

Abschlussbericht

Zuwendungsempfänger:	Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg / Medizinische Fakultät Heidelberg
Projektleiter:	Dr. Sandra Hoffmann / Prof. Dr. Gudrun Rappold
Projekttitel:	Säule B: Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for atrial fibrillation
Förderkennzeichen:	81X2500113
Laufzeit des Projektes:	01.06.2014 – 31.12.2015

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung

In vorangegangenen Studien konnten wir erstmals eine Variante in der 3'UTR des *SHOX2* Gens in Patienten mit Vorhofflimmern identifizieren und damit assoziieren. Im beantragten Forschungsvorhaben sollten spezifische iPS-Zellen eines dieser Patienten generiert werden, um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen näher zu untersuchen.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde,

In der Säule B der Kooperativen Initiativen des DZHK wurden auch in 2014 die Zusammenarbeit zwischen den einzelnen Standorten sowie der Austausch von Expertisen und Technologien durch eine Experimentelle Pipeline gefördert (siehe hierzu auch die Handreichung Säule B vom 29.01.2014 sowie den Gesamtantrag des DZHK vom 01.03.2011). Mit der Experimentellen Pipeline wurden im Berichtszeitraum ausgezeichnete wissenschaftliche Fähigkeiten, Fachkenntnisse und Infrastrukturen eines DZHK-Partners den DZHK-Partnern an anderen Standorten in Kooperationen zur Verfügung gestellt. Das vorliegende Kooperationsprojekt wurde im Rahmen der Säule B der Kooperativen Initiativen des DZHK zwischen den Standorten München und Heidelberg bewilligt.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das vorliegende Vorhaben verfolgte folgende wissenschaftliche Zielsetzung:

WP1) Generierung Patienten-spezifischer iPS Zellen durch Transkriptionsfaktor-basierte Reprogrammierung von T-Lymphozyten eines Vorhofflimmer Patienten mit *SHOX2* 3'UTR Variante (c.*28T>C) (Standort München)

WP2) Detaillierte Charakterisierung der erzeugten iPS Zellen (Standort München und Heidelberg)

WP3) Differenzierung der Patienten-spezifischen iPS Zellen in Kardiomyozyten (Standort München und Heidelberg)

Aufgrund technischer Schwierigkeiten kam es zur Verzögerung gegenüber dem ursprünglichen Projektvorhaben. Um das Erreichen des Projektziels zu gewährleisten, mussten wir eine kostenneutrale Verlängerung der Projektlaufzeit beantragen, die uns bis 31.12.2015 gewährt wurde. Damit wurde das Vorhaben zeitlich verzögert, jedoch wie im Antrag beschrieben durchgeführt.

4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden, Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste,

1. Morten S Olesen, Morten W Nielsen, Stig Haunsø and Jesper H Svendsen (2014) Atrial fibrillation: the role of common and rare genetic variants. *Eur J Hum Genet* 22(3):297-306.

2. Mahida S (2014) Transcription factors and atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 101: 194-202.

3*. Blaschke RJ, Monaghan AP, Schiller S, Schechinger B, Rao E, Padilla-Nash H, Ried T, **Rappold G** (1998) SHOT, a SHOX-related homeobox gene, is implicated in craniofacial, brain, heart, and limb development. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2406-2411.

4*. Blaschke RJ, Hahurij ND, Kuijper S, Just S, Wisse LJ, Deissler K, Maxelon T, Anastassiadis K, Spitzer J, Hardt SE, Schöler H, Feitsma H, Rottbauer W, Blum M, Meijlink F, **Rappold G***, Gittenberger-de Groot AC* (2007) Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor Shox2 in sinoatrial and pacemaking development. *Circulation* 115: 1830-1838. * shared last authors.

5*. Puskaric S (=Hoffmann S), Schmitteckert S, Mori AD, Glaser A, Schneider KU, Bruneau BG, Blaschke RJ, Steinbeisser H, **Rappold G** (2010) Shox2 mediates Tbx5 activity by regulating Bmp4 in the pacemaker region of the developing heart. *Hum Mol Genet* 19: 4625-4633.

6*. **Hoffmann S**, Berger IM, Glaser A, Bacon C, Li L, Gretz N, Steinbeisser H, Rottbauer W, Just S, **Rappold G** (2013) Islet1 is a direct transcriptional target of the homeodomain transcription factor Shox2 and rescues the Shox2-mediated bradycardia. *Basic Res Cardiol* 108: 339.

7. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318(5858): 1917–1920.

8. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5): 861–872.

9*. **Moretti A**, Bellin M, Welling A, Jung CB, Lam JT, Bott-Flugel L, Dorn T, Goedel A, Hohnke C, Hofmann F, Seyfarth M, Sinnecker D, Schömig A, **Laugwitz KL** (2010) Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med* 363: 1397-1409.

10*. Jung CB, **Moretti A**, Mederos y Schnitzler M, Iop L, Storch U, Bellin M, Dorn T, Ruppenthal S, Pfeiffer S, Goedel A, Dirschinger RJ, Seyfarth M, Lam JT, Sinnecker D, Gudermann T, Lipp P, **Laugwitz KL** (2012) Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *EMBO Mol Med*. 4:180-191.

11*. Sinnecker D, Goedel A, **Laugwitz KL**, **Moretti A** (2013) Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: a versatile tool for arrhythmia research. *Circ Res* 112: 961-968.

12*. Bellin M, Casini S, Davis RP, D'Aniello C, Haas J, Ward-van Oostwaard D, Tertoolen LG, Jung CB, Elliott DA, Welling A, **Laugwitz KL**, **Moretti A**, Mummery CL (2013) Isogenic human pluripotent stem cell pairs reveal the role of a KCNH2 mutation in long-QT syndrome. *EMBO J* 32(24):3161-75.

13. Muller FJ, Schuldt BM, Williams R, Mason D, Altun G, Papapetrou EP, Danner S, Goldmann JE, Herbst A, Schmidt NO, Aldenhoff JB, Laurent LC, Loring JF. A bioinformatic assay for pluripotency in human cells. *Nat Methods* 8:315-317, 2011.

14*. **Hoffmann S**, Clauss S, Berger IM, Weiß B, Montalbano A, Röth R, Bucher M, Klier I, Wakili R, Seitz H, Schulze-Bahr E, Katus HA, Flachsbar F, Nebel A, Guenther SPW, Bagaev E, Rottbauer W, Käab S, Just S, **Rappold GA** (2016) Coding and non-coding variants in the *SHOX2* gene in patients with early-onset atrial fibrillation. *Basic Res. Cardiol* 111:36.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Eine Zusammenarbeit mit anderen Stellen erfolgte mit PD Dr. Alessandra Moretti und Prof. Karl-Ludwig Laugwitz, Klinikum rechts der Isar, I. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universität München, sowie Prof. Stefan Käab und Dr. Sebastian Clauß Medizinische Klinik und Poliklinik I, Klinikum der Universität München.

II. Eingehende Darstellung zu

1. der Verwendung der Zuwendung und den erzielten wissenschaftlich-techn. Ergebnissen im Einzelnen, mit Gegenüberstellung zu den ursprünglichen Zielen,

Die Zuwendung wurde dem beantragten Vorhaben entsprechend eingesetzt und erbrachte folgende wissenschaftlichen Ergebnisse:

Zielsetzung des Projekts war die Generierung von Patienten-spezifischen iPS Zellen eines Vorhofflimmer Patienten mit *SHOX2* Variante, die durch den Standort Heidelberg zuvor identifiziert wurde. Durch die Transkriptionsfaktor-basierte Reprogrammierung (OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC) von T-Lymphozyten zur Erzeugung der Patienten-spezifischen iPS Zellen sollen die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen in der Zellkulturschale näher untersucht werden. Dafür wurden dem entsprechenden Patienten am Standort München 2 Blutproben entnommen und mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) daraus isoliert. Der erste Anlauf zur Reprogrammierung der T-Lymphozyten in iPSCs erfolgte am gleichen Tag mit frisch isolierten PBMCs unter Verwendung des CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kits (Life Technologies). PBMCs, die aus der zweiten Blutprobe isoliert wurden, wurden für spätere Analysen eingefroren. Bedauerlicherweise haben sowohl die erste Reprogrammierung der T-Lymphozyten aus Blutprobe 1, sowie die darauffolgende zweite Reprogrammierung des Gesamtblutes (Probe 2) nicht ausreichend gut funktioniert. Der Grund hierfür war höchstwahrscheinlich die schlechte Konstitution der Lymphozyten im peripheren Blut verursacht durch eine mögliche Aktivierung dieser während einer Immunantwort. Deshalb wurde am Standort München ein weiterer Patient mit *SHOX2* Variante rekrutiert. Dieser dritte Anlauf zur Reprogrammierung war letztendlich sehr erfolgreich, führte jedoch zur zeitlichen Verzögerung des Projekts. Zusätzlich wurden bei dieser dritten Reprogrammierung 2 unterschiedliche Protokolle angewandt (Fig.1). Nach ca. 21-28 Tagen konnten iPSC-ähnliche Kolonien gepickt und weiter kultiviert werden. Nach mehreren Passagen wurden die besten Klone selektiert, gestockt und weiterhin kultiviert.

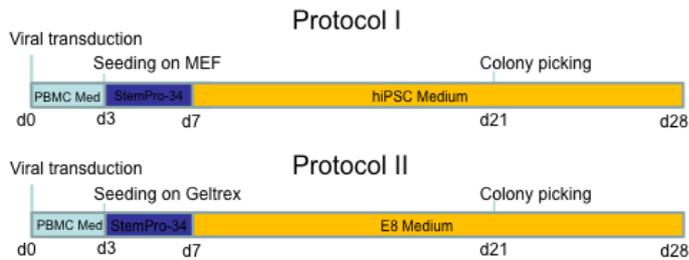


Fig 1. Schematische Darstellung der verwendeten Reprogrammierungsprotokolle. Protokoll 1 (oben) Virale Transduktion der PBMCs an Tag 0. Plattierung der Zellen auf MEFs (Mouse embryonic fibroblasts). Picken der iPSC Kolonien um Tag 21-28. Farblich hinterlegt sind die unterschiedlichen Medien. Protokoll 2 (unten) Virale Transduktion der PBMCs an Tag 0. Plattierung der Zellen auf Geltrex. Picken der iPSC Kolonien um Tag 21-28. Farblich hinterlegt sind die unterschiedlichen Medien.

Insgesamt konnten am Standort München 3 iPSC Zellklone (Shox2-iPSC clone#2, clone#B7, clone#Z) erzeugt werden, die anschließend größtenteils am Standort München detailliert charakterisiert wurden. Der erste Schritt des Charakterisierungsprozesses und der Pluripotenz-Bewertung bestand in der Untersuchung der Alkalischen Phosphatase Aktivität (Fig. 2).

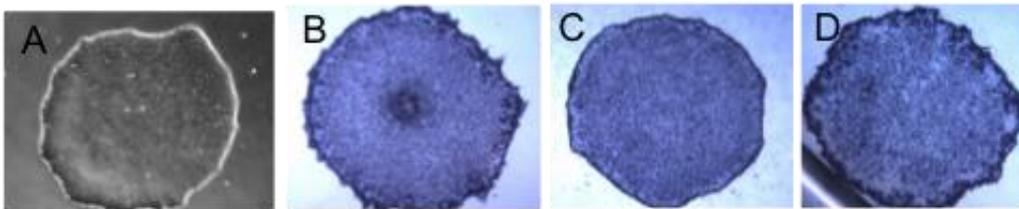


Fig 2. A) Repräsentative iPSC Zellkolonie kultiviert auf Geltrex. **B-D)** Alkalische Phosphatase Aktivität als Pluripotenz Marker in Patienten-spezifischen iPSC Zellen. B: Shox2-iPSC clone#2 p22, C: Shox2-iPSC clone#B7 p22, D: Shox2-iPSC clone#Z p21.

Im nachfolgenden Schritt wurde der Verlust des Sendai Virus, der für die Transkriptionsfaktor-basierte Reprogrammierung verwendet wurde und nicht in das Wirtsgenom integriert mittels RT-PCR überprüft. Alle 3 iPSC Zellklone konnten als Virus-frei bestätigt werden (Fig.3c-e).

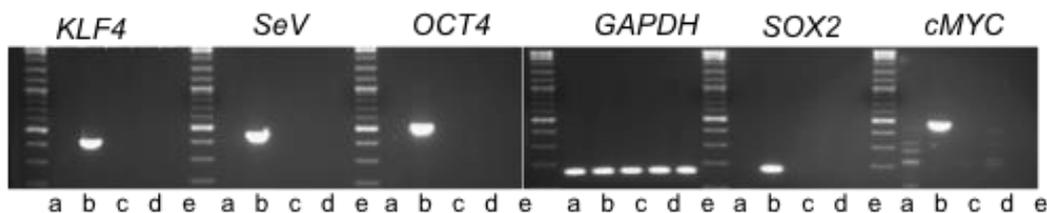


Fig 3. Bestätigung des Verlustes des Sendai Virus (SeV) und Sendai viraler Transgene (*OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, *cMYC*) mittels RT-PCR **a)** nicht infizierte PBMCs (Negativ Kontrolle), **b)** infizierte PBMCs (Positiv Kontrolle), **c)** Shox2-iPSC clone#B7 p23, **d)** Shox2-iPSC clone#Z p18, **e)** Shox2-iPSC clone#2 p32 *GAPDH* wurde als Kontrolle für alle Proben verwendet.

Um zu bestätigen, dass durch die Reprogrammierung eine Reaktivierung endogener Pluripotenz-Marker stattgefunden hat wurde die Immunreaktivität von embryonalen Stammzell-assoziierten Oberflächen-Antigenen wie z.B. NANOG und TRA-1-81 untersucht

(Fig. 4). Zusätzlich konnten die Pluripotenz-Gene *OCT3/4*, *SOX2*, *REX1*, *NANOG*, *TDGF1* mittels qRT-PCR auf mRNA Level nachgewiesen (Fig. 5).

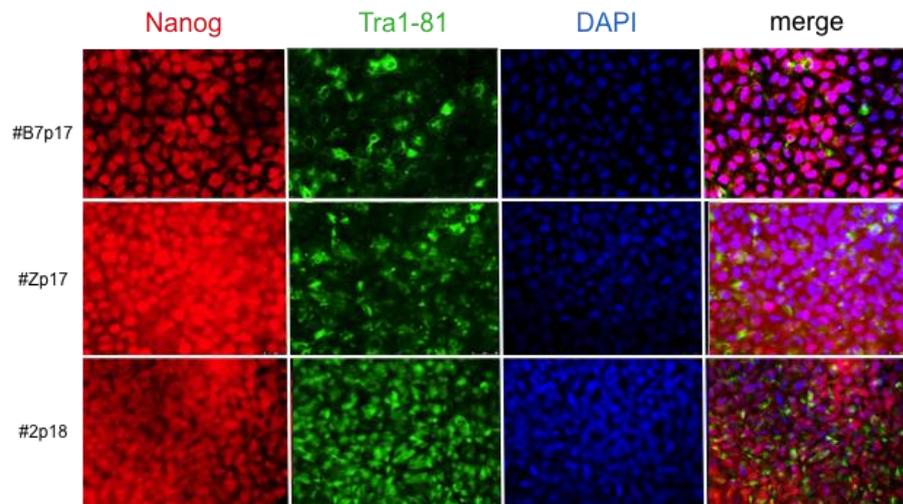


Fig 4. Immunfärbung der Pluripotenz-Marker NANOG und TRA1-81 in *SHOX2*-iPS Zellklonen.

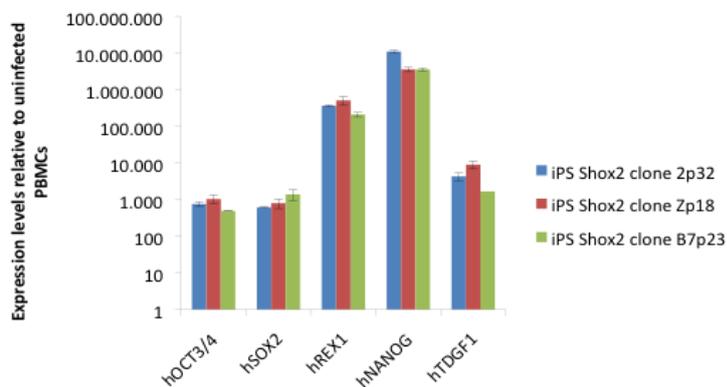


Fig 5. qRT-PCR Analyse endogener Pluripotenz-Gene in *SHOX2*-iPS Zellklonen.

Zur vollständigen Charakterisierung der erzeugten iPS Zellen wurden am Standort Heidelberg außerdem eine Karyotyp-Analyse mittel M-FISH, sowie die Sequenzierung der entsprechenden Klone zur Überprüfung der *SHOX2* 3'UTR Variante durchgeführt. Alle analysierten iPS Zellklone weisen dabei einen normalen Karyotyp auf (Fig. 6A). Durch die Sequenzierung konnte in den Patienten-spezifischen iPS Zellklonen die heterozygote *SHOX2* c.*28T>C Variante bestätigt werden (Fig. 6B). Der iPS Zellklon einer gesunden Kontrolle (Hans Klon#6) zeigt wie erwartet den Wildtyp Genotyp (T/T).

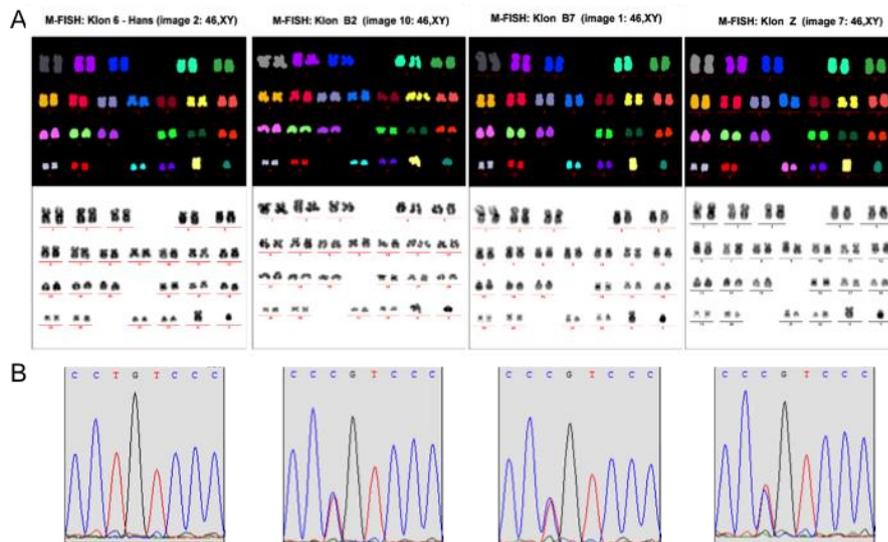


Fig 6. A) Karyotypisierung der iPSC Zellen Hans Klon#6 (Kontrolle), Shox2-iPSC Klon#2, Shox2-iPSC Klon#B7 und Shox2-iPSC Klon#Z. **B)** Sequenzierung der *SHOX2* 3'UTR zum Nachweis der zu untersuchenden heterozygoten Mutation c.*28T>C.

Nach Abschluss dieser detaillierten Charakterisierung durch beide Standorte erfolgte die Differenzierung der Patienten-spezifischen iPSCs zur Bestätigung der Pluripotenz-Eigenschaft *in vitro* zunächst am Standort München. Dafür wurden Embryoid bodies (EBs) spontan differenziert. Die anschließende Analyse Keimblatt-spezifischer Marker ergab, dass alle erzeugten iPSC Zellklone in Derivate der 3 Keimblätter differenzieren können (Fig. 7).

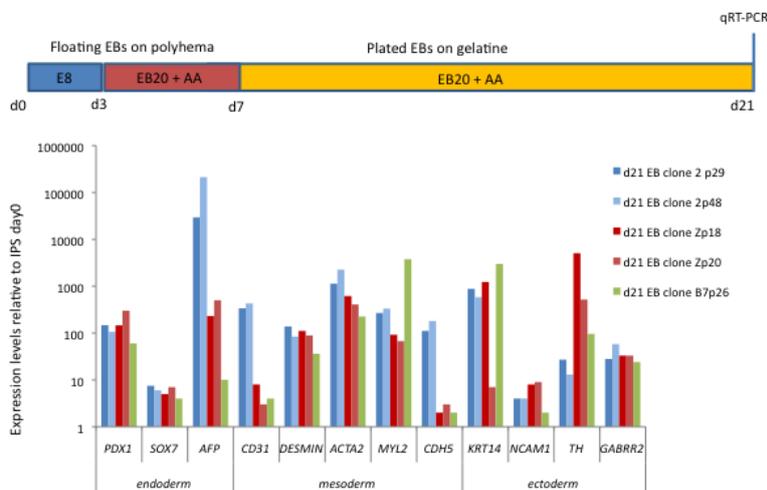


Fig 7. Differenzierung der iPSCs *in vitro*. Schematische Darstellung des spontanen Differenzierungsprotokolls (oben). Real-time RT-PCR Analyse Keimblatt-spezifischer Markergene in EBs (Embryoid bodies) an Tag 21 (unten).

Für weitergehende Analysen liegt unser Fokus in der Differenzierung der iPSCs zu Kardiomyoyten und der Verwendung kardialer Explantate. iPSC Zell-abgeleitete Kardiomyozyten konnten durch immunologische Färbung des Markers cardiac Troponin T nachgewiesen werden. Spezifische kardiale Zelltypen (ventrikuläre, atriale und nodale Kardiomyozyten) konnten am Standort Heidelberg nach Dissoziation kardialer Explantate durch Färbung entsprechender Marker (MLC-2V, MLC2A und SHOX2) detektiert werden (Fig. 8).

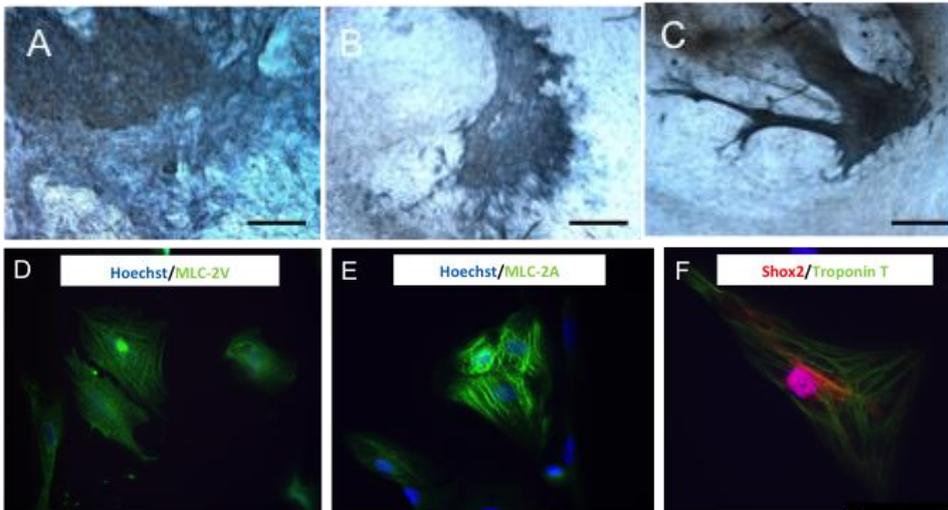


Fig 8. Immunfärbung spezifischer kardialer Marker. **A-C)** Detektion von cardiac troponin T in schlagenden Arealen der EBs an Tag 21 der Differenzierung. A: Shox2-iPSC clone#2 p38 , B: Shox2-iPSC clone#Z p20, C: Shox2-iPSC clone#B7 p26. Scale bar, 100μm. **D-F)** Detektion von MLC-2V, MLC-2A, SHOX2 und Troponin T in dissoziierten kardialen Explantaten.

Zusammenfassend konnten 3 Patienten-spezifische iPS Zellklone eines Patienten mit *SHOX2* Variante c.*28T>C generiert, charakterisiert und differenziert werden. Durch den Einsatz der bewilligten Mittel konnten somit alle in der Vorhabensbeschreibung beabsichtigten Arbeitsschritte durchgeführt und die geplanten Meilensteine erreicht werden:

- 1) Generierung (Standort München) und Charakterisierung (Standort München und Heidelberg) Patienten-spezifischer iPS Zellen durch Transkriptionsfaktor-basierte Reprogrammierung von T-Lymphozyten eines Vorhofflimmer Patienten mit *SHOX2* 3'UTR Variante (c.*28T>C)
- 2) Differenzierung der Patienten-spezifischen iPS Zellen in Kardiomyozyten (Standort München und Heidelberg)

Die erzielten Ergebnisse dienen außerdem als Grundlage für ein weiteres, bereits genehmigtes DZHK-Projekt („Modeling the genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias with patient-specific iPS cells“, FKZ 81X2500133).

2. den wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,

Für den Standort Heidelberg umfasste die Förderung insgesamt 7.000,- €. Diese Mittel beinhalteten entsprechend der Vorhabensbeschreibung:

- 6.500 € für Verbrauchsmittel (iPS Zellkultur, Molekularbiologische Analysen, Sequenzierung, Karyotypisierung)
- 500 € Reisekosten (Laboraufenthalt in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Alessandra Moretti zur Erlernung der iPS-Zellkultur und Differenzierung sowie zum wissenschaftlichen Austausch über das Forschungsvorhaben)

Die Mittel wurden wie geplant eingesetzt.

Für den Standort München umfasste die Förderung insgesamt 23.000,- €. Diese Mittel beinhalteten entsprechend der Vorhabensbeschreibung:

- 23.000 € für Zellkultur-Verbrauchsmittel (Transkriptionsfaktor-basierte Reprogrammierung humaner T-Lymphozyten mit Hilfe von Sendai-Viren, iPS Zellkultur, Charakterisierung der iPS Zellklone mittels qRT-PCR Analysen und Immunfärbungen , iPS Zell Differenzierung)

Die Mittel wurden wie geplant eingesetzt.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,

Mit der Experimentellen Pipeline werden ausgezeichnete wissenschaftliche Fähigkeiten, Fachkenntnisse und Infrastrukturen eines DZHK-Partners an anderen Standorten zur Verfügung gestellt. In diesem Projekt beteiligten sich beide Partnerstandorte wie folgt:

Standort München: Die Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Alessandra Moretti und Herrn Prof. Karl-Ludwig Laugwitz hat eine langjährige Expertise auf dem Gebiet der Stammzellen, insbesondere in der Reprogrammierung humaner Körperzellen und konnte daher für das beantragte Forschungsvorhaben Patienten-spezifische induzierbare pluripotente Stammzellen erzeugen. Zusätzlich unterstützte die Arbeitsgruppe mit Ihrer Expertise im Bereich der Differenzierung von iPSCs in spezifische kardiale Zelltypen.

Standort Heidelberg: Frau Dr. Sandra Hoffmann aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Rappold hat eine langjährige Expertise im Gebiet der Molekularen Humangenetik, insbesondere im Hinblick auf den Transkriptionsfaktor SHOX2 und liefert damit die Vorarbeiten und nötigen Kenntnisse, auf denen das Projekt basiert. Zusätzlich stellte die Arbeitsgruppe die notwendige Infrastruktur zur Charakterisierung und Differenzierung der iPSCs zur Verfügung.

4. dem voraussichtlichen Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans mit Zeithorizont,

Die erzielten Ergebnisse dienen als Grundlage für ein weiteres, bereits genehmigtes DZHK-Projekt („Modeling the genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias with patient-specific iPS cells“, FKZ 81X2500133), das als DZHK-Kooperationsprojekt mit Shared Expertise in der Translationalen Pipeline durchgeführt wird. Dieses Projekt wurde von Frau Dr. Hoffmann und Frau PD Dr. Moretti in Zusammenarbeit mit Herrn Prof Käab und Herrn Dr. Clauß beantragt. Frau Moretti stellt am Standort München hierfür die Shared Expertise SE043 zur Verfügung.

5. dem während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen,

Es sind von dritter Seite keine Ergebnisse bekannt geworden, die wesentlichen Einfluss auf die Verwertung der Ergebnisse nehmen.

6. den erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses.

Bislang sind aus dem Vorhaben noch keine Veröffentlichungen hervorgegangen, es wird jedoch darauf hingearbeitet. Die erzielten Ergebnisse werden mit den ausstehenden Ergebnissen des Nachfolgeprojekts „Modeling the genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias with patient-specific iPS cells“ in einem Manuskript zusammengefasst, um anschließend in einer Fachzeitschrift publiziert zu werden.

Wenn zur Wahrung berechtigter Interessen Ihrer Partnerinstitution oder Dritter oder aus anderen sachlichen Gesichtspunkten bestimmte Einzelheiten aus dem Bericht vertraulich zu behandeln sind (z.B. zur Wahrung der Priorität bei Schutzrechtsanmeldungen), so haben Sie ausdrücklich darauf hinzuweisen.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN „geplant“	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Säule B: Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for atrial fibrillation	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Dr. Sandra Hoffmann Prof. Dr. Gudrun Rappold	5. Abschlussdatum des Vorhabens Dezember 2015
	6. Veröffentlichungsdatum „geplant“
	7. Form der Publikation „geplant“
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Universitätsklinikum Heidelberg Institut für Humangenetik Abteilung Molekulare Humangenetik Im Neuenheimer Feld 366 69120 Heidelberg	9. Ber. Nr. Durchführende Institution -
	10. Förderkennzeichen *) 81X2500113
	11. Seitenzahl 9
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) 1. Bundesministerium für Bildung und Forschung Kapelle-Ufer 1 10117 Berlin 2. Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst Baden-Württemberg Königstraße 46 70173 Stuttgart	13. Literaturangaben 14
	14. Tabellen -
	15. Abbildungen 8
16. Zusätzliche Angaben -	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) -	
18. Kurzfassung Derzeitiger Stand von Wissenschaft und Technik <u>Begründung/Zielsetzung der Untersuchung</u> Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung, die zugrundeliegenden genetischen Mechanismen sind jedoch nur unzureichend aufgeklärt. In vorangegangenen Studien konnten wir erstmals eine Variante in der 3'UTR des <i>SHOX2</i> Gens in Patienten mit Vorhofflimmern identifizieren und damit assoziieren. Spezifische iPS-Zellen dieser Patienten sollen nun dazu dienen die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen näher zu untersuchen und damit zum besseren Verständnis der komplexen Genetik des Vorhofflimmerns beitragen. <u>Methode</u> Die Generierung von Patienten-spezifischen iPS Zellen erfolgte durch Reprogrammierung von T-Lymphozyten eines Vorhofflimmer Patienten mit <i>SHOX2</i> Variante (c.*28T>C). Anschließend wurden die erzeugten iPS Zellen im Detail charakterisiert und differenziert. <u>Ergebnis</u> Insgesamt konnten 3 iPS Zellklone eines Vorhofflimmer Patienten mit <i>SHOX2</i> 3'UTR Variante generiert werden. Alle 3 Klone weisen die typische humane ESC-ähnliche Morphologie auf und konnten positiv für den Pluripotenz Marker Alkalische Phosphatase getestet werden. Weitere Charakterisierungsschritte umfassten den Nachweis der integrationsfreien Reprogrammierung, Reaktivierung der endogenen Pluripotenz-Gene mittels qRT-PCR und Immunfärbung, Karyotyp-Analyse und Überprüfung der Mutation durch Sequenzierung. Anschließend konnten alle 3 iPS Zell Klone <i>in vitro</i> in alle Derivate der drei Keimblätter differenziert werden. Insbesondere die Differenzierung in schlagende kardiale Cluster war von besonderem Interesse. <u>Schlussfolgerung/Anwendungsmöglichkeiten</u> Die generierten Patienten-spezifischen iPS Zellen sind die Grundlage für ein Nachfolgeprojekt, in welchem unter Verwendung dieses Modells die genetischen und molekularen Grundlagen von Vorhofflimmern näher untersucht werden sollen.	
19. Schlagwörter Patienten-spezifische iPS Zellen, Vorhofflimmern, SHOX2	
20. Verlag -	21. Preis -