-mRNA induziert verstärkte SHOX2-Expression

In unseren Analysen kann zudem eine Wechselwirkung zwischen den Transkriptionsfaktoren beobachtet werden. Die TBX18-Überexpression induziert einen ~10-fachen Anstieg der

SHOX2-Expression (Abb. 13A). Dies würde die Theorie bestätigen, dass TBX18 ein positiver Regulator von SHOX2 darstellt (Kapoor et al. 2013). Zeitgleich induziert TBX18 ebenfalls einen deutlichen Anstieg der TBX3-Expression. Dies stützt die These, dass TBX18 in der funktionellen Reihenfolge der SAN-Bildung vor TBX3 liegt. TBX18 kontrolliert die Bildung des SAN-Kopfes aus mesenchymalen Vorläuferzellen, dessen Zellen im Anschluss das genetische Programm der Schrittmacherzellen durch Initiierung von TBX3 durchlaufen (Wiese et al. 2009). Es scheint, dass TBX18 die Spezifikation in Richtung Schrittmacherzellen zu Beginn durch Aktivierung von SHOX2 initiiert und zusätzlich nach Formation der mesenchymalen Vorläuferzellen in der SAN-Region, die TBX3-Expression fördert.

4.1.2 SHOX2-mRNA induziert TBX3-Expression

Für die embryonale Entwicklung der SAN-Region ist das Fehlen der Expression des Transkriptionsfaktors NKX2.5-Expression entscheidend, da dieser die Ausbildung des Arbeitsmyokards fördert (Mommersteeg et al. 2007). Die SHOX2-Expression führt über die Hemmung der Expression des Transkriptionsfaktors NKX2.5, sowie durch direkte positive Regulation, zu einer verstärkten Expression von TBX3 (Espinoza-Lewis et al. 2009; Zhang et al. 2014). Eine fehlende Expression von SHOX2 *in vivo* bedingt eine reduzierte Expression von SHOX2 und TBX3 sowie eine vermehrte Expression von NKX2.5 (Espinoza-Lewis et al. 2009). Diese Hypothesen können ebenfalls im Rahmen unserer Versuche bestätigt werden. In unseren Versuchen zeigt sich ein deutlicher Anstieg der TBX3-Transkripte nach Transfektion von SHOX2-mRNA. Um die in der Literatur beschriebenen Zusammenhänge zwischen SHOX2 und NKX2.5 zu untersuchen, könnte in zukünftigen Versuchen zusätzlich die NKX2.5-Expression nach jeweiliger mRNA-Transfektion untersucht werden.

Eine verstärkte Expression von schrittmacherspezifischen Markern kann in unseren Versuchen nicht beobachtet werden. Während der embryonalen Entwicklung kann eine Überexpression von TBX3 in atrialen KM zu einer vermehrten Expression von schrittmacherspezifischen Genen führen (Hoogaars et al. 2007). In adulten KM ist zwar eine verminderte Expression von Genen des Arbeitsmyokards nachweisbar, aber keine vermehrte Expression von schrittmacherspezifischen Markern (Bakker et al. 2012). Es wird daher vermutet, dass die Fähigkeit von TBX3, Zellen des Arbeitsmyokards in Schrittmacherzellen umzuwandeln, während der Herzreifung verloren geht (Brand 2016).

4.1.3 Forcierte Überexpression von SHOX2, TBX3 und TBX18 bedingt kein verändertes Expressionsmuster schrittmacherspezifischer Marker

In vielen Arbeiten wird die Expression des HCN4-Kanals als ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Reprogrammierung in Richtung Schrittmacherzellen herangezogen. In unserer Arbeit kann nach mRNA-Transfektion keine erhöhte Expression des HCN4-Kanals nachgewiesen werden. Im menschlichen Organismus werden jedoch die Isoformen HCN1, HCN2 und HCN4 im gesamten SAN, aber auch in den Vorhöfen, einheitlich exprimiert. Lediglich HCN1 zeigt eine fast ausschließliche Expression im SAN (Li et al. 2015). Obwohl der HCN4 die dominante Isoform im humanen Sinusknoten darstellt, sollte die Verwendung als alleiniger Marker für Sinusknotenzellen kritisch hinterfragt werden und ggf. den HCN1-Kanal als weiteren Schrittmachermarker mit in die Analyse einbeziehen.

Neben den HCN-Kanälen, stellt der RyR2 als weiteres Kanalprotein einen wichtigen Bestandteil des intrazellulären Ca^{2+} -Zyklus dar. Bakker et al. zeigen in ihrer Arbeit, dass TBX3 eine verminderte Expression des RyR2 bedingt. In unseren Versuchen sind Tendenzen einer verringerten RyR2-Expression nach mRNA-Transfektion erkennbar. Dies könnte ein Hinweis einer möglichen Reprogrammierung in Richtung Schrittmacherzellen sein, denn die RyR2-Expression ist im Sinusknoten vermindert (Marionneau et al. 2005).

Neben dem intrazellulären Ca^{2+} -Zyklus spielt die Impulsweiterleitung im Gewebe des Sinusknoten eine entscheidende Rolle. Eine reduzierte interzelluläre Kopplung und eine langsame Ausbreitung des elektrischen Impulses innerhalb des Gewebes sind spezifische Merkmale des Sinusknoten und schützen diesen vor den elektrischen Einflüssen des umgebenden atrialen Gewebes. Um diese Stabilität zu gewährleisten, überwiegt die Expression von langsam leitenden Gap Junctions wie Cx45 und Cx30.2 (Boyett et al. 2006). Das mutmaßliche humane Ortholog zu Cx30.2 in der Maus ist Cx31.9 (Nielsen und Kumar 2003). Unseres Wissens nach ist in der Literatur bisher kein Zusammenhang zwischen der Expression von Cx45 und Cx30.2 bzw. Cx31.9 beschrieben, sodass eine weitergehende Untersuchung hinsichtlich des Expressionsprofils dieser langsam leitenden Connexine ein interessanter Ansatz wäre. Bei einer erfolgreichen Reprogrammierung wäre eine vermehrte Expression dieser Connexine zu erwarten.

In der Literatur ist ein Zusammenhang zwischen den im Arbeitsmyokard vorherrschenden, schnell leitenden Connexin-Isoformen Cx40 und Cx43 und der Überexpression von spezifischen Transkriptionsfaktoren beschrieben. Die Expression von Cx43 wird während der Embryonalentwicklung durch TBX3 inhibiert (Hoogaars et al. 2007). Die Überexpression von

TBX3 bzw. TBX18 bedingt eine verringerte Expression von Cx43 (Bakker et al. 2012; Kapoor et al. 2011).

4.1.4 SHOX2-mRNA zeigt stärksten Einfluss auf Signalwege der kardialen Entwicklung

Für einen detaillierten Überblick zu den möglichen Veränderungen des Transkriptoms nach mRNA-Transfektion wurden Mikroarray-Analysen durchgeführt und beteiligte Signalwege identifiziert. Besonders die Transfektion von SHOX2-mRNA zeigt einen Einfluss auf die Expression wichtiger Gene im Signalweg der kardialen Differenzierung. In unseren Versuchen zeigt sich eine verstärkte Expression von Cx45 (GJC1) im Stadium der kardialen Progenitorzelle und stimmt dahingehend mit den Aussagen der Literatur überein. Selbiges konnte für ISL LIM Homeobox 1 (ISL1) beobachtet werden, welches ein Marker für eine Population an Progenitorzellen des sekundären Herzfeldes darstellt. Aus Zellen des sekundären Herzfeldes bildet sich im Verlauf der Embryonalentwicklung das Schrittmacherzentrum aus (Cai et al. 2003). SHOX2 bindet an einen ISL1-Enhancer und reguliert dessen Expression (Liang et al. 2015). Die vermehrte Expression von TBX5 nach SHOX2-Transfektion könnte durch eine rückkoppelnde Wirkung von SHOX2 auf TBX5 bedingt sein, da TBX5 ein positiver Regulator von SHOX2 ist (Mori et al. 2006).

Gegen eine Schrittmacherzellreprogrammierung der KM spricht die erhöhte Expression von SCN5A in den reifen KM nach SHOX2-Transfektion. SCN5A codiert für den spannungsgesteuerten Na⁺-Kanal Na_v1.5 und ist unter anderem für die schnelle Reizleitung im Arbeitsmyokard verantwortlich. Im SAN hingegen wird der Na_v1.5 nur gering bis garnicht exprimiert (Maier et al. 2002). SCN5A wird im ventrikulären Reizleitungssystem TBX5-abhängig exprimiert (Arnolds et al. 2012), so dass die verstärkte SCN5A-Expression in den reifen KM durch die verstärkte Expression von TBX5 in den Vorläuferzellen bedingt sein könnte. Kritisch hinterfragt werden sollte aber die Tatsache, dass die vermehrte SCN5A-Expression nur im Vergleich zu den mit Viomer und Buffer transfizierten Zellen nachweisbar ist und nicht zu den untransfizierten Zellen. Dies sollte durch weitergehende Untersuchungen genauer analysiert werden. Zudem problematisch hinsichtlich der Reprogrammierung zu Schrittmacherzellen könnte das Expressionsverhalten des kardialen Troponins TNNI3 (TNNI3) sein. Der kontraktile Apparat ist in Schrittmacherzellen schwach entwickelt (DEHAAN 1961). Bakker et al. zeigt in seiner Arbeit, dass eine verstärkte TBX3-Expression in terminal differenzierten KM eine verringerte Expression von TNNI3 bedingt (Bakker et al. 2012). Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit, da unter anderem nach

Transfektion von TBX3 eine verstärkte Expression von TNNI3 nachgewiesen wird. Inwieweit diese Eigenschaft von Schrittmacherzellen für die Schrittmacherfunktion entscheidend ist, ist bisher noch nicht vollständig geklärt.

4.2 mRNA-Transfektion induziert unreifen, schrittmacherzellähnlichen Phänotyp

Im Rahmen der Vorversuche ergab sich, dass mit 500 ng eine Translationseffizienz von ca. 80 % erreicht werden kann, ohne dass die zytotoxischen Effekte der mRNA überwiegen. Zu große Zeitintervalle zwischen den Transfektionen bedingen ein abnehmendes Fluoreszenzsignal, welches mit der abnehmenden Proteinexpression des fluoreszierenden eGFP korreliert. Die transfizierten mRNAs sowie die anschließend gebildeten Proteine werden im Laufe der Zeit abgebaut, wodurch das abnehmende Fluoreszenzsignal erklärbar ist.

Im Verlauf der mRNA-Transfektionen können morphologische Veränderungen der KM beobachtet werden. Vor den Transfektionen zeigen die KM ein eher ziegelartiges Aussehen mit eckigen Enden und scheinen damit eher dem Phänotyp ventrikulärer Myozyten zu ähneln (Hu et al. 2014). Im Verlauf der Transfektionen kommt es, abhängig von der transfizierten mRNA und deren Konzentration, zum Absterben der KM. Besonders starke zytotoxische Effekte treten nach der dritten Transfektion auf, sowie bei der Transfektion mit 1000 ng TBX3-mRNA. Generell zeigen sich bereits nach der zweiten Transfektion erste morphologische Veränderungen bei den transfizierten KM. Sie zeigen einen Phänotyp mit schlankeren, spindelförmigen, spitz zulaufenden Enden. Dieser Phänotyp scheint denen der Schrittmacherzellen im Bereich des Sinusknoten zu ähneln (Hu et al. 2014).

Bei Überwiegen der durch mRNA-Transfektion bedingten zytotoxischen Effekte kann es zum Zelltod durch Apoptose kommen. Die Apoptose ist ein organisierter, energieabhängiger Prozess und findet ohne Auftreten von entzündlichen Reaktionen im umgebenen Gewebe statt. Im Rahmen der Apoptose kommt es zur Zellschrumpfung und zum Verlust der Zell-Zell-Kontakte (Kerr et al. 1972). Inwieweit die morphologischen Veränderungen auf eine Transformation Richtung Schrittmacherzellen hindeuten, oder im Rahmen der durch zytotoxische Effekte eingeleiteten Apoptose zu Stande kommen, müsste weitergehend untersucht werden. Hierfür könnte mit Hilfe eines TUNEL-Assays die apoptotischen Zellen lichtmikroskopisch dargestellt werden und deren Anteil quantifiziert werden (Gavrieli et al. 1992).

Neben dem rein morphologischen Aussehen der Zellen, unterscheiden sich die Schrittmacherzellen durch eine spezifische Struktur der intrazellulären Proteine. SAN-Zellen weisen eine myofibrilläre Desorganisation (Bleeker et al. 1980) und eine schwache Expression von kardialem Sarkomer- α -Aktinin auf (Kapoor et al. 2013). Der kontraktile Apparat zeigt sich im Vergleich zum Arbeitsmyokard vermindert ausgebildet (Christoffels et al. 2010). In früheren Arbeiten konnte eine verminderte Troponin I- Expression nach Überexpression von TBX3 nachgewiesen werden (Bakker et al. 2012). Mittels immunhistochemischer Färbungen könnten die transfizierten KM im Verlauf auf eine myofibrilläre Desorganisation und eine verminderte Expression von Troponin I hin untersucht werden.

4.3 mRNA-Transfektion von SHOX2 und TBX3 beeinflusst die Schlagfrequenz in murinen neonatalen Kardiomyozyten

Der Sinusknoten stellt den primären Schrittmacher des Herzens dar und erzeugt den intrinsischen Herzschlag. Die innerhalb des Sinusknotens liegenden KM sind spontan aktiv und erzeugen den elektrischen Impuls, welcher an das umgebene Myokard weitergeleitet wird. Eine Anpassung der Schlagfrequenz kann über das autonome Nervensystem erfolgen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der Transkriptionsfaktoren SHOX2, TBX3 und TBX18 einen Einfluss auf die spontane Erregungsbildung der Schrittmacherzellen im Sinusknoten haben. Die Überexpression von SHOX2 während der ESC- Differenzierung führt zu einer Hochregulation des schrittmacherspezifischen Genprogramms und bedingt eine verbesserte Spezifikation von kardialen Schrittmacherzellen (Ionta et al. 2015). Es kann zudem eine erhöhte Anzahl an spontan schlagenden Arealen mit einer erhöhten Schlagfrequenz festgestellt werden sowie eine vermehrte Expression von HCN4 und Cx45 und zudem eine verminderte Expression von Cx43 (Ionta et al. 2015). Der Verlust der SHOX2-Expression geht mit einer verringerten Schlagfrequenz, einer verringerten Expression von HCN4 und Cx45 und einer vermehrten Expression von Cx43 einher (Hashem et al. 2013). Ähnliche Ergebnisse können durch Überexpression von TBX18 in adulten KM erzeugt werden (Kapoor et al. 2013). Die murinen neonatalen KM zeigen nach Transfektion der einzelnen Transkriptionsfaktoren keinen signifikanten Anstieg der Schlagfrequenz im Vergleich zu den Kontrollzellen. Interessanterweise führt die Transfektion der Kombination aus SHOX2- und TBX3-mRNA zu einem signifikanten Anstieg der Schlagfrequenz. Eine mögliche Wechselwirkung zwischen den Transkriptionsfaktoren sowie eine additive Wirkung könnten als Ursachen angesehen werden. Die fehlende Abhängigkeit der Schlagfrequenz von der mRNA-Konzentration könnte durch die

bereits bei geringer Konzentration bestehende Überschreitung eines Schwellenwertes bedingt sein. Bei Erreichen dieses Schwellenwertes üben die Transkriptionsfaktoren möglicherweise einen Einfluss auf die Schlagfrequenz aus. Um diesen Grenzwert zu bestimmen, müssten die neonatalen KM zusätzlich mit geringeren Mengen der mRNA-Kombination transfiziert werden. Da Kapoor et al. (2013) in einer vorherigen Arbeit nachweisen konnten, dass TBX18 ebenfalls einen Einfluss auf die Schlagfrequenz und ektope Erregungsbildung hat, sollte TBX18 in zukünftigen Versuchsreihen zusätzlich in die mRNA-Kombination mit aufgenommen werden. TBX18 bedingt eine verminderte Expression des schnellleitenden Gap Junction- Protein Cx43, welches normalerweise nicht in Schrittmacherzellen exprimiert wird. Die verminderte Cx43- Expression führt zu reduzierten Zell-Zell-Kontakten und damit einhergehend zu einer, für den Sinusknoten typischen, reduzierten Leitungsgeschwindigkeit (Kapoor et al. 2011; Jansen et al. 2010).

Unsere, von der bisherigen Literatur abweichenden Ergebnisse der Schlagfrequenz nach Transfektion der einzelnen Transkriptionsfaktoren, könnten durch unseren abweichenden experimentellen Aufbau bedingt sein. In den vorherigen Studien erfolgte die Transfektion der Transkriptionsfaktoren mittels adenoviralem Vektor und nicht mittels mRNA. Zudem verwendeten Ionta et al. (2015) ESC und keine postnatalen KM.

Insgesamt wird in unseren Versuchen eine breite Streuung der Messwerte der Schlagfrequenz festgestellt. Dies ist unter anderem durch die hohe Störanfälligkeit der Schlagfrequenz gegenüber den Kulturbedingungen begründet. Bereits kleinste Temperaturschwankungen können einen Einfluss auf die Schlagfrequenz haben. Insgesamt ist daher die Schlagfrequenz als Beurteilungsmaß für die erfolgreiche Differenzierung in Richtung Schrittmacherzellen als kritisch anzusehen. Häufigere Messungen und eine detaillierte Überwachung der äußeren Bedingungen können derartige Schwankungen minimieren.

4.4 Limitationen und Ausblick

Obwohl unsere Beobachtungen zum Teil mit dem allgemein anerkannten Modell der Wechselwirkungen zwischen den Transkriptionsfaktoren SHOX2, TBX3 und TBX18 übereinstimmen, kann gezeigt werden, dass die alleinige Transfektion von mRNA in dem von uns verwendete experimentellen Setup nicht ausreichend ist, um Veränderungen des Expressionsmusters der wichtigen funktionellen Akteure, wie dem HCN4-Kanal, dem RyR2 oder dem Gap Junction-Protein Cx45 zu erreichen.

Eine mögliche Ursache hierfür könnte darin liegen, dass in unseren Versuchen vollständig ausgereifte KM verwendet wurden. In Studien, die eine Differenzierung in Schrittmacherzellen beobachten konnten, wurden embryonale KM oder ESC verwendet, welche ein hohes Differenzierungspotential aufweisen (Hoogaars et al. 2007; Ionta et al. 2015).

Für zukünftige Studien müsste das Protokoll der mRNA-Transfektion hinsichtlich der mRNA-Konzentration und der Anzahl der Transfektionen weiter optimiert werden. Darüber hinaus wäre eine Aufnahme weiterer Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise TBX5, in das Protokoll sinnvoll. TBX5 gehört ebenfalls zu den bekannten Transkriptionsregulatoren der Sinusknotenentwicklung und stellt einen positiven Regulator von SHOX2 und TBX3 dar (Mori et al. 2006). In Kombination mit SHOX2 und HCN2 konnte in einer Studie nach viraler Transfektion von kardialer Progenitorzellen eine schrittmacherspezifische Genaktivität und eine vermehrte HCN4-Expression nachgewiesen werden (Raghunathan et al. 2020). Die Wirkung der aktuell verwendeten Transkriptionsfaktoren könnte durch Kombination mit TBX5 verstärkt werden. Zusätzlich sollte der Fokus nicht nur auf die Untersuchung der schrittmacherspezifischen Marker gelegt werden, sondern auch auf die Analyse von Markern des Arbeitsmyokards, wie z.B. Cx40 und Cx43 und dem Na⁺-Kanal Na_v1.5. Eine Reprogrammierung in Richtung Schrittmacherzellen könnte möglicherweise mit einer verringerten Expression dieser Marker einhergehen. Das Protein NKX2.5 wird im Sinusknoten selbst nicht exprimiert (Kasahara et al. 1998) und unterliegt der Regulation von SHOX2 (Espinoza-Lewis et al. 2011). Weitere Aufschlüsse über die Wirkungsweise der mRNAs auf molekularer Ebene könnte die Bestimmung des NKX2.5-Expressionsmusters im Verlauf der Transfektion geben.

Die Herzfrequenz unterliegt einem zirkadianen Rhythmus und täglichen Schwankungen. In der Literatur wird beschrieben, dass isolierte murine Sinusknotenzellen einen Tag-Nacht-Rhythmus der Schlagfrequenz aufweisen und dies mit einer rhythmischen mRNA-Expression spezifischer Ionenkanäle einhergeht. Die Expression des HCN4-Kanals sowie die Expression von SHOX2 und TBX3 unterliegen diesen täglichen Schwankungen (D'Souza et al. 2021). Aufgrund dessen wäre denkbar, dass auch in hiPSC-derivierten KM *in vitro* ein zyklischer Energiemetabolismus und eine zyklische Kontraktionsaktivität vorliegen. Diese Vermutung müsste jedoch durch weitergehende Untersuchungen abgeklärt werden.

Abschließend kann gesagt werden, dass die mRNA-Transfektion der KM insgesamt gut funktioniert hat und mRNA als Reprogrammierungswerkzeug genutzt werden kann. Die mRNA wurde ausreichend in die Zellen aufgenommen und die entsprechenden Proteine wurden exprimiert. Zusätzlich konnte ein Einfluss der mRNA-Transfektion auf die Expression

einzelner Gene und Signalkaskaden nachgewiesen werden. Ein großer Vorteil dieser Strategie ist der nicht-integrative Charakter und die fehlende Manipulation der Wirts-DNA, woraus sich eine bessere Translation in die Klinik ergibt. Nach derzeitigem Stand ist jedoch eine weitere Optimierung, die Effizienz der Transfektion und Translation beeinflussenden Parameter wie Zeit, Konzentration und Zelltyp geboten, um einen routinemäßigen Klinikeinsatz zu ermöglichen.

5 Thesen

1. Erkrankungen des Reizleitungssystems können als Folge zahlreicher kardialer und extrakardialer Grunderkrankungen auftreten und bedingen oftmals eine Einschränkung der Lebensqualität und eine gesteigerte Letalität.
2. Die Implantation eines elektronischen Schrittmachers stellt bisher die Therapie der Wahl bei Erkrankungen des kardialen Reizleitungssystems dar.
3. Die *in vitro* Generierung biologischer Schrittmacherzellen kann in Zukunft eine attraktive Möglichkeit zur patientenspezifischen Schrittmacherersatztherapie darstellen.
4. Die Transkriptionsfaktoren TBX3, TBX18 und SHOX2 spielen eine entscheidende Rolle in der embryonalen Genese des Sinusknoten.
5. Durch forcierte Expression spezifischer Proteine stellt die mRNA ein wichtiges Werkzeug in der Reprogrammierung von hiPSCs dar.
6. Diese Arbeit hat ergeben, dass die transfizierten mRNAs in die Kardiomyozyten aufgenommen, im Zytoplasma translatiert und das jeweilige codierte Protein verstärkt exprimiert werden.
7. Die Transfektion von SHOX2-, TBX3-, und TBX18-mRNA induziert einen unreifen, schrittmacherzellähnlichen Phänotyp.
8. Die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten wird durch die mRNA-Transfektion nicht beeinflusst.
9. Die forcierte Überexpression der Transkriptionsfaktoren TBX3, TBX18 und SHOX2 induziert keine verstärkte Expression schrittmacherspezifischer Marker.
10. Der in der Literatur beschriebene Zusammenhang der positiven Beeinflussung von TBX3 durch SHOX2 konnte in dieser Arbeit bestätigt werden.

Literaturverzeichnis

Abou-Saleh, Haissam; Zouein, Fouad A.; El-Yazbi, Ahmed; Sanoudou, Despina; Raynaud, Christophe; Rao, Christopher et al. (2018): The march of pluripotent stem cells in cardiovascular regenerative medicine. In: *Stem cell research & therapy* 9 (1), S. 201. DOI: 10.1186/s13287-018-0947-5.

Abriel, Hugues; Rougier, Jean-Sébastien; Jalife, José (2015): Ion channel macromolecular complexes in cardiomyocytes: roles in sudden cardiac death. In: *Circulation research* 116 (12), S. 1971–1988. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305017.

Almeida, Patricia E. de; Ransohoff, Julia D.; Nahid, Abu; Wu, Joseph C. (2013): Immunogenicity of pluripotent stem cells and their derivatives. In: *Circulation research* 112 (3), S. 549–561. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.249243.

Arnolds, David E.; Liu, Fang; Fahrenbach, John P.; Kim, Gene H.; Schillinger, Kurt J.; Smemo, Scott et al. (2012): TBX5 drives *Scn5a* expression to regulate cardiac conduction system function. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (7), S. 2509–2518. DOI: 10.1172/JCI62617.

Bakker, Martijn L.; Boink, Gerard J. J.; Boukens, Bas J.; Verkerk, Arie O.; van den Boogaard, Malou; den Haan, A. Denise et al. (2012): T-box transcription factor TBX3 reprogrammes mature cardiac myocytes into pacemaker-like cells. In: *Cardiovascular research* 94 (3), S. 439–449. DOI: 10.1093/cvr/cvs120.

Beitzke, D. (2019): Sichere MRT-Untersuchung bei Patienten mit Herzschrittmacher und ICD. In: *Der Radiologe* 59 (10), S. 885–893. DOI: 10.1007/s00117-019-0567-9.

Benson, D. Woodrow; Wang, Dao W.; Dymont, Macaira; Knilans, Timothy K.; Fish, Frank A.; Strieper, Margaret J. et al. (2003): Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (*SCN5A*). In: *The Journal of clinical investigation* 112 (7), S. 1019–1028. DOI: 10.1172/JCI18062.

Blaschke, Rüdiger J.; Hahurij, Nathan D.; Kuijper, Sanne; Just, Steffen; Wisse, Lambertus J.; Deissler, Kirsten et al. (2007): Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor *Shox2* in sinoatrial and pacemaking development. In: *Circulation* 115 (14), S. 1830–1838. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.637819.

Bleeker, W. K.; Mackaay, A. J.; Masson-Pévet, M.; Bouman, L. N.; Becker, A. E. (1980): Functional and morphological organization of the rabbit sinus node. In: *Circulation research* 46 (1), S. 11–22. DOI: 10.1161/01.res.46.1.11.

- Boyett, M. R.; Inada, S.; Yoo, S.; Li, J.; Liu, J.; Tellez, J. et al. (2006): Connexins in the sinoatrial and atrioventricular nodes. In: *Advances in cardiology* 42, S. 175–197. DOI: 10.1159/000092569.
- Brand, Thomas (2016): Tbx18 and the generation of a biological pacemaker. Are we there yet? In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 97, S. 263–265. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2016.06.006.
- Cai, Chen-Leng; Liang, Xingqun; Shi, Yunqing; Chu, Po-Hsien; Pfaff, Samuel L.; Chen, Ju; Evans, Sylvia (2003): Isl1 Identifies a Cardiac Progenitor Population that Proliferates Prior to Differentiation and Contributes a Majority of Cells to the Heart. In: *Developmental Cell* 5 (6), S. 877–889. DOI: 10.1016/S1534-5807(03)00363-0.
- Cao, Nan; Huang, Yu; Zheng, Jiashun; Spencer, C. Ian; Zhang, Yu; Fu, Ji-Dong et al. (2016): Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. In: *Science (New York, N.Y.)* 352 (6290), S. 1216–1220. DOI: 10.1126/science.aaf1502.
- Casini, Simona; Verkerk, Arie O.; Remme, Carol Ann (2017): Human iPSC-Derived Cardiomyocytes for Investigation of Disease Mechanisms and Therapeutic Strategies in Inherited Arrhythmia Syndromes: Strengths and Limitations. In: *Cardiovascular drugs and therapy* 31 (3), S. 325–344. DOI: 10.1007/s10557-017-6735-0.
- Chabanovska, Oleksandra; Galow, Anne-Marie; David, Robert; Lemcke, Heiko (2021): mRNA - A game changer in regenerative medicine, cell-based therapy and reprogramming strategies. In: *Advanced drug delivery reviews* 179, S. 114002. DOI: 10.1016/j.addr.2021.114002.
- Chen, Chun-Yu; Tran, Dominic M.; Cavedon, Alex; Cai, Xiaohe; Rajendran, Raj; Lyle, Meghan J. et al. (2020): Treatment of Hemophilia A Using Factor VIII Messenger RNA Lipid Nanoparticles. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 20, S. 534–544. DOI: 10.1016/j.omtn.2020.03.015.
- Chi, Neil C.; Shaw, Robin M.; Jungblut, Benno; Huisken, Jan; Ferrer, Tania; Arnaout, Rima et al. (2008): Genetic and physiologic dissection of the vertebrate cardiac conduction system. In: *PLoS biology* 6 (5), e109. DOI: 10.1371/journal.pbio.0060109.
- Christoffels, Vincent M.; Hoogaars, Willem M. H.; Tessari, Alessandra; Clout, Danielle E. W.; Moorman, Antoon F. M.; Campione, Marina (2004): T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 229 (4), S. 763–770. DOI: 10.1002/dvdy.10487.

- Christoffels, Vincent M.; Mommersteeg, Mathilda T. M.; Trowe, Mark-Oliver; Prall, Owen W. J.; Gier-de Vries, Corrie de; Soufan, Alexandre T. et al. (2006): Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18. In: *Circulation research* 98 (12), S. 1555–1563. DOI: 10.1161/01.RES.0000227571.84189.65.
- Christoffels, Vincent M.; Smits, Gertien J.; Kispert, Andreas; Moorman, Antoon F. M. (2010): Development of the pacemaker tissues of the heart. In: *Circulation research* 106 (2), S. 240–254. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.205419.
- Crozier, Ian; Smith, Warren (2012): Modern device technologies. In: *Heart, lung & circulation* 21 (6-7), S. 320–327. DOI: 10.1016/j.hlc.2011.11.001.
- Cunningham, Justine J.; Ulbright, Thomas M.; Pera, Martin F.; Looijenga, Leendert H. J. (2012): Lessons from human teratomas to guide development of safe stem cell therapies. In: *Nature biotechnology* 30 (9), S. 849–857. DOI: 10.1038/nbt.2329.
- Davis, Robert L.; Weintraub, Harold; Lassar, Andrew B. (1987): Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. In: *Cell* 51 (6), S. 987–1000. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90585-X.
- DEHAAN, R. L. (1961): Differentiation of the atrioventricular conducting system of the heart. In: *Circulation* 24, S. 458–470. DOI: 10.1161/01.CIR.24.2.458.
- Demoulin, J. C.; Kulbertus, H. E. (1978): Histopathological correlates of sinoatrial disease. In: *British heart journal* 40 (12), S. 1384–1389. DOI: 10.1136/hrt.40.12.1384.
- D'Souza, Alicia; Wang, Yanwen; Anderson, Cali; Bucchi, Annalisa; Baruscotti, Mirko; Olieslagers, Servé et al. (2021): A circadian clock in the sinus node mediates day-night rhythms in Hcn4 and heart rate. In: *Heart rhythm* 18 (5), S. 801–810. DOI: 10.1016/j.hrthm.2020.11.026.
- Espinoza-Lewis, Ramón A.; Liu, Hongbing; Sun, Cheng; Chen, Chaohui; Jiao, Kai; Chen, YiPing (2011): Ectopic expression of Nkx2.5 suppresses the formation of the sinoatrial node in mice. In: *Developmental biology* 356 (2), S. 359–369. DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.05.663.
- Espinoza-Lewis, Ramón A.; Yu, Ling; He, Fenglei; Liu, Hongbing; Tang, Ruhang; Shi, Jiangli et al. (2009): Shox2 is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing Nkx2-5. In: *Developmental biology* 327 (2), S. 376–385. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.12.028.
- Evans, M. J.; Kaufman, M. H. (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. In: *Nature* 292 (5819), S. 154–156. DOI: 10.1038/292154a0.

- Ferretti, Elisabetta; Hadjantonakis, Anna-Katerina (2019): Mesoderm specification and diversification: from single cells to emergent tissues. In: *Current opinion in cell biology* 61, S. 110–116. DOI: 10.1016/j.ceb.2019.07.012.
- Fuke, Hiroyuki; Ohno, Mutsuhito (2008): Role of poly (A) tail as an identity element for mRNA nuclear export. In: *Nucleic acids research* 36 (3), S. 1037–1049. DOI: 10.1093/nar/gkm1120.
- Gavrieli, Y.; Sherman, Y.; Ben-Sasson, S. A. (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. In: *The Journal of cell biology* 119 (3), S. 493–501. DOI: 10.1083/jcb.119.3.493.
- Gorabi, Armita M.; Hajjighasemi, Saeideh; Tafti, Hossein A.; Atashi, Amir; Soleimani, Masoud; Aghdami, Nasser et al. (2019): TBX18 transcription factor overexpression in human-induced pluripotent stem cells increases their differentiation into pacemaker-like cells. In: *Journal of cellular physiology* 234 (2), S. 1534–1546. DOI: 10.1002/jcp.27018.
- Grant, Augustus O. (2009): Cardiac ion channels. In: *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology* 2 (2), S. 185–194. DOI: 10.1161/CIRCEP.108.789081.
- Gregoratos, Gabriel (2005): Indications and recommendations for pacemaker therapy. In: *American family physician* 71 (8), S. 1563–1570.
- Hacein-Bey-Abina, S.; Kalle, C. von; Schmidt, M.; McCormack, M. P.; Wulffraat, N.; Leboulch, P. et al. (2003): LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. In: *Science (New York, N.Y.)* 302 (5644), S. 415–419. DOI: 10.1126/science.1088547.
- Hafeez, Yamama; Grossman, Shamaï A. (2022): StatPearls. Junctional Rhythm. Treasure Island (FL).
- Hashem, Sherin I.; Lam, May L.; Mihardja, Shirley S.; White, Steven M.; Lee, Randall J.; Claycomb, William C. (2013): Shox2 regulates the pacemaker gene program in embryoid bodies. In: *Stem cells and development* 22 (21), S. 2915–2926. DOI: 10.1089/scd.2013.0123.
- Hausburg, Frauke; Na, Silke; Voronina, Natalia; Skorska, Anna; Müller, Paula; Steinhoff, Gustav; David, Robert (2015): Defining optimized properties of modified mRNA to enhance virus- and DNA- independent protein expression in adult stem cells and fibroblasts. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 35 (4), S. 1360–1371. DOI: 10.1159/000373957.

- Hinnebusch, Alan G.; Ivanov, Ivaylo P.; Sonenberg, Nahum (2016): Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. In: *Science (New York, N.Y.)* 352 (6292), S. 1413–1416. DOI: 10.1126/science.aad9868.
- Holm, Hilma; Gudbjartsson, Daniel F.; Sulem, Patrick; Masson, Gisli; Helgadóttir, Hafdis Th; Zanon, Carlo et al. (2011): A rare variant in MYH6 is associated with high risk of sick sinus syndrome. In: *Nature genetics* 43 (4), S. 316–320. DOI: 10.1038/ng.781.
- Holtkamp, Silke; Kreiter, Sebastian; Selmi, Abderraouf; Simon, Petra; Koslowski, Michael; Huber, Christoph et al. (2006): Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. In: *Blood* 108 (13), S. 4009–4017. DOI: 10.1182/blood-2006-04-015024.
- Hoogaars, Willem M. H.; Engel, Angela; Brons, Janyne F.; Verkerk, Arie O.; Lange, Frederik J. de; Wong, L. Y. Elaine et al. (2007): Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. In: *Genes & development* 21 (9), S. 1098–1112. DOI: 10.1101/gad.416007.
- Hornung, Veit; Ellegast, Jana; Kim, Sarah; Brzózka, Krzysztof; Jung, Andreas; Kato, Hiroki et al. (2006): 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. In: *Science (New York, N.Y.)* 314 (5801), S. 994–997. DOI: 10.1126/science.1132505.
- Hu, Yu-Feng; Dawkins, James Frederick; Cho, Hee Cheol; Marbán, Eduardo; Cingolani, Eugenio (2014): Biological pacemaker created by minimally invasive somatic reprogramming in pigs with complete heart block. In: *Science translational medicine* 6 (245), 245ra94. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008681.
- Ionta, Vittoria; Liang, Wenbin; Kim, Elizabeth H.; Rafie, Reza; Giacomello, Alessandro; Marbán, Eduardo; Cho, Hee Cheol (2015): SHOX2 overexpression favors differentiation of embryonic stem cells into cardiac pacemaker cells, improving biological pacing ability. In: *Stem cell reports* 4 (1), S. 129–142. DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.11.004.
- Jansen, John A.; van Veen, Toon A. B.; Bakker, Jacques M. T. de; van Rijen, Harold V. M. (2010): Cardiac connexins and impulse propagation. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 48 (1), S. 76–82. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.08.018.
- Jong, F. de; Opthof, T.; Wilde, A. A.; Janse, M. J.; Charles, R.; Lamers, W. H.; Moorman, A. F. (1992): Persisting zones of slow impulse conduction in developing chicken hearts. In: *Circulation research* 71 (2), S. 240–250. DOI: 10.1161/01.RES.71.2.240.
- Joyner, R. W.; van Capelle, F. J. (1986): Propagation through electrically coupled cells. How a small SA node drives a large atrium. In: *Biophysical Journal* 50 (6), S. 1157–1164. DOI: 10.1016/S0006-3495(86)83559-7.

- Jung, Julia Jeannine; Husse, Britta; Rimmbach, Christian; Krebs, Stefan; Stieber, Juliane; Steinhoff, Gustav et al. (2014): Programming and isolation of highly pure physiologically and pharmacologically functional sinus-nodal bodies from pluripotent stem cells. In: *Stem cell reports* 2 (5), S. 592–605. DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.03.006.
- Kadari, Asifiqbal; Mekala, SubbaRao; Wagner, Nicole; Malan, Daniela; Köth, Jessica; Doll, Katharina et al. (2015): Robust Generation of Cardiomyocytes from Human iPS Cells Requires Precise Modulation of BMP and WNT Signaling. In: *Stem cell reviews and reports* 11 (4), S. 560–569. DOI: 10.1007/s12015-014-9564-6.
- Kamino, K.; Hirota, A.; Fujii, S. (1981): Localization of pacemaking activity in early embryonic heart monitored using voltage-sensitive dye. In: *Nature* 290 (5807), S. 595–597. DOI: 10.1038/290595a0.
- Kapoor, Nidhi; Galang, Giselle; Marbán, Eduardo; Cho, Hee Cheol (2011): Transcriptional suppression of connexin43 by TBX18 undermines cell-cell electrical coupling in postnatal cardiomyocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (16), S. 14073–14079. DOI: 10.1074/jbc.M110.185298.
- Kapoor, Nidhi; Liang, Wenbin; Marbán, Eduardo; Cho, Hee Cheol (2013): Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of Tbx18. In: *Nature biotechnology* 31 (1), S. 54–62. DOI: 10.1038/nbt.2465.
- Karikó, Katalin; Buckstein, Michael; Ni, Houping; Weissman, Drew (2005): Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. In: *Immunity* 23 (2), S. 165–175. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.06.008.
- Karikó, Katalin; Muramatsu, Hiromi; Welsh, Frank A.; Ludwig, János; Kato, Hiroki; Akira, Shizuo; Weissman, Drew (2008): Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16 (11), S. 1833–1840. DOI: 10.1038/mt.2008.200.
- Kasahara, H.; Bartunkova, S.; Schinke, M.; Tanaka, M.; Izumo, S. (1998): Cardiac and extracardiac expression of Csx/Nkx2.5 homeodomain protein. In: *Circulation research* 82 (9), S. 936–946. DOI: 10.1161/01.res.82.9.936.
- Kelly, Robert G.; Buckingham, Margaret E. (2002): The anterior heart-forming field: voyage to the arterial pole of the heart. In: *Trends in Genetics* 18 (4), S. 210–216. DOI: 10.1016/S0168-9525(02)02642-2.

- Kennedy, Alan; Finlay, Dewar D.; Guldenring, Daniel; Bond, Raymond; Moran, Kieran; McLaughlin, James (2016): The Cardiac Conduction System: Generation and Conduction of the Cardiac Impulse. In: *Critical care nursing clinics of North America* 28 (3), S. 269–279. DOI: 10.1016/j.cnc.2016.04.001.
- Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. In: *British journal of cancer* 26 (4), S. 239–257. DOI: 10.1038/bjc.1972.33.
- Kim, Dohoon; Kim, Chun-Hyung; Moon, Jung-Il; Chung, Young-Gie; Chang, Mi-Yoon; Han, Baek-Soo et al. (2009): Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. In: *Cell stem cell* 4 (6), S. 472–476. DOI: 10.1016/j.stem.2009.05.005.
- Kimbrel, Erin A.; Lanza, Robert (2015): Current status of pluripotent stem cells: moving the first therapies to the clinic. In: *Nature reviews. Drug discovery* 14 (10), S. 681–692. DOI: 10.1038/nrd4738.
- Koczan, Dirk; Fitzner, Brit; Zettl, Uwe Klaus; Hecker, Michael (2018): Microarray data of transcriptome shifts in blood cell subsets during S1P receptor modulator therapy. In: *Scientific data* 5, S. 180145. DOI: 10.1038/sdata.2018.145.
- Kurtz, Steven M.; Ochoa, Jorge A.; Lau, Edmund; Shkolnikov, Yakov; Pavri, Behzad B.; Frisch, Daniel; Greenspon, Arnold J. (2010): Implantation trends and patient profiles for pacemakers and implantable cardioverter defibrillators in the United States: 1993–2006. In: *Pacing and clinical electrophysiology : PACE* 33 (6), S. 705–711. DOI: 10.1111/j.1540-8159.2009.02670.x.
- Kusumoto, F. M.; Goldschlager, N. (1996): Cardiac pacing. In: *The New England journal of medicine* 334 (2), S. 89–97. DOI: 10.1056/NEJM199601113340206.
- Kwon, Hyokyoung; Kim, Minjeong; Seo, Yunmi; Moon, Yae Seul; Lee, Hwa Jeong; Lee, Kyuri; Lee, Hyukjin (2018): Emergence of synthetic mRNA: In vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine. In: *Biomaterials* 156, S. 172–193. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.11.034.
- Lee, Andrew S.; Tang, Chad; Rao, Mahendra S.; Weissman, Irving L.; Wu, Joseph C. (2013): Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. In: *Nature medicine* 19 (8), S. 998–1004. DOI: 10.1038/nm.3267.
- Li, Ning; Csepe, Thomas A.; Hansen, Brian J.; Dobrzynski, Halina; Higgins, Robert S. D.; Kilic, Ahmet et al. (2015): Molecular Mapping of Sinoatrial Node HCN Channel Expression

in the Human Heart. In: *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology* 8 (5), S. 1219–1227. DOI: 10.1161/CIRCEP.115.003070.

Liang, Xingqun; Wang, Gang; Lin, Lizhu; Lowe, Jennifer; Zhang, Qingquan; Bu, Lei et al. (2013): HCN4 dynamically marks the first heart field and conduction system precursors. In: *Circulation research* 113 (4), S. 399–407. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301588.

Liang, Xingqun; Zhang, Qingquan; Cattaneo, Paola; Zhuang, Shaowei; Gong, Xiaohui; Spann, Nathanael J. et al. (2015): Transcription factor ISL1 is essential for pacemaker development and function. In: *The Journal of clinical investigation* 125 (8), S. 3256–3268. DOI: 10.1172/JCI68257.

Liu, Feng; Fang, Yibing; Hou, Xiaojie; Yan, Ying; Xiao, Haiying; Zuo, Dongchuan et al. (2020): Enrichment differentiation of human induced pluripotent stem cells into sinoatrial node-like cells by combined modulation of BMP, FGF, and RA signaling pathways. In: *Stem cell research & therapy* 11 (1), S. 284. DOI: 10.1186/s13287-020-01794-5.

Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

Maier, Sebastian K. G.; Westenbroek, Ruth E.; Schenkman, Kenneth A.; Feigl, Eric O.; Scheuer, Todd; Catterall, William A. (2002): An unexpected role for brain-type sodium channels in coupling of cell surface depolarization to contraction in the heart. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (6), S. 4073–4078. DOI: 10.1073/pnas.261705699.

Mangoni, Matteo E.; Nargeot, Joël (2008): Genesis and regulation of the heart automaticity. In: *Physiological reviews* 88 (3), S. 919–982. DOI: 10.1152/physrev.00018.2007.

Mangrum, J. M.; DiMarco, J. P. (2000): The evaluation and management of bradycardia. In: *The New England journal of medicine* 342 (10), S. 703–709. DOI: 10.1056/NEJM200003093421006.

Marionneau, Céline; Couette, Brigitte; Liu, Jie; Li, Huiyu; Mangoni, Matteo E.; Nargeot, Joël et al. (2005): Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. In: *The Journal of physiology* 562 (Pt 1), S. 223–234. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.074047.

Markewitz, A. (2021): Jahresbericht 2018 des Deutschen Herzschrittmacher- und Defibrillator-Registers – Teil 1: Herzschrittmacher : Fachgruppe Herzschrittmacher und Defibrillatoren beim IQTIG – Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im

- Gesundheitswesen. In: *Herzschrittmachertherapie & Elektrophysiologie* 32 (1), S. 62–73. DOI: 10.1007/s00399-020-00731-6.
- Martin, G. R. (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (12), S. 7634–7638. DOI: 10.1073/pnas.78.12.7634.
- Mayr, Christine (2019): What Are 3' UTRs Doing? In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 11 (10). DOI: 10.1101/cshperspect.a034728.
- Mikawa, Takashi; Hurtado, Romulo (2007): Development of the cardiac conduction system. In: *Seminars in cell & developmental biology* 18 (1), S. 90–100. DOI: 10.1016/j.semcdb.2006.12.008.
- Mommersteeg, Mathilda T. M.; Hoogaars, Willem M. H.; Prall, Owen W. J.; Gier-de Vries, Corrie de; Wiese, Cornelia; Clout, Danielle E. W. et al. (2007): Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. In: *Circulation research* 100 (3), S. 354–362. DOI: 10.1161/01.RES.0000258019.74591.b3.
- Mond, Harry G.; Proclemer, Alessandro (2011): The 11th world survey of cardiac pacing and implantable cardioverter-defibrillators: calendar year 2009--a World Society of Arrhythmia's project. In: *Pacing and clinical electrophysiology : PACE* 34 (8), S. 1013–1027. DOI: 10.1111/j.1540-8159.2011.03150.x.
- Moorman, Antoon F. M.; Christoffels, Vincent M. (2003): Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. In: *Physiological reviews* 83 (4), S. 1223–1267. DOI: 10.1152/physrev.00006.2003.
- Mordwinkin, Nicholas M.; Lee, Andrew S.; Wu, Joseph C. (2013): Patient-specific stem cells and cardiovascular drug discovery. In: *JAMA* 310 (19), S. 2039–2040. DOI: 10.1001/jama.2013.282409.
- Mori, Alessandro D.; Zhu, Yonghong; Vahora, Ilyas; Nieman, Brian; Koshiba-Takeuchi, Kazuko; Davidson, Lorinda et al. (2006): Tbx5-dependent rheostatic control of cardiac gene expression and morphogenesis. In: *Developmental biology* 297 (2), S. 566–586. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.05.023.
- Mueller, Paula; Wolfien, Markus; Ekat, Katharina; Lang, Cajetan Immanuel; Koczan, Dirk; Wolkenhauer, Olaf et al. (2020): RNA-Based Strategies for Cardiac Reprogramming of Human Mesenchymal Stromal Cells. In: *Cells* 9 (2). DOI: 10.3390/cells9020504.

- Neofytou, Evgenios; O'Brien, Connor Galen; Couture, Larry A.; Wu, Joseph C. (2015): Hurdles to clinical translation of human induced pluripotent stem cells. In: *The Journal of clinical investigation* 125 (7), S. 2551–2557. DOI: 10.1172/JCI80575.
- Niehoff, Julius; Matzkies, Matthias; Nguemo, Filomain; Hescheler, Jürgen; Reppel, Michael (2019): The Effect of Antiarrhythmic Drugs on the Beat Rate Variability of Human Embryonic and Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 14106. DOI: 10.1038/s41598-019-50557-7.
- Nielsen, Peter A.; Kumar, Nalin M. (2003): Differences in expression patterns between mouse connexin-30.2 (Cx30.2) and its putative human orthologue, connexin-31.9 1. In: *FEBS Letters* 540 (1-3), S. 151–156. DOI: 10.1016/s0014-5793(03)00252-7.
- Okita, Keisuke; Nakagawa, Masato; Hyenjong, Hong; Ichisaka, Tomoko; Yamanaka, Shinya (2008): Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. In: *Science (New York, N.Y.)* 322 (5903), S. 949–953. DOI: 10.1126/science.1164270.
- Patel, Siddharth; Athirasala, Avathamsa; Menezes, Paula P.; Ashwanikumar, N.; Zou, Ting; Sahay, Gaurav; Bertassoni, Luiz E. (2019): Messenger RNA Delivery for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. In: *Tissue engineering. Part A* 25 (1-2), S. 91–112. DOI: 10.1089/ten.tea.2017.0444.
- Pearl, Jeremy I.; Kean, Leslie S.; Davis, Mark M.; Wu, Joseph C. (2012): Pluripotent stem cells: immune to the immune system? In: *Science translational medicine* 4 (164), 164ps25. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005090.
- Protze, Stephanie I.; Liu, Jie; Nussinovitch, Udi; Ohana, Lily; Backx, Peter H.; Gepstein, Lior; Keller, Gordon M. (2017): Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker. In: *Nature biotechnology* 35 (1), S. 56–68. DOI: 10.1038/nbt.3745.
- Raghunathan, Suchi; Islas, Jose Francisco; Mistretta, Brandon; Iyer, Dinakar; Shi, Liheng; Gunaratne, Preethi H. et al. (2020): Conversion of human cardiac progenitor cells into cardiac pacemaker-like cells. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 138, S. 12–22. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.09.015.
- Ramanathan, Anand; Robb, G. Brett; Chan, Siu-Hong (2016): mRNA capping: biological functions and applications. In: *Nucleic acids research* 44 (16), S. 7511–7526. DOI: 10.1093/nar/gkw551.
- Ramaswamy, Suvasini; Tonnu, Nina; Tachikawa, Kiyoshi; Limphong, Patraranee; Vega, Jerel B.; Karmali, Priya P. et al. (2017): Systemic delivery of factor IX messenger RNA for

- protein replacement therapy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (10), E1941–E1950. DOI: 10.1073/pnas.1619653114.
- Roseman, Daniel S.; Khan, Tayeba; Rajas, Fabienne; Jun, Lucy S.; Asrani, Kirtika H.; Isaacs, Cleo et al. (2018): G6PC mRNA Therapy Positively Regulates Fasting Blood Glucose and Decreases Liver Abnormalities in a Mouse Model of Glycogen Storage Disease 1a. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 26 (3), S. 814–821. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.01.006.
- Rosen, Michael R.; Robinson, Richard B.; Brink, Peter R.; Cohen, Ira S. (2011): The road to biological pacing. In: *Nature reviews. Cardiology* 8 (11), S. 656–666. DOI: 10.1038/nrcardio.2011.120.
- Sachs, Alan B.; Sarnow, Peter; Hentze, Matthias W. (1997): Starting at the Beginning, Middle, and End: Translation Initiation in Eukaryotes. In: *Cell* 89 (6), S. 831–838. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80268-8.
- Schuster, Samantha L.; Hsieh, Andrew C. (2019): The Untranslated Regions of mRNAs in Cancer. In: *Trends in cancer* 5 (4), S. 245–262. DOI: 10.1016/j.trecan.2019.02.011.
- Shatkin, A. J.; Manley, J. L. (2000): The ends of the affair: capping and polyadenylation. In: *Nature structural biology* 7 (10), S. 838–842. DOI: 10.1038/79583.
- Shi, Yanhong; Inoue, Haruhisa; Wu, Joseph C.; Yamanaka, Shinya (2017): Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. In: *Nature reviews. Drug discovery* 16 (2), S. 115–130. DOI: 10.1038/nrd.2016.245.
- Sizarov, Aleksander; Devalla, Harsha D.; Anderson, Robert H.; Passier, Robert; Christoffels, Vincent M.; Moorman, Antoon F. M. (2011): Molecular analysis of patterning of conduction tissues in the developing human heart. In: *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology* 4 (4), S. 532–542. DOI: 10.1161/CIRCEP.111.963421.
- Smith, Alec S. T.; Macadangdang, Jesse; Leung, Winnie; Laflamme, Michael A.; Kim, Deok-Ho (2017): Human iPSC-derived cardiomyocytes and tissue engineering strategies for disease modeling and drug screening. In: *Biotechnology advances* 35 (1), S. 77–94. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.12.002.
- Stadtfeld, Matthias; Nagaya, Masaki; Utikal, Jochen; Weir, Gordon; Hochedlinger, Konrad (2008): Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. In: *Science (New York, N.Y.)* 322 (5903), S. 945–949. DOI: 10.1126/science.1162494.
- Takahashi, Kazutoshi; Tanabe, Koji; Ohnuki, Mari; Narita, Megumi; Ichisaka, Tomoko; Tomoda, Kiichiro; Yamanaka, Shinya (2007): Induction of pluripotent stem cells from adult

- human fibroblasts by defined factors. In: *Cell* 131 (5), S. 861–872. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Takebe, Takanori; Sekine, Keisuke; Enomura, Masahiro; Koike, Hiroyuki; Kimura, Masaki; Ogaeri, Takunori et al. (2013): Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. In: *Nature* 499 (7459), S. 481–484. DOI: 10.1038/nature12271.
- Thomson, J. A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S.; Jones, J. M. (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. In: *Science (New York, N.Y.)* 282 (5391), S. 1145–1147. DOI: 10.1126/science.282.5391.1145.
- Valentinuzzi, Max E. (2019): Biological Pacemakers: Still a Dream? In: *IEEE pulse* 10 (5), S. 18–19. DOI: 10.1109/MPULS.2019.2937241.
- van Mierop, L. H. (1967): Location of pacemaker in chick embryo heart at the time of initiation of heartbeat. In: *The American journal of physiology* 212 (2), S. 407–415. DOI: 10.1152/ajplegacy.1967.212.2.407.
- Wang, Kai; Lin, Rwei-Zeng; Hong, Xuechong; Ng, Alex H.; Lee, Chin Nien; Neumeier, Joseph et al. (2020): Robust differentiation of human pluripotent stem cells into endothelial cells via temporal modulation of ETV2 with modified mRNA. In: *Science advances* 6 (30), eaba7606. DOI: 10.1126/sciadv.aba7606.
- Warren, Luigi; Manos, Philip D.; Ahfeldt, Tim; Loh, Yuin-Han; Li, Hu; Lau, Frank et al. (2010): Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. In: *Cell stem cell* 7 (5), S. 618–630. DOI: 10.1016/j.stem.2010.08.012.
- Watanabe, Kiichi; Ueno, Morio; Kamiya, Daisuke; Nishiyama, Ayaka; Matsumura, Michiru; Wataya, Takafumi et al. (2007): A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. In: *Nature biotechnology* 25 (6), S. 681–686. DOI: 10.1038/nbt1310.
- Weide, Benjamin; Carralot, Jean-Philippe; Reese, Anne; Scheel, Birgit; Eigentler, Thomas Kurt; Hoerr, Ingmar et al. (2008): Results of the first phase I/II clinical vaccination trial with direct injection of mRNA. In: *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 31 (2), S. 180–188. DOI: 10.1097/CJI.0b013e31815ce501.
- Weide, Benjamin; Pascolo, Steve; Scheel, Birgit; Derhovanessian, Evelyn; Pflugfelder, Annette; Eigentler, Thomas K. et al. (2009): Direct injection of protamine-protected mRNA: results of a phase 1/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients. In: *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 32 (5), S. 498–507. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181a00068.

- Weng, Yuhua; Li, Chunhui; Yang, Tongren; Hu, Bo; Zhang, Mengjie; Guo, Shuai et al. (2020): The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. In: *Biotechnology advances* 40, S. 107534. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107534.
- Wernig, Marius; Meissner, Alexander; Foreman, Ruth; Brambrink, Tobias; Ku, Manching; Hochedlinger, Konrad et al. (2007): In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. In: *Nature* 448 (7151), S. 318–324. DOI: 10.1038/nature05944.
- Wiese, Cornelia; Grieskamp, Thomas; Airik, Rannar; Mommersteeg, Mathilda T. M.; Gardiwal, Ajmal; Gier-de Vries, Corrie de et al. (2009): Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3. In: *Circulation research* 104 (3), S. 388–397. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.187062.
- Wobus, Anna M.; Boheler, Kenneth R. (2005): Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. In: *Physiological reviews* 85 (2), S. 635–678. DOI: 10.1152/physrev.00054.2003.
- Yakubov, Eduard; Rechavi, Gidi; Rozenblatt, Shmuel; Givol, David (2010): Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. In: *Biochemical and biophysical research communications* 394 (1), S. 189–193. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.150.
- Yamanaka, Shinya (2012): Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. In: *Cell stem cell* 10 (6), S. 678–684. DOI: 10.1016/j.stem.2012.05.005.
- Yasui, K.; Liu, W.; Opthof, T.; Kada, K.; Lee, J. K.; Kamiya, K.; Kodama, I. (2001): I(f) current and spontaneous activity in mouse embryonic ventricular myocytes. In: *Circulation research* 88 (5), S. 536–542. DOI: 10.1161/01.res.88.5.536.
- Yechikov, Sergey; Copaciu, Raul; Gluck, Jessica M.; Deng, Wenbin; Chiamvimonvat, Nipavan; Chan, James W.; Lieu, Deborah K. (2016): Same-Single-Cell Analysis of Pacemaker-Specific Markers in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Subtypes Classified by Electrophysiology. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 34 (11), S. 2670–2680. DOI: 10.1002/stem.2466.
- Yi, Tongyin; Wong, Johnson; Feller, Eric; Sink, Samantha; Taghli-Lamalle, Ouarda; Wen, Jianyan et al. (2012): Electrophysiological mapping of embryonic mouse hearts: mechanisms for developmental pacemaker switch and internodal conduction pathway. In: *Journal of cardiovascular electrophysiology* 23 (3), S. 309–318. DOI: 10.1111/j.1540-8167.2011.02191.x.
- Yu, Junying; Vodyanik, Maxim A.; Smuga-Otto, Kim; Antosiewicz-Bourget, Jessica; Frane, Jennifer L.; Tian, Shulan et al. (2007): Induced pluripotent stem cell lines derived from

- human somatic cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 318 (5858), S. 1917–1920. DOI: 10.1126/science.1151526.
- Zhang, Jianhua; Wilson, Gisela F.; Soerens, Andrew G.; Koonce, Chad H.; Yu, Junying; Palecek, Sean P. et al. (2009): Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. In: *Circulation research* 104 (4), e30-41. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.192237.
- Zhang, Lu; Nomura-Kitabayashi, Aya; Sultana, Nishat; Cai, Weibin; Cai, Xiaoqiang; Moon, Anne M.; Cai, Chen-Leng (2014): Mesodermal Nkx2.5 is necessary and sufficient for early second heart field development. In: *Developmental biology* 390 (1), S. 68–79. DOI: 10.1016/j.ydbio.2014.02.023.
- Zhao, Boxuan Simen; Roundtree, Ian A.; He, Chuan (2017): Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 18 (1), S. 31–42. DOI: 10.1038/nrm.2016.132.
- Zhao, Tongbiao; Zhang, Zhen-Ning; Rong, Zhili; Xu, Yang (2011): Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. In: *Nature* 474 (7350), S. 212–215. DOI: 10.1038/nature10135.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

Danksagung

Diese wissenschaftliche Arbeit hätte in der Form nicht ohne Unterstützung und Engagement von mehreren Beteiligten verfasst werden können.

Ich bedanke mich an dieser Stelle bei Prof. Dr. Robert David, meinem Doktorvater, für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit, ein Teil seiner Arbeitsgruppe zu werden. Darüber hinaus möchte ich mich für alle wertvollen Hinweise zu den fachlichen und formellen Aspekten dieser Arbeit bedanken

Ich bedanke mich vor allem auch bei Dr. Heiko Lemcke für seine kompetente fachliche Unterstützung bei der Gestaltung und Durchführung dieser Arbeit, für die Einführung in die Grundlagenforschung und für die Anregungen und stets konstruktive Kritik bei der Zusammenfassung dieser Monographie.

Dr. Anna Skorska, Dr. Praveen Vasudevan und Dr. Ralf Gäbel möchte ich danken für die Unterstützung und Hilfestellung bei der Durchführung der Experimente und die konstruktiven Gespräche und Diskussionen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Markus Wolfien für die Anfertigungen der Abbildungen im Rahmen der Mikroarray-Analysen und die stetigen Hilfestellungen bei Auswertung dieser.

Bei Dr. Dirk Koczan möchte ich mich für die Aufbereitung der Proben und die Durchführung der Mikroarrays bedanken.

Madeleine Bartsch möchte ich danken für die wertvollen Hinweise und die Unterstützung bei der Durchführung der Zellkultur sowie ihren Einsatz an Tagen, an denen ich mal nicht selber im Labor sein konnte.

Ein besonderer Dank gilt meinen Kommilitonen und geschätzten Freunden Lea Aschenbrenner, Marte Henningsen und meinem Partner Luca Poppe für die stetige moralische Unterstützung und Stärkung sowie die Hilfe bei der Gestaltung des Layouts und Korrektur dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich jederzeit sowohl mental als auch fachlich unterstützt haben und die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben.

Lebenslauf

Inhalt in der Online-Version entfernt



Inhalt in der Online-Version entfernt

