



**Technische Universität München**

**Fakultät für Medizin**

**Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie des Deutschen Herzzentrums  
München**

**Patienten-spezifisches iPSC Modell zur funktionellen und  
molekularen Analyse des Holt-Oram Syndroms**

**Martina Dreßen**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

**Vorsitzende/r:** Prof. Dr. Heiko Lickert

**Prüfer der Dissertation:**

1. apl. Prof. Dr. Markus Krane
2. Prof. Angelika Schnieke, Ph.D
3. Prof. Dr. Eckhard Wolf

Die Dissertation wurde am 22.08.2019 bei der der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.06.2020 angenommen.



## **Danksagung**

Diese Arbeit widme ich meinen Kindern Magdalena und Maximilian.

Ich seid das aller Wichtigste in meinem Leben und ich bin über glücklich euch zu haben.

Danke, liebe Mama. Du bist immer für mich und die Kinder da und springst immer ein, wenn Not am Mann ist – und das war in den letzten Jahren oft der Fall.

Ein großer Dankeschön möchte ich PD Dr. med. Markus Krane aussprechen. Er war immer mit Rat und Tat zur Seite. Er nahm sich immer die nötige Zeit für mich. Seine Unterstützung und Ideen haben viel zu dieser Arbeit beigetragen.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. rer. nat. A. Schnieke für die Betreuung meiner Dissertation bedanken. Ihre Vorschläge und ihre Meinung zu meiner Arbeit habe ich mit großem Dank entgegen genommen und umgesetzt.

Ich möchte mich besonders bei PD Dr. rer. nat. Harald Lahm bedanken. Es gibt keinen besseren Mentor. Er ist immer für einen da, weiß auf alles eine Antwort und findet Lösungen bei kleinen und großen Problemen.

Ich möchte mich bei Irina Neb, Claudia Abou-Ajram, Nicole Beck, Zhong Zhang und Klaudia Wolf bedanken. Humane iPS Kultur ist was ganz Besonderes. Spannend, anstrengend, zeitaufwendig und manchmal frustrierend. Mit euch als Team funktioniert es perfekt. Ich danke euch für eure Unterstützung und hoffe, dass wir noch lange so zusammenarbeiten werden.

Ich möchte mich bei der ganzen Abteilung der Experimentellen Chirurgie bedanken. Ich denke man kann sich keinen schöneren Arbeitsplatz wünschen.



# Patienten-spezifisches iPS Model zur funktionellen und molekularen Analyse des Holt-Oram Syndroms

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>xi</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>xvii</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>xix</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>xxi</b>
<b>Abstract</b>	<b>xxiii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Angeborene Herzfehler</b>	<b>1</b>
1.1.1 Prävalenz angeborener Herzfehler	1
1.1.2 Klassifikation von angeborenen Herzfehlern	2
1.1.3 Ätiologie von angeborenen Herzfehlern	2
1.1.4 Holt-Oram Syndrom	5
<b>1.2 Humane induzierte pluripotente Stammzellen und <i>Disease-Modelling</i></b>	<b>6</b>
<b>1.3 Genom-Editierung</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Ziel der Arbeit</b>	<b>9</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Ethikvoten und Genehmigungen</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Anamnese der HOS Indexfamilien</b>	<b>11</b>
<b>2.3 Material</b>	<b>11</b>
2.3.1 Utensilien	11
2.3.2 Chemikalien und Reagenzien	13
2.3.3 Kommerziell erworbene Kits	16
2.3.4 Antikörper	17

2.3.5	Oligonukleotide	18
2.3.6	Lösungen und Puffer	20
2.3.7	Medien	28
2.3.8	Zelllinien und Mikroorganismen	35
2.3.9	Mäuse	36
2.3.10	Geräte	36
2.3.11	Dienstleistungen	37
2.3.12	Webseiten/Datenbanken und Software Programme	37
2.3.13	Genehmigung zur Reproduktion von Abbildungen	39
<b>2.4</b>	<b>Methoden</b>	<b>39</b>
2.4.1	Zellzahlbestimmung	39
2.4.2	Isolation und Kryokonservierung von Zellen	39
2.4.2.1	Murine embryonale Fibroblasten	40
2.4.2.2	Periphere mononukleäre Blutzellen	40
2.4.2.3	Humane Fibroblasten	41
2.4.3	Vervielfältigung von Plasmid DNA	41
2.4.3.1	Bakterielle Transformation	41
2.4.3.2	Plasmidpräparation	42
2.4.3.3	Anfertigung eines Glycerolstocks	42
2.4.4	Isolation von DNA und RNA	43
2.4.4.1	Isolation und Aufreinigung genomischer DNA aus Vollblut	43
2.4.4.2	Isolation und Aufreinigung von genomischer DNA aus Zellen	43
2.4.4.3	Isolation und Aufreinigung von RNA	43
2.4.4.4	Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der DNA und RNA	44
2.4.4.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	44
2.4.5	Produktion von cDNA	45

2.4.6	Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)	46
2.4.7	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	47
2.4.8	Sequenzierung	50
2.4.9	Immunzytologische Färbung	51
2.4.9.1	Immunzytologische Färbung von HEK 293 Zellen	52
2.4.9.2	Immunzytologische Färbung von induzierten pluripotenten Stammzellen	52
2.4.9.3	Immunzytologische Färbung des Flag-Tags in differenzierenden Kardiomyozyten	53
2.4.9.4	Immunzytologische Färbung von Kardiomyozyten	53
2.4.10	Durchflusszytometrische Analyse	54
<b>2.5</b>	<b>Untersuchung genetischer Varianten</b>	<b>56</b>
2.5.1	Exom Sequenzierung	56
2.5.2	Amplifikation der genomischen <i>TBX5</i> Sequenz, der <i>TBX5</i> Promotor- und Enhancerregionen zur Identifikation genetischer Varianten in den HOS Indexfamilien	57
<b>2.6</b>	<b>Charakterisierung der identifizierten <i>TBX5 de novo</i> Mutation p.Pro85Thr des Indexpatienten 1460</b>	<b>57</b>
2.6.1	Entwicklung der <i>TBX5</i> Proteinstruktur und Vorhersage des funktionalen Effekts der Mutation	57
2.6.2	Gezielte Mutagenese des <i>TBX5</i> Gens an Position c.920 C→A	58
2.6.3	Vergleich der Genexpression in HEK 293 Zellen transfiziert mit humanem <i>TBX5</i> <sup>mut</sup> und <i>TBX5</i> <sup>WT</sup>	60
2.6.4	Funktionalität der <i>TBX5</i> Mutation c.920 C→A im Luziferase-Reporter Assay	61
<b>2.7</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>63</b>
2.7.1	Kultivierung von humanen Fibroblasten	63
2.7.2	Kultivierung von peripheren mononukleären Blutzellen	63
2.7.3	Kultivierung von induzierten pluripotenten Stammzellen	63
<b>2.8</b>	<b>Humanes induziertes pluripotentes Stammzellmodell zur Untersuchung des Holt-Oram Syndroms</b>	<b>65</b>

2.8.1	Reprogrammierung	65
2.8.1.1	Reprogrammierung humaner Fibroblasten	66
2.8.1.2	Reprogrammierung peripherer mononukleärer Blutzellen	68
2.8.2	Charakterisierung der generierten induzierten pluripotenten Stammzellen	70
2.8.3	Differenzierung von induzierten pluripotenten Stammzellen	75
2.8.3.1	Spontane Differenzierung	75
2.8.3.2	Gerichtete Differenzierung	77
2.8.3.3	Statistik	78
2.8.4	Untersuchungen der Kardiomyozyten des Indexpatienten 1460	78
<b>2.9</b>	<b>Genom-Editierung und CRISPR/Cas</b>	<b>78</b>
2.9.1	TBX5-Flag Donorkonstrukt	79
2.9.2	sgRNA Design	79
2.9.3	Generierung TBX5-Flag editierter humaner induzierter pluripotenter Stammzellen	82
2.9.4	Charakterisierung der CRISPR/Cas9 editierten iPS Zellen E5 TBX5Flag <sup>hom</sup> 331	84
2.9.5	Nachweis der Flag Funktionalität	85
2.9.5.1	Flag Genexpression	85
2.9.5.2	Western Blot	85
2.9.5.3	Durchflusszytometrie	87
2.9.5.4	Immunzytochemie	87
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>88</b>
<b>3.1</b>	<b>Anamnese der HOS Indexfamilien</b>	<b>88</b>
<b>3.2</b>	<b>Genetische Untersuchungen der HOS Indexpatienten und ihrer Verwandten ersten Grades</b>	<b>91</b>
3.2.1	Identifikation von <i>de novo</i> Mutationen in Patienten mit HOS	91



3.2.2	Genotypisierung des <i>TBX5</i> Lokus der HOS Indexpatienten 780, 950, 972, 804 und 1460	93
<b>3.3</b>	<b>Charakterisierung der neu identifizierten <i>de novo</i> Mutation p.Pro85Thr des HOS Indexpatienten 1460 im <i>TBX5</i> Protein</b>	<b>95</b>
3.3.1	3-dimensionale Strukturanalyse der <i>TBX5</i> -DNA Interaktion und Relevanz der Position Prolin an Aminosäureposition 85 des <i>TBX5</i> Proteins	96
3.3.2	Auswirkungen der p.Pro85Thr Mutation auf die Aktivität des <i>NPPA</i> Promotors	97
3.3.3	Effekte der p.Pro85Thr Mutation auf die Expression von <i>TBX5</i> Zielgenen	99
3.3.4	Identifikation der subzellulären Lokalisation der p.Pro85Thr Mutante	99
<b>3.4</b>	<b>Humanes HOS-spezifisches induziertes pluripotentes Stammzellmodell</b>	<b>101</b>
3.4.1	Generierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen	101
3.4.1.1	Generierung der iPS Zellen des HOS Indexpatienten 1460 aus Fibroblasten	101
3.4.1.2	Generierung der iPS Zellen der HOS Indexpatientin 804-K und ihrer gesunden Eltern 804-MU und 804-VA aus peripheren mononukleären Blutzellen	103
3.4.2	Charakterisierung der generierten iPS Zellen	106
3.4.3	Funktionelle Analysen des Holt-Oram Syndroms in einem humanen iPS Modell	116
3.4.3.1	Identifikation eines <i>in vitro</i> Phänotyps basierend auf der spontanen Differenzierung von HOS patienten-spezifischen iPS Zellen mit und ohne Mutation im <i>TBX5</i> Gen	116
3.4.3.2	Verifikation der identifizierten differenziell exprimierten Gene als Schlüsselregulatoren der kardialen Differenzierung in einem gerichteten Differenzierungsprotokoll	129
3.4.3.3	Maturierung der Kardiomyozyten des HOS Indexpatienten 1460	145
<b>3.5</b>	<b>Genom-Editierung von humanen iPS Zellen</b>	<b>146</b>
3.5.1	Generierung <i>TBX5</i> Flag markierter iPS Zellen	146
3.5.2	Charakterisierung der <i>TBX5</i> Flag markierten iPS Zellen	149
3.5.3	Untersuchung des Induktionsprofils von <i>in vitro</i> differenziell regulierten Genen in den editierten iPS Zellen E5 <i>TBX5</i> Flag <sup>hom</sup> Klon 331 unter Verwendung eines gerichteten Differenzierungsprotokolls	151
3.5.4	Nachweis der Funktionalität des <i>TBX5</i> Flag-Tags	154

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>157</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>180</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>183</b>
	<b>Supplement</b>	<b>207</b>
	<b>A Supplement Abbildungen</b>	<b>207</b>
	<b>B Supplement Tabelle</b>	<b>233</b>
	<b>C Publikationen</b>	<b>236</b>
	<b>D Vorträge</b>	<b>239</b>
	<b>E Posterpräsentationen</b>	<b>240</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Diammoniumsulfat
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
A	Absorptionskoeffizient
A	Nukleinbase Adenin
ACTA2	engl. <i>Actin-Alpha-2, Alpha-Cardiac Actin</i>
ACTB	engl. <i>Actin Beta</i>
ACTC1	engl. <i>Alpha Actin 1, cardiac</i>
AF	adipose Fibroblasten, engl. <i>adipose fibroblasts</i>
AFP	engl. <i>Alpha Fetoprotein</i>
AHF	Angeborener Herzfehler
AK	Antikörper
ANF	engl. <i>Atrial Natriuretic Factor</i>
aq. bidest.	bidestilliertes Wasser, lat. <i>Aqua bidestillata</i>
AS	Aortenstenose, engl. <i>aortic stenosis</i>
ASD	Atriumseptumdefekt, engl. <i>atrial septal defect</i>
ATP	engl. <i>Adenosine triphosphate</i>
AU	engl. <i>Arbitrary Units</i>
AV Block	Atrioventrikulärer Block, engl. <i>atrioventricular block</i>
AVSD	Atrioventrikulärer Septumdefekt, engl. <i>atrioventricular septal defect</i>
AZU1	<i>Azurocidin 1</i>
B	<i>Brachyury</i>
BAV	bikuspide Aortenklappe, engl. <i>bicuspid aortic valve</i>
b-FGF	engl. <i>basic fibroblast growth factor</i>
BLAST	engl. <i>Basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar/e, engl. <i>base pair/s</i>
BSA	Rinderserumalbumin, engl. <i>Albumin from Bovine Serum</i>
C	Nukleinbase Cytosin
C/EBPa	C/EBP Alpha
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
Cas9	engl. <i>CRISPR-associated endonuclease 9</i>
CD31	engl. <i>Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule 1, syn. PECAM-1</i>
CDM3	engl. <i>chemically Defined Medium 3</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
CHD	engl. <i>Congenital Heart Disease</i>
CHD7	engl. <i>Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 7</i>
CIS	engl. <i>cis-regulatory element</i>
CIU	engl. <i>cell infectious units</i>
cm	Zentimeter, engl. <i>centimeter</i>
CM	Kardiomyozyten, engl. <i>cardiomyocytes</i>
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CMV	Zytomegalovirus, engl. <i>cytomegalovirus</i>
c-MYC	engl. <i>MYC Proto-Oncogene, bHLH Transcription Factor</i>
CNV	Veränderungen der Kopienzahlen, engl. <i>copy number variants</i>
CoA	Aortenisthmustrenose, engl. <i>coarctation of the aorta</i>
CPRG	Chlorophenol red β-D-Galaktopyranosid, engl. <i>chlorophenol red β-D-galactopyranosid</i>
CRISPR	engl. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRISPR/Cas	engl. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein</i>
CRISPR/Cas9	engl. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated endonuclease 9</i>
CRISPR/Cf1	engl. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats from Prevotella and Francisella</i>
ct	engl. <i>cycle treshold</i>
D	Tag, engl. <i>day</i>
DAPI	engl. <i>4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCRI	<i>Duke Clinical Research Institute</i>

dCTP	Desoxycytidintriphosphat
del	Deletion, engl. <i>deletion</i>
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHM	Deutsches Herzzentrum München
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	engl. <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>DeoxyriboNucleic Acid</i>
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DORV	engl. <i>double outlet right ventricle</i>
D-PBS	Dulbecco's Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, engl. <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
dsDNA	engl. <i>double-stranded DNA</i>
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Deoxyuridintriphosphate
E	Effizienz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. cup</i>	Eppendorfgefäß, engl. <i>Eppendorf cup</i>
EBs	engl. <i>embryoid bodies</i>
EC	engl. <i>endothelial cells</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, engl. <i>Ethylendiamintetraacetat</i>
EHS	engl. <i>Engelbreth-Holm-Swarm</i>
EKG	Elektrokardiogramm
ELN	<i>Elastin</i>
EMSA	engl. <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
enh	engl. <i>Enhancer</i>
ES	Embryonale Stammzellen
ES Zellen	Embryonale Stammzellen
ESchG	Embryonenschutzgesetz
<i>et al.</i>	und andere, lat. <i>et alii, et aliae, et alia</i>
etc.	lat. <i>et cetera</i>
EVC	engl. <i>Ciliary Complex Subunit1</i> , Ellis-Van Creveld Syndrome Protein
EVC2	engl. <i>Ciliary Complex Subunit2</i> , Ellis-Van Creveld Syndrome Protein 2
F	Fibroblasten, engl. <i>fibroblasts</i>
F	engl. <i>forward</i>
FACS	engl. <i>fluorescence-activated cell scanning</i>
FCS	Fötales Kälberserum, engl. <i>fetal calve serum</i>
FGF	engl. <i>fibroblast growth factor</i>
FGF-2	engl. <i>fibroblast growth factor 2</i>
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FLT-3	engl. <i>Fms-related Tyrosin Kinase 3 Ligand</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht, engl. <i>forward scatter</i>
Fwd	engl. <i>forward</i>
G	Nukleinbase Guanin
<i>g</i>	Fallbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gRNA	engl. <i>guide RNA</i>
GATA4	engl. <i>Transcription Factor GATA-4</i>
GATA6	engl. <i>Transcription Factor GATA-6</i>
GDF3	engl. <i>Growth Differentiation Factor 3</i>
GDM	Gestationsdiabetes mellitus
GJA5	engl. <i>Gap Junction Protein Alpha 5</i> , syn. <i>Connexin 40</i>
gRNA	engl. <i>guide RNA</i>
GSK3 $\alpha$	Glykogensynthase Kinase 3 $\alpha$
GSK3 $\beta$	Glykogensynthase Kinase 3 $\beta$
GT	engl. <i>genotyping</i>
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien, engl. <i>genome wide association studies</i>
h	Stunde/n, engl. <i>hour/s</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie, eng. <i>hypotrophic cardiomyopathy</i>
HDR	Homologe Reparatur, engl. <i>homology directed repair</i>
HEK	Humane embryonale Nierenzellen, engl. <i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

hES Zellen	humane Embryonale Stammzellen
hESC	Humane Embryonale Stammzellen, engl. <i>human embryonic stem cells</i>
HEY2	engl. <i>Hes Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif 2</i>
hiPS Zellen	Humane induzierte pluripotente Stammzellen
hiPSC	humane induzierte pluripotente Stammzellen, engl. <i>human induced pluripotent stem cells</i>
HLH	Hypoplastisches Linksherz, engl. <i>hypoplastic left heart</i>
HOS	Holt-Oram Syndrom
hPSC	Humane pluripotente Stammzellen, engl. <i>human pluripotent stem cells</i>
HRP	engl. <i>horseradisch peroxidase</i>
HVJ	engl. <i>Hemagglutinating Virus of Japan</i>
IAA	unterbrochener Aortenbogen, engl. <i>interrupted aortic arch</i>
ICC	Immunzytochemie, engl. <i>immuncytochemistry</i>
ICD	engl. <i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
ID	Identifikation, engl. <i>identification</i>
ID2	engl. <i>Inhibitor of DNA Binding 2</i>
IEG	engl. <i>immediate early genes</i>
IF	Immunfluoreszenz, engl. <i>immunofluorescence</i>
Ig	Immunglobulin
IL-3	Interleukin 3
IL-6	Interleukin 6
Indel	Insertion/Deletion, engl. <i>indeletion</i>
IPCCC	engl. <i>International Pediatric and Congenital Cardiac Code</i>
iPS Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
IQR	Interquartilsabstand
IRX4	engl. <i>Iroquois Homeobox 4</i>
ISL1	eng. <i>ISL LIM Homeobox 1</i>
iStable	engl. <i>Integrated predictor for protein stability change upon single mutation</i>
IVF	<i>in vitro</i> Fertilisation
JAG1	engl. <i>Jagged-1 Ligand</i>
K	Kind
K	Kalium
KaBi-DHM	Kardiovaskuläre Biobank des Deutschen Herzzentrums München
kb	Kilobase/n, engl. <i>kilobase/s</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton, engl. <i>kilodalton</i>
KLF4	engl. <i>Kruppel Like Factor 4</i>
KRT14	engl. <i>Keratin 14</i>
KSR	<i>Knock-out Serum</i>
l	Liter, engl. <i>liter</i>
LB	engl. <i>Lysogeny Broth</i>
LC	engl. <i>Light Cyclers</i>
LEOPARD	engl. <i>Lentigines, Electrocardiographic abnormalities, Ocular hypertelorism, Pulmonary valve stenosis, Abnormal genitalia, Retardation of growth and Deafness</i>
ln	natürlicher Logarithmus (Basis e)
log	Dekadischer Logarithmus (Basis 10)
LV	Linker Ventrikel, engl. <i>left ventricle</i>
M	Molar, engl. <i>molar</i>
M	Mittelwert, engl. <i>mean value</i>
m	Steigung
MAP	engl. <i>mitogen-activated protein</i>
mm	Millimeter
MEF	murine embryonale Fibroblasten, engl. <i>murine embryonale fibroblasts</i>
MESP1	engl. <i>Mesoderm Posterior BHLH Transcription Factor 1</i>
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Magnesiumsulfatheptahydrat
min	Minute/n, engl. <i>minute/s</i>
Mio	Millionen
miPS	murine induzierte pluripotente Stammzellen
ml	Milliliter
MLC2A	engl. <i>Myosin Light Chain 2, atrial isoform</i>
MLC2V	engl. <i>Myosin Light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform</i>
mm	Millimeter

mM	Millimolar
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
M-MLV	engl. <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
M-MLV RT	engl. <i>Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase</i>
MOI	engl. <i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
ms	Millisekunde/n, engl. <i>millisecond/s</i>
MS	Mitralstenose, engl. <i>mitral stenosis</i>
MU	Mutter
mut	engl. <i>mutant</i>
MYH6	engl. <i>Alpha Myosin Heavy Chain</i>
MYH7	engl. <i>Beta Myosin heavy Chain</i>
MYL	engl. <i>myosin light chain</i>
MYL2	engl. <i>Myosin Light Chain 2, syn. MLC2V</i>
MYL7	engl. <i>Myosin Light Chain 7, syn. MLC2A</i>
n	Stichprobenumfang
Na	Natrium
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Dinatriumhydrogenphosphatheptahydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Dinatriumhydrogenphosphatmonohydrat
NANOG	engl. <i>Nanog Homeobox, syn. Homeobox Transcription Factor Nanog</i>
NaOH	Natronlauge
NCB Lab	engl. <i>Natural Computing &amp; Bioinformatics Laboratory</i>
NCBI	engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
NHEJ	engl. <i>non-homologous end-joining</i>
NKX2.5	engl. <i>NK2 Homeobox 5</i>
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NOTCH1	engl. <i>Notch (Drosophila) homolog 1 (translocation-associated), Notch homolog1</i>
NOTCH2	engl. <i>Notch (Drosophila) homolog 2 (translocation-associated), Notch homolog2</i>
NPPA	engl. <i>Natriuretic Peptide A</i>
NVM	engl. <i>non compaction of ventricular myocardium</i>
OCT4	engl. <i>POU Class 5 Homeobox 1, syn. Octamer-Binding Protein 4</i>
OFT	Ausflusstrakt, engl. <i>outflow tract</i>
p	kurzer Arm des Chromosoms
p	Passage
p	Promotor
P/S	Penicillin/Streptomycin
p1/p2	Promotorbereich 1/2
PAM	Vorabstandshalter-angrenzendes Motiv, engl. <i>protospacer adjacent motif</i>
PAN	Prävalenz Angeborener Herzfehler bei Neugeborenen in Deutschland
PAPVR	Lungenvenenfehlöffnung, engl. <i>partial anomalous pulmonary venous return</i>
PAS	Pulmonalarterienstenose, engl. <i>pulmonary artery stenosis</i>
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen, engl. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	engl. <i>phosphate buffered saline containing Triton-X-100</i>
PC	Progenitorzellen, engl. <i>progenitor cells</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PDA	persistierender <i>Ductus arteriosus</i> , engl. <i>patent ductus arteriosus</i>
Pen	Penicillin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PFO	Persistierendes Foramen ovale, engl. <i>patent foramen ovale</i>
pH	lat. <i>potentia hydrogenii</i>
pHEMA	Poly-2-Hydroxyethylmethacrylat
PHF	Primäres Herzfeld
pmol	Pikomol
PolyPhen-2	engl. <i>Polymorphism Phenotyping version 2</i>
PPS	Periphere Pulmonalstenose, engl. <i>peripheral pulmonary stenosis</i>
PRKAG2	engl. <i>Phosphorylase kinase catalytic subunit gamma 2</i>
PS	Pulmonalstenose, engl. <i>pulmonary stenosis</i>
PTPN11	engl. <i>Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 11</i>

PVDF	engl. <i>PolyVinylidene Fluoride</i>
PVS	Pulmonalklappenstenose, engl. <i>pulmonary valve stenosis</i>
q	Lange Arm des Chomosoms
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion, engl. <i>quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
R	engl. <i>reverse</i>
R <sup>2</sup>	Bestimmungsmaß
RCSB PDB	engl. <i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics - Protein Data Bank</i>
Rev	engl. <i>reverse</i>
REX1	engl. <i>ZFP42 Zinc Finger Protein</i> , syn. <i>Reduced Expression Protein 1</i>
RIPA	engl. <i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RLB	engl. <i>Reporter Lysis Buffer</i>
RNS/RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>RiboNucleic Acid</i>
ROCKI	engl. <i>Rho-associated protein kinase I</i>
ROCKII	engl. <i>Rho-associated protein kinase II</i>
ROX	5-Carboxy-Rhodamin-X
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. <i>rotation per minute</i>
RPMI	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Tanskriptase, engl. <i>reverse transcriptase</i>
RT	Echtzeit, engl. <i>real time</i>
RT-PCR	engl. <i>real-time polymerase chain reaction</i>
RV	Rechter Ventrikel
s	Streuung
s	Sekunde/n, engl. <i>second/s</i>
SAN	Sinusknoten, engl. <i>sinoatrial node</i>
SBS	engl. <i>sequencing-by synthesis</i>
SCF	engl. <i>Stem Cell Factor</i>
SD	Standardabweichung, engl. <i>Standard Deviation</i>
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Sekunde/n, engl. <i>second/s</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwerts, engl. <i>standard error of the mean</i>
SeV	Sendai virus
SF	engl. <i>Smartflares</i>
sgRNA	engl. <i>single guide RNA</i>
SHF	Sekundäres Herzfeld
SMC	engl. <i>smooth muscle cells</i>
SNP	engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>
SOB	engl. <i>super optimal broth</i>
SOC	engl. <i>super optimal broth medium mit Catabolit Unterdrückung</i>
SOX2	engl. <i>SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2</i>
SOX7	engl. <i>SRY (Sex Determining Region Y)-Box 7</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht, engl. <i>side scatter</i>
Strep	Streptomycin
STS-CHSD	engl. <i>Society of Thoracic Surgeons Congenital Heart Surgery Database</i>
SVAS	Supravalvuläre Aortenstenose, engl. <i>supravalvular aortic stenosis</i>
T	NukleinbaseThymin
TA	Trikuspidalatresie, engl. <i>tricuspid atresia</i>
TALEN	engl. <i>transcription activator-like effector nuclease</i>
TBE	TRIS Borat EDTA Puffer
TBX1	engl. <i>T-Box Transcription Factor TBX1</i>
TBX20	engl. <i>T-Box Transcription Factor TBX20</i>
TBX5	engl. <i>T-Box Transcription Factor TBX5</i>
TF	Transkriptionsfaktor/Transkriptionsfaktoren, engl. <i>transcription factor/transcription factors</i>
TFAP2B	engl. <i>Transcription Factor AP-2 Beta</i>
TFGβ1	engl. <i>Transforming Growth Factor β1</i>
TGA	Transposition der großen Arterien, engl. <i>transposition of the great arteries</i>
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor, engl. <i>transforming growth factor</i>
TH	engl. <i>Tyrosine Hydroxylase</i>
THEMIS2	engl. <i>Thymocyte Selection Associated Family Member 2</i>
TierSchG	Tierschutzgesetz
TNNI3	engl. <i>Troponin I3, Cardiac Type</i>
TNNT2	engl. <i>Troponin T2, Cardiac Type</i>

TOF	Fallot'sche Tetralogie, engl. <i>tetralogy of Fallot</i>
TRA1-81	Syn. Podocalyxin
Tris Cl	Tris-Chlorid
U	engl. <i>Units</i>
UK	engl. <i>United Kingdom</i>
USA	Vereinigte Staaten von Amerika, engl. <i>United States of America</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v	Varianz
v/v	engl. <i>volume per volume</i>
VA	Vater
w/v	engl. <i>weight per volume</i>
VSD	Ventrikelseptumdefekt, engl. <i>ventricular septal defect</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation, engl. <i>World Health Organisation</i>
WES	Genomsequenzierung, engl. <i>Whole Exome Sequencing</i>
y	Lineare Regression
ZFN	engl. <i>zinc finger nuclease</i>
zp	Schnittpunkt der y-Achse



## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Workflow der Reprogrammierung von Fibroblasten	66
<b>Abbildung 2:</b> Workflow der Reprogrammierung von PBMC	68
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung der Struktur und des Funktionsprinzips fluoreszenz-markierter Nanopartikel	72
<b>Abbildung 4:</b> Sequenzalignment der humanen, murinen und porcinen mRNA Sequenzen der Pluripotenmarker <i>NANOG</i> und <i>GDF3</i>	73
<b>Abbildung 5:</b> Workflow der spontanen Differenzierung zum Nachweis keimblattspezifischer Marker	74
<b>Abbildung 6:</b> Workflow der spontanen Differenzierung humaner iPS Zellen	75
<b>Abbildung 7:</b> Workflow der gerichteten Differenzierung humaner iPS Zellen	77
<b>Abbildung 8:</b> CRISPR/Cas9 Technologie	79
<b>Abbildung 9:</b> Stammbäume der HOS Indexfamilien 780, 950, 972, 804 und 1460	88
<b>Abbildung 10:</b> Dokumentation des Krankheitsbildes der HOS Indexpatienten 1460 und 804	90
<b>Abbildung 11:</b> Genetische Analysen der HOS Indexfamilien	92
<b>Abbildung 12:</b> Identifikation der <i>TBX5</i> Mutationen der HOS Indexpatienten 780 und 1460	95
<b>Abbildung 13:</b> Charakterisierung der p.Pro85Thr Mutation des Indexpatienten 1460	96
<b>Abbildung 14:</b> Funktionelle Analyse der p.Pro85Thr Mutation im <i>TBX5</i> Gen	98
<b>Abbildung 15:</b> Darstellung der subzellulären Lokalisation von <i>TBX5</i> <sup>wt</sup> und <i>TBX5</i> <sup>mut</sup> Protein	100
<b>Abbildung 16:</b> Dokumentation der Reprogrammierung adipöser Fibroblasten und der sich daraus entwickelnden iPS Klone des HOS Indexpatienten 1460	102
<b>Abbildung 17:</b> Dokumentation der Morphologie der aktivierten PBMC der Indexfamilie 804 bis Tag D3 nach Transduktion	104
<b>Abbildung 18:</b> Dokumentation der Morphologie der sich entwickelnden iPS Klone der Indexfamilie 804	105
<b>Abbildung 19:</b> Charakterisierung der iPS Zellen des HOS Indexpatienten 1460	107
<b>Abbildung 20:</b> Charakterisierung der iPS Zellen der Probandin 804-MU	110
<b>Abbildung 21:</b> Charakterisierung der iPS Zellen des Probanden 804-VA	112
<b>Abbildung 22:</b> Charakterisierung der iPS Zellen der Indexprobandin 804-K	114
<b>Abbildung 23:</b> Genexpressionsanalyse der spontanen Differenzierung für humanes <i>NKX2.5</i>	117
<b>Abbildung 24:</b> Genexpressionsanalyse der spontanen Differenzierung für humanes <i>TBX5</i>	119
<b>Abbildung 25:</b> Genexpressionsanalyse der spontanen Differenzierung für humanes <i>NPPA</i>	121
<b>Abbildung 26:</b> Genexpressionsanalyse der spontanen Differenzierung für humanes <i>ISL1</i>	123

<b>Abbildung 27:</b> Genexpressionsanalyse der spontanen Differenzierung für humanes <i>TNNT2</i>	125
<b>Abbildung 28:</b> Genexpressionsanalyse der spontanen Differenzierung für humanes <i>TBX20</i>	127
<b>Abbildung 29:</b> Genexpressionsanalyse der gerichteten Differenzierung für humanes <i>NKX2.5</i>	130
<b>Abbildung 30:</b> Genexpressionsanalyse der gerichteten Differenzierung für humanes <i>TBX5</i>	132
<b>Abbildung 31:</b> Genexpressionsanalyse der gerichteten Differenzierung für humanes <i>NPPA</i>	134
<b>Abbildung 32:</b> Genexpressionsanalyse der gerichteten Differenzierung für humanes <i>ISL1</i>	136
<b>Abbildung 33:</b> Genexpressionsanalyse der gerichteten Differenzierung für humanes <i>TNNT2</i>	138
<b>Abbildung 34:</b> Genexpressionsanalyse der gerichteten Differenzierung für humanes <i>TBX20</i>	140
<b>Abbildung 35:</b> Zusammenfassung der Induktion für die spontane und gerichtete Differenzierung der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K im Vergleich zu den vier gesunden Kontrollprobanden	142
<b>Abbildung 36:</b> Zusammenfassung der Induktion für die spontane und gerichtete Differenzierung des HOS Indexpatienten 1460 im Vergleich zu der HOS Indexpatientin 804-K	143
<b>Abbildung 37:</b> Immunzytochemische Färbungen der gerichteten Differenzierung der iPS Zellen des Indexpatienten 1460 an Tag D30	145
<b>Abbildung 38:</b> CRISP/Cas9 Editierung der iPS Zellen des gesunden Probanden E5 mit einem Flag-Tag im <i>TBX5</i> Gen	147
<b>Abbildung 39:</b> Charakterisierung der CRISPR/Cas9 editierten iPS Zellen des homozygoten Klons 331 E5 <i>TBX5Flag<sup>hom</sup></i>	149
<b>Abbildung 40:</b> Charakterisierung der gerichteten Differenzierung für den E5 <i>TBX5Flag<sup>hom</sup></i> Klon 331	152
<b>Abbildung 41:</b> Nachweis der Funktionalität des <i>TBX5</i> -Flag Tags	154
<b>Abbildung 42:</b> Schematische Darstellung kardial relevanter Marker und ihre Bedeutung in der Kardiogenese	172

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Gene assoziiert mit isolierten AHF	4
<b>Tabelle 2:</b> Mikrodeletionen und Genmutationen assoziiert mit AHF	5
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Utensilien	11
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Chemikalien und Reagenzien	13
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete Kits	16
<b>Tabelle 6:</b> Verwendete Primärantikörper	17
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Sekundärantikörper	18
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete Oligonukleotide zur Amplifikation von genomischer DNA	19
<b>Tabelle 9:</b> Verwendete Oligonukleotide zur Amplifikation von cDNA	19
<b>Tabelle 10:</b> Kommerziell erworbene Medien	28
<b>Tabelle 11:</b> Zytokin-Supplementierung des PBMC Mediums	30
<b>Tabelle 12:</b> Zusammensetzung des iPSC Mediums	30
<b>Tabelle 13:</b> Zusammensetzung des TeSR™-E8™ Mediums	31
<b>Tabelle 14:</b> Zusammensetzung des spontanen Differenzierungsmediums	32
<b>Tabelle 15:</b> Zusammensetzung des gerichteten Differenzierungsmediums CDM3	33
<b>Tabelle 16:</b> Zusammensetzung des LB Mediums	34
<b>Tabelle 17:</b> Zusammensetzung des LB Agars	34
<b>Tabelle 18:</b> Zusammensetzung des SOC Mediums	35
<b>Tabelle 19:</b> Verwendete Geräte	36
<b>Tabelle 20:</b> Mastermix 1 der cDNA Synthese	45
<b>Tabelle 21:</b> Mastermix 2 der cDNA Synthese	46
<b>Tabelle 22:</b> Reaktionsbedingungen der cDNA Synthese	46
<b>Tabelle 23:</b> Ansatz der DNA Amplifikation	47
<b>Tabelle 24:</b> Reaktionsbedingungen der DNA Amplifikation	47
<b>Tabelle 25:</b> qRT-PCR Ansätze	48
<b>Tabelle 26:</b> Amplifikationsbedingungen Light Cycler® 1.5	49
<b>Tabelle 27:</b> Amplifikationsbedingungen Quant Studio 3	49
<b>Tabelle 28:</b> Anforderungen der Sequenzierung (Source BioScience)	51
<b>Tabelle 29:</b> Anforderungen der Sequenzierung (Eurofins GmbH)	51
<b>Tabelle 30:</b> Ansätze der Primärantikörper für die ICC von CM in der gerichteten Differenzierung	53
<b>Tabelle 31:</b> Ansätze der Sekundärantikörper für die ICC von CM in der gerichteten Differenzierung	54
<b>Tabelle 32:</b> Kombination der Primär- und Sekundärantikörper in der durchflusszytometrischen Analyse von CM an Tag D30 und D60	55
<b>Tabelle 33:</b> Spezifität des pcDNA3.1 <sup>(+)</sup>	59
<b>Tabelle 34:</b> Reaktionsansatz der Mutagenese	59
<b>Tabelle 35:</b> Bedingungen der Mutagenesereaktion	59
<b>Tabelle 36:</b> Ansätze der Transfektion zur Evaluierung der Genexpression in HEK 293 Zellen	60

<b>Tabelle 37:</b> Verwendete Plasmide zur Transfektion von HEK 293 Zellen	61
<b>Tabelle 38:</b> Transfektionsansätze	62
<b>Tabelle 39:</b> Reprogrammierungsvektoren des CytoTune®-iPS 2.0 Reprogramming Kits	66
<b>Tabelle 40:</b> Titer der Vektoren nach Angabe des Analysezertifikats für die Reprogrammierung der Fibroblasten des Indexpatienten 1460	67
<b>Tabelle 41:</b> Titer der Vektoren nach Angabe des Analysezertifikats für die Reprogrammierung der PBMC der Indexfamilie 804	69
<b>Tabelle 42:</b> Reaktionsansatz zur Überprüfung karyotypischer Anomalien	72
<b>Tabelle 43:</b> Amplifikationsbedingungen zur Überprüfung karyotypischer Anomalien	72
<b>Tabelle 44:</b> Anzahl der ausplattierten EBs pro Wachstumsfläche	76
<b>Tabelle 45:</b> Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung der sgRNAs	80
<b>Tabelle 46:</b> Phosphorylierung und Annealing der Oligonukleotide (Reaktion 1)	80
<b>Tabelle 47:</b> Bedingungen des Oligonukleotid-Annealings	80
<b>Tabelle 48:</b> Ligation (Reaktion 2)	80
<b>Tabelle 49:</b> Bedingungen der Ligation	81
<b>Tabelle 50:</b> Behandlung der Ligation mit der PlasmidSafe™ ATP-abhängigen DNase	81
<b>Tabelle 51:</b> Ansatz der Transfektion zur Bestimmung der Schneideeffizienz	81
<b>Tabelle 52:</b> Ansatz der Amplifikation genomischer DNA über die Schnittstellenregion der sgRNAs	82
<b>Tabelle 53:</b> Bedingungen der Amplifikation genomischer DNA über die Schnittstellenregion der sgRNAs	82
<b>Tabelle 54:</b> Ansatz zur Amplifikation der Flag Region	84
<b>Tabelle 55:</b> Bedingungen der Amplifikation der Flag Region	84

## Zusammenfassung

Das Holt-Oram Syndrom (HOS) gehört zu den Herz-Handsyndromen und ist durch Fehlbildungen der oberen Extremitäten und angeborene Herzfehler (AHF) charakterisiert. Das Syndrom wird autosomal dominant vererbt und ist mit einer Prävalenz von 1 auf 100.000 Lebendgeburten angegeben. AHF treten bei HOS Patienten mit einer hohen Inzidenz (>70%) auf, vor allem als Ventrikelseptumdefekte. Das klinische Bild des HOS ist variabel und selbst innerhalb einer Familie mit HOS kann der Phänotyp variieren.

In den 90er Jahren des letzten Jahrtausends wurde die genetische Ursache auf dem langen Arm von Chromosom 12 lokalisiert und erste ursächliche Mutationen im *TBX5* Gen identifiziert. Inzwischen sind mehr als 90 Mutationen im *TBX5* Gen bei Patienten mit HOS beschrieben. In 75% der Fälle kann das HOS auf eine Mutation im Transkriptionsfaktor (TF) *TBX5* zurückgeführt werden. Das HOS gehört somit zu den wenigen AHF, die in vielen Fällen auf eine eindeutige genetische Ursache zurückgeführt werden können.

Die Relevanz von *Tbx5* für die Morphogenese des Herzens und den Phänotyp des HOS, als Folge einer veränderten Genexpression von *Tbx5*, wurde durch spezifisch temporär und lokal modulierte Expressionsmuster in der Embryogenese von *M. musculus* und *D. rerio* untersucht. Verschiedene Studien zeigen, dass Erkenntnisse aus Tiermodellen nicht ohne Einschränkung auf den Menschen übertragbar sind. Diese Einschränkungen sind durch die Etablierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS Zellen), welche es ermöglichen humane Entwicklungsprozesse *in vitro* zu untersuchen, weitgehend aufgehoben. Publierte patienten-spezifische iPS Modelle zeigen, dass diese zellulären Systeme in der Lage sind, den *in vivo* Phänotyp widerzuspiegeln und grundlegende Mechanismen der Pathogenese aufzuklären.

In dieser Arbeit wurde ein patienten-spezifisches iPS Modell für das HOS etabliert, das es erlaubt die Rolle von *TBX5* in der humanen Kardiogenese zu untersuchen und Dysregulationen, die zur Ausbildung des HOS beitragen zu identifizieren. Für die Etablierung des patienten-spezifischen humanen iPS Modells wurden iPS Zellen von zwei HOS Indexpatienten generiert. Um die Variabilität des Syndroms widerzuspiegeln, wurde ein HOS Indexpatient ausgewählt, der eine *de novo* Mutation im *TBX5* Gen trägt, die bislang nicht beschrieben war und der einen stark ausgeprägten klinischen Phänotyp zeigt. Bei der zweiten HOS Indexpatientin lag keine Mutation im *TBX5* Gen vor und der klinische Phänotyp ist mild ausgeprägt. Als Kontrollen wurden iPS Zellen von zwei gesunden Probanden verwendet. Zudem wurden iPS Zellen aus peripheren mononukleären Blutzellen der Eltern der Indexpatientin ohne *TBX5* Mutation generiert. Alle generierten iPS Zellen zeigten sämtliche zellulären und molekularbiologischen Eigenschaften, die für undifferenzierte pluripotente Stammzellen charakteristisch sind.

Die neu identifizierte *de novo* Mutation des HOS Indexpatienten (Pro85Thr) wurde detailliert untersucht. Die Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch, der mit hoher Wahrscheinlichkeit in einer Konformationsänderung von *TBX5* resultiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des mutierten *TBX5* Proteins weniger als 5% des Wildtyp-*TBX5* Proteins beträgt und keine Aktivierung des Zielgens *NPPA* erfolgt. Eine nukleäre Exklusion als

Mechanismus der fehlenden Aktivität des mutierten TBX5 Proteins konnte ausgeschlossen werden.

Unter Verwendung eines spontanen Differenzierungsprotokolls wurde ein *in vitro* Phänotyp definiert, der die Entstehung des HOS erklären kann. Es konnte gezeigt werden, dass *TBX5* in der spontanen Differenzierung der HOS patienten-spezifischen iPS Zellen in geringerem Maße exprimiert wurde. Für weitere kardial relevante TF, wie *NKX2.5*, *ISL1* und *TBX20*, das Strukturprotein *Troponin T* sowie *NPPA* konnte ebenfalls eine Dysregulation der Expression nachgewiesen werden.

Protokolle für gerichtete Differenzierungen generieren Kardiomyozyten in großer Menge und Reinheit. Um sicherzustellen, dass das gerichtete Differenzierungsprotokoll den, in der spontanen Differenzierung definierten *in vitro* Phänotyp nicht beeinflusst, wurden die patienten-spezifischen iPS Zellen nach diesem Protokoll differenziert. Der identifizierte *in vitro* Phänotyp der spontanen Differenzierung konnte für die HOS Indexpatienten bestätigt werden. Der HOS Patient mit ausgeprägtem klinischem Krankheitsbild und vorhandener *TBX5* Mutation zeigte dabei einen deutlich stärker ausgeprägten *in vitro* Phänotyp als die Indexpatientin ohne *TBX5* Mutation und milderem Phänotyp.

Da vorhandene anti-TBX5 Antikörper in verschiedenen molekularbiologischen Anwendungen deutliche Unzulänglichkeiten zeigen, wurde in iPS Zellen unter Verwendung von CRISPR/Cas9 ein Flag-Tag in den Lokus des *TBX5* Gens eingebaut. Durch anti-Flag Antikörper kann das TBX5 Protein hochspezifisch nachgewiesen werden. In verschiedenen Experimenten wurde der korrekte Einbau des Flag-Tags, die vorhandene Funktionalität des Flag-Tags, die Spezifität von anti-Flag Antikörpern zur indirekten Detektion des TBX5 Proteins sowie eine nicht veränderte Expression des genetisch modifizierten Allels nachgewiesen.

Das in dieser Arbeit etablierte humane iPS Modell für das HOS ist geeignet, ein temporäres Expressionsmuster von *TBX5* im Verlauf der Kardiogenese zu definieren und Dysregulationen, die zur Ausbildung des HOS beitragen können, zu identifizieren. Die genetische Editierung dieser iPS Zellen stellt ein ideales *in vitro* Modellsystem dar, um zusätzlich zur Analyse des HOS Phänotyps weitergehende molekularbiologische Untersuchungen zur Biologie von TBX5 durchführen zu können, die bisher nicht möglich waren.

## Abstract

The Holt-Oram Syndrome (HOS) is assigned to the heart-hand syndromes and characterised by upper limb malformation and congenital heart defects (CHD). The syndrome is an autosomal dominant disorder with a prevalence of 1/100.000 live births. HOS patients have a high incidence (>70%) for CHD, in particular ventricular septal defects. The clinical phenotype is highly variable, even within a family.

In the 90ies of the last millennium the genetic cause was mapped to the long arm of chromosome 12 and first causative mutations in the *TBX5* gene were identified. In patients diagnosed with HOS, more than 90 mutations in the *TBX5* gene have been described so far. In more than 75% of the cases, HOS can be attributed to a mutation in the transcription factor (TF) *TBX5*. Thus, HOS is one of the few CHD, which can be attributed to a distinct genetic cause.

The relevance of *Tbx5* for the heart morphogenesis and the HOS phenotype, as a consequence of a reduced gene dose of *Tbx5*, was investigated in the embryogenesis of *M. musculus* and *D. rerio* by specifically modulating the temporary and spatial expression pattern. Various studies suggest, that the results obtained in animal models cannot directly be transferred to the human system. These limitations were significantly reduced by the establishment of human induced pluripotent stem cells (iPS cells). These cells allow the investigation of human developmental processes *in vitro*. Published patient-specific iPS models prove the ability of these cellular systems to recapitulate the *in vivo* phenotype and basic pathogenic mechanisms.

In this thesis, a HOS patient-specific iPS model was established to allow the investigation of the role of *TBX5* in human cardiogenesis and the identification of dysregulations, associated with the development of the HOS. Two HOS index patients were selected to establish a patient-specific human iPS model. To reflect the variability of the syndrome, one HOS index patient with a yet undescribed *de novo* mutation in the *TBX5* gene and a severe clinical phenotype was selected. The second selected HOS patient had no mutation in the *TBX5* gene and showed a mild phenotype. iPS cells from two healthy probands served as controls. Furthermore, iPS cells from peripheral mononuclear blood cells of the healthy parents of the index patient without *TBX5* mutation were generated. Every established iPS cell line showed all cellular and molecular requirements characteristic of undifferentiated pluripotent stem cells.

The yet undescribed *de novo* mutation of the index patient (Pro85Thr) was investigated in detail. The mutation caused a change of amino acids, most probably leading to a conformational change of the three-dimensional structure of *TBX5*. It was shown, that the biological activity of the mutated *TBX5* protein was reduced to less than 5% of the wild-type *TBX5* protein and was unable to activate expression of the target gene *NPPA*. In addition, nuclear exclusion could be excluded as a mechanism for the impaired biological activity of the mutated *TBX5* protein.

Using a protocol for spontaneous differentiation, an *in vitro* phenotype was defined which could possibly explain the development of HOS. It could be shown, that *TBX5* was expressed

at lower levels in HOS patient-specific iPS cells during spontaneous differentiation. Furthermore, additional cardiac TFs, including *NKX2.5*, *ISL1* and *TBX20*, as well as *Troponin T* and *NPPA* were dysregulated.

Protocols for direct cardiac differentiation are able to generate cardiomyocytes of high quality and quantity. Patient-specific iPS cells were differentiated according to this protocol to exclude an influence on the *in vitro* phenotype defined in the spontaneous differentiation. The *in vitro* phenotype defined in the spontaneous differentiation could entirely be confirmed using the protocol for direct cardiac differentiation. The HOS patient with a pronounced clinical phenotype and a *TBX5* mutation displayed a stronger *in vitro* phenotype compared to the index patient without a *TBX5* mutation and a milder phenotype.

Since existing anti-TBX5 antibodies show insufficiencies for different molecular applications, a Flag-tag was integrated into the *TBX5* locus of iPS cells using CRISPR/Cas9 to allow an indirect highly specific detection of the TBX5 protein by anti-Flag antibodies. Different experiments validated the correct insertion of the Flag-tag, its functionality, the specific indirect detection of TBX5 protein by anti-Flag antibodies and an unaffected expression of the genetically modified allele.

The human iPS model for HOS established in this work is well suitable to define a temporary expression pattern of *TBX5* during cardiogenesis. In addition, it is a powerful tool to identify dysregulations possibly contributing to the development of HOS. The genetically edited iPS cells represent an ideal *in vitro* system to carry out advanced molecular biological analyses of the TBX5 protein, which previously have not been possible.



# 1 Einleitung

## 1.1 Angeborene Herzfehler

Ein angeborener Herzfehler (AHF, engl. *Congenital Heart Disease*, CHD) ist nach Mitchell und Kollegen als eine „große strukturelle Fehlbildung des Herzens oder der intrathorakalen großen Gefäße, welche jetzt oder potentiell eine signifikante Relevanz“ haben, definiert (Mitchell *et al.*, 1971). AHF sind die häufigsten angeborenen Organfehlbildungen und tragen signifikant zur infantilen Mortalität und Morbidität bei (Hoffmann & Kaplan, 2002; Wren *et al.*, 2000). Knapp ein Drittel der dokumentierten angeborenen Fehlbildungen sind Herzfehler (Dolk *et al.*, 2011; Reller *et al.*, 2008). Betrachtet man alle Kinder, die aufgrund einer angeborenen Fehlbildung sterben, sind AHF für 24% der Todesfälle verantwortlich (Khairy *et al.*, 2010). Aufgrund der Häufigkeit von AHF und der daraus resultierenden Gesundheitsfolgen ist es von großer Relevanz die Entstehung von AHF detailliert zu untersuchen.

Der am häufigsten auftretende AHF ist der Ventrikelseptumdefekt (VSD) mit etwa 35% (Herold, 2018). Ein VSD ist ein Defekt der Herzscheidewand im Bereich der Kammern. Da der Druck im linken Ventrikel (LV) deutlich höher als im rechten Ventrikel (RV) ist, kommt es zu einem Links-Rechts-Shunt, sodass sauerstoffreiches Blut während der Systole vom LV in den RV übertritt. Daraus resultierend kommt es zu einer erhöhten Belastung des Lungengefäßsystems und einer erhöhten Rechtsherzbelastung. Kleinere VSD können sich im Kindesalter von selber verschließen. Größere VSD müssen operativ oder interventionell verschlossen werden.

### 1.1.1 Prävalenz angeborener Herzfehler

Von den jährlich ca. 32.000 in den Vereinigten Staaten von Amerika (engl. *United States of America*, USA) geborenen Kindern mit AHF, benötigen 25% einen invasiven Eingriff innerhalb des ersten Lebensjahres (Roger *et al.*, 2011). Die Prävalenz von AHF ist in den USA mit 8 von 1.000 Lebendgeburten (van der Linde *et al.*, 2011) und einer Prävalenz von 3-4 von 1.000 Erwachsenen (van der Bom *et al.*, 2012) angegeben.

In Deutschland wurde die Studie „Prävalenz Angeborener Herzfehler bei Neugeborenen in Deutschland – PAN“, durch das Kompetenznetzwerk für AHF in Deutschland initiiert und durchgeführt. Diese Studie ermöglichte erstmals eine flächendeckende, deutschlandweite Erfassung der AHF (Lindinger *et al.* 2010; Schwedler *et al.* 2011). In dem Zeitraum von 2006 bis 2008 wurden insgesamt 673.282 Neugeborene eingeschlossen. Durch die 263 teilnehmenden Institute wurden 7.245 Neugeborene mit AHF erfasst. Die Erhebung der Diagnose basierte auf echokardiographischen Befunden. Bei einer geschätzten Erfassungsrate von 92-95%, ermittelte die Studie eine Prävalenz für AHF von 1,1% aller Lebendgeburten in Deutschland.

Die Prävalenz von AHF, die von diversen Registern erhoben wurden, liegt zwischen 4 und 50 pro 1.000 Lebendgeburten und zeigt somit deutliche Unterschiede. Auch die Prävalenz der moderaten und schweren AHF zeigt in den publizierten Studien eine Varianz und liegt zwischen 6 und 19 pro 1.000 Lebendgeburten. Hoffmann und Kaplan untersuchten 62

Studien zur Inzidenz von AHF und 44 Studien zu den am häufigsten vorkommenden Phänotypen (Hoffmann & Kaplan, 2002). Ziel dieser Studie war die Identifikation von Gründen, welche zur Varianz der Inzidenz für AHF führten. Es konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der Inzidenz in den einzelnen Studien auf das angelegte Studiendesign, den untersuchten Kohorten und den verwendeten Screening-Verfahren, wie der zunehmenden Verwendung von Echokardiographie als Diagnosemethodik zurückzuführen waren. Weitere Unterschiede der Prävalenz von AHF sind durch die unterschiedlichen Klassifizierungen, welche für AHF existieren (Egbe *et al.*, 2015; Schwedler *et al.*, 2011; van der Bom *et al.*, 2011; Bernier *et al.*, 2010) bedingt.

Aus den diversen Studien zur Prävalenz von AHF lässt sich die Bedeutung einer einheitlichen Klassifikation, strikter Diagnosekriterien und die Relevanz neuer Screening-Verfahren durch voranschreitende Technologien ableiten.

### **1.1.2 Klassifikation von angeborenen Herzfehlern**

Für die Klassifikation von AHF wird die „Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme“ (ICD, engl. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*) bzw. die Einteilung nach dem Register *Society of Thoracic Surgeons Congenital Heart Surgery Database* (STS-CHSD) verwendet. Die ICD ist ein von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) herausgegebenes Klassifikationssystem für alle medizinischen Diagnosen, die regelmäßig aktualisiert wird. Die aktuelle internationale gültige Ausgabe ist die ICD-10 (<http://www.dimi.de/dynamic/de/klassifikation/icd/icd-10-who/>).

Für pädiatrische Patienten mit angeborenen Fehlbildungen des Herzens, die einen operativen Eingriff benötigen existiert zusätzlich das STS-CHSD Register (Jacobs *et al.*, 2014; Jacobs *et al.*, 2009). Dieses weltweit größte Register erfasst Daten aus 117 von 125 Kliniken der USA und 3 von 8 Zentren in Kanada, die alle die gleiche Nomenklatur *International Pediatric and Congenital Cardiac Code* (IPCCC, <http://ipccc.net/>) verwenden. Alle in diesem Register erfassten Daten laufen im *Duke Clinical Research Institute* (DCRI), welches als *Data Warehouse* und analytisches Zentrum dient, zusammen. Für die Klassifizierung der AHF existieren somit exakte Diagnosekriterien.

Im Deutschen Herzzentrum München (DHM) wird zur Klassifikation von AHF die Nomenklatur nach IPCCC, basierend auf dem STS-CHSD Register verwendet (Tabelle S1).

### **1.1.3 Ätiologie von angeborenen Herzfehlern**

In den meisten Fällen ist die Ätiologie des AHFs unbekannt. Es ist allgemein anerkannt, dass bei unbekannter Ätiologie sowohl genetische wie auch umweltbedingte Faktoren zur Entstehung des AHFs führen (Nora *et al.*, 1968). Neben der genetisch unabhängigen Ätiologie, wie dem Einfluss von Teratogenen (Kopf *et al.*, 2009), der maternalen Exposition (Yang *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2009), Infektionen während der Schwangerschaft (Liang *et al.*, 2017; Dewan *et al.*, 2012), Übergewichtigkeit (Madsen *et al.*, 2013), dem Gestationsdiabetes mellitus (GDM, Wren *et al.*, 2003) und der Einnahme von anti-retroviralen Medikamenten

(Watts *et al.*, 2011), können genetische Faktoren, wie Mutationen, die autosomal dominant, autosomal rezessiv oder X-chromosomal Natur sein können, ursächlich für die Entstehung eines AHFs sein. Für die Entstehung von AHF sind auch epigenetische Faktoren, wie DNA-Methylierungen oder Modifikationen der Histone beschrieben (Gilsbach *et al.*, 2018; Chowdhury *et al.*, 2011).

Mehr als 60 Gene, welche mit der Entstehung von AHF assoziiert sind, sind heute bekannt (Su *et al.*, 2017; Lahm *et al.*, 2015c; Blue *et al.*, 2012; Wessels & Willems, 2010). Da sich bei gleicher Mutation innerhalb einer Familie mit AHF der Phänotyp unterscheiden kann und auch Mutationen in unterschiedlichen Genen zum gleichen Phänotyp führen können, scheinen weitere Faktoren für den patienten-spezifischen Phänotyp ursächlich zu sein. Eine weit verbreitete Hypothese für das „genetische Modell“ der Entstehung von AHF sind multiple Varianten in einer Vielzahl an Genen, die Risikofaktoren darstellen und in der Summe als Auslöser des AHFs gelten. Umfangreiche Genomanalysen von Patienten mit AHF, wie Exom-Sequenzierungen (engl. *whole exome sequencing*, WES), Genom-Sequenzierungen (engl. *whole genome sequencing*, WGS) und Genomweite Assoziationsstudien (engl. *genome wide association studies*, GWAS) von Patienten mit AHF erlauben heute die genetische Ätiologie detaillierter zu erfassen.

Chromosomale Veränderungen können eine Vielzahl von AHF auslösen, sind aber zu einem hohen Prozentsatz mit einem spezifischen Phänotyp beschrieben. Diese Genotyp-Phänotyp Korrelation favorisiert den Auslöser des AHFs als „Veränderung der Dosis bestimmter Gene“. Chromosomenveränderungen, wie Aneuploidien (Trisomie 21, 18 und 13, Turner Syndrom, Lahm *et al.*, 2015c) und Veränderungen in der Kopienzahl von Genen (engl. *copy number variants*, CNV), wie im DiGeorge Syndrom (Deletion 22q11, Deletion *TBX1*) und dem Williams-Beuren Syndrom (Deletion 7q11.23, Deletion *ELN*) vorliegend, sind zu einem hohen Prozentsatz mit AHF assoziiert (Lahm *et al.*, 2015c). CNV, die kardial relevante Faktoren, wie *GATA4* (Soemedi *et al.*, 2012) und *NOTCH1* (Greenway *et al.*, 2009) betreffen, wurden ebenfalls identifiziert und gehen mit AHF einher.

Für eine Reihe von Punktmutationen wurden isolierte AHF identifiziert. Hier sind Mutationen in kardial relevanten Transkriptionsfaktoren (TF) wie *NKX2.5* (Su *et al.*, 2017; McCulley & Black, 2012; Sarkozy *et al.*, 2005), *GATA4* (Sun *et al.*, 2017; Butler *et al.*, 2010; Sarkozy *et al.*, 2005), *GATA6* (Xu *et al.*, 2018; Catli *et al.*, 2013; Kodo & Yamagishi, 2010), *TBX5* (Chen *et al.*, 2017; McCulley & Black, 2012; Basson *et al.*, 1999) und *TBX20* (Wolf & Basson, 2010; Posch *et al.*, 2010) zu nennen. Weiterhin sind Mutationen in Genen, welche für die Signaltransduktion (*NOTCH1*, *NOTCH2*, *JAG1*) (McBride *et al.*, 2008; Li *et al.*, 1997a; Oda *et al.*, 1997) von Bedeutung sind und Mutationen in kardialen Strukturproteinen, wie *MYH6* (Razmara & Garshasbi, 2018; Priest *et al.*, 2016; Tomita-Mitchell *et al.*, 2016), *MYH7* (van der Linde *et al.*, 2017; Towe *et al.*, 2015; Vermeer *et al.*, 2013) und *ACTC1* (Wang *et al.*, 2016; Greenway *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2010) mit der Ausbildung von AHF assoziiert.

Führen Mutationen in TF zu einem reduzierten unphysiologischen Level der TF durch Inaktivierung eines Allels oder handelt es sich um eine *loss of function* Mutation, welche die Bindung des TFs an die DNA verhindert oder reduziert, bzw. die Interaktion mit anderen TF

beeinflusst, kommt es zur Ausbildung des AHFs (Blue *et al.*, 2012; Fahed *et al.*, 2013; Tabelle 1).

**Tabelle 1: Gene assoziiert mit isolierten AHF**

Gen	Protein	Phänotyp
<b>Transkriptionsfaktor</b>		
<i>NKX2.5</i>	Homeobox Containing Transkriptionsfaktor	<b>ASD, VSD, ASD-AV Block</b> , TOF, HLH, CoA, TGA, DORV, IAA, OFT Defekte, Ebstein Anomalie
<i>GATA4</i>	GATA4 Transkriptionsfaktor	<b>ASD, PS, VSD</b> , TOF, <b>AVSD</b> , PAPVR, DORV
<i>GATA6</i>	GATA6 Transkriptionsfaktor	ASD, TOF, PS, <b>AVSD</b> , PDA, OFT Defekte, <b>VSD</b> , TA
<i>IRX4</i>	Iroquois Homeobox 4	<b>VSD</b>
<i>TBX20</i>	T-Box 20 Transkriptionsfaktor	<b>ASD, MS, VSD</b>
<i>TBX5*</i>	T-Box 5 Transkriptionsfaktor	<b>AVSD, ASD, VSD, Anomalien des Reizleitungssystems, (Holt-Oram Syndrom)</b>
<i>TBX1*</i>	T-Box 1 Transkriptionsfaktor	TOF, IAA, Anomalien des Aortenbogens, <b>VSD</b> , (22q11 Deletion)
<b>Signaltransduktion</b>		
<i>JAG1*</i>	Jagged-1 Ligand	PAS, TOF, (Alagille Syndrom)
<i>NOTCH1</i>	NOTCH1 (Ligand für JAG1)	BAV, AS, CoA, HLH
<b>Strukturproteine</b>		
<i>ACTC1</i>	Alpha Cardiac Actin 1	<b>ASD</b>
<i>MYH6</i>	Alpha Myosin Heavy Chain	<b>ASD</b> , TA, AS, PFO, TGA
<i>MYH7</i>	Beta Myosin Heavy Chain	Ebstein Anomalie, <b>ASD</b> , NVM
<i>ELN*</i>	Elastin	SVAS, PAS, PS, AS, (Williams-Beuren Syndrom)

**Abkürzungen:** **AS:** Aortenstenose (engl. *aortic stenosis*, AS). **ASD:** Atriumseptumdefekt (engl. *atrial septal defect*, ASD), **ASD-AV Block:** ASD mit atrioventrikulärem Block (engl. *atrial septal defect with atrioventricular block*, ASD-AV block). **AVSD:** atrioventrikulärer Septumdefekt (engl. *atrioventricular septal defect*, AVSD). **BAV:** bikuspidale Aortenklappe (engl. *bicuspid aortic valve*, BAV). **CoA:** Aortenisthmusstenose (engl. *coarctation of the aorta*, CoA). **DORV:** engl. *double outlet right ventricle*. **HLH:** Hypoplastisches Linksherz (engl. *hypoplastic left heart*, HLH). **IAA:** unterbrochener Aortenbogen (engl. *interrupted aortic arch*, IAA). **MS:** Mitralklappenstenose (engl. *mitral stenosis*, MS). **NVM:** engl. *non compaction of ventricular myocardium*. **OFT:** Ausflusstrakt (engl. *outflow tract*, OFT). **PAS:** Pulmonalarterienstenose (engl. *pulmonary artery stenosis*, PAS). **PDA:** persistierender *Ductus arteriosus* (engl. *patent ductus arteriosus*, PDA). **PFO:** Persistierendes Foramen ovale (engl. *patent foramen ovale*, PFO). **PS:** Pulmonalstenose (engl. *pulmonary stenosis*, PS). **PAPVR:** Lungenvenenfehlmündung (engl. *partial anomalous pulmonary venous return*, PAPVR). **SVAS:** supralvalvuläre Aortenstenose (engl. *supralvalvular aortic stenosis*, SVAS). **TA:** Trikuspidalatresie (engl. *tricuspid atresia*, TA). **TGA:** Transposition der großen Arterien (engl. *transposition of the great arteries*, TGA). **TOF:** Fallot'sche Tetralogie (engl. *tetralogy of Fallot*, TOF). **VSD:** Ventrikelseptumdefekt (engl. *ventricular septal defect*, VSD). \*ebenfalls für syndromale AHF beschrieben. **Fett:** Phänotyp, der bei Patienten mit dem Holt-Oram Syndrom beschrieben ist. Adaptiert Fahed *et al.*, 2013; Blue *et al.*, 2012.

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene *loss of function* Mutationen eines TFs in nicht verwandten Patienten den gleichen oder „einen“ AHF Phänotyp verursachen. Es ist hervorzuheben, dass das klinische Spektrum an AHF, die in Patienten mit Punktmutationen gesehen werden breit gefächert ist. In der Entwicklung des Herzens haben TF ein definiertes Expressionsmuster, das in zeitlicher und räumlicher Ordnung ablaufen muss, um eine korrekte Kardiogenese zu sichern (Boettger & Braun, 2012; Kim *et al.*, 2012; Munshi, 2012; von Gise & Pu, 2012; Singh *et al.*, 2011). Das weitgefächerte Spektrum an AHF ist durch die Vielzahl an zeitlichen und räumlichen Fehlregulationen, die im Verlauf der Entwicklung vorkommen können zu erklären.

Patienten mit AHF können neben der Fehlbildung des Herzens auch extrakardiale Fehlbildungen zeigen. Ist dies der Fall, ist der AHF Teil eines Syndroms. 3-5% der AHF haben ein Syndrom, welches nach Mendel vererbt wird. In Tabelle 2 sind Mikrodeletionen und Genmutationen, die mit AHF assoziiert sind und Teil eines Syndroms sind, zusammengefasst (adaptiert Blue *et al.*, 2012).

**Tabelle 2: Mikrodeletionen und Gemutationen assoziiert mit AHF**

Syndrom	Betroffenes Gen (Genregion)	Assoziierter AHF	Anteil der Patienten mit AHF [%]
<b>Alagille</b>	<i>JAG1, NOTCH1</i> (del20p12)	PPS, TOF, ASD, PS	85-95%
<b>Noonan</b>	<i>PTPN11, SOS1, KRAS, RAF1</i>	PVS, ASD, CoA, HCM	80-90%
<b>Holt-Oram</b>	<i>TBX5</i>	PVS, ASD, AVSD, TOF	80%
<b>Char</b>	<i>TFAP2B</i>	PDA	60%
<b>Ellis-van Creveld</b>	<i>EVC, EVC2</i>	ASD I, singuläres Atrium, AVSD	60%
<b>Smith-Lemli-Opitz</b>	<i>DHCR7</i>	AVSD, ASD I, VSD, PAPVR	45%
<b>CHARGE</b>	<i>CHD7, SEMA3E</i>	ASD, VSD, Klappendefekte	50-80%
<b>Kabuki</b>	<i>MLL2</i> , in einigen Fällen	CoA, ASD, VSD	40%

**Abkürzungen:** **ASD:** Atriumseptumdefekt (engl. *atrial septal defect*, ASD). **ASD I:** Atriumseptumdefekt Typ I (engl. *atrial septal defect type I*, ASD type I). **AVSD:** atrioventrikulärer Septumdefekt (engl. *atrioventricular septal defect*, AVSD). **CoA:** Aortenisthmusstenose (engl. *coarctation of the aorta*, CoA). **HCM:** hypertrophe Kardiomyopathie (engl. *hypertrophic cardiomyopathy*, HCM). **PAPVR:** Lungenvenenfehlmündung (engl. *partial anomalous pulmonary venous return*, PAPVR). **PDA:** persistierender *Ductus arteriosus* (engl. *patent ductus arteriosus*, PDA). **PPS:** periphere Pulmonalstenose (engl. *peripheral pulmonary stenosis*, PPS). **PS:** Pulmonalstenose (engl. *pulmonary stenosis*, PS). **PVS:** Pulmonalklappenstenose (engl. *pulmonary valve stenosis*, PVS). **TOF:** Fallot'sche Tetralogie (engl. *tetralogy of Fallot*, TOF). **VSD:** Ventrikelseptumdefekt (engl. *ventricular septal defect*, VSD). Adaptiert Blue *et al.*, 2012.

Das Risiko für das erneute Auftreten eines AHF in Familien, bei denen bereits ein Geschwister mit AHF vorhanden ist, liegt zwischen 1 und 6% (Calcagni *et al.*, 2007; Burn *et al.*, 1998). Ist mehr als ein Geschwisterteil von einem AHF betroffen, steigt das Risiko für das Auftreten eines weiteren AHFs auf bis zu 10% (Nora *et al.*, 1988). Familien in denen die Eltern einen AHF haben zeigen ein noch höheres Risiko für einen rezidivierenden AHF (Gill *et al.*, 2003). Das erhöhte Risiko für das erneute Auftreten eines weiteren AHFs in Familien mit AHF untermauert die Bedeutung der genetischen Ätiologie für die Ausbildung von AHF. Weiterhin zeigen Untersuchungen zur genetischen Ätiologie eindeutig die Assoziation von Genen als ursächlich für die Ausbildung von AHF (Fahed *et al.*, 2013; Blue *et al.*, 2012). Eine Reihe von Genen, welche mit der Entstehung von AHF assoziiert sind, konnten identifiziert werden (Padang *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2013; Kirk *et al.*, 2007; Elliott *et al.*, 2003; Garg *et al.*, 2003). Dennoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen in der humanen Kardiogenese und der Einfluss dieser Gene in der humanen Herzentwicklung weitestgehend unbekannt. Ein genaues Verständnis der Kardiogenese ist essentiell, um die Entstehung von AHF erklären zu können.

#### 1.1.4 Holt-Oram Syndrom

Das Holt-Oram Syndrom (HOS) wurde erstmals 1960 beschrieben (Holt & Oram, 1960) und wird zu den Herz-Hand Syndromen gezählt (Basson *et al.*, 1995). Das HOS ist ein seltenes, autosomal dominant vererbtes Syndrom, welches mit einer Prävalenz von 1 auf 100.000 Lebendgeburten angegeben ist (Elek *et al.*, 1991). HOS Patienten zeigen skelettale Fehlbildungen der präaxialen oberen Extremitäten (Gruenauer-Kloevekorn *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2002; Basson *et al.*, 1994) und haben eine hohe Inzidenz (>70%) für das Auftreten von AHF, wie VSD (Li *et al.*, 1997b; Newbury-Ecob *et al.*, 1996; Basson *et al.*, 1994). Die kardiale Manifestation des Phänotyps ist variabel und reicht von einfachen bis komplexen Vorhofseptumdefekten (engl. *atrial septal defect*, ASD) und VSD bis hin zu komplexen Anomalien wie der Fallot'schen Tetralogie und dem hypoplastischen

Linksherzsyndrom (Bruneau *et al.*, 1999; Newbury-Ecob *et al.*, 1996; Basson *et al.*, 1994). Elektrophysiologische Defekte, wie der AV-Block sind ebenfalls beschrieben (Basson *et al.*, 1994).

In den 90er Jahren wurde die genetische Ursache für das HOS auf dem langen Arm von Chromosom 12 lokalisiert und erste Mutationen im *TBX5* Gen identifiziert (Basson *et al.*, 1999; Basson *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997b). *Tbx5* ist ein TF, der für die Strukturierung und Differenzierung von Gewebe essentiell ist (Papaioannou & Silver, 1998). *Tbx5* ist in diverse Entwicklungsprozesse involviert und spielt in der Embryonalentwicklung der oberen Extremitäten und im Herzen eine Rolle (Showell *et al.*, 2004).

Die Relevanz von *Tbx5* in der Morphogenese des Herzens wurde durch spezifische Expressionsmuster in der murinen Embryogenese definiert (Bruneau *et al.*, 1999; Chapman *et al.*, 1996). Es existieren eine Reihe von Studien zum HOS, das in mehr als 70% der Fälle auf eine Mutation im *TBX5* Gen zurückgeführt werden kann (Boogerd *et al.*, 2010; Lichiardopol *et al.*, 2007; Basson *et al.*, 1999; Basson *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997b). In der Literatur sind mehr als 90 Mutationen im *TBX5* Gen beschrieben, die eine Dysfunktion des Proteins zur Folge haben und zur Haploinsuffizienz führen (Aoki & Horie, 2018; Kimura *et al.*, 2015; Clark *et al.*, 2006; Packham & Brook, 2003; Basson *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997b; Basson *et al.*, 1994). Hier spielen vor allem Punktmutationen, Duplikationen/Deletionen des Gens bzw. einzelner Exone eine Rolle, die eine veränderte Gendosis zur Folge haben und daraus resultierend ursächlich für das Syndrom sind. Mutationen im *TBX5*, welche die 5'-regulatorische Sequenz oder das T-box DNA Bindemotiv zerstören, führen ebenfalls zu Veränderung der Gendosis und resultieren in der Ausbildung des HOS (Ghosh *et al.*, 2001; Hiroi *et al.*, 2001; Boogerd *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2016).

Die funktionelle Bedeutung der *Tbx5* Mutationen und ein entsprechender kausaler Zusammenhang mit kardialen Fehlbildungen *in vivo* konnte in Tiermodellen verschiedener Spezies gezeigt werden (Tsai *et al.*, 2012; Goetz *et al.*, 2006; Bruneau *et al.*, 2001). Obwohl die Relevanz von *TBX5* für eine korrekt ablaufende Kardiogenese allgemein anerkannt ist, existiert bislang nur ein Modell, das die Rolle von *TBX5* in der humanen Kardiogenese untersucht hat (Karakikes *et al.*, 2017), so dass die genauen Mechanismen des *TBX5* in der humanen Kardiogenese immer noch weitgehend unbekannt sind und bislang nur aus Tiermodellen abgeleitet werden. Die Definition eines spezifischen lokalen und temporären Expressionsmusters von humanem *TBX5* ist für das Verständnis des TFs in der Kardiogenese und seines Einflusses auf die Ausbildung von AHF unabdingbar.

## **1.2 Humane induzierte pluripotente Stammzellen und *Disease-Modelling***

Stammzellen sind Körperzellen, die sich in verschiedene Zelltypen differenzieren lassen. Man unterscheidet – je nach ontogenetischem Alter und vorhandenem Differenzierungspotential totipotente, pluripotente, omnipotente und multipotente Stammzellen (Daley, 2015).

Im Jahre 1981 gelang es erstmals murine embryonale Stammzellen (ES Zellen), gewonnen aus Embryonen zu kultivieren (Evans & Kaufmann, 1981). Humane embryonale Stammzellen wurden im Jahre 1998 erstmals erfolgreich aus Blastozysten kultiviert (Thomson *et al.*,

1998). Humane ES Zellen werden in den allermeisten Fällen aus überzähligen Embryonen, die durch *in vitro* Fertilisation (IVF) entstehen und nicht mehr für Fortpflanzungszwecke benötigt werden, gewonnen. Seit 1991 existiert in Deutschland das Embryonenschutzgesetz (ESchG), welches die Verwendung von *in vitro* Fertilisationstechnik (IVF Technik) zur Erzeugung von Embryonen regelt. Dieses Gesetz verbietet es in Deutschland menschliche Embryonen, zu denen bereits die Blastozyste gerechnet wird, zu Forschungszwecken herzustellen. Unter Auflagen ist es möglich humane ES Zellen, die vor 2007 gewonnen wurden, zu importieren.

Aufgrund der ethischen Problematik zählt es zu den großen Durchbrüchen der Medizin, als es im Jahre 2006 in der Arbeitsgruppe von Takahashi und Yamanaka erstmals gelang murine induzierte pluripotente Stammzellen (miPS Zellen) (Takahashi & Yamanaka, 2006) und bereits ein Jahr später humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPS Zellen) herzustellen (Takahashi *et al.*, 2007).

Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS Zellen) werden durch Reprogrammierung von somatischen Zellen generiert. Die Generierung der iPS Zellen wird durch die exogene Expression von TF angeregt und induziert die Zellen ein endogenes Expressionsprofil anzuschalten, welches dem von ES Zellen ähnelt. Auch nach Beendigung der exogenen Expression der TF ist eine korrekt reprogrammierte iPS Zelle in der Lage, ihren pluripotenten Charakter aufrecht zu erhalten.

In vielen Bereichen der Forschung und Medizin finden iPS Zellen heute ihre Anwendung. Patienten-spezifische iPS Zellen ermöglichen die Entwicklung von Krankheitsmodellen (*in vitro Disease Modelle*), die grundlegende Einblicke in die Genese und Pathogenese von Erkrankungen geben. Hier sind besonders die Entwicklungen in der neurodegenerativen Forschung zu nennen (Avior *et al.*, 2016; Sternecker *et al.*, 2014; Soldner & Jaenisch, 2012; Soldner *et al.*, 2011).

Auch in der kardialen Forschung existieren eine Reihe von iPS Modellen, die zur Aufklärung von AHF beitragen. Induzierte pluripotente Stammzellen lassen sich differenzieren und ermöglichen so, die embryonale Entwicklung nachzustellen und die komplexen Entwicklungen eines Organismus zu verstehen, bzw. Entwicklungsstörungen zu untersuchen. Im Bereich der kardiovaskulären Forschung wurden die ersten iPS Modelle für monogenetische Erkrankungen, wie das LEOPARD Syndrom (Carvajal-Vergara *et al.*, 2010), das Long-QT Syndrom (Itzhaki *et al.*, 2011; Moretti *et al.*, 2010b) und die supralvalvuläre Aortenstenose (engl. *supravalvular aortic stenosis*, SVAS) (Ge *et al.*, 2012) etabliert. Diese publizierten iPS Modelle konnten einen *in vitro* Phänotyp definieren, der die Entstehung des patienten-spezifischen AHFs erklären konnte und grundlegend zum Verständnis der Mechanismen, die zur Ausbildung des AHFs führen, beitragen.

Für das HOS existiert bislang kein patienten-spezifisches iPS Modell, das die Entstehung des kardialen Phänotyps erklären kann. Obwohl die Relevanz von *TBX5* für eine korrekt ablaufende Kardiogenese allgemein anerkannt ist, existiert bislang nur ein Modell, das die Rolle von *TBX5* in der humanen Kardiogenese untersucht hat (Karakikes *et al.*, 2017). Es ist hervorzuheben, dass das hier verwendete Modell nicht auf patienten-spezifischen iPS Zellen basiert. Die genauen Mechanismen von *TBX5* in der humanen Kardiogenese und die daraus

resultierenden Dysregulationen, die zur Ausbildung des HOS führen sind immer noch weitgehend unbekannt und werden bislang nur aus Tiermodellen abgeleitet. Die Etablierung eines humanen patienten-spezifischen iPS Modells, welches es ermöglicht ein spezifisches lokales und temporäres Expressionsmuster von humanem *TBX5* zu definieren, ist für das Verständnis des TFs in der Kardiogenese und seines Einflusses auf die Ausbildung des HOS von großer Relevanz.

### 1.3 Genom-Editierung

Genom-Editierung (engl. *genome-editing*) umfasst alle molekularbiologischen Techniken zur gezielten Veränderung von DNA. Endonukleasen schneiden an definierter Stelle, verursachen einen Doppelstrangbruch der DNA und aktivieren so natürliche DNA-Reparaturmechanismen in der Zelle. Man unterscheidet dabei das nicht-homologe Verbinden (engl. *non-homologous end-joining*, NHEJ) und die homologe Reparatur (engl. *homology directed repair*, HDR). Wird der Zelle für die Reparatur eine Matrize angeboten, wird diese in die Schnittstelle eingebaut und man spricht von einer homologen Rekombination. Liegt der Zelle keine Matrize vor, ist die Reparatur meist unpräzise und produziert „Indels“. Indels sind kleine DNA Fragmente, die während des Reparaturmechanismus zusätzlich eingebaut (**I**nsertion) oder verloren gehen (**D**eletion), und somit einen Funktionsverlust des editierten Genes nicht ausschließen.

Zu den in der Genom-Editierung verwendeten Nukleasen zählen die Zinkfingernukleasen (engl. *zinc finger nuclease*, ZFN), transkriptionsaktivatorartige Effektor-nukleasen (engl. *transcription activator-like effector nuclease*, TALEN), die CRISPR/Cas (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, CRISPR-associated protein) Methode, das CRISPR/Cpf1 System (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats from Prevotella and Francisella*) und Meganukleasen, bei denen es sich um veränderte *Homing* Endonukleasen handelt.

Die Entwicklung der CRISPR/Cas9 (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, *CRISPR-associated endonuclease 9*) Methode geht auf die Entdeckung und Untersuchung der CRISPR Sequenzen und dem dazugehörigen CRISPR/Cas-System im Immunsystem von Bakterien und Archaea zurück (Jinek *et al.*, 2012). CRISPR Elemente sind palindromische Sequenzen, die im Erbgut vorkommen (Ishino *et al.*, 1987). Diese repetitiven Sequenzen sind von variablen Sequenzmotiven (engl. *spacer*) unterbrochen. Es zeigte sich, dass die Sequenz dieser *Spacer* mit der Sequenz von Viren übereinstimmt (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005; Pourcel *et al.*, 2005).

Die viralen Sequenzen innerhalb des CRISPR werden durch Motive, die als Vorabstandshalter-angrenzendes Motiv (engl. *protospacer adjacent motif*, PAM) bezeichnet werden, erkannt. Cas-assoziierte Proteine binden am PAM Motiv und schneiden die virale DNA/RNA (Makarova *et al.*, 2006; Haft *et al.*, 2005; Jansen *et al.*, 2002; Makarova *et al.*, 2002). Da Bakterien keine PAM Motive besitzen, erlaubt dieser Mechanismus den Bakterien zwischen eigener DNA/RNA und fremder DNA/RNA zu unterscheiden (Mojica *et al.*, 2009).



Prokaryoten mit einem CRISPR/Cas System bauen bei Infektion mit Viren/Phagen, DNA/RNA Elemente dieser Viren/Phagen in die Spacerregionen der palindromischen CRISPR Region ein. Diese virale RNA dient in Kombination mit den Cas-Proteinen als *guide-RNA* (gRNA), die bei erneuter Infektion das Cas Protein direkt zur viralen DNA/RNA führt. Die gRNA bindet an die passende Sequenz des viralen Genoms und markiert für die Cas-assoziierte Proteine die Stelle, an der das virale Erbgut geschnitten werden soll. Bakterien, die erneut mit diesem Virus/Phagen infiziert werden, sind in der Lage durch die vorhandene Spacersequenzen, die als Elemente der Wiedererkennung von infektiöser DNA/RNA dienen, eine schnelle adaptive Abwehr auszulösen. Das CRISPR/Cas System der Prokaryoten ist somit ein adaptiver Abwehrmechanismus, der Bakterien effektiv vor einer erneuten Infektion mit Viren/Phagen schützt (Rath *et al.*, 2015; Sorek *et al.*, 2008).

Die CRISPR/Cas9 Methode ermöglicht es gezielt DNA einzufügen, auszuschneiden oder zu verändern (Jinek *et al.*, 2012). Diese Methodik macht man sich bei der Editierung der DNA, wie dem Einbringen bzw. der Korrektur von Mutationen (Pittermann *et al.*, 2017; Wattanapanitch *et al.*, 2018; Flynn *et al.*, 2015) oder einem kompletten *knock-out* von Genen zu Nutze (Ye *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2013; Crane *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013).

Im Mausmodell wurden unter Verwendung von CRISPR/Cas9 AHF durch Einbringen/Korrektur von Mutationen untersucht (Bengtsson *et al.*, 2017; Kemaladewi *et al.*, 2017).

Auch im humanen Bereich der kardialen Forschung findet CRISPR/Cas9 bereits Anwendung (Ge *et al.*, 2012; Itzhaki *et al.*, 2011; Carvajal-Vergara *et al.*, 2010; Moretti *et al.*, 2010b). In der Arbeitsgruppe von Ben und Kollegen wurde unter Verwendung eines humanen iPS Modells gezielt eine Mutation im *PRKAG2* Gen, welches kausativ für die Entstehung von hypertropher Kardiomyopathie und dem familiären Wolff-Parkinson-White (WPW) Syndrom beschrieben ist, korrigiert (Ben Jehuda *et al.*, 2018).

Die CRISPR/Cas9 Technologie wird ebenfalls zum sogenannten „Taggen“ von Zellen (Spanjaard *et al.*, 2018) und Proteinen verwendet (Waldron *et al.*, 2016). Besonders für Proteine, bei denen keine spezifischen Antikörper existieren eignet sich diese Technik, um einen „Tag“ in den Lokus des zu detektierenden Gens einzubringen und ermöglicht dadurch die Detektion des Proteins über Antikörper gegen das Tag.

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, ein humanes patienten-spezifisches iPS Modell für das HOS zu etablieren und einen *in vitro* Phänotyp zu definieren. Die Definition eines *in vitro* Phänotyps, der den Phänotyp des HOS rekapituliert ist für die Funktionalität des patienten-spezifischen iPS Modells essentiell.

Das HOS kann nur in 70% der Fälle auf eine Mutation im *TBX5* Gen zurückgeführt werden und der Phänotyp der HOS Patienten ist sehr variabel. Zur Etablierung eines iPS Modells, das das breite Spektrum des HOS widerspiegelt, war es Teil dieser Arbeit, die in der kardiovaskulären Biobank des Deutschen Herzzentrum Münchens (KaBi-DHM) identifizierten HOS Patienten bezüglich ihrer Genetik (*TBX5*) und ihres klinischen Phänotyps genau zu

charakterisieren. Die Generierung und Verwendung von iPS Zellen aus HOS Indexpatienten, die sowohl im Phänotyp unterschiedlich sind, wie auch in ihrer Kausalität bezüglich des *TBX5* Gens, zielte darauf ab, die Variabilität des HOS in dem humanen patienten-spezifischen iPS Modell zu berücksichtigen.

Die Untersuchung der *TBX5* Expression auf Transkriptions- und Translationsebene zur Definition eines spezifischen temporären Expressionsmusters von humanem *TBX5*, ist für das Verständnis des TFs in der humanen Kardiogenese und seines Einflusses auf die Ausbildung des HOS von großer Relevanz. Für einige molekularbiologische Anwendungen sind nur unzureichend funktionelle Antikörper für *TBX5* vorhanden. Aus diesem Grund sollte eine Strategie entwickelt werden, diese Problematik zu umgehen und eine Lösung dafür anzubieten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Ethikvoten und Genehmigungen

Für die Promotion mit dem Titel „Patienten-spezifisches iPS Modell zur funktionellen und molekularen Analyse des Holt-Oram Syndroms“ wurde bei der Ethikkommission ein Antrag mit dem Titel „Etablierung eines patienten-spezifischen iPS Modellsystems zur funktionellen und molekularen Analyse des Holt-Oram Syndroms“ (Projektnummer 5737/13) gestellt und genehmigt. Die Einrichtung einer kardiovaskulären Biobank innerhalb des Deutschen Herzzentrums München (KaBi-DHM) (5943/13) und die Studie mit dem Titel „Untersuchung von TBX5 assoziierten regulatorischen Prozessen in der humanen kardialen Embryonalentwicklung unter Verwendung eines patienten-spezifischen Holt-Oram Syndrom iPS Modells“ (285/17S) wurden von der Ethikkommission ohne Einwände akzeptiert. Für alle Patienten und Probanden lag eine unterschriebene Einverständniserklärung vor.

Die Verwendung von murinen Fibroblasten ist durch §4 Absatz 3 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) durch die Regierung von Oberbayern geregelt. Für gentechnischen Arbeiten wurde bei der Regierung von Oberbayern ein Antrag mit dem Titel: „Reprogrammierung primärer humaner Fibroblasten und PBMC zu induzierten pluripotenten Stammzellen mit Hilfe von Sendai Viren“ gestellt und genehmigt (Aktenzeichen 50-8791-26.11542332).

### 2.2 Anamnese der HOS Indexfamilien

Innerhalb der KaBi-DHM wurden 20 Patienten mit HOS identifiziert. Von diesen Patienten erklärten sich vier einverstanden an Untersuchungen, im Rahmen der vorliegenden Arbeit teilzunehmen. Die Verwandten ersten Grades der HOS Indexpatienten wurden ebenfalls in das Projekt eingeschlossen. Die Anamnese der Indexpatienten wurde durch vorhandene klinische Unterlagen und Operationsberichte erstellt.

### 2.3 Material

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgeführt.

#### 2.3.1 Utensilien

Alle verwendeten Utensilien sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Verwendete Utensilien**

<b>Utensilien</b>	<b>Hersteller</b>
<b>BD Vacutainer® CPT™ Mononuclear Cell Preparation Tube - Sodium Heparin, #362780</b>	BD Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, San Jose, CA
<b>EASYstrainer™ Zellsieb, #542040</b>	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
<b>Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1,5 mL, Eppendorf Quality™, #30120086</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<b>Falcon® 15mL High Clarity PP Centrifuge Tube, Conical Bottom, steril, #734-0451</b>	VWR International, Radnor, PA
<b>Falcon® 50mL High Clarity PP Centrifuge Tube, Conical Bottom, steril, #734-0448</b>	VWR International, Radnor, PA

<b>Kryoröhrchen Nunc 1,0 ml, Innengewinde, Sternfuss, #479-6842P</b>	VWR International, Radnor, PA
<b>Lumi-vial 5 ml, #9778</b>	Berthold Technologies, Oak Ridge, TN
<b>Menzel™ Microscope Coverslips 24x60 mm, #11778691</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, #N8010560</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>MicroAmp™ Optical Adhesive Film, #4311971</b>	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Millicell EZ SLIDE 4-well glass, sterile, #PEZGS0496</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Parafilm® M, #P7793-1EA</b>	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>PCR 8er-SoftStrips, 0,2 ml, farblos High Profile, #711030</b>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>PCR SingleCap 8er Soft strips 0,2 ml, farblos, #710970</b>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>PURPLE NITRIL-Untersuchungshandschuhe, #52002M</b>	Halyard Health, Alpharetta, GA
<b>PVDF-Filter 0,22 µm, #P666.1</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>SafeSeal SurPhob Filterspitzen, 10 µl, extra lang, steril, #VT0200</b>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>SafeSeal SurPhob Filterspitzen, 100 µl, steril, #VT0230</b>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>SafeSeal SurPhob Filterspitzen, 1250 µl, steril, #VT0270</b>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>Sempercare® Einmalhandschuhe, Latex, Premium, #0321</b>	Sempercare, Semperit AG, Wien, Österreich
<b>Serologische Pipetten 10 ml, steril, Teilung: 0,1 ml, Farbe: orange, #GPS-10.0</b>	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
<b>Serologische Pipetten 5 ml, steril, Teilung: 0,1 ml, Farbe: blau, #GPS-5.0</b>	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
<b>S-Monovette® EDTA K<sub>3</sub>/Forensic, #02.1066.001</b>	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
<b>Spitzenfilter, steril, 0,22µm, #P666.1</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Surgical Disposable Scalpels, #BA220</b>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
<b>Tissue Culture Cell Scraper 25 cm, #831830</b>	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
<b>Zellkultur Multiwellplatte, 24 well, PS, Transp., Cellstar®, TC, Abdeckplatte mit Kondensationsringen, steril, einzeln verpackt, #662160</b>	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
<b>Zellkultur Multiwellplatte, 6 well, PS, Transp., Cellstar®, TC, Abdeckplatte mit Kondensationsringen, steril, einzeln verpackt, #657160</b>	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
<b>Zellkulturflaschen T25, #G200FF-25</b>	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
<b>Zellkulturflaschen T75, #G200FF-75</b>	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
<b>Zellkulturschalen, 100/20 mm (10 cm), #664160</b>	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
<b>Zellkulturschalen, 60/15 mm (6 cm), #628160</b>	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland

### 2.3.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien und Reagenzien (Tabelle 4) wurden wie im Folgenden beschrieben bzw. nach Angabe des Herstellers gelagert und verwendet.

**Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien**

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
10x Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, ohne $\text{Ca}^{2+}$ , ohne $\text{Mg}^{2+}$ , #L1835	Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
10x T4 Ligationspuffer, #B69	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
10x Tango Puffer, #BY5	Thermo Fisher Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
10x Tris/Glycine/SDS Buffer, #161-0772	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
4x Laemmli Sample Buffer, #161-0747	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
5x Reporter Lysis Buffer, #E4030	Promega, Madison, WI
Accutase, #7920	StemCell™ Technologies, Köln, Deutschland
Aceton Rotipuran® >99,8%, #9372	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agar, #2266.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose (PeqGOLD Universal), #35-1020	PEQLAB GmbH, VWR Life Science Competence, Erlangen, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz, K029.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ascorbinsäure, #A4544	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ATP, 100 mM, #R0441	Thermo Fisher Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
Borsäure, #6943.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BSA (engl. <i>bovine serum albumin</i> ), #A7906	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CHIR99021, #C-6556	LC Laboratories, Woburn, MA
Chlorophenol red $\beta$ -D-Galaktopyranosid (CPRG), #10884308001	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Collagenase Typ II, #17101-015	Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
Color Prestained Protein Standard, Broad Range, #P77125	New England Biolabs NEB, Ipswich, MA
Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix, #354277	Corning, Tewksbury, MA
Dimethylsulfoxid (DMSO), #A994.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , $\geq 99.99\%$ trace metals basis, #431478	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dispase (5 U/ml), #7913	StemCell™ Technologies, Köln, Deutschland
DNA Away® Dekontaminationslösung, #732-2353	VWR, Radnor, PA
DNA Gel Loading Dye (6x), # R0611	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
DNase I recombinant, RNase-free, #04716728001	Roche Molecular Systems, Inc., Rotkreuz, Schweiz
dNTP-Set 1 (100 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP), #K039.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DTT, 1 mM, #28025013	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
EDTA, #CN06.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure, >99%, #A6283	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 96% vergällt, #T171.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut 95%, #64-17-5	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid, #MKBV9660V	Sigma Life Science, Sigma Aldrich, Merck Millipore,

	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>FastDigest BbsI</b> , #FD1014	Thermo Fisher Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Fetal Bovine Serum, EU Approved origin, South America</b> , #10270-106	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Fetal Bovine Serum, FCS, South America, GE Healthcare Hyclone</b> , #SV30160.03	Hyclone Laboratories Inc, GE Healthcare, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>FLT3 Ligand Rekombinant Human Protein</b> , #PHC9414	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>FuGENE® HD Transfection Reagent</b> , #E2311	Promega Corporation, Fitchburg, WI
<b>G418</b> , #A2912 (25.000 U/ml)	Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Gelatine</b> , #G9391	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>GeneRuler™ DNA Ladder, 50 bp</b> , #SM0371	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific
<b>Glucose</b> , #G8270	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>GlutaMAX™-I Supplement</b> , #35050-061	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Glycerin</b> , #3783	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>H<sub>2</sub>O VE</b>	Wasseraufbereitungssystem des DHMs
<b>H<sub>2</sub>O, nuclease-frei</b> , #R0581	Thermo Fisher Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Hefeextrakt</b> , #2363.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>IL3 Rekombinantes Humanes Protein</b> , #PHC0034	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Immersionsöl</b> , #56822	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Kaliumchlorid KCl, ≥ 99,0%</b> , #P9541	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>KnockOut™ Serum Replacement (KSR)</b> , #10828-028	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Kollagenase, Typ 2</b> , #CLS-2	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ
<b>L-Ascorbinsäure-2-Phosphat</b> , #A8960	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>L-Glutamin (200 mM)</b> , #25030-024	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Luziferase Assay Buffer</b> , #E152A	Promega, Madison, WI
<b>Luziferase Assay Substrat</b> , #E151A	Promega, Madison, WI
<b>Magnesiumsulfat Heptahydrat, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, BioReagent, for molecular biology, suitable for plant cell culture, ≥99.0%</b> , #M2773	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>MEM Non-Essential Amino Acids Solution 100x</b> , #11140-050	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Methanol</b> , #34860	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>MgCl<sub>2</sub> Hexahydrat</b> , #105833	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Milchpulver</b> , #A0830	PanReac AppliChem, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>Mini-Protean® TGX Stain-Free™ Protein Gel</b> , #4568094	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<b>Mitomycin C</b> , #M4287	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Mounting Medium with DAPI</b> , #ab104138	Abcam, Cambridge, England
<b>NaCl</b> , #3957.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat</b> ,	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA,

<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, BioXtra, for molecular biology, ≥99,5%, #71507</b>	Darmstadt, Deutschland
<b>Natriumhydroxidlösung, c(NaOH) = 0,1 mol/l (0,1 N) Titripur® Reag. Ph Eur, Reag. USP, #1.09141</b>	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Natriumpyruvat, #11360-070</b>	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Normales Kaninchenserum (engl. rabbit serum), #ab7487</b>	Abcam, Cambirdge, England
<b>Normales Ziegen Serum (engl. goat-serum), #ab7841</b>	Abcam, Cambridge, England
<b>Nuclease Free H<sub>2</sub>O, #10977-035</b>	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>O. sativa-derived recombinant human serum albumin, #A0237</b>	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Paraformaldehyd, #0335</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Penicillin – Streptomycin (100x) for cell culture BC, #A8943</b>	PanReac AppliChem, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Ampules, #23209</b>	Pierce Technolgy, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase, #E3101K</b>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>Poly-(2-Hydroxyethylmethacrylate), #P3932</b>	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Polyacrylamidgel Mini-Protean® TGX Stain-Free™ Protein Gel, #4568094</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<b>Puromycinhydrochlorid, #P8833-25 mg</b>	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Quantitas DNA Marker 25 – 500 bp, #250216</b>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>Random Hexamer Oligonukleotide, #48190011</b>	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Recombinant Human FGF basic 146 aa, #233-FB</b>	R&D Systems, Minneapolis, MI
<b>Recombinantes humanes FGF basic (b-FGF), #133-FB</b>	R&D Systems, Minneapolis, MI
<b>Rekombinantes humanes Serumalbumin, #A0237</b>	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>ReLeSR™, #05872</b>	StemCell™ Technologies, Köln, Deutschland
<b>Reporter Lysis Buffer (5x), #E4030</b>	Promega, Madison, WI
<b>RIPA Puffer, #9806</b>	Cell Signaling Technology. Inc., Danvers, MA
<b>Rock Inhibitor Y-27632, #72304</b>	StemCell™ Technologies, Köln, Deutschland
<b>Salzsäure, c(HCl) = 0,1 mol/l (0,1 N) Titripur® Reag. Ph Eur, Reag. USP, #109060</b>	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>SmartFlare™ Proben</b>	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Stem Cell Factor - SCF (c-KIT Ligand) Rekombinantes Humanes Protein, #PHC2115</b>	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>T4 Polynukleotid Kinase PNK 10.000 U/ml, #M0201S</b>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
<b>T7 DNA Ligase 3.000.000 U/ml, #M0318S</b>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
<b>Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Pack, #1704156</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<b>TrisBase, #5429.3</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Triton-X-100*, #T8787</b>	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Trypanblau 0.5% (w/v), #L6323</b>	Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>TrypLE™ Select Enzym 10x, #A12177-01</b>	Thermo Fisher Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Trypsin-EDTA (0,25%, phenol red), #25200-056</b>	Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram,

	MA
<b>Trypton</b> , #8952.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>UltraPure™ 0.5M EDTA, pH 8.0</b> , #15575-038	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Universal-Agarose, peqGOLD</b> , #732-2789	VWR, Radnor, PA
<b>Water, RNase-free, DEPC treated, Molecular Biology Grade</b> , Ultrapure, # J70783	Thermo Fisher Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Wnt-C59</b> , #S7037	Sellekchem, Houston, TX
<b>β-Mercaptoethanol (55 mM)</b> , #21985-023	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>λ DNA/EcoR1+ HindIII Marker 3</b> , #11833953	Fisher Scientific GmbH by Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA

\*4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol.

### 2.3.3 Kommerziell erworbene Kits

Alle kommerziell erworbenen Kits sind in Tabelle 5 aufgelistet und wurden nach Vorgabe des Herstellers gelagert und verwendet.

**Tabelle 5: Verwendete Kits**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
<b>BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit</b> , #554714	BD Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, San Jose, CA
<b>CytoTune™ -iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit</b> , #A16517	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>DNeasy Blood &amp; Tissue Kit</b> , #69506	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>DNeasy Blood Mini Kit</b> , #51104	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>FastStart™ High Fidelity PCR System, dNTPack, 500U</b> , #4738292001	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>High Pure PCR Product Purification Kit</b> , #11732668001	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>hPSC Genetic Analysis Kit</b> , #07550	StemCell™ Technologies, Köln, Deutschland
<b>Human Stem Nucleofactor® Kit 1</b> , # VH-5012	Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland
<b>M-MLV Reverse Transkriptase Kit</b> , #28025013	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System</b> , #N1610	Promega Corporation, Fitchburg, WI
<b>peqGOLD DNase I Digest Kit</b> , #732-2982	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
<b>peqGOLD Total RNA Kit (S-Line)</b> , #732-2871	VWR International, Radnor, PA
<b>Pierce™ BCA Protein Assay Kit</b> , #23225	Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Power SYBR® Green PCR Master Mix</b> , #4367659	Applied Biosystems by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>QIAGEN Plasmid Midi Kit</b> , #12143	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>QIAGEN Plasmid Mini Kit</b> , #27106	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit</b> , #204143	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit, 10 Rxn</b> , #200515	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA
<b>SuperSignal™ West Dura Extend Duration Substrate</b> , #34076	Thermo Fisher Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA



### 2.3.4 Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper wurden nach Vorgabe der Hersteller gelagert, falls durch den Hersteller vorgegeben, aliquotiert und sind in den Tabellen 6 (Primärantikörper) und 7 (Sekundärantikörper) gelistet.

**Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper**

Antikörper	Spezifität/ Isotyp	Hersteller	Bestell- nummer	Konzentration [mg/ml]	Verdünnung
<b>Anti NANOG antibody</b>	rabbit polyclonal	Abcam, Cambridge, UK	ab80892	1	1:75 (ICC)
<b>Anti-Cardiac Troponin T antibody [1C11]</b>	mouse monoclonal IgG <sub>1</sub>	Abcam, Cambridge, UK	ab8295	1	1:100 (ICC) 1:200 (FACS)
<b>Anti-Connexin 40 /GJA5 antibody</b>	rabbit polyclonal IgG	Abcam, Cambridge, UK	ab38580		1:100 (ICC)
<b>Anti-Connexin 43 antibody</b>	mouse monoclonal IgG <sub>1</sub>	Chemicon International, Merck Millipore, Burlington, MA	MAB3068	0,25	1:100 (ICC)
<b>Anti-DDK (FLAG) antibody, clone OT14C5</b>	mouse monoclonal IgG <sub>2a</sub>	OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD	TA50011	1	1:500 (WB) 1:1000 (FACS)
<b>Anti-GAPDH antibody</b>	rabbit polyclonal IgG	Abcam, Cambridge, UK	ab36840	1	1:200 (ICC)
<b>Anti-Myosin Light Chain 2 (MYL2) antibody, syn. MLC2V</b>	rabbit, polyclonal IgG	Proteintech Group Inc., Rosemont, IL	10906-1-AP	1	1:200 (ICC) 1:200 (FACS)
<b>Anti-Myosin Light Chain 7 (MYL7) antibody, syn. MLC2A</b>	mouse monoclonal IgG <sub>2b</sub>	Synaptic Systems GmbH, Göttingen, Deutschland	311011	1	1:400 (ICC) 1:400 (FACS)
<b>Anti-SOX2 antibody</b>	rabbit, polyclonal IgG	Abcam, Cambridge, UK	ab137385	1	1:250 (ICC)
<b>Anti-TRA-1-81 antibody, clone TRA-1-81</b>	mouse, monoclonal IgM	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	MAB4381	1	1:75 (ICC)
<b>Anti-α smooth muscle Actin antibody</b>	rabbit polyclonal IgG	Abcam, Cambridge, UK	ab5694	0,2	1:200 (ICC)
<b>Mouse Monoclonal ANTI-Flag® M2 antibody, Clone M2</b>	mouse monoclonal IgG <sub>1</sub>	Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	F1804	1	1:200 (ICC)
<b>Myosin Heavy Chain Antibody (MF20)</b>	mouse monoclonal IgG <sub>2</sub>	Novus Biologicals, R&D Systems, Minneapolis, MN	MAB4470	0,5	1:50 (ICC)

Abkürzungen: FACS: engl. *fluorescence activated cell sorting*. ICC: engl. *immunocytochemistry*. WB: Western Blot.

**Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper**

Antikörper	Spezifität/ Isotyp	Hersteller	Bestell- nummer	Konzentration [mg/ml]	Verdünnung
Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 555)	polyclonal, IgG	Abcam, Cambridge, UK	ab150114	2	1:500 (ICC)
Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	polyclonal, IgG	Abcam, Cambridge, UK	ab150166	2	1:500 (ICC)
Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	polyclonal, IgG	Abcam, Cambridge, UK	ab150113	2	1:500 (ICC) 1:1.000 (FACS)
Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP)	polyclonal, IgG	Abcam, Cambridge, UK	ab97023	2	1:100.000 (WB)
Goat Anti-Mouse IgM mu chain (Alexa Fluor® 488)	polyclonal, IgM	Abcam, Cambridge, UK	ab150121	2	1:500 (ICC)
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 555)	polyclonal, IgG	Abcam, Cambridge, UK	ab150078	2	1:500 (ICC)
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	polyclonal, IgG	Abcam, Cambridge, UK	ab150077	2	1:500 (ICC) 1:1.000 (FACS)

Abkürzungen: FACS: engl. *fluorescence activated cell sorting*. ICC: engl. *immuncytochemistry*. WB: Western Blot.

### 2.3.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide zur Amplifikation von genomischer DNA wurden auf der Webseite <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (*National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*, Bethesda, MD (NCBI)) konzipiert. Die Oligonukleotide zur Amplifikation von cDNA wurden unter Verwendung der Webseite [https://lifescience.roche.com/en\\_de/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center/](https://lifescience.roche.com/en_de/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center/) (*Universal ProbeLibrary System Assay Design*, Roche Molecular Systems, Inc., Rotkreuz, Schweiz) generiert. Alle Oligonukleotide wurden auf der Webseite <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (*Basic local alignment search tool (BLAST)*, Altschul *et al.*, 1990) auf die Korrektheit ihrer Sequenz überprüft. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Ella Biotech GmbH (Martinsried, Deutschland) bezogen und nach Herstellervorgabe rekonstituiert und gelagert. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in Tabelle 8 und 9 angegeben.

**Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide zur Amplifikation von genomischer DNA**

Zielsequenz	5' → 3' (forward)	5' → 3' (reverse)
<i>TBX5 enh9</i>	CCC ATA CCC ATG GAG CTG AC	GAA CTC TAA CCA TAA GGC TCA CCA
<i>TBX5 Ex9 Flag (F/R1)</i>	ACT TCT CCG CTC ACT TCA CCT C	GGA CAG ACT CCA ACT ACG CAC T
<i>TBX5 Exon 2</i>	CAC CCC CAT CTC CCC CTG	GCC GAG CAG GAA AGC CAG A
<i>TBX5 Exon 3</i>	GTC TCT GTG TTT TGG GGG AG	CTC TTC CAA GCC ACC TTT TCT
<i>TBX5 Exon 4</i>	TGG ATG GAG GCT GCC TTA AAA	GTT CAC TGA TAC AAC TTT TCA AC
<i>TBX5 Exon 5</i>	GGT GCG TGA ACT GAA GCA CG	GGG AGA GAA ACC CAG TGA GA
<i>TBX5 Exon 5 nested</i>	TTC GGT GCA GTG CGC TAC C	AGA GAG GAC AAG AGG GAG AC
<i>TBX5 Exon 6</i>	AGC AGG GTT TTA TCT GGA GAC	CAG CAG GAA AAC CTT GCA GAT
<i>TBX5 Exon 7</i>	ATT AGC TCA TGT CCT GAG GTG	GGT TGC TGC TGG CTT ACC TG
<i>TBX5 Exon 8</i>	CCT GGT TCA GCC ACT CAG G	TAC TCC TCA CCC CCT CAC C
<i>TBX5 Exon 9</i>	TAA CTG TCT CCA CTT TTA GCT G	GGG GTT CTC TTG GCT ACT GT
<i>TBX5 Exon 9 nested</i>	CCT GGT GCC TGC TCC TGG	CTA CTG TCT CTC TCC TTC TCT
<i>TBX5 Flag GT (Fwd2/Rev2)</i>	AAT GGC GGT TAG GGC TAA CAG T	ACC CGG TAG AAT TTC GAG GTC G
<i>TBX5 Flag GT (Fwd2/Rev3)</i>	AAT GGC GGT TAG GGC TAA CAG T	AGG AAA TGT CTG TTG TGA AGC A
<i>TBX5 p1</i>	TAT TCT GTT CGT GGT GCG GG	TTT CTA AGC AGC GCA GTG GT
<i>TBX5 p2</i>	CCT TGG CGG AGA ACT TAC CC	GTC TTC GCC TAT CAG TGC CG
<i>TBX5 p2 nested</i>	TCC AGA TTC AGA CGT CCA GC	TCA CGA GTC ACG CAA CCG
<i>U6/TBX5_R1208</i>	GAG GGC CTA TTT CCC ATG ATT CC	GCT GGT ATT TGT GCA TGG AA
<i>THEMIS2</i>	CAG AGG CTT TGC GTC TAT GGC C	TCC CAG GCT CAG AGT CTA GGC T

Abkürzungen: **enh**: Enhancer. **F**: engl. forward. **Fwd**: engl. forward. **GT**: engl. genotyping. **p**: Promotor. **R**: engl. reverse. **Rev**: engl. reverse. **THEMIS2**: engl. Thymocyte Selection Associated Family Member 2

**Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide zur Amplifikation von cDNA**

Offizielles Genymbol	Offizieller Name	GenBank Identifikation (ID)	5' → 3' (forward)	5' → 3' (reverse)
<b>ACTA2</b> F1220/R1331	<i>Homo sapiens actin, alpha 2, smooth muscle, aorta</i>	NM_001141945.2	GTG ATC ACC ATC GGA AAT GAA	TCA TGA TGC TGT TGT AGG TGG T
<b>ACTB</b> F382/R478	<i>Homo sapiens actin beta</i>	NM_0011101.3	CCA ACC GCG AGA AGA TGA	CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG
<b>AFP</b> F1665/R1755	<i>Homo sapiens alpha fetoprotein</i>	NM_0011134.2	GTG CCA AGC TCA GGG TGT AG	CAG CCT CAA GTT GTT CCT CTG
<b>CD31</b> F2378/R2485	<i>Homo sapiens platelet and endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1)</i>	NM_000442.4	ATG CCG TGG AAA GCA GAT AC	CTG TTC TTC TCG GAA CAT GGA
<b>c-MYC</b> F1311/R1412	<i>Homo sapiens MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>	NM_002467.5	CAC CAG CAG CGA CTC TGA	GAT CCA GAC TCT GAC CTT TTG C
<b>GJA5</b> F33/R131	<i>Homo sapiens gap junction protein alpha 5</i> Syn. CX40	NM_005266.6	CGT GGG CAG TTG GAG AAG	GGG AAC AGA TGC CAA AAC TT
<b>HEY2</b> F817/R910	<i>Homo sapiens hes related family bHLH transcription factor with YRPW motif 2</i>	NM_012259.2	CTT GTC GCC TCT CCA CAA CT	ATT CGG AGG GCT GAA TCC
<b>ID2</b> F509/R612	<i>Homo sapiens inhibitor of DNA binding 2</i>	NM_002166.4	ATA TCA GCA TCC TGT CCT TGC	AAA GAA ATC ATG AAC ACC GCT TA
<b>IRX4</b> F833/R909	<i>Homo sapiens iroquois homeobox 4</i>	NM_001278632.1	CCT CAA GAG CTC CAA GAA CG	CGA AGT CGT CCA AGT CAC TAA G
<b>ISL1</b> F1295/R1372	<i>Homo sapiens ISL LIM homeobox 1</i>	NM_002202.2	GCA GCC CAA TGA ACA AAA CTA A	CCG TCG TGT CTC TCT GGA CT
<b>KLF4</b> F1441/R1574	<i>Homo sapiens Kruppel like factor 4</i>	NM_001314052.1	TCT TCG TGC ACC CAC TTG GG	CTG CTC AGC ACT TCC TCA AG

<b>KRT14</b> F1334/R1419	<i>Homo sapiens keratin 14</i>	NM_000526.4	CAC CTC TCC TCC TCC CAG TT	ATG ACC TTG GTG CGG ATT T
<b>MYL2</b> F446/R519	<i>Homo sapiens myosin light chain 2</i>	NM_000432.3	GCA GGC GGA GAG GTT TTC	AGT TGC CAG TCA CGT CAG G
<b>NANOG</b> F253/R446	<i>Homo sapiens Nanog homeobox</i>	NM_024865.3	TGC TTT GAA GCA TCC GAC TGT	GGT TGT TTG CCT TTG GGA CTG
<b>NKX2.5</b> F450/R552	<i>Homo sapiens NK2 homeobox 5</i>	NM_004387.3	TTC TAT CCA CGT GCC TAC AGC	CTG TCT TCT CCA GCT CCA CC
<b>NPPA</b> F522/R614	<i>Homo sapiens natriuretic peptide</i>	NM_006172.3	GAG CGG ACT GGG CTG TAA C	GGA GCC TCT TGC AGT CTG TC
<b>OCT4</b> F268/R416	<i>Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1),</i>	NM_002701.5	GGG ATG GCG TAC TGT GGG	GCA CCA GGG GTG ACG GTG
<b>REX1</b> F292/R397	<i>Homo sapiens ZFP42 zinc finger protein (ZFP42),</i>	NM_174900.4	AGT AGT GCT CAC AGT CCA GCA G	TGT GCC CTT CTT GAA GGT TT
<b>SeV</b> 181 bp	<i>Sendai Virus Genom ( CytoTuneR 2.0 Sendai reprogramming)</i>	M69046.1	GGA TCA CTA GGT GAT ATC GAG C	ACC AGA CAA GAG TTT AAG AGA TAT GTA TC
<b>SOX2</b> F1305/R1496	<i>Homo sapiens SRY-box 2</i>	NM_003106.3	AGC AGA CTT CAC ATG TCC CAG	ACC GGG TTT TCT CCA TGC TGT
<b>SOX7</b> F287/R398	<i>Homo sapiens SRY-box 7</i>	NM_031439.3	TGA ACG CCT TCA TGG TTT G	AGC GCC TTC CAC GAC TTT
<b>TBX20</b> <b>F993/1086</b>	<i>Homo sapiens T-box 20</i>	NM_001077653.2	AGT CAG ACA ACC CCA AAT CG	ACC CAG GAA AAC TGG AAG AAG
<b>TBX5</b> F888/R953	<i>Homo sapiens T-box 5</i>	NM_000192.3	TGA TCA TAA CCA AGG CTG GA	GAT TAA GGC CCG TCA CCT TC
<b>TBX5</b> F2141/R2245			GGC GTG CCA AGG ACT CTA TC	TGT TGT GAA GCA GGC CTC AC
<b>TBX5</b> F2141/FlagR2242			GGC GTG CCA AGG ACT CTA TC	GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC
<b>TH</b> F1218/R1337	<i>Homo sapiens tyrosine hydroxylase</i>	NM_199292.2	TGT ACT GGT TCA CGG TGG AGT	TCT CAG GCT CCT CAG ACA GG
<b>TNNI3</b> F594/R707	<i>Homo sapiens troponin I3, cardiac type</i>	NM_000363.4	GCA GAT GCC ATG ATG CAG	CAC CTC CCG GTT TTC CTT
<b>TNNT2</b> F610/R709	<i>Homo sapiens troponin T2, cardiac type</i>	NM_000364.3	ATG ATG CAT TTT GGG GGT TA	TCC TCC TCT CAG CCA GAA TC

Die Position der verwendeten Oligonukleotide ist für die angegebene GenBank Identifikation (ID) angegeben. **Abkürzungen:** F: engl. forward. R: engl. reverse.

### 2.3.6 Lösungen und Puffer

Die Herstellung, Lagerung und Haltbarkeit aller verwendeten Lösungen und Puffer ist im Folgenden beschrieben. Alle Sterilfiltrationen wurden mit einem 0,22 µm PVDF-Filter (Carl Roth GmbH + Co. KG) durchgeführt. Bidestilliertes Wasser (*aq. bidest.*), welches zur Verdünnung von Lösungen und Puffern verwendet wurde, stammte aus der Millipore Wasseranlage des DHM.

#### Dulbecco's Phosphat gepufferte Saline (D-PBS)

10x Dulbecco's Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (engl. *Dulbecco's phosphate buffered saline*, 10x D-PBS, Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA) wurde mit *aq. bidest.* (v/v) verdünnt. 1x D-PBS wurde zur Sterilisation autoklaviert und bei Raumtemperatur (RT, 15-25°C) aufbewahrt.

#### Trypanblau Lösung (0,2%)

Trypanblau Lösung (0,2%) wurde zur Bestimmung der Zellviabilität eingesetzt. Trypanblau (0,5%, Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA) wurde mit sterilem 1x D-PBS auf eine 0,2%-ige Lösung verdünnt (v/v). Die Aliquots wurden bei 4°C gelagert.

#### Ethanol (70%)

Ethanol (70%) wurde zur Sterilisation von Plastikmaterialien in der Zellkultur und der Sicherheitswerkbänke verwendet. Die Herstellung erfolgte durch Verdünnung von vergälltem 96%-igem Ethanol (Carl Roth GmbH + Co. KG) mit *aq. bidest.* (v/v). Die Lagerung erfolgte bei RT.

#### Ethanol

Ethanol in unterschiedlichen Konzentrationen wurde für diverse Anwendungen verwendet. Ethanol absolut (99%, Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) wurde mit *aq. bidest.* auf die entsprechende Konzentration (v/v) eingestellt.

#### Essigsäure (100 mM)

100 mM Essigsäure wurde zur Rekonstitution des Zytokins IL-6 verwendet. Zur Herstellung der Essigsäure in einer Stoffmengenkonzentration von 100 mM wurde Essigsäure (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) mit *aq. bidest.* verdünnt (v/v).

#### Methanol (90%)

Methanol (90%) wurde zur Aufbereitung der Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse und in der Immunzytochemie (engl. *immuncytochemistry*, ICC) verwendet. Methanol (90%) wurde aus 100%-igem Methanol (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) mit *aq. bidest.* hergestellt (v/v) und bei -20°C gelagert.

#### Trypsin EDTA Lösung (0,05%)

Trypsin EDTA Lösung (0,05%) wurde zur Passagierung von Zellen verwendet. Trypsin-EDTA (0,25%, Life Technologies<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific) wurde mit sterilem 1x D-PBS verdünnt (v/v). Die Trypsin EDTA Lösung (0,05%) wurde sterilfiltriert. Die Stabilität der Arbeitslösung ist für zwei Wochen bei 4°C gegeben.

#### Kollagenase Lösung (0,2%)

Kollagenase Lösung (0,2%) wurde zum Verdau von humanem adipösen Biomaterial verwendet. Eine 0,2%-ige Kollagenase Lösung wurde hergestellt, indem Kollagenase Typ II (Life Technologies<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific) in sterilem 1x D-PBS gelöst wurde (w/v). Der Lösung wurde Penicillin und Steptomycin (PanReac AppliChem, AppliChem GmbH) in einer finalen Konzentration von 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Steptomycin zugesetzt. Die Kollagenase Lösung wurde sterilfiltriert und frisch verwendet.

### Kollagenase Typ 2/DNase I Lösung

Die Kollagenase Typ 2/DNase I Lösung (3000 U/ml Kollagenase I, 300 U/ml DNase I) wurde zur Dissoziation von Kardiomyozytenaggregaten verwendet. Die hier verwendete Kollagenase, Typ 2 besitzt kollagenolytische und proteolytische Aktivität, löst effektiv extrazelluläre Matrices auf und ist für die Dissoziation von Gewebe wie Herz, Leber und Knochen und zur Herstellung von Einzelzellen beschrieben (Angaben des Herstellers). Kollagenase Typ 2 (Worthington Biochemical Corporation) ist lyophilisiert bei 2-8°C stabil. DNase I Recombinant (Roche Molecular Systems, Inc.) ist eine DNA spezifische Endonuklease, deren Lagerung bei -20°C erfolgt. Die Aktivität ist mit 10.000 U/ml angegeben.

Die Kollagenase Typ 2/DNase I Lösung (3000 U/ml Kollagenase I, 300 U/ml DNase I) wurde in 1x D-PBS (v/v) hergestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und frisch verwendet.

### EDTA/PBS Lösung (0,5 mM)

EDTA/PBS Lösung (0,5 mM) wurde für die Dissoziation von humanen iPS Zellen verwendet. Die Herstellung der Lösung erfolgte aus einer 0,5 M EDTA (UltraPure™ 0,5 M EDTA, pH 8.0, Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific) Lösung durch Zugabe von sterilem 1x D-PBS (v/v). Die Lösung wurde sterilfiltriert und ist für sechs Monate bei RT stabil.

### Dispase Lösung (1 U/ml)

Dispase ist eine Protease, welche zur sensiblen Dissoziation von Gewebe geeignet ist. Die in dieser Arbeit verwendete Dispase (StemCell™ Technologies) enthält die Dispase II mit einer Aktivität von 5 U/ml. Die neutrale Protease gewonnen aus *Bacillus polymyxa* ist in *Hanks' Balanced Salt Solution Modified* gelöst und wird bei -20°C gelagert. Die Protease wurde über Nacht bei 4°C aufgetaut, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Dispase Lösung mit einer Aktivität von 1 U/ml (Arbeitslösung) wurde mit sterilem 1x D-PBS hergestellt (v/v) und ist bei 4°C für zwei Wochen stabil.

### Mitomycin C Lösung

Mitomycin C (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) inhibiert die DNA Synthese, indem es kovalent mit der DNA reagiert, die Separation der komplementären DNA Stränge verhindert und daraus resultierend die DNA Replikation unterbindet. Mitomycin C wurde zur Arretierung muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs), die als Fibroblastenschicht (engl. *feeder layer*) bei der Reprogrammierung von peripheren mononukleären Blutzellen (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) verwendet wurden eingesetzt. Mitomycin C wurde in *aq. bidest.* auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml eingestellt (w/v), sterilfiltriert und bei -20°C im Dunklen gelagert. Bei Verwendung wurde die Stocklösung aufgetaut und bei 4°C für zwei Wochen ohne Verlust der Aktivität aufbewahrt. Die final eingesetzte Konzentration von 10 µg/µl zur Inaktivierung von MEFs wurde mit MEF Medium eingestellt.

### Rinderserumalbumin (BSA)

BSA (engl. *Albumin from Bovine Serum*, BSA) Lösungen wurden für diverse Anwendungen, zur Stabilisierung von Zytokinen nach Rekonstitution und in der ICC verwendet. Eine 10%-ige

BSA Lösung wurde hergestellt, indem BSA (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) in 1x D-PBS gelöst wurde (w/v). Die Lösung wurde sterilfiltriert und zur Langzeitlagerung in geeigneten Aliquots bei -20°C eingefroren. Alle höheren Verdünnungen wurden mit 1x D-PBS (v/v) hergestellt. Für die Rekonstitution der Zytokine wurde BSA nach Angaben der Hersteller verwendet. Für die immunzytochemische Anwendung wurde die BSA Lösung (10%) in dem zu verwendenden Reagenz auf die gewünschte Konzentration eingestellt (v/v).

#### Fötale Kälberserum (FCS)

FCS (engl. *fetal calve serum*, FCS), South America, GE Healthcare Hyclone (Hyclone Laboratories Inc, GE Healthcare, Thermo Fisher Scientific) wurde über Nacht bei 4°C aufgetaut, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

#### Fötale Kälberserum (FCS)

FCS, EU Approved origin, South America (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific) wurde über Nacht bei 4°C aufgetaut, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

#### FACS Puffer (PBS/0,5% BSA/ 2 mM EDTA)

FACS Puffer wurde verwendet, um Zellen final für die durchflusszytometrische Analyse in Suspension zu nehmen. Der Puffer dient zur Stabilisierung und zur Aufrechterhaltung einer Einzelzellsuspension. 1,0 g BSA (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) und 0,11 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Carl Roth GmbH + Co. KG) wurden in 1x D-PBS gelöst (w/v) und sterilfiltriert. Die Lösung wurde auf 200 ml mit sterilem 1x D-PBS aufgefüllt. FACS Puffer ist für vier Wochen bei 4°C stabil.

#### Humaner basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (b-FGF)

Der Fibroblastenwachstumsfaktor b-FGF (engl. *basic „fibroblast growth factor“*, basic FGF) ist ein Mitglied der FGF Familie von mitogenen Proteinen. Diese Wachstumsfaktoren sind entscheidend an der Regulation des Zellwachstums, der Proliferation und Differenzierung beteiligt (Coulier *et al.*, 1997). Der b-FGF stimuliert nachweislich die Proliferation von Zellen mesodermalen Ursprungs (Chen *et al.*, 2004). Des Weiteren ist bekannt, dass b-FGF die embryonale Entwicklung und Differenzierung moduliert (Fering *et al.*, 1994). Humaner rekombinanter b-FGF (R&D Systems) ist lyophilisiert für 12 Monate bei -20°C bis -70°C lagerbar (Angabe des Herstellers). Der b-FGF wurde mit sterilem 1x D-PBS, supplementiert mit 0,1% BSA (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) rekonstituiert und auf eine Stockkonzentration von 20 µg/ml eingestellt (w/v). Die Stocklösung wurde aliquotiert und zur Langzeitlagerung bei -20°C aufbewahrt. Im rekonstituierten Zustand ist b-FGF für drei Monate bei -20°C stabil.

#### β-Mercaptoethanol

β-Mercaptoethanol ist ein Reduktionsmittel für Zellkulturmedien und vermeidet toxische Konzentrationen an Sauerstoffradikalen. β-Mercaptoethanol (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific) ist eine 55 mM Stocklösung in *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

(DMEM, Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA). Die Stocklösung wurde aliquotiert und ist bei 4°C für 36 Monate stabil.

#### Rock inhibitor Y-27632

Rock Inhibitor Y-27632 wird in der humanen iPS Kultur verwendet, um die Überlebensfähigkeit nach Subkultivierung und Auftauen von iPS Zellen zu verbessern (Chen *et al.*, 2014). Y-27632 ist ein zellpermeabler, potenter und selektiver Inhibitor der Rho-assoziierten Doppelwendel-Struktur enthaltenden Proteinkinase ROCK. Y-27632 inhibiert sowohl ROCKI, wie auch ROCKII, indem es zur kompetitiven Bindung mit ATP am katalytischen Zentrum der Proteinkinase kommt (Davies *et al.*, 2000; Ishizaki *et al.*, 2000). Die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von Y-27632 (10 µM) ist durch verschiedene Publikationen als ideal beschrieben, um den Erhalt des Stammzellcharakters und die Selbsterneuerung von humanen ES Zellen zu fördern (Li *et al.*, 2009; Koyanagi *et al.*, 2008; Ungrin *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 1996). Des Weiteren ist die Zugabe von Y-27632 für die Steigerung der Überlebensrate von ES Zellen, die als Einzelzellschicht (engl. *monolayer*) bei der Initiierung der Differenzierung ausplattiert werden beschrieben (Mehta *et al.*, 2014). Auch in dem, in dieser Arbeit verwendeten Protokoll der gerichteten Differenzierung nach Burridge und Kollegen (Burridge *et al.*, 2014) wird die Zugabe von Y-27632 beim Plattieren der Einzelzellen empfohlen. Eine 10 mM Stocklösung wurde hergestellt, indem 1 mg Rock Inhibitor Y-27632 (StemCell™ Technologies) in 312 µl sterilem 1x D-PBS gelöst wurden. Rekonstituierter Rock Inhibitor ist bei -20°C im Dunklen für sechs Monate stabil. Die Stocklösung wurde bei Gebrauch aufgetaut und eine finale Konzentration von 10 µM mit Zellkulturmedium eingestellt. Die Stocklösung ist bei 4°C für zwei Wochen stabil.

#### Rekombinantes humanes Serum Albumin

Rekombinantes humanes Serum Albumin (engl. *O. sativa-derived recombinant human serum albumin*, Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) ist Bestandteil des gerichteten Differenzierungsmediums CDM3 und wird als Pulver bei -20°C gelagert. Die Stocklösung (75 mg/ml) wurde mit *aq. bidest.* (w/v) hergestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und geeignete Aliquots bei -20°C für bis zu sechs Monate gelagert.

#### Ascorbinsäure

Ascorbinsäure wurde für das spontane Differenzierungsmedium verwendet. Ascorbinsäure (#A4544, Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) wurde in *aq. bidest.* in einer Konzentration von 5 mg/ml (w/v) hergestellt. Da Ascorbinsäure lichtsensibel ist, wurde darauf geachtet die Lösung keinem Licht auszusetzen. Geeignete Aliquots wurden hergestellt und bei -20°C für maximal sechs Monate gelagert.

#### L-Ascorbinsäure-2-Phosphat

L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (#A8960, Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) wurde für das gerichtete Differenzierungsmedium CDM3 verwendet. Es wurde eine Stocklösung (64 mg/ml) mit *aq. bidest.* hergestellt und diese sterilfiltriert. Aliquots wurden für maximal



sechs Monate bei -20°C gelagert. L-Ascorbinsäure-2-Phosphat wurde bei jedem Mediumwechsel frisch zugegeben.

#### CHIR99021

CHIR99021 wurde zur Aktivierung des Wnt-Signalweges (engl. *Wg* für *Wingless* und *Int-1*) in der gerichteten Differenzierung verwendet. CHIR99021 ist ein *small molecule*, welches spezifisch die Glykogensynthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) und die Glykogensynthase Kinase 3 $\alpha$  (GSK3 $\alpha$ ) durch Blockade von C/EBP $\alpha$  und PPAPy inhibiert und den Wnt-Signalweg aktiviert (Bennett *et al.*, 2002). In der Publikation von BurrIDGE und Kollegen wird beschrieben, dass die Zugabe von CHIR99021 zu einem signifikanten Zelltod der iPS Zellen führt (BurrIDGE *et al.*, 2014). CHIR99021 (LC Laboratories) wird bei -20°C gelagert. Eine Stocklösung mit 6 mM wurde in DMSO (engl. *Dimethyl Sulfoxide*, Carl Roth GmbH + Co. KG) hergestellt (w/v). Die Lösung wurde sterilfiltriert und geeignete Aliquots bei -80°C gelagert. Die Stabilität des CHIR99021 ist für eine Stoffmengenkonzentration von 6 mM bei -80°C, nach Angabe des Herstellers, für sechs Monate gegeben.

#### Wnt-C59

Wnt-C59 ist ein *small molecule*, welches in der Literatur zur Abschwächung des Wnt-Signalweges beschrieben ist (Han *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016). Wnt-C59 (Sellekchem) ist ungelöst für drei Jahre bei -20°C stabil (Angabe des Herstellers). Eine Stocklösung von 2 mM wurde in DMSO hergestellt (w/v), sterilfiltriert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Stabilität von Wnt-C59 ist bei -80°C für eine Stoffmengenkonzentration von 2 mM, nach Angabe des Herstellers, für sechs Monate gegeben.

#### 0,1% PBS-T

Um eine 0,1%-ige PBS-T Lösung herzustellen wurde Triton-X-100 (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) in 1x D-PBS verdünnt (v/v). Eine Durchmischung wurde durch vorsichtiges Invertieren erreicht. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

#### Paraformaldehyd (PFA)

Paraformaldehyd (PFA) wurde zur Fixierung von Zellen in der ICC und der Durchflusszytometrie eingesetzt. Eine 4%-ige PFA Lösung wurde hergestellt, indem PFA (Carl Roth GmbH + Co. KG) in 1x D-PBS gelöst wurde (v/v). Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

#### Normales Ziegen Serum

Normales Ziegen Serum (engl. *normal goat serum*, Abcam) wurde zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen in der ICC und der Durchflusszytometrie verwendet. Das Serum (100%) wurde aliquotiert und bei -20°C für sechs Monate gelagert.

#### Normales Kaninchenserum

Normales Kaninchenserum (engl. *normal rabbit serum*, Abcam) wurde zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen in der ICC und der Durchflusszytometrie verwendet. Das Serum (100%) wurde aliquotiert und bei -20°C für sechs Monate gelagert.

### SmartFlare™ Proben

Die SmartFlare™ Proben (SF-Proben) wurden zur visuellen Detektion der Genexpression in lebenden Zellen eingesetzt. SF-Proben wurden nach Angabe des Herstellers mit *aq. bidest.* rekonstituiert und auf eine Stoffmengenkonzentration von 100 nM eingestellt. Die *Scramble*- (Negativkontrolle) und *Uptake*-Proben (Positivkontrolle) wurden äquivalent rekonstituiert. Die Stocklösungen sind bei RT im Dunklen, nach Angabe des Herstellers für sechs Monate stabil. Die finalen Konzentrationen wurden in dem zu verwendenden Kulturmedium hergestellt.

### TRIS Borat EDTA Puffer (1x TBE)

1x TRIS Borat EDTA (TBE) Puffer wurde zur Herstellung von Agarosegelen und als Laufpuffer in der Gelelektrophorese verwendet. Ein 10x TBE Puffer wurde hergestellt indem 55,03 g Borsäure (Carl Roth GmbH + Co. KG), 107,81 g Tris Base (Carl Roth GmbH + Co. KG) und 5,85 g EDTA (Carl Roth GmbH + Co. KG) in 750 ml *aq. bidest.* gelöst wurden. Der pH Wert wurde mit HCl/NaOH (Merck Millipore, Merck KGaA) auf 8,3 eingestellt. Im Anschluss wurde der Puffer mit *aq. bidest.* auf 1 l aufgefüllt. Der 1x TBE-Puffer wurde aus dem 10x TBE-Puffer mit *aq. bidest.* (v/v) hergestellt.

### Reporter Lysis Puffer (RLB)

Der Reporter Lysis Puffer (engl. *Reporter Lysis Buffer*, RLB) ist ein mildes Lysereagenz, welches für Säugerzellen entwickelt wurde und einen einzelnen Frost-Tau-Zyklus benötigt, um die komplette Zelllyse sicherzustellen. RLB ist sowohl in Kombination mit dem Reporterenzym  $\beta$ -Galaktosidase, wie auch mit der Luziferase geeignet. Der 5x Reporter Lysis Puffer (Promega) wurde bei Gebrauch mit *aq. bidest.* verdünnt (v/v).

### Chlorophenolrot- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (CPRG)

Chlorophenolrot- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (engl. *chlorophenol red  $\beta$ -D-galactopyranosid*, CPRG, Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) wird zur kolorimetrischen Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in Zellextrakten verwendet. CPRG ist ein langwelliger Farbstoff, der bei einer Wellenlänge von 574 bzw. 578 nm gemessen wird. Die Stocklösung wurde bei -20°C im Dunklen für bis zu sechs Monate gelagert.

### Reaktionslösung $\beta$ -Galaktosidase Test

Die Reaktionslösung (Z-Puffer) für den  $\beta$ -Galaktosidase Test wurde wie folgt hergestellt. 16,1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA), 5,5 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA), 0,75 g KCl (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) und 0,246 g  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) wurden in 1 l *aq. bidest.* gelöst und mit  $\beta$ -Mercaptoethanol (1:1000) und CPRG (1:100) versetzt.

### Luziferase Assay Substrat

Lyophilisiertes Luziferase Assay Substrat (Promega) wurde nach Angabe des Herstellers mit Luziferase Assay Puffer (Promega) rekonstituiert.

### Gelatine (0,1%)

Gelatine wurde zur Beschichtung von Zellkulturplatten verwendet. Gelatine (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) wurde in *aq. bidest.* gelöst (w/v) und sterilfiltriert. Die 0,1%-ige Lösung wurde bei 4°C für sechs Monate gelagert.

### RIPA Puffer

RIPA (engl. *radioimmunoprecipitation assay*) Puffer ist ein Lyse- bzw. Extraktionspuffer. Er wurde bei der Isolation der Proteine aus Zellen verwendet. RIPA Puffer (10x, Cell Signaling Technology, Inc.) wurde mit *aq. bidest.* auf einen 1x Puffer eingestellt und Aliquots geeigneten Volumens bei -20°C gelagert.

### 10X Tris/Glycine/SDS Puffer

10x Tris/Glycine/SDS Puffer (Bio-Rad Laboratories GmbH) wurde mit *aq. bidest.* auf einen 1x Tris/Glycine/SDS Puffer verdünnt (v/v). Der Puffer enthält 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% Natriumlaurylsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfat*, SDS), pH 8,3. Der Puffer wird bei RT gelagert.

### 5%-ige Milchpulverlösung

Eine 5%-ige Milchpulverlösung wurde zum Blocken freier Bindungsstellen der Membran im Western Blot (WB) verwendet. Das Milchpulver (PanReac AppliChem, AppliChem GmbH) wurde in 1x PBS-T (w/v) gelöst. Die Lösung wurde frisch hergestellt.

### 2,5%-ige Milchpulverlösung

Eine 2,5%-ige Milchpulverlösung wurde zur Verdünnung des Sekundärantikörpers im WB verwendet. Milchpulver (PanReac AppliChem, AppliChem GmbH) wurde in 1x PBS-T (w/v) gelöst. Die Lösung wurde frisch hergestellt.

### G418

G418-BC ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum und Neomycinderivat, welches zur Selektion transfizierter eukaryotischer Zellen eingesetzt wird, indem es die Proteinbiosynthese an den Ribosomen blockiert. G418-BC (Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA) wurde mit einer Aktivität von 25.000 U/ml, welche einer Einwaage von 50 mg/ml entspricht bestellt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Es wurde darauf geachtet, dass verwendete Aliquots für maximal 24 Monate bei 4°C gelagert wurden.

### Puromycin

Puromycin ist ein Inhibitor der Proteinsynthese und wurde zur Selektion editierter iPS Zellen (Editierung mit einem Vektor, der eine Puromycinkassette trägt) verwendet. Puromycinhydrochlorid (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) wurde nach Angabe des Herstellers mit *aq. bidest.* auf eine Konzentration von 50 mg/ml (v/v) eingestellt, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

## Ampicillin

Ampicillin hemmt die Zellwandbiosynthese in wachsenden Bakterien. Ampicillin Natriumsalz (Carl Roth GmbH + Co. KG) wurde mit *aq. bidest.* auf eine Stockkonzentration von 50 mg/ml eingestellt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die verwendete Arbeitskonzentration lag zwischen 50 und 100 µg/ml und wurde mit *aq. bidest.* eingestellt.

### 2.3.7 Medien

Alle aufgelisteten Medien wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die Zusammensetzung, Herstellung, Verwendung und Lagerung ist beschrieben und wurde nach Anleitung der Hersteller bzw. zitierter Publikationen durchgeführt. In Tabelle 10 sind alle kommerziell erworbenen Medien aufgeführt.

**Tabelle 10: Kommerziell erworbene Medien**

Medium	Beschreibung	Hersteller
<b>DMEM high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate, #10569-010</b>	DMEM, mit hohem Glucoseanteil, mit Natrium Pyruvat, GlutaMAX™ und Phenol Red, ohne HEPES	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>DMEM/Ham's F12, #FG-4815</b>	DMEM/Ham's F-12 ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i> ) Flüssigmedium mit stabilem Glutamin	Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Dulbecco's MEM (DMEM Medium), #FG0435</b>	DMEM Flüssigmedium, ohne Na-Pyruvat, mit 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> , 4,5 g/l D-Glukose und stabilem Glutamin (2 mM)	Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Gibco™ AIM-V™ Medium, #10297582</b>	enthält L-Glutamin, Streptomycinsulfat (50 µg/mL), Gentamicinsulfat (10 µg/mL) und humanes Serumalbumin	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>KnockOut™ DMEM/F12, #12660-012</b>	Medium mit niedriger osmotischer Konzentration, ohne L-Glutamin und HEPES-Puffer; optimiert für das Wachstum humaner ES und iPS Zellen	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>mFreSR™, #05854</b>	definiertes, serumfreies Kryokonservierungsmedium für humane ES und iPS Zellen	StemCell™ Technologies, Köln, Deutschland
<b>mTeSR™1, #85850</b>	„feeder-freies“ Erhaltungsmedium zur Kultivierung humaner ES und iPS Zellen, cGMP zertifiziert; 2 Komponenten: mTeSR™1 Basal Medium und mTeSR™1 5X Supplement	StemCell™ Technologies, Köln, Deutschland
<b>RPMI 1460, #FG-1215</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640: Flüssigmedium mit stabilem Glutamin, mit 2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub>	Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>StemPro®-34 SFM Medium 1x, #10639-011</b>	Medium mit serumfreier Formulatur, welche die Entwicklung von humanen hematopoetischen Zellen in Kultur fördert; 2 Komponenten: StemPro®-34 Serum Free Medium und StemPro®-34 Nutrient Supplement	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>TeSR™-E8™, #05990</b>	„feeder-freies“ Erhaltungsmedium, ohne tierische Komponenten zur Kultivierung humaner ES und iPS Zellen; 2 Komponenten: TeSR™-E8™ Basal Medium und TeSR™-E8™ 25X Supplement	StemCell™ Technologies, Köln, Deutschland

**Abkürzungen:** **DMEM:** engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. **ES:** Embryonale Stammzellen. **HEPES:** 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure. **iPS:** induzierte pluripotente Stammzellen. **RPMI:** engl. *Roswell Park Memorial Institute*.

### MEF Medium (Fibroblasten Medium)

MEF Medium wurde zur Kultivierung von MEFs und humanen Fibroblasten verwendet. *Dulbecco's Modified Eagle* Medium (DMEM Medium, Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA) wurde mit 10% fetalem Rinderserum (engl. *fetal calf serum*, FCS) HyClone™ Fetal Bovine Serum (Hyclone Laboratories Inc, GE Healthcare, Thermo Fisher Scientific) und 1 mM Natrium Pyruvat (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific) versetzt. Dem Medium wurden Penicillin und Steptomycin (PanReac AppliChem, AppliChem GmbH) in einer finalen Aktivität/Konzentration von 100 U/ml an Penicillin und 100 µg/ml Steptomycin zugesetzt. Die Stabilität des Mediums ist bei 4°C für vier Wochen gegeben.

### StemPro®-34 Medium

Das StemPro®-34 SFM Medium wurde während der Reprogrammierung von PBMC eingesetzt. Das StemPro®-34 SFM Medium 1x (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific) wurde wie folgt hergestellt: Das gefrorene Supplement StemPro® Nutrient Supplement (40x) wurde bei 4°C über Nacht aufgetaut. Das Supplement wurde durch Inversion gemischt und in das StemPro®-34 SFM überführt. Durch vorsichtige Inversion wurde das Medium gemischt, bis sich ein homogenes Medium zeigte. L-Glutamin (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific) wurde in einer finalen Konzentration von 2 mM steril zugegeben. Die Stabilität des Mediums ist bei 4°C für vier Wochen gegeben.

### PBMC Medium

PBMC Medium wurde während der Reprogrammierung von PBMC verwendet. Das PBMC Medium wurde aus komplettem StemPro®-34 Medium (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific) durch Supplementierung mit den Zytokinen humaner Stammzellfaktor (engl. *Stem cell factor*, SCF, Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific), humane Fms-related Tyrosin Kinase 3 Ligand (engl. *Fms-related tyrosine kinase 3 ligand*, FLT-3), rekombinantes humanes Interleukin-3 (IL-3, Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific) und rekombinantes humanes Interleukin-6 (IL-6, Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific) täglich frisch hergestellt. Die finale Konzentration der Zytokine ist in Tabelle 11 angegeben.

- Rekombinanter humaner Stammzellfaktor (SCF)

SCF (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific) wurde nach Anleitung des Herstellers in *aq. bidest.* mit 0,1% BSA (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) rekonstituiert. SCF (100 µg/ml) wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die nach Angabe des Herstellers durchgeführte Rekonstitution stellt die Stabilität bei -20°C für ein Jahr sicher.

- Rekombinanter humaner Fms-related Tyrosin Kinase 3 Ligand (Flt-3 Ligand)

FLT-3 (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific) wurde nach Anleitung des Herstellers in sterilem 1x D-PBS mit 0,1% BSA (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) rekonstituiert. FLT-3 (100 µg/ml) wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die nach Angabe des Herstellers durchgeführte Rekonstitution sichert die Stabilität bei -20°C für ein Jahr.

- Rekombinantes humanes Interleukin-3 (IL-3)

IL-3 (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific) wurde nach Angabe des Herstellers in sterilem *aq. bidest.* mit 0,1% BSA (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) rekonstituiert. IL-3 (100 µg/ml) wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die durchgeführte Rekonstitution sichert die Stabilität bei -20°C für ein Jahr (Angabe des Herstellers).

- Rekombinantes humanes Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific) wurde in 100 mM steriler Essigsäure (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) mit 0,1% BSA (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) rekonstituiert. Zur Langzeitlagerung wurde IL-6 (100 µg/ml) aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die nach Angabe des Herstellers durchgeführte Rekonstitution sichert die Stabilität bei -20°C für ein Jahr.

**Tabelle 11: Zytokin-Supplementierung des PBMC Mediums**

Zytokin	Bestellnummer	Hersteller	Finale Konzentration
SCF	#PHC2115	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA	100 ng/ml
FLT-3	#PHC9414	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA	100 ng/ml
IL-3	#PHC0034	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA	20 ng/ml
IL-6	#PHC0065	Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA	20 ng/ml

### Induziertes pluripotentes Stammzellmedium (iPSC Medium)

Induziertes pluripotentes Stammzellmedium (engl. *induced pluripotent stem cell (iPSC) medium*) wurde bei der Reprogrammierung von PBMC eingesetzt. 100 ml komplettes iPSC Medium wurden wie in Tabelle 12 zusammengefasst hergestellt.

**Tabelle 12: Zusammensetzung des iPSC Mediums**

Komponente	Volumen	Finale Konzentration
<b>KnockOut™ DMEM/F12</b> (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific)	78 ml	
<b>KnockOut™ Serum Replacement</b> (KSR, Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific)	20 ml	20%
<b>MEM Non-Essential Amino Acids Solution*, 100x</b> (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific)	1 ml	0,1 mM
<b>GlutaMAX™-I Supplement</b> (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific), 200 mM Glutamin	1 ml	2 mM
<b>β-Mercaptoethanol, 55 mM</b> (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific)	100 µl	55 µM
<b>bFGF (20 µg/ml)</b> (R&D Systems)	20 µl	400 ng/ml
<b>Gesamtvolumen</b>	100 ml	

\* Glycin, L-Alanin, L-Asparagin, L-Aspartatsäure, L-Glutaminsäure, L-Prolin, L-Serin. **Abkürzungen:** **DMEM:** engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. **KSR:** engl. *knock-out serum replacement*.

Das iPSC Medium, ohne bFGF ist für eine Woche bei 4°C stabil. bFGF wurde bei jedem Mediumwechsel frisch zugeben.

### mTeSR<sup>TM</sup>1

mTeSR<sup>TM</sup>1 (StemCell<sup>TM</sup> Technologies) ist ein definiertes Medium, welches eine „feeder“-freie Kultivierung von humanen ES Zellen und iPS Zellen erlaubt. Das Medium basiert auf Publikationen des Labors von Dr. James Thomson (Levenstein *et al.*, 2006; Ludwig *et al.*, 2006a; Ludwig *et al.*, 2006b; Thomson *et al.*, 1998) und wurde optimiert.

Das mTeSR<sup>TM</sup>1 5x Supplement wurde bei -20°C, das mTeSR<sup>TM</sup>1 Basalmedium bei 2-8°C gelagert. mTeSR<sup>TM</sup>1 5x Supplement wurde über Nacht bei 4°C aufgetaut. In einigen Fällen war das Supplement leicht trüb. War dies der Fall, wurde das Supplement für 5 min in ein 37°C Wasserbad (LAUDA-Brinkmann) gegeben, sodass die Lösung klar wurde (Angabe des Herstellers). Es wurde darauf geachtet, dass nur klares Supplement zum Basalmedium gegeben wurde. Die 100 ml Supplement wurden zu den 400 ml Basalmedium gegeben. Um eine homogene Medium zu erhalten, wurde vorsichtig invertiert. Komplettes mTeSR<sup>TM</sup>1 Medium ist bei 2-8°C nach Angaben des Herstellers für zwei Wochen stabil.

### TeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup> Medium

Das TeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup> (StemCell<sup>TM</sup> Technologies) ist ein Kulturmedium für humane ES und iPS Zellen und eine Variante des mTeSR<sup>TM</sup>1 Mediums. Das Medium beruht auf den Publikationen des Labors von Dr. James Thomson (Beers *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2011; Ludwig *et al.*, 2006a; Ludwig *et al.*, 2006b). Das mTeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup> wurde durch sukzessive Reduktion von Komponenten des mTeSR<sup>TM</sup>1 Mediums entwickelt, besteht aus acht definierten Komponenten und ist frei von Albumin. Die Komponenten des Mediums mit finaler Konzentrationen sind publiziert (Chen *et al.*, 2011) und in Tabelle 13 angegeben. Das Medium ist auf einen pH von 7,4 eingestellt.

**Tabelle 13: Zusammensetzung des TeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup> Mediums**

Komponente	Finale Konzentration
DMEM/F12	
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat Magnesium*	64 mg/l
Sodiumselenium	14 µg/l
FGF-2	100 µg/l
Insulin	19,4 mg/l
NaHCO <sub>3</sub>	543 mg/l
Transferrin	10,7 mg/l
TGFβ1 oder Nodal	2 µg/l oder 100 µg/l

\*stabile Form der Ascorbinsäure für die Zellkultur. **Abkürzungen:** **DMEM:** engl. *Dulbeccos's Modified Eagle Medium*. **FGF:** Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (engl. *fibroblast growth factor*). **TGF:** transformierender Wachstumsfaktor (engl. *transforming growth factor*). Angaben nach Chen *et al.*, 2011.

Die Kultivierung der iPS Zellen in TeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup> setzt eine oberflächenbeschichtete Matrix und eine enzymfreie Subkultivierung voraus. Die Verwendung dieses Mediums nach Angabe des Herstellers erlaubt eine etablierte Expansion von iPS Zelllinien für mehr als 20 Passagen unter Aufrechterhaltung eines normalen Karyotyps (Buzzard *et al.*, 2004; Draper *et al.*, 2004). Das TeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup> 25x Supplement ist bei -20°C für 12 Monate stabil. Das Supplement wurde über Nacht bei 4°C aufgetaut, vorsichtig durchmischt und zu 480 ml TeSR<sup>TM</sup>-E8<sup>TM</sup>

Basal Medium, welches bei 2-8°C für 12 Monate stabil ist, gegeben. Eine Mischung wurde durch vorsichtiges Invertieren sichergestellt. Das komplette Medium ist bei 2-8°C für zwei Wochen stabil.

### Spontanes Differenzierungsmedium

In Tabelle 14 sind die Komponenten des spontanen Differenzierungsmediums angegeben.

**Tabelle 14: Zusammensetzung des spontanen Differenzierungsmediums**

Komponenten	Volumen	Finale Konzentration
<b>DMEM/Ham's F12*</b> (Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA)	153 ml	
<b>Fetales Kälberserum</b> (FCS, EU Approved origin, South America, Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific)	40 ml	20%
<b>MEM Non-Essential Amin Acids Solution 100x</b> (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific)	2 ml	0,1 mM
<b>Pen/Strep 100x</b> (PanReac AppliChem, AppliChem GmbH) mit 10.000 U/mL Penicillin und 10 mg/mL Streptomycin)	1 ml	1x (100 U/ml Pen, 100 µg/ml Strep)
<b>β-Mercaptoethanol, 55 mM</b> (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific)	0,36 µl	0,1 mM
<b>Ascorbinsäure**</b> (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) Stocklösung 5 mg/ml	2 ml	50 µg/ml
<b>Gesamtvolumen</b>	200 ml	

\*enthält stabiles Glutamin und D-Glukose als Kohlenstoffquelle. \*\*wurde frisch zum Medium zugegeben. **Abkürzungen:** **DMEM:** engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. **FCS:** engl. *fetal bovine serum*. **Pen:** Penicillin. **Strep:** Streptomycin.

Das Medium wurde sterilfiltriert (0,22 µm PVDF-Filter, Carl Roth GmbH + Co. KG) und in Aliquots für bis zu sechs Monate bei -20°C eingefroren. Einen Tag vor Verwendung wurde das Aliquot bei 4°C aufgetaut. Am Tag des Mediumwechsels wurde Ascorbinsäure frisch in einer finalen Konzentration von 50 µg/ml zugegeben. Das spontane Differenzierungsmedium basiert auf der Publikation von Moretti und Kollegen (Moretti *et al.*, 2010b). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Differenzierungsmedium (Tabelle 14) weicht leicht von der publizierten Zusammensetzung ab. In der vorliegenden Arbeit wurde DMEM/Ham's F12 Medium mit stabilem Glutamin (2 mM, Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA) verwendet und die Antibiotika mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin eingesetzt. In der Arbeit von Moretti und Kollegen wurde L-Glutamin (2 mM) supplementiert, Penicillin mit 50 U/ml und Streptomycin mit 50 µg/ml eingesetzt (Moretti *et al.*, 2010b). Für die spontane Differenzierung wurden Zellkulturplatten wie folgt speziell beschichtet.

- Poly-2-Hydroxyethylmethacrylat (pHEMA) -beschichtete Zellkulturplatten

Für die Generierung von *embryoid bodies* (EBs) in der spontanen Differenzierung wurden Zellkulturplatten mit Poly-2-Hydroxyethylmethacrylat (pHEMA, Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) beschichtet. Eine 5%-ige Lösung an pHEMA wurde mit 95%-igem Ethanol (w/v) hergestellt. Um eine homogene Lösung zu erreichen, wurde das pHEMA für mindestens 6 h bei 40°C auf einem Magnetrührer RCT basic (IKA Werke) gelöst und sterilfiltriert. Die Lösung wurde bis zu sechs Monate bei 4°C gelagert. Die Zellkulturplatten wurden vollständig mit pHEMA bedeckt und über Nacht (16 h) in einer Sicherheitswerkbank Safe 2020 (Thermo Fisher Scientific) mit leicht geöffnetem Deckel getrocknet. Überflüssiges pHEMA wurde entfernt und die Zellkulturplatten für weitere 30 min getrocknet. Die Zellkulturplatten wurden mit Parafilm verschlossen und bis zu vier Wochen bei 4°C gelagert.



Es wurde darauf geachtet, dass die Zellkulturplatten vor Verwendung mit DMEM/Ham's F12 gewaschen wurden.

- Herstellung von Gelatine-beschichteten Zellkulturplatten

Zellkulturplatten der spontanen Differenzierung wurden mit Gelatine (0,1%) für 30 min beschichtet. Überständige Gelatine wurde abgesaugt und die Platten über Nacht in einer Sicherheitswerkbank Safe 2020 (Thermo Fisher Scientific) getrocknet. Die beschichteten Zellkulturplatten wurden bis zur weiteren Verwendung mit Parafilm verschlossen und bis zu vier Wochen bei RT gelagert.

### Gerichtetes Differenzierungsmedium CDM3

Das gerichtete Differenzierungsmedium CDM3 basiert auf der Publikation von Burrige und Kollegen (Burrige *et al.* 2015a). In Tabelle 15 sind die Komponenten des Mediums angegeben. *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1460 (Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA) wurde mit rekombinantem humanem Serumalbumin (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) angesetzt und ist für zwei Wochen bei 4°C stabil. L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) wurde dem Medium frisch zugesetzt.

**Tabelle 15: Zusammensetzung des gerichteten Differenzierungsmediums CDM3**

Komponenten	Volumen	Finale Konzentration
<b>Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1460*</b> (Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA)	99 ml	
<b>Rekombinantes humanes Serumalbumin Stocklösung (75 mg/ml)</b> (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA)	666 µl	500 µg/ml
<b>L-Ascorbinsäure-2-Phosphat Stocklösung (64 mg/ml)</b> (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA)	333 µl	213 µg/ml
<b>Gesamtvolumen</b>	100 ml	

\*enthält stabiles Glutamin und D-Glukose als Kohlenstoffquelle. **Abkürzungen:** RPMI: engl. *Roswell Park Memorial Institute*.

Stocklösungen der *small molecules* CHIR99021 und Wnt-C59 wurden wie bereits beschrieben hergestellt. Am Tag D0 wurde dem gerichteten Differenzierungsmedium CHIR99021 (LC Laboratories) in einer finalen Konzentration von 2-6 µM zugegeben. Am Tag D2 wurde dem Medium Wnt-C59 (Sellekchem) in einer finalen Konzentration von 2 µM zugesetzt.

### HEK 293 Medium

500 ml HEK (engl. *human embryonic kidney*) 293 Medium enthalten 475 ml DMEM/Ham's F12 (Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA) und 25 ml FCS (Hyclone Laboratories Inc, GE Healthcare, Thermo Fisher Scientific). Dem Medium wurde Penicillin und Steptomycin (PanReac AppliChem, AppliChem GmbH) mit einer finalen Aktivität/Konzentration von 100 U/ml an Penicillin und 100 µg/ml Steptomycin zugesetzt. Das Medium ist für vier Wochen bei 4°C stabil.

### mFreSR<sup>TM</sup> – definiertes Medium zur Kryokonservierung von humanen ES und iPS Zellen

Das mFreSR<sup>TM</sup> (StemCell<sup>TM</sup> Technologies) ist ein definiertes, serum-freies Medium zur Kryokonservierung von humanen ES und iPS Zellen. Das Medium enthält DMSO, ist ohne

Zugabe weiteren Komponenten zu verwenden und wird bei -20°C gelagert. Um Aliquots geeigneter Volumina herzustellen, wurde das Medium aufgetaut, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Aliquots sind bei -20°C nach Angabe des Herstellers für 12 Monate stabil. Ein erneutes Einfrieren des Mediums ist nach Angabe des Herstellers nicht zu empfehlen. Am Tag der Kryokonservierung wurde das Aliquot aufgetaut und nach Angabe des Herstellers verwendet.

#### PBMC-Kryokonservierungsmedium

PBMC-Kryokonservierungsmedium enthält Gibco™ AIM-V™ Medium (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific) supplementiert mit 40% (v/v) FCS (Hyclone Laboratories Inc, GE Healthcare, Thermo Fisher Scientific) und 10% (v/v) DMSO (Carl Roth GmbH + Co. KG). Das Kryokonservierungsmedium wurde frisch hergestellt.

#### MEF-Kryokonservierungsmedium

MEF-Kryokonservierungsmedium enthält MEF Medium mit 10% (v/v) FCS (Hyclone Laboratories Inc, GE Healthcare, Thermo Fisher Scientific) und 10% (v/v) DMSO (Carl Roth GmbH + Co. KG). Das Konservierungsmedium wurde frisch hergestellt.

#### HEK 293-Kryokonservierungsmedium

HEK 293-Kryokonservierungsmedium enthält HEK 293 Medium mit 10% (v/v) FCS (Hyclone, Hyclone Laboratories Inc, GE Healthcare) und 10% (v/v) DMSO (Carl Roth GmbH + Co. KG). Das Konservierungsmedium wurde frisch hergestellt.

#### Lysogeny Broth Medium (LB Medium)

Lysogeny Broth Medium (engl. *lysogeny broth*, LB) ist ein komplexes Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien. Die Komponenten des Mediums sind in Tabelle 16 angegeben.

**Tabelle 16: Zusammensetzung des LB Mediums**

Komponente	Eingewogene Menge
<b>Trypton</b> (Carl Roth GmbH + Co. KG)	1,0 g
<b>Hefeextrakt</b> (Carl Roth GmbH + Co. KG)	2,5 g
<b>NaCl</b> (Carl Roth GmbH + Co. KG)	5,0 g
<b>VE-Wasser</b>	1 l

Das LB Medium wurde zur Sterilisation für 20 min bei 121°C autoklaviert.

#### Lysogeny Broth Agar

Die Zusammensetzung des Lysogeny Broth Agars ist in Tabelle 17 angegeben.

**Tabelle 17: Zusammensetzung des LB Agars**

Komponente	Eingewogene Menge
<b>Trypton</b> (Carl Roth GmbH + Co. KG)	5,0 g
<b>Hefeextrakt</b> (Carl Roth GmbH + Co. KG)	2,5 g
<b>NaCl</b> (Carl Roth GmbH + Co. KG)	5,0 g
<b>Agar</b> (Carl Roth GmbH + Co. KG)	7,5 g
<b>VE-Wasser</b>	500 ml

Der LB Agar wurde zur Sterilisation für 20 min bei 121°C autoklaviert.

### Superoptimal Broth Medium mit Catabolit Unterdrückung (SOC) Medium

*Superoptimal Broth* Medium mit Catabolit Unterdrückung (SOC) Medium ist ein komplexes Nährmedium, welches speziell bei der Transformation von Bakterien eingesetzt wird. Das SOC Medium ist ein Medium auf Basis des SOB (engl. *super optimal broth*) Mediums, welches zur Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien etabliert wurde und zusätzlich 20 mM Glukose enthält. Die Komponenten des SOC Mediums sind in Tabelle 18 angegeben.

**Tabelle 18: Zusammensetzung des SOC Mediums**

Komponente	Finale Konzentration
<b>Trypton</b> (Carl Roth GmbH + Co. KG)	2% (w/v)
<b>Hefeextrakt</b> (Carl Roth GmbH + Co. KG)	0.5% (w/v)
<b>NaCl</b> (Carl Roth GmbH + Co. KG)	10 mM
<b>KCl</b> (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA)	2,5 mM
<b>MgCl<sub>2</sub> Hexahydrat</b> (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA)	10 mM
<b>Glucose</b> (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA)	20 mM
<b>VE-Wasser</b>	

Das SOC Medium wurde zur Sterilisation für 20 min bei 121°C autoklaviert. Es wurden Aliquots bei -20°C eingefroren und für einen Zeitraum von maximal sechs Monate gelagert. Bei Bedarf wurden die Aliquots aufgetaut.

### **2.3.8 Zelllinien und Mikroorganismen**

Folgende Zelllinien und Bakterien wurden kommerziell erworben.

- humane embryonale Nierenzellen 293 (engl. *human embryonic kidney cells*, HEK 293, #CRL-1573, ATCC, Manassas, VA)
- One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (#C404010, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA)
- *XL1-Blue supercompetent Cells* (#200515, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA)

Die iPS Zellen der Kontrollen „C“ und „H“ wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alessandra Moretti (1. Department Medizin, Kardiologie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Deutschland) reprogrammiert und der Abteilung der Experimentellen Chirurgie des DHMs zur Verfügung gestellt. Die iPS Zellen „C“ wurden aus Fibroblasten mit dem Sendai Reprogrammierungskit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) generiert und sind publiziert (Lahm *et al.*, 2015a). Die iPS Zellen „H“ wurden aus PBMC mit dem Sendai Reprogrammierungskit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) generiert und wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Moretti vollständig charakterisiert.

Die, zur Editierung verwendete iPS Zellen „E5“ wurde im Labor von Prof. Joseph Wu (*Stanford Cardiovascular Institute, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA*) aus Fibroblasten reprogrammiert, sind vollständig charakterisiert und publiziert (Sun *et al.*, 2012). Die iPS Zellen wurden der Abteilung der Experimentellen Chirurgie des DHMs in Kooperation mit Prof. Joseph Wu und Prof. Sean Wu (*Institute of Stem Cell and Regenerative Medicine, Stanford, CA*) zur Verfügung gestellt.

### 2.3.9 Mäuse

MEF wurden aus Embryonen der C57BL/6J Maus (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) gewonnen.

### 2.3.10 Geräte

In Tabelle 19 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

**Tabelle 19: Verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Analysenwaage Kern ABT 220-5 DNM</b>	Kern & Sohn GmbH, Bahlingen, Deutschland
<b>Autoklav, HICLAVE HI-50</b>	HMC Europe GmbH, Tüßling, Deutschland
<b>Bio-Rad Mini Protean® Tetra Cell System</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<b>C1000 Thermal Cycler</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<b>Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene™</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>DNA/RNA UV-Cleaner Box</b>	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
<b>Eppendorf Thermomixer comfort</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>Eppendorf® Research® plus Pipetten (1000 µl, 100 µl, 10 µl, 2 µl)</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>EVOS XI Core Mikroskop</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>FACS (BD LSR Fortessa)</b>	Becton, Dickinson and Company, BD Bioscience, San Jose, CA
<b>Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M</b>	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
<b>Flüssigstickstofftank (engl. <i>Liquid Nitrogen System</i>)</b>	Messer Griesheim, Bad Soden, Deutschland
<b>Geldokumentationsgerät ChemDoc XR System</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<b>Gelelektrophoresegerät PowerPac Basic</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<b>Gelkammer Sub-Cell Modell 96 (50 ml, 150 ml)</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<b>Geschlitten</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
<b>Heidolph Polymax 1040 - Plattformschüttler 10°</b>	Profilab24 GmbH, Berlin, Deutschland
<b>HERA Freezer Basic (-80°C)</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>HERACell 240i CO<sub>2</sub> Inkubator</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>Heraeus Megafuge 40R</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>ImageQuant LAS 4000</b>	GE Healthcare, Life Sciences, General Electric Company, Boston, MA
<b>Infinite® 200 PRO</b>	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
<b>Kühlschrank Liebherr Medline (4°C)</b>	Liebherr, Bulle, Deutschland
<b>Kühlschrank Liebherr Premium No Frost (-20°C)</b>	Liebherr, Bulle, Deutschland
<b>Lauda Aqualine AL 12, Wasserbad</b>	LAUDA-Brinkmann, LP, Delran, NJ
<b>LC Carousel Centrifuge 2.0</b>	Roche Molecular Systems, Inc., Rotkreuz, Schweiz
<b>Light Cycler® 1.5 Real Time PCR Thermal Cycler</b>	Roche Molecular Systems, Inc., Rotkreuz, Schweiz
<b>Magnetrührer RCT basic</b>	IKA Werke, Stauffen, Deutschland
<b>Mikrowelle MW 7849 900W</b>	Severin, Sundern, Deutschland
<b>MilliQ</b>	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Mini Plate Spinner mps 1000</b>	Labnet International, Cary, NC
<b>Nalgene® "Mr. Frosty" Freezing Container Rack</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
<b>NanoDrop 2000c Spectrophotometer</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
<b>Neubauer Zählkammer</b>	Thomas Scientific, Svedesboro, NJ
<b>Nucleofector™ II</b>	Amaxa Biosystems, Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland
<b>pH Meter Multical pH540 GLP</b>	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, WTW, Weilheim, Deutschland
<b>Quant Studio 3 Real-Time PCR System</b>	Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA

Schüttelinkubator NFORS HT Ecotron	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA
Stuart™ Analogue Rocker & Roller Mixer	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tischzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systems	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY

### 2.3.11 Dienstleistungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma Ella Biotech GmbH (Martinsried, Deutschland) bestellt. Sequenzierungen zur Überprüfung von PCR Produkten und Plasmiden wurden durch die Firmen Source BioScience Images (Berlin, Deutschland) und Eurofins GmbH (Ebersberg, Deutschland) übernommen.

Der Expressionsvektor pAW48-huTBX5<sup>WT</sup> Klon 52 wurde von Prof. Dr. A. Moretti (1. Department Medizin, Kardiologie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Deutschland), das Reporterplasmid pALI-Lva/ANF-Luciferase von Dr. Q. Wang (Cleveland, OH) zur Verfügung gestellt.

Das TBX5 Flag Donorkonstrukt 5`HA-EcoRI-BamHI-3`HA im Klonierungsvektor pUC57-Simple wurde bei GenScript (Piscataway, NJ), der Expressionsvektor pcDNA3.1<sup>(+)</sup> (#V79020) bei Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific (Waltram, MA) und der Vektor pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0 (#62988) bei Addgene (Watertown, MA) bestellt.

Die SmartFlare™ Proben zum Nachweis der Pluripotenz von Stammzellen wurden von der Firma Merck Millipore (Temecula, CA) gestellt.

Die Vorhersagen zur räumlichen Struktur der TBX5-DNA Interaktion von TBX5<sup>WT</sup> und TBX5<sup>mut</sup> wurden durch Armin Lahm (Bioinformatics Project Support, Rome, Italy) vorgenommen.

### 2.3.12 Webseiten/Datenbanken und Software Programme

Im Folgenden sind alle verwendeten Webseiten/Datenbanken und Software Programme aufgelistet.

National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, MD (NCBI), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Basic local alignment search tool (BLAST), Altschul *et al.*, 1990. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

Research Collaboratory for Structural Bioinformatics - Protein Data Bank (RCSB PDB) Rutgers University The State University of New Jersey, NJ, Berman *et al.*, 2000. <https://www.rcsb.org/>

Polymorphism Phenotyping version 2 (PolyPhen-2), Sunyaiev lab at Harvard Medical School, Boston, MA, Adzhubei *et al.*, 2010. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

MutationTaster (Exzellenzcluster NeuroCure Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland), Schwarz *et al.*, 2014. <http://www.mutationtaster.org/>

**iStable** (Integrated predictor for protein **stability** change upon single mutation), Natural Computing & Bioinformatics Laboratory (NCB Lab.), Institute of Genomics and Bioinformatics, National Chung Hsing University, Taiwan, Chen *et al.*, 2013. <http://predictor.nchu.edu.tw/istable/>

**QuikChange® Primer Design Program** (Stratagene, La Jolla, CA), <http://www.stratagene.com/qcprimerdesign/>

**Universal ProbeLibrary System Assay Design** (Roche Molecular Systems, Inc., Rotkreuz, Schweiz), [https://lifescience.roche.com/en\\_de/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center/](https://lifescience.roche.com/en_de/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center/)

**Clustal X Version 2.0**, Multiple alignment of nucleic acid and protein sequences (Conway Institute UCD Dublin, Dublin, Irland), Larkin *et al.*, 2007. <http://www.clustal.org/clustal2/>

**Benchling CRISPR gRNA Design**, <https://benchling.com/>

**Software TIDE**, <https://tide.deskgen.com/>

**hPSC Genetic Analysis** (StemCell™ Technologies, Köln, Deutschland), [www.stemcell.com/geneticanalysisapp](http://www.stemcell.com/geneticanalysisapp)

**Discovery Studio Visualizer 4.5**, Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, Frankreich, <http://www.3dsbiovia.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/>

**Technical Manual Maintenance of Human Pluripotent Stem Cells in mTeSR™1**, <https://cdn.stemcell.com/media/files/manual/MA29106>  
[Maintenance Human Pluripotent Stem Cells mTeSR1.pdf](https://cdn.stemcell.com/media/files/manual/MA29106)

**Carl Zeiss™ Axio Vision Rel. 4.8.2 Software**, Zeiss, Oberkochen, Deutschland

**Finch TV Version 1.4.0**, Geospiza, Seattle, WA

**Software Image Lab™ 4.0**, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

**BD FACSDiva™ Version 8.0.1**, BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ

**Light Cycler® Software, Version 3.5**, Roche Molecular Systems, Inc., Rotkreuz, Schweiz

**Quant Studio Design & Analysis Software Version 1.4**, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA

**FlowJo Version 7.6.5**, FlowJow LLC, Ashland, OR

**Quantity One Chemidox XRS Version 4.6.9**, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

**i-control™ Microplate Reader Software, 2.0.**, Tecan, Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz

**ImageQuant LAS 4000**, GE Healthcare, Life Sciences, General Electric Company, Boston, MA

**SPSS Statistics 25**, IBM, Armonk NY

### **2.3.13 Genehmigung zur Reproduktion von Abbildungen**

Die Genehmigung zur Reproduktion der Abbildungen aus Dreßen *et al.* A novel *de novo* mutation in a patient with Holt-Oram syndrome leading to a dramatically reduced biological function. *Mol Genet Genomic Med.* 2016 Jul 14;4(5):557-67 wurde eingeholt. © 2016 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals, Inc.

Die Genehmigung zur Reproduktion der Abbildungen aus Lahm *et al.* Live fluorescent RNA-based detection of pluripotency gene expression in embryonic and induced pluripotent stem cells of different species. *Stem Cells.* 2015 Feb;33(2):392-402 wurde eingeholt. © 2014 AlphaMed Press.

## **2.4 Methoden**

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit angewendeten Methoden beschrieben.

### **2.4.1 Zellzahlbestimmung**

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde Trypanblau, welches durch perforierte Zellmembranen von toten Zellen eindringen kann, verwendet (diffusionsbasiertes Verfahren). Die Zellen wurden zelltypspezifisch abgelöst und durch Zentrifugation (1500 x *g*, 10 min) in einer Heraeus Megafuge (Thermo Fisher Scientific) bei RT pelletiert. Das Zellpellet wurde in zelltypspezifischem Medium aufgenommen und resuspendiert. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in geeigneter Verdünnung mit Trypanblau Lösung (0,2%) versetzt und in einer Neubauer Zählkammer (Kammertiefe: 0,1 mm, Thomas Scientific) gegeben. Die Lebendzellzahl wurde durch Auszählen der lebenden (nicht blau gefärbten) Zellen in den vier Großquadraten von je 1 mm<sup>2</sup> der Neubauerkammer bestimmt. Die Gesamtlebendzellzahl wurde nach folgender Formel berechnet.

$$\text{Zellzahl} * 10^4/\text{ml} = \sum 4 \text{ Grossquadrate}/4 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

### **2.4.2 Isolation und Kryokonservierung von Zellen**

In der vorliegenden Arbeit wurden murine embryonale Fibroblasten (MEF, engl. *murine embryonic fibroblasts*), periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC, engl. *peripheral mononuclear blood cells*) und humane adipose Fibroblasten (AF, engl. *human adipose fibroblasts*) isoliert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, bei RT in einer Heraeus Megafuge (Thermo Fisher Scientific). Die Inkubation aller isolierten Zellen wurden in einem HERACell 240i CO<sub>2</sub> Inkubator (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Alle Zellen wurden nach Lebendzellzahlbestimmung (siehe Punkt 2.4.1) zur Langzeitkonservierung in 1 ml Kryoröhrchen (VWR International) in den entsprechenden

Kryokonservierungsmedien aufgenommen. Die Kryokonservierung wurde unabhängig vom Zelltyp über ein standardisiertes Protokoll zur langsamen Temperatursenkung eingeleitet. Hierzu wurde ein Nalgene<sup>®</sup> 5100-0001 Cryo 1°C “Mr. Frosty” Freezing Container Rack (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Verwendung des Einfrierbehälters sichert eine langsame schrittweise Senkung der Temperatur um 1°C/min. Die Zellen wurden in dem Einfrierbehälter bei -80°C über Nacht (16 h) gelagert und zur Langzeitlagerung in einen Flüssigstickstofftank (engl. *Liquid Nitrogen System*, Messer Griesheim) transferiert.

#### **2.4.2.1 Murine embryonale Fibroblasten**

MEFs wurden isoliert, um sie nach Inaktivierung als *feeder layer* für die humane iPS Zellkultur zu verwenden.

Das Uterushorn der C57BL/6J Mäuse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) wurde am Tag E13/E14 der Embryonalentwicklung aus den schwangeren Mäusen entfernt und in steriles 1x D-PBS gegeben. Jeder Embryo wurde von der Plazenta und dem Embryonensack getrennt. Die Köpfe und roten Organe wurden entfernt. Die restlichen Teile der Embryonen wurden in sterilem 1x D-PBS gewaschen und mit einem Skalpell (B. Braun Melsungen AG) zerkleinert. Ein Verdau der Stücke mit 0,25% Trypsin EDTA Lösung (Life Technologies<sup>™</sup>, Thermo Fisher Scientific) und 300 U/ml DNase I (Roche Molecular Systems, Inc.) wurde bei 37°C in einem HERACell 240i CO<sub>2</sub> Inkubator für 15 min durchgeführt. Die Proben wurden alle 5 min durch pipettieren durchmischt. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch Zugabe des gleichen Volumens an MEF Medium. Nach Zentrifugation (300 x *g*, 5 min) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in MEF Medium resuspendiert und die Zellen in T25 Zellkulturflaschen (Kisker Biotech GmbH & Co. KG) ausplattiert. MEFs wurden in den Passagen p0 bis p3 mit 3x10<sup>6</sup> Zellen/ml in MEF-Kryokonservierungsmedium langzeitkonserviert.

#### MEF Inaktivierung

Kryokonservierte MEF wurden auf Trockeneis in das Labor transferiert. Die Zellen wurden in einem 37°C Wasserbad (LAUDA-Brinkmann) aufgetaut und vorsichtig in ein 15 ml Falcongefäß transferiert. Nach Zugabe von 10 ml MEF Medium und Invertierung des Falcongefäßes wurden die Zellen pelletiert (300 x *g*, 10 min) und mit 1x10<sup>6</sup> pro Well einer Zellkultur Multiwellplatte (6-well Format) ausgesät. Die Arretierung der MEF mit Mitomycin erfolgte 24 h später. Die Mitomycinstocklösung wurde mit MEF Medium auf eine finale Konzentration von 10 µg/ml eingestellt. Nach Inkubation der MEF mit Mitomycinlösung für 2,5 h bei 37°C wurde die Lösung abgenommen, die MEF Fibroblastenschicht zweimal mit serum-freiem Medium gewaschen und im Anschluss als *feeder layer* für die Kultivierung von iPS Zellen verwendet.

#### **2.4.2.2 Periphere mononukleäre Blutzellen**

Für die Isolation von PBMC wurden zwei Vacutainer CPT Gefäße (engl. *Vacutainer CPT Tubes*, BD Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences) mit Vollblut durch einen Arzt



abgenommen. Die Blutproben wurden durch mehrmalige, vorsichtige Inversion durchmischt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 1.500 x *g*. Nach Zentrifugation des Vollblutes sind mehrere Phasen zu erkennen. Die Hälfte der oberen Plasmaschicht wurde vorsichtig, ohne Durchmischung der PBMC Interphase entfernt. Die PBMC Interphase wurde in ein 15 ml Falcongefäß überführt und das Gefäß mit sterilem 1x D-PBS auf 15 ml aufgefüllt. Nach vorsichtiger Invertierung wurden die PBMCs für 15 min bei 300 x *g* pelletiert. Die Zellen wurden in 10 ml sterilem 1x D-PBS resuspendiert und zentrifugiert (300 x *g*, 15 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in PBMC Medium aufgenommen. PBMC wurden nach Isolation direkt mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in PBMC-Kryokonservierungsmedium langzeitkonserviert.

### **2.4.2.3 Humane Fibroblasten**

Adipose Fibroblasten wurden, im Rahmen von herzchirurgischen Eingriffen am DHM, aus adiposem Biomaterial der Patienten, welches im Verlauf der Operation anfiel, gewonnen. Der Transfer der Proben erfolgte in sterilem 1x D-PBS innerhalb von 10 min auf Eis. Das Biomaterial wurde mit einem Skalpell (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) in kleine Stücke ( $1 \text{ mm}^3$ ) geschnitten, in ein 1,5 ml *Eppendorf cup* (E. *cup*, Eppendorf AG) transferiert und mit Kollagenase Lösung (0,2%) für 2,5 h bei 37°C unter leichtem Schütteln (500 rpm, 1,5 ml Gefäßeinsatz) in einem Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf AG) verdaut. Das verdaute Gewebe wurde für 10 min bei 300 x *g* zentrifugiert, das Pellet in MEF Medium aufgenommen und in eine T25 Zellkulturflasche (Kisker Biotech GmbH & Co. KG) überführt. Nach fünf bis sieben Tagen begannen die AF auszuwachsen (p0). Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Bei 80%-iger Konfluenz wurden die AF mit Trypsin EDTA Lösung (0,05%), äquivalent zu den MEF subkultiviert. AF (p1-3) wurden mit  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in MEF-Kryokonservierungsmedium langzeitkonserviert.

### **2.4.3 Vervielfältigung von Plasmid DNA**

Bakterien werden zur Vervielfältigung von genetischem Material (Plasmid DNA) verwendet. Die Ausbeute der Vervielfältigung hängt dabei von dem verwendeten Bakterienstamm, dem Plasmid und den gewählten Kulturbedingungen (Medium, Temperatur, Inkubationsgefäß etc.) ab.

#### **2.4.3.1 Bakterielle Transformation**

In dieser Arbeit wurde Plasmid DNA in One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) Bakterien vervielfältigt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide trugen eine Ampicillinresistenz, sodass Bakterien, welche das Plasmid aufgenommen hatten, resistent für Ampicillin waren und durch die Zugabe des Antibiotikums selektioniert werden konnten. Für die Transformation wurden 50 µl der One Shot® Zellen auf Eis aufgetaut. Es wurden 2 µl des zu transformierenden Plasmids in einer Konzentration von 10 ng/µl zu den Bakterien gegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock, der zur Öffnung der Poren in der bakteriellen Zellmembran und

somit zur Aufnahme des Plasmids führt, wurde für 30 sec bei 42°C in einem Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf AG) durchgeführt. Nach einer Inkubation auf Eis (5 min), wurden 50 µl Bakteriensuspension mit 250 µl SOC Medium in einem Schüttelinkubator NFORS HAT Ecotron (Infors AG, Bottmingen) bei 200 rpm (1 h, 37°C) inkubiert. Es wurden 5 und 50 µl der Bakteriensuspension auf je eine 10 cm Zellkulturschale (Greiner Bio-One International GmbH) mit LB Agar versetzt mit Ampicillin (50 µg/ml) gegeben. Die Zellkulturschalen wurden über Nacht (16 h) in einem Schüttelinkubator (Infors AG) ohne Bewegung bei 37°C inkubiert. Einzelne Bakterienklone wurden manuell gepickt und für die anschließende Plasmidpräparation in 3 ml LB Medium supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin (Carl Roth GmbH + Co. KG) überführt.

### **2.4.3.2 Plasmidpräparation**

Zur Isolation von kleinen Mengen an Plasmid (25 µg) stehen die Minipräparationen (engl. *minipreparation*), für größere Mengen an Plasmid die Midi- und Maxipräparationen (engl. *midi- and maxipreparation*) zur Verfügung. Plasmidpräparationen erlauben die präparative Isolation der Plasmide aus transformierten Bakterien. Zur Präparation der Plasmide wurde der QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen) und der QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Das Prinzip der Kits basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien. Vorhandene RNA wird durch die Zugabe von RNase degradiert. Im Anschluss wird die DNA in einem Puffer mit hohem Salzgehalt auf eine QIAprep Membran (Silikamembran) absorbiert und in einem Puffer mit niedrigem Salzgehalt eluiert. Die Zusammensetzung der Puffer und die Verwendung von Silikamembranen stellt die Absorption von DNA ohne Verunreinigungen von RNA, zellulären Proteinen und anderen Metaboliten sicher (Angabe des Herstellers).

Zur Präparation der Plasmide mit dem QIAGEN Plasmid Mini Kit wurden Flüssigkulturen der gepickten Bakterienkolonien wie unter Punkt 2.4.3.1 beschrieben angelegt. Die Kulturen wurden über Nacht (16 h) bei 37°C in einem Schüttelinkubator (Infors AG) bei 200 rpm inkubiert. Der Kit wurde nach Anleitung des Herstellers verwendet.

Zur Überprüfung der korrekten Sequenz wurden die Minipräparationen sequenziert (siehe Punkt 2.4.8). Minipräparationen, bei denen die Sequenzierung die korrekte Sequenz zeigte, wurden für Midipräparationen der Plasmide mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit verwendet. 50 µl der Minipräparation wurden in 250 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft und über Nacht (16 h, 200 rpm, Schüttelinkubator) inkubiert. Die Midipräparation erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Zur Überprüfung der korrekten Sequenz wurden die Midipräparationen sequenziert (siehe Punkt 2.4.8).

### **2.4.3.3 Anfertigung eines Glycerolstocks**

Für alle Midipräparationen deren Sequenzierungsergebnisse korrekt waren, wurde ein Glycerolstock angelegt. Hierzu wurden 300 µl Glycerin (Carl Roth GmbH + Co. KG) zu 700 µl Bakterienkultur in ein *E. cup* (VWR International) gegeben. Die Kultur wurde durch Auf- und

Abpipettieren und anschliessendem Vortexen durchmischt. Die Glycerolstocks wurden zügig bei -80°C zur Langzeitlagerung eingefroren.

#### **2.4.4 Isolation von DNA und RNA**

In der vorliegenden Arbeit wurde DNA und RNA für weiterführende Analysen isoliert und aufgereinigt. Die Quantifizierung und Beurteilung der Reinheit der genomischen DNA und RNA wurde mit dem NanoDrop 2000c Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt (siehe Punkt 2.4.4.4). Um qualitativ hochwertige, nicht degradierte DNA sicherzustellen, wurde die DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Punkt 2.4.4.5). Die genomische DNA und RNA wurde bei -80°C in einem HERA Freezer Basic (Thermo Fisher Scientific) langzeitgelagert. Die zur Isolation und Aufreinigung verwendeten Methoden sind im Folgenden beschrieben.

##### **2.4.4.1 Isolation und Aufreinigung genomischer DNA aus Vollblut**

Für die Isolation der genomischen DNA der HOS Indexpatienten und ihrer Verwandten ersten Grades wurde Vollblut durch einen Arzt in eine S-Monovette® EDTA K<sub>3</sub>/Forensic (K3E, Sarstedt) abgenommen. Die DNA wurde nach Angaben des Herstellers mit dem DNeasy Blood Mini Kit (Qiagen) isoliert. Das Prinzip des Kits ist eine Silikamembran-basierte Aufreinigung der DNA. In einem ersten Schritt werden die Blutzellen lysiert und die DNA auf die Silikamembran gebunden. Zellulärer Debris und andere Kontaminationen werden durch Waschschritte entfernt, sodass eine Inhibition von nachgeschalteten Experimenten ausgeschlossen wird. Die DNA wird final in dem, im Kit enthaltenen Puffer eluiert.

##### **2.4.4.2 Isolation und Aufreinigung von genomischer DNA aus Zellen**

Zur Isolation von genomischer DNA aus iPS Zellen wurden die Zellen mit 0,5 mM EDTA/PBS abgelöst und in ein 15 ml Falcongefäß überführt. Die Zellen wurden pelletiert (300 x g, 10 min, RT) und das Zellpellet bis zur Extraktion der DNA bei -20°C gelagert. Zur Isolation der DNA wurde der DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), welcher auf einer Silikamembran-basierten Aufreinigung der DNA beruht, nach Anleitung des Herstellers verwendet.

##### **2.4.4.3 Isolation und Aufreinigung von RNA**

In dieser Arbeit wurde RNA aus iPS Zellen und HEK 293 Zellen isoliert. Zur Aufreinigung von RNA wurde der Total RNA Kit, peqGOLD (VWR International) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden unter denaturierenden Bedingungen lysiert und die Lysate bis zur Isolation der RNA bei -20°C gelagert. Zur Isolation der RNA wurden die Lysate auf PerfectBind RNA Säulen geladen. Die RNA Moleküle binden an die Silikamembran der Säulen. Zellulärer Debris und andere Kontaminationen wurden durch Waschschritte mit spezifischen Puffern entfernt. Die aufgereinigte RNA wurde in sterilem RNase-freien Wasser eluiert. Für alle RNA Aufreinigungen wurde ein DNase I Verdau mit dem peqGOLD DNase I Digest Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH) auf der PerfectBind RNA Säule nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

#### **2.4.4.4 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der DNA und RNA**

Die Quantifizierung und Beurteilung der Reinheit von DNA und RNA wurde mit einem NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Die Messung der Nukleinsäuren im NanoDrop erlaubt eine Quantifizierung und Beurteilung der Reinheit unter Verwendung von 1 µl Probenvolumen. Während der Messung wird ein Absorptionsspektrum über den gesamten Wellenbereich (190 – 840 nm) aufgenommen und dargestellt. Die allgemein akzeptierten Extinktionskoeffizienten für Nukleinsäuren sind wie folgt (Angabe Thermo Fisher Scientific).

Doppelsträngige DNA: 50 ng-cm/µl

Einzelsträngige DNA: 33 ng-cm/µl

RNA: 40 ng-cm/µl

Im ausgewählten Mikrovolumen-Modus verwendet das Spektralphotometer Schichtdicken zwischen 1,0 und 0,05 mm um die Messungen von konzentrierten Proben zu ermöglichen (Angabe Thermo Fisher Scientific). Die Absorptionswerte der Messung von Nukleinsäuren sind hierbei auf eine Schichtdicke von 1,0 mm genormt (Angabe Thermo Fisher Scientific). Der Reinheitsgrad der Nukleinsäuren (DNA, RNA) wird über das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten  $A_{260/280}$  beurteilt. Ein Verhältnis  $A_{260/280}$  von ~1,8 wird als rein für DNA angesehen (Angabe Thermo Fisher Scientific). Ein Verhältnis  $A_{260/280}$  von ~2,0 wird als rein für RNA angesehen (Angabe Thermo Fisher Scientific). Die spektrophotometrische Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentrationen wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

#### **2.4.4.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren**

Die Integrität genomischer DNA kann durch gelelektrophoretische Auftrennung überprüft werden. Da die zu erwartende Fragmentgröße von genomischer, nicht degradiertes DNA bei weit über 10.000 Basenpaaren (bp) liegt, wurde ein niedrigprozentiges Agarosegel (0,8%) verwendet. 0,4 g Agarose (PeqGOLD Universal, PEQLAB GmbH, VWR Life Science Competence) wurden abgewogen und in 50 ml 1x TBE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst.

Die in der quantitativen RT-PCR amplifizierten Fragmente wurden aufgrund der zu erwartenden Fragmentgrößen von 100 bis 200 bp in einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt. Für die Herstellung des Gels wurde 1 g Agarose mit 50 ml 1x TBE-Puffer gemischt und durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst.

Nach Lösen der Agarose und Abkühlen auf 52°C wurden 10 µl einer 50 µg/ml Ethidiumbromid Lösung (Sigma Life Science, Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) in 50 ml Agaroselösung gegeben. Ethidiumbromid ist ein roter Phenathridin-Farbstoff, der zum Anfärben von Nukleinsäuren in der Gelelektrophorese verwendet wird. Ethidiumbromidmoleküle interkalieren zwischen die Basen der Nukleinsäuren, wodurch das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert wird. Die erhöhte Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids ist bei Anregung mit UV-Licht sichtbar und kann visualisiert werden.

Die Agaroselösung wurde zum Aushärten in eine Gelkammer (Gelkammer Sub-Cell Modell 96, Bio-Rad Laboratories GmbH) gefüllt. Je 1 µl der DNA Probe wurde mit 19 µl *aq. bidest.* und 4 µl 6x DNA Gel Loading Dye (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific) in die Taschen des ausgehärteten Agarosegels überführt. Als Marker für die genomische DNA wurde der λ DNA/EcoRI+ HindIII Marker 3 (Fisher Scientific GmbH by Thermo Fisher Scientific) nach Angabe des Herstellers verwendet. Zur Überprüfung der Amplifikationsprodukte der qRT-PCR wurden je 4 µl des Amplifikationsproduktes mit 16 µl *aq. bidest.* und 4 µl 6x DNA Gel Loading Dye in die Taschen überführt. Als Marker für die amplifizierte cDNA wurde der Marker Quantitas DNA Marker 25 - 500bp (Biozym Scientific GmbH) oder die *GeneRuler™ DNA Ladder* (50 bp, Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Alle Nukleinsäuren wurden für 40 min bei 120 V mit einem Gelektrophoresegerät PowerPac Basic (Bio-Rad Laboratories GmbH), in einer Gelkammer, die mit 1x TBE Puffer befüllt wurde, aufgetrennt und in dem Geldokumentationsgerät ChemDoc XR System (Bio-Rad Laboratories GmbH) visualisiert.

#### 2.4.5 Produktion von cDNA

RNA wurde mit dem M-MLV Reverse Transkriptase Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung von Random Oligonukleotiden (Oligodesoxyribonukleotide, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific), die als Hexamere vorliegen, nach Anleitung des Herstellers umgeschrieben. Diese absolut zufälligen Oligonukleotide sind durch den Hersteller für die DNA-Synthese mit dem in dieser Arbeit verwendeten M-MLV Reverse Transkriptase Kit vorgeschlagen. Es wurden 100 µl der Random Oligonukleotide (3 µg/µl) mit 1100 µl H<sub>2</sub>O (Water, RNase-free, DEPC treated, Molecular Biology Grade, Ultrapure, Thermo Scientific) versetzt. Die Oligonukleotide wurden in 100 µl Aliquots mit einer Konzentration von 250 ng/ml bei -20°C gelagert. Die in dem Kit verwendete M-MLV (engl. *Moloney Murine Leukemia Virus*) Reverse Transcriptase (M-MLV RT) ist eine rekombinante DNA-Polymerase, die aus einzelsträngiger RNA, DNA oder einem RNA:DNA-Hybrid einen DNA-Komplementärstrang synthetisiert (Angabe des Herstellers). Die cDNA Produktion wurde wie folgt durchgeführt. Die Random Oligonukleotide wurden mit den dNTPs (Carl Roth GmbH + Co. KG) und 100 ng RNA gemischt und in einem Thermomixer (Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf) für 5 min bei 65°C inkubiert. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 20 gezeigt. Die Reaktion wurde durch Transfer des Ansatzes auf Eis gestoppt.

**Tabelle 20: Mastermix 1 der cDNA Synthese**

Komponente	Volumen
Random Oligonukleotide (250 ng/ml)	3 µl
dNTPs (100 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	1,5 µl
RNA (100 ng)	16 µl

Der Mastermix 2 (Tabelle 21) wurde zum Mastermix 1 gegeben, gemischt und für 2 min bei 37°C in einem Thermomixer (Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert.

**Tabelle 21: Mastermix 2 der cDNA Synthese**

Komponente	Volumen
5x First Strand Buffer	6 µl
0,1 M DTT	3 µl

0,5 µl M-MLV RT (200 U/ml) wurden dem kompletten Reaktionsansatz (Mastermix 1 und 2) zugegeben und die cDNA Synthese unter den in Tabelle 22 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

**Tabelle 22: Reaktionsbedingungen der cDNA Synthese**

Reaktion	Temperatur	Inkubationszeit
Inkubation	RT	10 min
cDNA Synthese	37°C	50 min
Enzyminaktivierung	75°C	15 min
	ice	∞

#### 2.4.6 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) wird verwendet um spezifische DNA Sequenzen zu vervielfältigen. Für die Durchführung der PCR ist die DNA Matrize, spezifische entwickelte Oligonukleotide, eine thermostabile DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate, Mg<sup>2+</sup>-Ionen, welche für die Funktion der Polymerase essentiell sind, die Anlagerung der Oligonukleotide stabilisieren und lösliche Komplexe mit den Desoxyribonukleosidtriphosphaten bilden, sowie eine Pufferlösung, die die chemischen Bedingungen für die enzymatische Aktivität der Polymerase sicherstellt, nötig (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA). Die meisten in PCR Kits verwendeten *Taq* Polymerasen benötigen eine Hitzeaktivierung bei 95°C und werden deshalb auch als *Hot-Start* Enzyme bezeichnet. Bei der in dieser Arbeit verwendeten FastStart™ High Fidelity Polymerase des FastStart™ High Fidelity PCR System (FastStart™ High Fidelity PCR System, dNTPack, 500U, Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) beträgt die Aktivierungszeit zwei Minuten. Nach Aktivierung der Polymerase, folgt die drei-stufige PCR Reaktion (Denaturierung, Oligonukleotidhybridisierung, Elongation), die standardmässig 40-mal wiederholt wird. Während der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA auf 94-96°C erhitzt, so dass die Wasserstoffbrückenbindungen, welche die beiden DNA Stränge zusammenhalten, aufbrechen. Oligonukleotide, wie auch die DNA Matrize liegen als Einzelstränge vor, sodass sich während der Oligonukleotidhybridisierung die Oligonukleotide spezifisch an die DNA Einzelstränge anlagern können. Während der Elongation erkennt die DNA-Polymerase das angelagerte Oligonukleotid und beginnt an seinem 3'-Ende die freien Nukleotide in 5'→3' Richtung aufzufüllen.

Die Oligonukleotide wurden manuell mit der Datenbank NCBI (*National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*, NCBI, Bethesda, MD, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mit einer Annealing-Temperatur von 60°C konzipiert und mit der Anwendung *Basic local alignment search tool* (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) auf Spezifität überprüft. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 8 aufgeführt und wurden von der Firma Ella Biotech GmbH (Martinsried,

Deutschland) synthetisiert. Der Ansatz der Amplifikation ist in Tabelle 23 gezeigt. Die Bedingungen der PCR wurden, wie in Tabelle 24 gezeigt gewählt. Alle Amplifikationen wurden auf einem C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH) durchgeführt.

**Tabelle 23: Ansatz der DNA Amplifikation**

Komponente	Volumen/Reaktion	Finale Konzentration
FastStart High Fidelity Reaction Buffer, 10x	2 µl	1x; 1,8 mM MgCl <sub>2</sub>
DMSO	1 µl	5%
PCR Grade Nucleotide Mix	0,4 µl	200 µM
Oligonukleotid (forward), 2 µM	1,6 µl	0,16 µM
Oligonukleotid (reverse); 2 µM	1,6 µl	0,16 µM
DNA Matrize	variabel	100 ng
FastStart High Fidelity Enzyme Blend (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U/Reaktion
Water, PCR Grade	auf 20 µl	

**Tabelle 24: Reaktionsbedingungen der DNA Amplifikation**

	Zyklen	Zeit	Temperatur
Initiale Aktivierung	1	2 min	95°C
Amplifikation	30-40		
	Denaturierung	30 s	95°C
	Annealing	30 s	60°C
	Elongation	120 s	72°C
Finale Elongation	1	10 min	72°C
Kühlung		∞	4°C

Für die Identifikation von genetischen Varianten in den HOS Indexpatienten und ihrer Verwandten ersten Grades wurden die Amplifikationsprodukte vor der Sequenzierung mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

#### 2.4.7 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (engl. *quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*, qRT-PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren basierend auf dem Prinzip der PCR und wurde in der vorliegenden Arbeit zur Quantifizierung der Genexpression verwendet.

Der Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit die amplifizierte DNA durch Fluoreszenzmessung, die während jedem PCR Zyklus in Echtzeit (engl. *real-time*) erfasst wird, zu quantifizieren. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge des Amplifikationsproduktes zu und wird in der exponentiellen Phase (*Elongation*) der PCR erfasst. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde in dieser Arbeit der DNA-Farbstoff SYBR Green I verwendet. Dieser Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA, bzw. interagiert mit den „minor groove“ Regionen der DNA (Dragan *et al.*, 2012; Zipper *et al.*, 2004), die unter UV-Licht fluoresziert.

Eine PCR kann in ihrem zeitlichen Verlauf in vier Phasen unterteilt werden. In der „Background“-Phase (1. Phase) sind die Bedingungen zur Quantifizierung suboptimal, da sich nur wenig Matrizen-DNA in der Reaktion befindet. Während der Interphase (3. Phase) und

Plateauphase (4. Phase) sind die Bedingungen ebenfalls suboptimal, da das Amplifikationsprodukt, das in großen Mengen vorhanden ist, zur Hemmung führt. Aus diesem Grund erfolgt die Quantifizierung in der 2. Phase (exponentiellen Phase). Für die Quantifizierung wird der Schwellenwert-Zyklus, an dem die Fluoreszenz über die vorhandene Hintergrundfluoreszenz (engl. *background fluorescence*) signifikant ansteigt, als Ct-Wert (engl. *cycle threshold*, ct) definiert. Zur Unterscheidung der einzelnen Amplifikationsprodukte, kann nach Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse, bei der die DNA durch einen langsamen, kontinuierlichen Anstieg der Temperatur von 60°C auf 95°C aufgeschmolzen wird, durchgeführt werden. Für jedes Amplifikationsprodukt existiert eine spezifische Schmelztemperatur, bei der der Doppelstrang vollständig denaturiert ist und zwei Einzelstränge vorliegen. Während der Denaturierung des Doppelstrangs wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und die Fluoreszenz nimmt rapide ab. Da die Schmelzkurve und die Schmelztemperatur der doppelsträngigen DNA-Fragmente von der Länge und der Basenzusammensetzung des DNA-Fragments abhängig sind, kann mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse die Unterscheidung zwischen unspezifisch entstehenden Fragmenten und dem spezifischen Amplifikationsprodukt erfolgen. Die Schmelzkurvenmaxima werden als Ableitung des Fluoreszenzsignals (y-Achse) gegen die Temperatur (x-Achse) dargestellt. Für die qRT-PCR auf einem Light Cycler® 1.5 Real Time PCR Thermal Cycler (Roche Molecular Systems, Inc., Rotkreuz, Schweiz) wurde der QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Für die qRT-PCR auf dem Quant Studio 3 (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA) wurde der Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Eine Umstellung des Kits erfolgte als Anpassung auf das Gerät. Alle für die qRT-PCR verwendeten Oligonukleotide wurden über die Internetseite *Universal ProbeLibrary System Assay Design* (Roche Molecular Systems, Inc., Rotkreuz, Schweiz, [https://lifescience.roche.com/en\\_de/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center](https://lifescience.roche.com/en_de/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center)) spezifisch für eine Annealingtemperatur von 60°C konzipiert und bei der Firma Ella Biotech GmbH (Martinsried, Deutschland) synthetisiert. Alle in dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCR Reaktionen wurden auf einem Light Cycler® 1.5 Real Time PCR Thermal Cycler (Roche Molecular Systems, Inc., Rotkreuz, Schweiz) bzw. dem Quant Studio 3 (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA) durchgeführt. Die Reaktionen wurden nach den in Tabelle 25 gezeigten Ansätzen, entsprechend den Vorgaben, der verwendeten Kits durchgeführt. Die jeweiligen Bedingungen für den Light Cycler® 1.5 Real Time PCR Thermal Cycler bzw. den Quant Studio 3 sind in Tabelle 26 und 27 angegeben.

**Tabelle 25: qRT-PCR Ansätze**

Komponente des QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (Light Cycler® 1.5)	Volumen/Reaktion	Finale Konzentration
2x QuantiTect SYBR Green PCR MasterMix	10 µl	2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
Oligonukleotid (forward), 5 µM	2 µl	0,5 µM
Oligonukleotid (reverse), 5 µM	2 µl	0,5 µM
cDNA	variabel	≤ 1 µg/Reaktion
RNase-freies Wasser	variabel	auf 20 µl
Reaktionsvolumen	20 µl	



Komponente des Power SYBR® Green PCR Master Mix (Quant Studio 3)	Volumen/Reaktion	Finale Konzentration
Power SYBR® Green PCR MasterMix 2x	10 µl	2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
Oligonukleotid (forward), 5 µM	2 µl	0,5 µM
Oligonukleotid (reverse), 5 µM	2 µl	0,5 µM
cDNA	variabel	≤ 1 µg/Reaktion
RNase-freies Wasser	variabel	auf 20 µl
Reaktionsvolumen	20 µl	

Tabelle 26: Amplifikationsbedingungen Light Cycler® 1.5

	Zyklen	Zeit	Temperatur	Rate
Initialer Aktivierungsschritt	1	15 min	95°C	20°C/s
Amplifikation	30-40			
Denaturierung		15 s	94°C	20°C/s
Annealing		20 s	60°C	20°C/s
Elongation		20 s	72°C	2°C/s
Schmelzkurvenanalyse	1			
1. Segment			95°C	20°C/s
2. Segment		30 s	60°C	20°C/s
3. Segment			95°C	0,1°C/s
Kühlung	1	30 s	40°C	20°C/s

Tabelle 27: Amplifikationsbedingungen Quant Studio 3

	Zyklen	Zeit	Temperatur	Rate
Initialer Aktivierungsschritt	1	2 min	50°C	1,6°C/s
Amplifikation	30-40			
Denaturierung		15 s	95°C	1,6°C/s
Annealing/ Elongation		1 min	60°C	1,6°C/s
Schmelzkurvenanalyse	1			
1. Segment		15 s	95°C	1,6°C/s
2. Segment		1 min	60°C	1,6°C/s
3. Segment		1 sec	95°C	0,15°C/s
Kühlung	1	∞	4°C	

### Relative Quantifizierung der Genexpression

Für die Berechnung der Genexpression wurde zunächst die Effizienz (E) der Amplifikation berechnet. Hierzu wurde eine serielle Verdünnungsreihe für jedes Amplifikationsprodukt über sechs log<sub>10</sub>-Stufen hergestellt, die Verdünnungsreihe amplifiziert und die jeweiligen Ct-Werte bestimmt. Es wurde eine lineare Regressionsgerade durch die Ct-Werte (y-Achse) in Abhängigkeit der ansteigenden Konzentration der DNA (x-Achse) gelegt.

Die lineare Regression (y) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$y = -m \ln(x) + zp, \quad m: \text{Steigung der Gerade, } zp: \text{Schnittpunkt der y-Achse}$$

$$[x = (Ct-b)/m]$$

Die Effizienz (E) wurde nach folgender Formel berechnet:  $E = 10^{(-1/m)}$

Effizienzen zwischen 1,8 und 2,0 entsprechen einer Amplifikationseffizienz zwischen 90% und 100%. Für alle linearen Regressionen wurde das Bestimmungsmaß  $R^2$  berechnet.  $R^2$  ist ein Gütemaß der linearen Regression und gibt an, wie gut die unabhängigen Variablen (Verdünnungsstufen) die Varianz der abhängigen Variablen (Ct-Werte) erklären.

Das Gütemaß ist wie folgt definiert:  $R^2 = [0, 1]$

Für die relative Quantifizierung wurde als Referenzgen *Actin Beta (ACTB)* verwendet. Die relative Genexpression wurde in willkürlichen Einheiten (engl. *arbitrary units*, AU) als Induktion über Tag D0 nach Normalisierung mit *ACTB* (NM\_001101.3) nach folgenden Formeln bestimmt:

$$\text{AU (arbitrary units)} = e^{(\text{Ct Wert} - z_p)/m}$$

$$\text{n-fache Expression} = \frac{\text{Gruppe A}}{\text{Gruppe (Tag 0)}} = \frac{\text{Gen (normalisiert) Gruppe A}}{\text{Gen (normalisiert) Gruppe (Tag 0)}}$$

Für alle Expressionsanalysen wurde die Standardabweichung (engl. *standard deviation*, SD), welche die Streubreite (syn. Varianz  $v$ , Streuung  $s$ ) der Werte angibt bzw. der relative Standardfehler (engl. *standard error*) des Mittelwerts: SEM (engl. *standard error of the mean*), welcher die theoretische Streubreite des Stichprobenmittelwertes ermittelt, nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{SD} = \sqrt{v}$$

$$\text{SEM} = v/\sqrt{n}$$

$$\text{S(x)} = \sum_{i=1}^n (x_i - \text{Mittelwert}(x)), \text{ mit } n = \text{Stichprobenumfang}$$

Für alle Expressionsdaten wurde der T-Test für unverbundene Stichproben (engl. *unpaired Student's t-test*) zur Berechnung der Signifikanz der Genexpressionsunterschiede verwendet. Es wurden folgende Signifikanzgrenzen gesetzt: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 2.4.8 Sequenzierung

Alle Amplifikationsprodukte, Mini- und Midipräparationen wurden mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Konzentration und Reinheit der PCR Produkte und Plasmid DNA wurden spektrophotometrisch, wie unter Punkt 2.4.4.4 beschrieben bestimmt. Die Überprüfung der Qualität und Größe des zu sequenzierenden Templates erfolgte gelelektrophoretisch (siehe Punkt 2.4.4.5). Die Sequenzierungen wurden durch die Firmen Source BioScience (Berlin, Deutschland) bzw. Eurofins GmbH (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Die Sequenzierungsansätze wurden nach den Vorgaben der Firmen durchgeführt und sind in Tabelle 28 und 29 zusammengefasst. Für Sequenzierungen der Firma Source BioScience wurden die Plasmid DNA/PCR-Produkte und die Oligonukleotide getrennt versandt. Für die Sequenzierungen der Firma Eurofins konnten die Plasmid DNA/PCR-Produkte mit dem entsprechenden Oligonukleotid zusammen verschickt werden.

**Tabelle 28: Anforderungen der Sequenzierung (Source BioScience)**

Source BioScience	Konzentration [ng/μl]	Volumen [μl]	Konzentration Oligonukleotid [pmol/μl]	Volumen Oligonukleotid [μl]
Plasmid DNA	100	5	3,2	5
PCR-Produkt	1 ng/μl pro 100 bp	5	3,2	5

**Tabelle 29: Anforderungen der Sequenzierung (Eurofins GmbH)**

Eurofins GmbH	Konzentration [ng/μl]	Volumen [μl]	Konzentration Oligonukleotid [pmol/μl]	Volumen Oligonukleotid [μl]
Plasmid DNA	50-100	15	10	2
PCR-Produkt	1 ng/μl (150-300 bp) 5 ng/μl (300-1000 bp) 10 ng/μl (1000-3000 bp)	15	10	2

### 2.4.9 Immunzytologische Färbung

Immunzytochemie (ICC) ist eine Methode, mit der Proteine und Zellstrukturen in Zellen mit Hilfe von markierten Antikörpern (AK) sichtbar gemacht werden können (Lang, 2013). Die Voraussetzung für die Detektion ist die Affinität des AKs zu seinem spezifischen Antigen (Epitop). In der ICC unterscheidet man zwischen der direkten und indirekten Methode. Bei der direkten Methode ist der, das Antigen spezifisch erkennende Primärantikörper direkt durch Konjugation mit einem Enzym oder Fluorophor markiert. Bei der indirekten Methode wird nach Bindung des Primärantikörpers an das spezifische Epitop ein Sekundärantikörper, der ein Fluorophor/Enzym gebunden hat zugegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die indirekte Methode zur Detektion verschiedener Epitope unter Verwendung von Fluorophoren angewendet. Für alle ICC Färbungen wurde eine Fixierung der Zellen auf einem *Chamber Slide* System (Millicell EZ SLIDE 4-well glass, sterile, Merck KGaA) durchgeführt. Zur Detektion intrazellulärer Epitope wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Nach der Antigen-Antikörper-Bindung mit den spezifischen Primärantikörpern wurden Fluorophor-markierte Sekundärantikörper zur Detektion verwendet. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper, eingesetzte Verdünnungen und finale Konzentrationen für alle ICC Färbungen sind in den Tabellen 6 (Primärantikörper) und 7 (Sekundärantikörper) angegeben. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden, falls nicht anders beschrieben, bei RT durchgeführt. Alle Konzentrationen der verwendeten Lösungen sind als Volumenprozent (v/v) oder Prozent (%) angegeben. Nach Beendigung der ICC wurden die Objektträger im Dunklen luftgetrocknet und mit dem Eindeckmedium *Fluoroshield mounting* Medium (Abcam), das 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI) zur Kernfärbung enthält, beschichtet. Die Objektträger wurden mit Deckgläsern (Thermo Fisher Scientific) verschlossen und 24 h später mit Nagellack versiegelt.

Alle in dieser Arbeit gezeigten Bilder der ICC Färbungen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss), unter Verwendung des Programms Carl Zeiss™ Axio Vision Rel. 4.8.2 Software (Zeiss) generiert.

#### 2.4.9.1 Immunzytologische Färbung von HEK 293 Zellen

HEK 293 Zellen wurden bis zur Erreichung einer 80%-igen Konfluenz kultiviert und mit den entsprechenden Expressionsvektoren (pAW48 leer, pAW48-TBX5<sup>WT</sup>, pAW48-TBX5<sup>mut</sup>) transfiziert (siehe Punkt 2.6.3). Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen für 5 min mit 1x D-PBS gewaschen. Die Fixierung wurde für 15 min mit 4% Paraformaldehyd (Carl Roth GmbH + Co. KG) in 1x D-PBS durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen (1x D-PBS, 5 min) wurden die Zellen mit PBS-T (0,1%) für 10 min permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 5% normalem Ziegen Serum (Abcam) in 0,1% PBS-T für 30 min blockiert. Nach zwei weiteren Waschschritten (0,1% PBS-T, 5 min) wurden die Zellen für 1 h mit dem monoklonalen Maus IgG<sub>1</sub> Antikörper Anti-flag® M2 (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) und dem polyklonalen Kaninchen IgG Antikörper Anti-GAPDH (Abcam) in 0,1% PBS-T mit 1,5% normalem Ziegen Serum bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (0,1% PBS-T, 5 min) wurden die Zellen mit den polyklonalen Sekundärantikörpern Goat Anti-Mouse IgG (H&L) Alexa-Fluor 488 (Abcam) und Goat Anti-Rabbit IgG (H&L) Alexa Fluor 555 (Abcam) in 0,1% PBS-T mit 1,5% normalem Ziegen Serum für 1 h im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit 1x D-PBS und einmal mit *aq. bidest.* für je 5 min gewaschen.

#### 2.4.9.2 Immunzytologische Färbung von induzierten pluripotenten Stammzellen

Immunzytochemische Färbungen für TRA1-81, SOX2 und NANOG werden in der Literatur zum Nachweis des pluripotenten Charakters von iPS Zellen verwendet (Lahm *et al.*, 2015a; Moretti *et al.*, 2010b).

Die iPS Zellen wurden für die ICC in einem *Chamber Slide System* (Merck KGaA) subkultiviert und 2-4 Tage später, wie folgt gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit 1x D-PBS (5 min), wurden die Zellen für die TRA1-81 Färbungen mit eiskaltem 100%-igem Methanol (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) für 10 min bei -20°C fixiert. Die Fixierung für die SOX2 und NANOG Färbung wurde mit eiskaltem 100%-igem Aceton (Carl Roth GmbH + Co. KG) für 10 min bei -20°C durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen (1x D-PBS, 5 min) wurden die Zellen für 10 min mit 0,1% PBS-T permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 5% normalem Ziegen Serum (Abcam) in 1x PBS-T für 30 min geblockt. Für die Färbung von NANOG wurden unspezifische Bindungsstellen mit 20% normalem Ziegen Serum (Abcam) in 1x PBS-T für 30 min geblockt. Nach dreimaligem Waschen (0,1% PBS-T, 5 min) erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern (1 h), welche in 0,1% PBS-T mit 1,5% normalem Ziegen Serum verdünnt wurden. Nach dreimaligem Waschen (0,1% PBS-T, 5 min) wurden die entsprechenden Sekundärantikörper für 60 min im Dunkeln zugegeben. Für den Anti-TRA1-81 AK wurde ein goat-anti-mouse IgM Alexa Fluor 488 (Abcam) als Sekundärantikörper verwendet. Für den Anti-SOX2 AK wurde die Zweitantikörper goat-anti-rabbit IgG (H&L) Alexa Fluor 488/555 (Abcam) verwendet. Als Sekundärantikörper für NANOG wurde goat-anti rabbit IgG (H&L) Alexa Fluor 555 (Abcam) verwendet. Alle Sekundärantikörper wurden in 0,1% PBS-T mit 1,5% normalem Ziegen Serum verdünnt. Einem dreimaligen Waschen mit 1x D-PBS für 5 min folgte ein Waschschriff mit *aq. bidest.* (5 min).

### 2.4.9.3 Immunzytologische Färbung des Flag-Tags in differenzierenden Kardiomyozyten

Induzierte pluripotente Stammzellen wurden mit EDTA/PBS Lösung (0,5 mM) in einem *Chamber Slide* System (Merck KGaA) subkultiviert. Bei erreichter Konfluenz (80%) wurde die gerichtete Differenzierung wie unter Punkt 2.8.3.2 beschrieben gestartet. Am Tag D16 der Differenzierung wurden die ICC für Flag in den CRISPR/Cas9 editierten Klon E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> 331 durchgeführt. Die Zellen wurden für 5 min mit 1x D-PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 100%-igem Methanol für 15 min bei -20°C. Nach zweimaligem Waschen (5 min, 1x D-PBS) wurde die Permeabilisierung mit 0,25% PBS-T für 10 min bei RT durchgeführt. Nach zwei weiteren Waschschritten (0,1% PBS-T, 5 min) wurden unspezifische Bindungsstellen für 30 min mit 5% normalem Ziegen Serum in 0,1% PBS-T für 1 h bei 37°C geblockt. Der Primärantikörper Mouse monoclonal Anti-Flag<sup>®</sup>M2, Clone M2 (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) wurde in 0,1% PBS-T mit 1,5% normalem Ziegen Serum verdünnt. Die Inkubation mit dem AK erfolgte für 1 h bei 37°C. Nach 2 Waschschritten (5 min, 0,1% PBS-T) wurde die Inkubation mit dem Zweitantikörper Goat Anti-Mouse IgG H&L Alexa Flour<sup>®</sup> 488 (Abcam) für 1 h im Dunklen durchgeführt. Der Sekundärantikörper wurde in 0,1% PBS-T mit 1,5% Ziegen Serum verdünnt. Die Zellen wurden final zweimal mit 1x D-PBS und einmal mit *aq. bidest.* (5 min) gewaschen.

### 2.4.9.4 Immunzytologische Färbung von Kardiomyozyten

Induzierte pluripotente Stammzellen wurden mit EDTA/PBS Lösung (0,5 mM) in ein *Chamber Slide* System (Merck KGaA) ausplattiert. Bei erreichter Konfluenz (80%) wurde die gerichtete Differenzierung wie unter Punkt 2.8.3.2 beschrieben gestartet. Kardiomyozyten (CM) wurden an den Tagen D14, D30 und D60 der gerichteten Differenzierung für den kardialen Marker Troponin T, die sarkomeren Strukturproteine  $\alpha$ -MHC und sarkomeres  $\alpha$ -Actinin, wie auch für die Connexine 40 und 43 gefärbt. Für alle Färbungen wurden die CM für 5 min mit 1x D-PBS gewaschen. Die Fixierung der CM für die Troponin T-,  $\alpha$ -MHC- und  $\alpha$ -Actininfärbungen erfolgte mit 4% PFA in 1x D-PBS für 10 min. Die Fixierung für die Connexin-Färbungen wurde mit eiskaltem 100%-igem Aceton (Carl Roth GmbH + Co KG) für 10 min bei -20°C durchgeführt. Für alle Färbungen wurden die CM nach Fixierung zweimal für 5 min mit 1x D-PBS gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte mit 0,25% PBS-T für 10 min. Nach zwei weiteren Waschschritten (0,1% PBS-T, 5 min) wurden unspezifische Bindungsstellen für 30 min geblockt. Für die Färbungen mit Troponin T,  $\alpha$ -MHC und sarkomerem  $\alpha$ -Actinin wurde 5% normales Ziegen Serum in 0,1% PBS-T verwendet. Das Blocken für die Connexinfärbungen wurde mit 10% BSA in 0,1% PBS-T durchgeführt. Die Primärantikörper wurden wie in Tabelle 30 angegeben angesetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h.

**Tabelle 30: Ansätze der Primärantikörper für die ICC von CM in der gerichteten Differenzierung**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnungslösung</b>
<b>Anti-Cardiac Troponin T antibody [1C11]</b> , mouse monoclonal IgG <sub>1</sub>	1,5% Ziegen Serum in 0,1% PBS-T
<b>Anti-<math>\alpha</math> smooth muscle Actin antibody</b> , rabbit polyclonal IgG	1,5% Ziegen Serum in 0,1% PBS-T
<b><math>\alpha</math> Myosin Heavy Chain Antibody (MF20)</b> , mouse monoclonal, IgG <sub>2a</sub>	1,5% Ziegen Serum in 0,1% PBS-T
<b>Anti-Connexin 40</b> , rabbit polyclonal IgG	5% BSA in 0,1% PBS-T
<b>Anti-Connexin 43</b> , mouse monoclonal IgG <sub>1</sub>	5% BSA in 0,1% PBS-T

<b>Anti-Myosin Light Chain 2 (MYL2)</b> , syn. MLC2V rabbit polyclonal, IgG	1,5% Ziegen Serum in 0,1% PBS-T
<b>Anti-Myosin Light Chain 2 (MYL7)</b> , syn. MLC2A mouse monoclonal, IgG <sub>2b</sub>	1,5% Ziegen Serum in 0,1% PBS-T

Abkürzungen: MYL: engl. *Myosin Light Chain*.

Die CM wurden zweimal für 5 min mit 0,1% PBS-T gewaschen. Die Inkubation der Sekundärantikörper wurde für 1 h unter den in Tabelle 31 angegebenen Bedingungen im Dunklen durchgeführt. Die CM wurden final zweimal mit 1x D-PBS und einmal mit *aq. bidest.* (5 min) gewaschen.

**Tabelle 31: Ansätze der Sekundärantikörper für die ICC von CM in der gerichteten Differenzierung**

Primärantikörper	Verwendete Sekundärantikörper	Verdünnungslösung
<b>Anti-alpha smooth muscle Actin antibody</b>	Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488/555)	1,5% Ziegen Serum in 0,1% PBS-T
<b>Anti-Cardiac Troponin T antibody [1C11]</b>	Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488/555)	1,5% Ziegen Serum in 0,1% PBS-T
<b>Anti-Connexin 40</b>	Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488/555)	10% BSA in 0,1% PBS-T
<b>Anti-Connexin 43</b>	Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488/555)	10% BSA in 0,1% PBS-T
<b>Anti-Myosin Light Chain 2 (MYL2), MLC2V</b>	Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488/555)	1% BSA in PBS
<b>Anti-Myosin Light Chain 7 (MYL7), MLC2A</b>	Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488/555)	1% BSA in PBS
<b>α Myosin Heavy Chain Antibody (MF20)</b>	Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488/555)	1,5% Ziegen Serum in 0,1% PBS-T

An Tag D30 und D60 der gerichteten Differenzierung wurden CM für MLC2A und MLC2V gefärbt. Die CM wurden für 5 min mit 1x D-PBS gewaschen. Die Fixierung mit 4% PFA in 1x D-PBS erfolgte für 15 min. Nach zwei Waschschritten (5 min, 1x D-PBS) wurden unspezifische Bindungsstellen für 30 min mit 10% Ziegen Serum in 0,25% PBS-T geblockt. Die CM wurden zweimal gewaschen (0,1% PBS-T, 5 min) und die AK, wie in Tabelle 30 angegeben für 1,5 h zugegeben. Nach viermaligem Waschen (10 min, 1,5% Ziegen Serum in 0,1% PBS-T), wurden die entsprechenden Sekundärantikörper wie in Tabelle 31 angegeben für 1 h im Dunklen zugegeben. Es folgten vier Waschschrritte mit 1x D-PBS für jeweils 10 min und ein Waschschritt mit *aq. bidest.* (5 min).

#### 2.4.10 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie (eng. *flow cytometry*) erlaubt die Analyse von Zellen, die einzeln und mit hoher Geschwindigkeit an einem Lichtstrahl vorbeifliessen und optische Signale emittieren. Für jede durchflusszytometrische Bestimmung wird die Größe der Zelle als Messung des Vorwärtsstreulichts (engl. *Forward Scatter*, FSC) und die Granularität der Zellen als Seitwärtsstreulicht (engl. *Side Scatter*, SSC) erfasst. Neben diesen Parametern können die Zellen, spezifisch für die Fragestellung, mit AK markiert werden, sodass die Fluoreszenzsignale für das markierte Epitop detektiert werden und weitere Parameter für jede Zelle analysiert werden können. Die für die Durchflusszytometrie verwendeten Primär- und Sekundärantikörper mit Hersteller, eingesetzter Verdünnung und finaler Konzentration sind in den Tabellen 6 (Primärantikörper) und 7 (Sekundärantikörper) angegeben. Für die

durchflusszytometrische Analyse wurden alle Zellen final in 300 µl FACS Puffer aufgenommen und in einem BD LSR Fortessa (Becton, Dickinson and Company, BD Bioscience, San Jose, CA) unter Verwendung der Software *BD FACSDiva™ Version 8.0.1*, (Becton, Dickinson and Company, BD Bioscience) analysiert. Alle weiteren Auswertungen wurden mit der Software *FlowJo Version 7.6.5* (FlowJow LLC) durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurden CM der gerichteten Differenzierung (D30, D60) durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen wurden auf die Expression von kardialen Troponin T (TNNT2), Myosin Light Chain 7 (MYL7, syn. MLC2A), als Marker atrialer CM und Myosin Light Chain 2 (MYL2, syn. MLC2V) als Marker der ventrikulären CM untersucht. Die CMs wurden wie folgt für die Durchflusszytometrie vorbereitet. Das Differenzierungsmedium wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit 1x D-PBS für 5 min gewaschen. Eine Inkubation mit Kollagenase Typ 2/DNA Lösung für 3,5 h bei 37°C (HERACell 240i CO<sub>2</sub>Inkubator) führte zur Vereinzelnung der CM. Die Einzelzellsuspension wurde in ein 15 ml Falcongefäß überführt und durch Zentrifugation (100 x g, 10 min, RT) pelletiert. Die CM wurden mit 4% PFA in 1x D-PBS für 10 min bei RT fixiert. Nach einem Waschschrift mit 1x D-PBS (5 min) erfolgte die Permeabilisierung mit 90%-igem Methanol in 1x D-PBS für 5 Minuten bei 4°C. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei RT mit 1x D-PBS gewaschen und anschließend für 45 min mit den Primärantikörpern gegen Troponin T (Abcam), MLC2A (Synaptic Systems GmbH) oder MLC2V (Proteintech Group Inc.) bei RT inkubiert. Die Primärantikörper wurden in 1x BD Perm/Wash™ Puffer des BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences) verdünnt. Nach 2 Waschschriften mit 1x BD Perm/Wash™ Puffer (5 min, 4°C) wurden die Zellen im Dunklen auf Eis (1 h) mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (Tabelle 32) in 1x BD Perm/Wash™ Puffer inkubiert. Es folgten zwei Waschschriften (5 min, 4°C) mit 1x BD Perm/Wash™ Puffer.

**Tabelle 32: Kombination der Primär- und Sekundärantikörper in der durchflusszytometrischen Analyse von CM an Tag D30 und D60**

Primärantikörper	Sekundärantikörper
<b>Anti-Cardiac Troponin T antibody [1C11]</b>	Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 555), ab150113
<b>Anti-Myosin Light Chain 2 (MYL2), syn. MLC2V</b>	Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488), ab150077
<b>Anti-Myosin Light Chain 7 (MYL7), syn. MLC2A</b>	Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488), ab150113

**Abkürzungen:** **MLC2A:** engl. *Myosin regulatory light chain 2, atrial isoform*. **MLC2V:** engl. *Myosin Light Chain 2 ventricular/cardiac muscle isoform*. **MYL2:** engl. *Myosin Light Chain 2 gene*. **MYL7:** engl. *Myosin Light Chain 7 gene*.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Spezifität des monoklonalen Maus IgG<sub>2a</sub> Antikörpers ANTI-DDK (Flag) Antikörpers clone OTI4C5 (OriGene Technologies, Inc.) zur Detektion des Flag-Tags in transfizierten HEK 293 Zellen und frühen CM des Klons 331 der E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> durchflusszytometrisch untersucht. Als Negativkontrollen wurden untransfizierte HEK 293 Zellen, adipose Fibroblasten und iPS Zellen, die kein Flag Protein exprimieren verwendet.

Kardiomyozyten am Tag D10 der gerichteten Differenzierung wurden mit Kollagenase Typ 2/DNase Lösung von der Oberfläche gelöst. HEK 293 Zellen wurden mit 1x D-PBS durch vorsichtiges Spülen abgelöst. iPS Zellen wurden mit EDTA/PBS Lösung (0,5 mM) behandelt. Für die Ablösung der Fibroblasten wurde Trypsin EDTA Lösung verwendet. Alle

Einzelzellsuspensionen wurden mit dem BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences) nach Angabe des Herstellers vorbereitet. Als Primärantikörper wurde der monoklonale Maus IgG<sub>2a</sub> ANTI-DDK (Flag) Antikörper clone OTI4C5 (OriGene Technologies, Inc., Rockville) in einer Verdünnung von 1/1000 verwendet. Als Sekundärantikörper wurde der polyklonale Antikörper Goat Anti-Mouse IgG H&L Alexa Fluor® 555 (Abcam) in einer Verdünnung von 1/1000 eingesetzt.

## 2.5 Untersuchung genetischer Varianten

Die HOS Indexpatienten und ihre Verwandten wurden, zur Abklärung einer genetischen Ursache des Syndroms, auf genetische Varianten untersucht.

### 2.5.1 Exom Sequenzierung

Die Exom Sequenzierung (engl. *Whole Exome Sequencing*, WES) der vier HOS Familien wurde in Kooperation mit Prof. Dr. T. Meitinger (Helmholtz Zentrum München, *German Research Center for Environmental Health Institute of Human Genetics*, Neuherberg, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertungen wurden im Institut für Integrative und Experimentelle Genomik an der Universität zu Lübeck durchgeführt.

Für jeden HOS Indexpatienten und ihre Verwandten ersten Grades wurden 10 µg DNA mit entsprechenden Qualitätskontrollen (spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der DNA, Bestimmung des Extinktionsverhältnisses A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> nm und gelelektrophoretische Auftrennung der DNA), wie in den Punkten 2.4.4.4 und 2.4.4.5 beschrieben, an das Helmholtz-Zentrum überführt.

Die WES wurde wie folgt durchgeführt (Angabe Helmholtz Zentrum).

Für die Präparation der Library wurden 3000 ng doppelsträngige DNA verwendet. Die Reinheit der DNA wurde in einem NanoDrop System (Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA) und durch Agarosegelelektrophorese unter Verwendung des Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kits (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltram, MA) überprüft. Die Exom Sequenzierung wurde mit dem SureSelect Human All Exon 50Mb V5 Kits (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) unter Verwendung von Bravo NGS Option B (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) durchgeführt. Es wurde eine paired end-Sequenzierung auf einem HiSeq2500 System (Illumina Inc., San Diego, CA) mit einer Lesetiefe von 130 durchgeführt. Das *Alignment* wurde mit dem *UCSC human Reference Assembly hg19* und BWA v.0.5.89 durchgeführt. Die Programme SAMtools v.0.1.719 und constom Perl scripts wurden verwendet, um Varianten zu bestimmen.

Bei der verwendeten *Illumina sequencing-by-synthesis* (SBS)-Methode wird die DNA fragmentiert und über spezifische Adaptoren kovalent an Objektträger gebunden. Über einen PCR-ähnlichen Prozess werden „Cluster“ des gebundenen Startmoleküls gebildet. Die Sequenzierung mit fluoreszierenden Nukleotiden erfolgt zyklusweise, sodass in jedem Sequenzierungszyklus ein Nukleotid komplementär zur Matrizen-DNA eingebaut wird. Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenzgruppe abgespalten und das entstehende Lichtsignal detektiert. Durch die Abspaltung der Fluoreszenzgruppe kann im darauffolgenden Zyklus ein



weiteres fluoreszierendes Nukleotid eingebaut und detektiert werden. Bei einer *paired-end* Sequenzierung wird von jeder Seite der fragmentierten DNA sequenziert, sodass überlappende „Reads“ entstehen, welche die bioinformatische Auswertung vereinfachen und die Genauigkeit der Analyse erhöhen.

## **2.5.2 Amplifikation der genomischen *TBX5* Sequenz, der *TBX5* Promotor- und Enhancerregionen zur Identifikation genetischer Varianten in den HOS Indexfamilien**

Die Exone 2 bis 9 des *TBX5* Gens und ausgewählte Regionen des Enhancers 9 und des *TBX5* Promotors wurden wie unter Punkt 2.4.6 beschrieben amplifiziert. Da die zu amplifizierende Region des Promotors sehr lang war, wurden überlappende Bereiche amplifiziert (Region p1/p2). Für die Exone 5 und 9 des *TBX5* Gens, wie auch für den Promotorbereich p2 wurde eine geschachtelte (engl. *nested*) PCR durchgeführt. Hierzu werden zwei Amplifikationen nacheinander durchgeführt. Das Amplifikationsprodukt der ersten PCR dient dabei als Matrize für die zweite PCR, welche Oligonukleotide, die an Sequenzbereichen innerhalb der Matrize (Amplifikationsprodukt der ersten PCR) binden verwendet. Für die *nested* PCR wurde je 1 µl des Amplifikationsproduktes der ersten PCR als Matrize in die zweite Amplifikation, unter den gleichen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Alle für die PCR und *nested* PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden wie unter Punkt 2.4.8 beschrieben für die Sequenzierung vorbereitet. Die Auswertung der Sequenzierungen wurde mit dem Programm Finch TV Version 1.4.0 (Geospiza, Seattle, WA) durchgeführt. Die Sequenzen wurden unter Verwendung der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine* (NCBI, Bethesda, MD <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und der Anwendung *Basic local alignment search tool* (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) gegen die Referenzsequenzen des humanen *TBX5* (NM\_000192.3) und die Sequenzen der Promotor- und Enhancerregion (NC\_000012.11) auf genetische Varianten untersucht.

## **2.6 Charakterisierung der identifizierten *TBX5 de novo* Mutation p.Pro85Thr des Indexpatienten 1460**

Die identifizierte *de novo* *TBX5* Mutation des HOS Indexpatienten 1460 war nicht beschrieben oder in Datenbanken hinterlegt und wurde in der vorliegenden Arbeit charakterisiert und funktionell untersucht.

### **2.6.1 Entwicklung der *TBX5* Proteinstruktur und Vorhersage des funktionalen Effekts der Mutation**

Die räumliche Anordnung des *TBX5*-DNA Komplexes wurde von der Datenbank *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics - Protein Data Bank* (RCSB PDB, Rutgers University, The State University of New Jersey, NJ, <https://www.rcsb.org/>) geladen. Mit Hilfe der Software *Discovery Studio Visualizer 4.5* (Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, Frankreich, [57](http://www.3dsbiovia.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-</a></p></div><div data-bbox=)

[studio/](#)) wurden Bilder der Interaktion zwischen TBX5 und der DNA generiert. Die Darstellung der Interaktion erfolgte durch Armin Lahm (Bioinformatics Project Support, Rome, Italy). Zur Vorhersage der funktionellen Auswirkung der p.Pro85Thr Mutation des Indexpatienten 1460 auf die Funktion des TBX5 Proteins wurden die Programme **Polymorphism Phenotyping version 2** (PolyPhen-2, Sunyaev lab at Harvard Medical School, Boston, MA, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) und *MutationTaster* (Exzellenzcluster NeuroCure Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland, <http://www.mutationtaster.org/>) verwendet. Zur Überprüfung der Stabilität des mutierten TBX5 Proteins wurde das Programm *iStable* (*Integrated predictor for protein stability change upon single mutation*, Natural Computing & Bioinformatics Laboratory (NCB Lab.), Institute of Genomics and Bioinformatics, National Chung Hsing University, Taiwan, <http://predictor.nchu.edu.tw/istable/>) verwendet.

### 2.6.2 Gezielte Mutagenese des *TBX5* Gens an Position c.920 C→A

Bei einer gezielten Mutagenese (eng. *site-directed mutagenesis*) wird unter Verwendung von rekombinanter DNA eine spezifische Veränderung der DNA möglich, sodass einzelne Nukleotide gezielt aus der DNA entfernt oder ausgetauscht werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde der QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Inc.), welcher auf der *Ligation-During-Amplification* Methode (Shenoy & Visweswariah, 2003) beruht, zur gezielten Mutagenese der Position c.920C→A, welche zum Aminosäureaustausch von Prolin zu Threonin (p.Pro85Thr) führt verwendet. Die Methode basiert auf der Verwendung eines mutierten Oligonukleotids, bei der ein Strang einer zirkulären Plasmid DNA (Matrize) über mehrere Zyklen gezielt amplifiziert und ligiert wird. Die parentale Plasmid DNA, welche am Nukleotid Adenin der DNA Sequenz statistisch häufiger 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3' methyliert ist, wird nach Amplifikation mit dem Restriktionsenzym *DpnI*, welches nur *dam* methylierte DNA spaltet, abgebaut. Da mutierte, amplifizierte DNA am Nukleotid Adenin nicht methyliert ist, kommt es durch das Restriktionsenzym nicht zum Abbau. Die amplifizierte, mutierte einzelsträngige DNA wird in Bakterien transformiert (siehe Punkt 2.4.3.1) und zu doppelsträngiger Plasmid DNA vervollständigt.

Der als Matrize verwendete Vektor pAW48-huTBX5<sup>WT</sup> Klon 52 wurde von Prof. Dr. A. Moretti (1. Department Medizin, Kardiologie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Deutschland) zur Verfügung gestellt und trägt die humane TBX5<sup>WT</sup> Sequenz (Klon IRATp970D0542D, Source Bioscience), wie auch eine Flag-Sequenz am 5'-Ende des *TBX5*.

Der verwendete Expressionsvektor pAW48 basiert auf dem Backbone Vektor pcDNA3.1<sup>(+)</sup> (Invitrogen<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific) und ist wie in Tabelle 33 gezeigt spezifiziert.

**Tabelle 33: Spezifität des pcDNA3.1<sup>(+)</sup>**

pcDNA3.1 <sup>(+)</sup>	
Promotor	CMV
Funktion	konstitutive Expression
Protein Tag/Fusion	kein Tag
Einbringen des Vektors	Transfektion
Klonierung	Restriktionsenzyme
Selektionsresistenz (Eukaryonten)	Geneticin®, (G-418)
Weitere Resistenzen	Ampicillin

Abkürzungen: CMV: Zytomegalovirus (engl. *cytomegalovirus*, CMV) Enhancer-Promoter

Die gezielte Mutagenese der Wildtyp-Sequenz *TBX5* im Vektor pAW48-hu*TBX5*<sup>WT</sup> Klon 52 wurde nach Anleitung des Herstellers (QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies, Inc.) durchgeführt. Das verwendete mutierte Oligonukleotid 5'GGCTGGAAGG CGGATGTTTA CCAGTTACAA AGTGAAGGTG 3' wurde mit der Software *QuikChange® Primer Design Program* (Stratagene, La Jolla, CA, <http://www.stratagene.com/gcprimerdesign>) nach Vorgabe des Herstellers entwickelt und bei der Firma Ella Biotech GmbH (Martinsried, Deutschland) synthetisiert.

Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 34 zusammengefasst. Die verwendete Matrize pAW48-hu*TBX5*<sup>WT</sup> Klon 52 hat eine Größe von ca. 7000 bp, sodass für die Durchführung der Mutagenese die Bedingungen für Matrizen >5 kb gewählt wurden.

**Tabelle 34: Reaktionsansatz der Mutagenese**

Mastermix	Ansatz [µl] Matrize > 5kb	Finale Konzentration (Angabe des Herstellers)
10x QuikChange Multi reaction buffer PCR	2,5	1x
Matrize (pAW48-hu <i>TBX5</i> Klon 52)	1	100 ng
Oligonucleotide (25 ng/µl)	4	100 ng
dNTPs*	1	1
QuikChange Enzyme ( <i>Pfu Turbo</i> DNA Polymerase) 2,5 U/µl	1	2,5 U
QuikSolution	0,5	0-0,75 µl
<i>aq. bidest.</i>	15	auf 25 µl finales Volumen

\*Zusammensetzung vorgegeben durch den Hersteller.

Die Bedingungen der Reaktion sind in Tabelle 35 zusammengefasst. Die Mutagenese wurde auf einem C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH) durchgeführt.

**Tabelle 35: Bedingungen der Mutagenesereaktion**

	Zyklen	Zeit	Temperatur
Initiale Aktivierung	1	1 min	95°C
Amplifikation	30	Denaturierung	1 min 95°C
		Annealing	1 min 55°C
		Finale Elongation	14 min 65°C
Kühlung		∞	< 37°C

Das Amplifikationsprodukt wurde zum Abbau der parentalen Matrize mit 1 µl des Restriktionsenzym *DpnI* (10 U/µl) für 3,5 h bei 37°C (Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert. Kompetente *E. coli* Bakterien (*XL1-Blue supercompetent Cells*, Agilent

Technologies, Inc.) wurden nach Angabe des Herstellers mit dem mutierten Amplifikationsprodukt transformiert. Nach Ampicillinselektion (100 µg/ml) wurden 10 Bakterienklone gepickt. Von allen Klonen wurden Mini- und Midipräparationen angefertigt (siehe Punkt 2.4.3.2). Alle Mini- und Midipräparationen wurden zur Überprüfung der korrekten Mutagenese sequenziert (siehe Punkt 2.4.8). Die verwendeten Oligonukleotide U6/TBX5\_R1208 sind in Tabelle 8 gezeigt. Für alle Midipräparationen, deren Sequenzen die eingebrachte Mutation korrekt zeigten wurden Glycerolstocks angefertigt (siehe Punkt 2.4.2.3).

### 2.6.3 Vergleich der Genexpression in HEK 293 Zellen transfiziert mit humanem TBX5<sup>mut</sup> und TBX5<sup>WT</sup>

HEK 293 Zellen wurden entweder mit dem Vektor pAW48-TBX5<sup>WT</sup> oder pAW48-TBX5<sup>mut</sup> transfiziert. HEK 293 Zellen, die mit dem leeren pAW48 Vektor transfiziert wurden, dienten als Kontrolle. Die Transfektion wurde mit dem FuGENE<sup>®</sup> HD Transfektionsreagenz (Promega Corporation) durchgeführt. Das FuGENE<sup>®</sup> HD Transfektionsreagenz ist ein nicht-liposomales Reagenz, welches diverse Zelllinien mit hoher Effizienz bei gleichzeitig niedriger Toxizität transfiziert (Angabe des Herstellers). Die Benutzung dieses Reagenzes birgt den Vorteil, dass auf Waschschriffe und Mediumwechsel nach Einbringung des Reagenz/DNA-Komplexes verzichtet werden kann (Angabe des Herstellers).

Die durchgeführten Transfektionsansätze sind in Tabelle 36 gezeigten.

**Tabelle 36: Ansätze der Transfektion zur Evaluierung der Genexpression in HEK 293 Zellen**

Ansatz	Plasmid	Konzentration [µg/ml]
1	pAW48 leer	2
2	pAW48-huTBX5 <sup>wt</sup>	2
3	pAW48 -huTBX5 <sup>mut</sup>	2

Einen Tag vor Transfektion (D-1) wurden HEK 293 Zellen in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/well in HEK 293 Medium ohne Antibiotikum auf Multiwellplatten (6-well Format) ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden alle Komponenten auf RT gebracht. Die Plasmide wurden mit serumfreiem HEK 293 Medium auf eine DNA-Menge von 2 µg eingestellt. Vier µl des Transfektionsreagenzes wurde ohne Berührung der Ansatzgefäße (*E. cups*) zugegeben, sodass das Verhältnis DNA:FuGene 2:4 (2 µg DNA: 4 µl FuGene) betrug. Die Ansätze wurden für 1-2 s auf einem Vortex Genie 2 (Scientific Industries Inc.) gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Der Transfektionskomplex wurde tropfenweise zu den HEK 293 Zellen gegeben. Ein leichtes Schwenken der Platte sicherte die optimale Verteilung. Zwei Tage nach Transfektion wurde die Selektion der transfizierten HEK 293 Zellen (pAW48-TBX5<sup>WT</sup>, pAW48-TBX5<sup>mut</sup> und pAW48 leer) durch Zugabe von G418 (Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA) in einer finalen Konzentration von 1 mg/ml begonnen. Untransfizierte HEK 293 Zellen wurden bei der G418 Selektion mitgeführt, um die Wirkung der G418 Selektion zu dokumentieren. Nach vollständigem Absterben der G418 behandelten, nicht transfizierten HEK 293 Zellen, wurde die RNA der transfizierten HEK 293 Zellen (pAW48 leer, pAW48-TBX5<sup>WT</sup> und pAW48-TBX5<sup>mut</sup>) wie unter Punkt 2.4.4.3 beschrieben isoliert und die

Konzentration spektrophotometrisch gemessen (siehe Punkt 2.4.4.4). Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben (siehe Punkt 2.4.5). Die Genexpression von *TBX5* (NM\_000192.3), *natriuretic peptide A (NPPA)* (NM\_006172.3), *Connexin 40 (CX40)* (NM\_005266.6), *Iroquois Homeobox 4 (IRX4)* (NM\_016358.2), *hes related family bHLH transcription factor with YRPW motif 2 (HEY2)* (NM\_012259.2), *Inhibitor of DNA binding 2 (ID2)* (NM\_002166.4), *Troponin I3 - kardialer Typ (TNNI3)* (NM\_000363.4), wie auch *Actin Beta (ACTB)* (NM\_001101.3) als Referenzgen wurde auf einem LightCycler® 1.5 Real Time PCR Thermal Cycler (Roche Molecular Systems, Inc.) mit dem QuantiTect SYBR Green Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers, wie bereits beschrieben (siehe Punkt 2.4.7) gemessen. Für alle Amplifikationsprodukte wurde eine Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung des Produktes (siehe Punkt 2.4.7) und eine gelelektrophoretische Auftrennung zur Größenbestimmung und Quantifizierung des Amplifikationsproduktes (siehe Punkt 2.4.4.5) durchgeführt. Die relative Genexpression der *TBX5*<sup>WT</sup>-transfizierten und *TBX5*<sup>mut</sup>-transfizierten HEK 293 Zellen wurde als n-fache Genexpression gegen die Genexpression in untransfizierten HEK 293 Zellen nach Normalisierung mit *ACTB* ausgewertet. Die Genexpression wurde als Mittelwert von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten in Duplikaten analysiert. Die Abweichung des Mittelwertes ist als Standardfehler angegeben. Die Signifikanz der Genexpressionsunterschiede wurde mit dem T-Test für unverbundene Stickproben (engl. *unpaired Student's t-test*) geprüft. P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

#### 2.6.4 Funktionalität der *TBX5* Mutation c.920 C→A im Luziferase-Reporter Assay

Um die Funktionalität von *TBX5*<sup>mut</sup> Protein zu untersuchen wurde ein Luziferase Reporter Assay durchgeführt. Für die Transfektionen der HEK 293 Zellen wurden die in Tabelle 37 aufgeführten Plasmide verwendet. Die Konzentrationen der Plasmide wurden spektrophotometrisch wie unter Punkt 2.4.4.4 beschrieben bestimmt.

**Tabelle 37: Verwendete Plasmide zur Transfektion von HEK 293 Zellen**

Plasmid	Funktion des Plasmids	Eingesetzte DNA-Menge/Ansatz
pALI Lva/ANF-Luciferase	Reporterplasmid	150 ng
pKSII	Kontrollplasmid	250 ng
β-Gal RSV	Kontrollplasmid	50 ng
pAW48 leer	Effektorplasmid	150 ng
pAW48-hu <i>TBX5</i> <sup>wt</sup>	Effektorplasmid	150 ng
pAW48-hu <i>TBX5</i> <sup>mut</sup>	Effektorplasmid	150 ng

Das Reporterplasmid pALI-Lva/ANF-Luciferase wurde von Dr. Q. Wang (Cleveland, OH) zur Verfügung gestellt und trägt den *NPPA* Promotor, welcher die Expression der Luziferase steuert. *NPPA* ist ein bekanntes Zielgen von *TBX5*. Biologisch aktives *TBX5* bindet an den *NPPA* Promotor, sodass die Luziferaseexpression angeschaltet wird. Das Kontrollplasmid pKSII diente zur Normalisierung der DNA-Menge. Das Kontrollplasmid β-Gal RSV wurde zur Bestimmung der Transfektionseffizienz mitgeführt.

HEK 293 Zellen wurden in Zellkultur Multiwellplatten (24-well Format) in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/well am Tag vor Transfektion in HEK 293 Medium ohne Antibiotikum ausgesät. Die Ansätze der Transfektion sind in Tabelle 38 gezeigt.

**Tabelle 38: Transfektionsansätze**

#	Reporterplasmid	Effektorplasmid	Kontrollplasmid β-Gal RSV	Kontrollplasmid pKSII	Fugene
1	-	-	-	-	-
2	pALILva/ANF-Luciferase	pAW48 leer	β-Gal RSV	pKSII	+
3	pALILva/ANF-Luciferase	pAW48-huTBX5 <sup>wt</sup>	β-Gal RSV	pKSII	+
4	pALILva/ANF-Luciferase	pAW48-huTBX5 <sup>mut</sup>	β-Gal RSV	pKSII	+

Jeder Ansatz erhielt insgesamt 600 ng DNA. Das Verhältnis DNA:FuGene betrug 2:4 (0,6 µg DNA : 1,2 µl FuGene). Die Transfektion wurde wie unter Punkt 2.6.3 beschrieben durchgeführt.

Nach Transfektion, wurden die HEK 293 Zellen für 48 h inkubiert (HERACell 240i CO<sub>2</sub>). Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen vorsichtig mit sterilem 1x D-PBS gewaschen. Es wurden 100 µl 1x Reporter Lysis Buffer (Promega) zu jedem Ansatz gegeben und dieser für 10 min bei RT inkubiert.

Der Reporter Lysis Puffer ist ein mildes lysierendes Agents, welches einen Frost-Tau-Zyklus zur vollständigen Lyse von Zellen benötigt. Aus diesem Grund wurden die Zellkultur Multiwellplatten (24-well Format) bis zur Bestimmung der Luziferaseaktivität, mindestens aber für 30 min bei -80°C (HERA Freezer Basic, Thermo Fisher Scientific) gelagert. Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität wurden die Multiwellplatten für 30 min auf einem Heidolph Polymax 1040 – Plattformschüttler 10 (ProfiLab24 GmbH) bei RT inkubiert. Die Zelllysate wurden in *E. cups* transferiert und 10 µl des Überstandes nach Zentrifugation der Lysate (2 min, 20.000 x *g*, RT) in ein Lumi-vial (Berthold Technologies) überführt. Nach Zugabe von 100 µl Luziferase Substrat wurde die Lumineszenz nach einer Verzögerung von 2 s für 10 s in Luminometer Infinite® 200 PRO (Tecan Trading AG) gemessen.

Die Luziferaseaktivität wurde als Mittelwert von vier unabhängig durchgeführten Experimenten in Triplikaten berechnet. Die Abweichung des Mittelwertes ist als Standardabweichung angegeben. Die Signifikanz der Unterschiede im Luziferase Reporter Assay wurden mit dem T-Test für unverbundene Stichproben (engl. *unpaired Student's t-test*) bestimmt. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet.

Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen wurden 10 µl des Überstandes jedes Ansatzes in eine MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific) überführt. Nach Zugabe von 200 µl Reaktionslösung für den β-Galaktosidasetest, wurden die Ansätze für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch den Transfer der Platte auf Eis gestoppt. Die β-Galaktosidase Aktivität wurde als Extinktion bei einer Wellenlänge von 570 nm in einem Infinite® 200 PRO (Tecan Trading AG) gemessen. Als Negativkontrolle wurden 200 µl Reaktionslösung mit 10 µl 1x Reporter Lysis Puffer mitgeführt.

## 2.7 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Sicherheitswerkbank Safe 2020 (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden in HERACell 240i CO<sub>2</sub> Inkubatoren (Thermo Fisher Scientific) bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Isolation und Kryokonservierung der Zellen ist in Punkt 2.4.2 beschrieben. Die Lebendzellzahl wurde wie unter Punkt 2.4.1. beschrieben bestimmt.

### 2.7.1 Kultivierung von humanen Fibroblasten

Humane Fibroblasten wurden mit MEF Medium in T25 Zellkulturflaschen (Kisker Biotech GmbH & Co. KG) kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80% wurde die Fibroblastenkultur mit Trypsin EDTA Lösung (0,05%) in einem Verhältnis von 1:6 subkultiviert. Für die Subkultivierung wurde das MEF Medium abgesaugt und die Fibroblasten vollständig mit Trypsin EDTA Lösung überschichtet. Nach Inkubation für 5 min (37°C) wurde kräftig gegen die Flasche geklopft und das Ablösen der Zellen visuell unter dem Mikroskop überprüft. Wenn sich die Fibroblasten abgelöst hatten, wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe der 5-fachen Menge der Trypsin EDTA Lösung an MEF Medium gestoppt. Bei unvollständiger Ablösung der Fibroblasten, wurde die Inkubation mit Trypsin EDTA Lösung um jeweils 2 min verlängert.

Die Fibroblasten wurden mit MEF Medium abgespült und in ein 15 ml Falcongefäß überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 300 x g (RT) wurde das Zellpellet in MEF Medium resuspendiert und die Zellen subkultiviert. Ein vorsichtiges Schwenken der Zellkulturgefäße sicherte eine optimale Verteilung der Fibroblasten.

### 2.7.2 Kultivierung von peripheren mononukleären Blutzellen

Für die Reprogrammierung wurden PBMC nach dem Auftauen bis zum Tag D3 nach Transduktion in PBMC Medium kultiviert. Am Tag D3 wurden die transduzierten PBMC auf einem inaktivierten MEF *feeder layer* (siehe Punkt 2.4.2.1) in StemPro<sup>®</sup>34 SFM Medium (Gibco<sup>®</sup> by Life Technologies<sup>™</sup>, Thermo Fisher Scientific) kultiviert.

### 2.7.3 Kultivierung von induzierten pluripotenten Stammzellen

Humane iPS Zellen wurden standardisiert in TeSR<sup>™</sup>-E8<sup>™</sup> Medium (StemCell<sup>™</sup> Technologies) in Matrigel-beschichteten Zellkultur Multiwellplatten (6-well Format) kultiviert. Zur Beschichtung der Zellkultur Multiwellplatten wurde Corning<sup>®</sup> Matrigel<sup>®</sup> hESC-Qualified Matrix (Corning) verwendet.

Corning<sup>®</sup> Matrigel<sup>®</sup> hESC-Qualified Matrix ist ein basales, lösliches Extrakt aus der Membran des *Engelbreth-Holm-Swarm* (EHS) Tumors der Maus, welches bei RT geliert und eine „echte“ konstituierte basale Membran ausbildet. Die enthaltenen Hauptkomponenten sind Laminin, Kollagen IV, Entaaktin und Heparansulfat Proteoglycan (Bissell *et al.*, 1987; Kleinman *et al.*, 1982). Zusätzlich sind Wachstumsfaktoren, Kollagenase, Plasminogen Aktivatoren und andere nicht genau definierte Komponenten für die Corning<sup>®</sup> Matrigel<sup>®</sup> hESC-qualified Matrix beschrieben (Vukicevic *et al.*, 1992; McGuire & Seeds, 1989).

Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix wurde nach Angaben des Herstellers aufgetaut, und in Abhängigkeit von der, im Analysezertifikat angegebene Proteinmenge aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zur Beschichtung der Multiwell Zellkulturplatten (6-well Format) wurde ein Aliquot des Matrigels auf Eis aufgetaut. Das aufgetaute Aliquot wurde mit der entsprechenden Menge an kaltem DMEM/Ham's F-12 Medium (Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA) verdünnt. Ein vorsichtiges Auf- und Abpipettieren sicherte eine gute Durchmischung. Die Multiwell Zellkulturplatten (6-well Format) wurden vollständig und zügig beschichtet. Die Verdünnung der Matrigelaliquots und das zur Beschichtung verwendete Volumen an Matrigel wurden für eine definierte Menge an Protein pro Fläche ( $8,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) für die sich ausbildende Matrix berechnet. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Proteinmenge pro Fläche entspricht der, in den Publikationen von Lian und Kollegen (Lian *et al.*, 2012) und Burrige und Kollegen (Burrige *et al.*, 2014) verwendeten Proteinmenge/cm<sup>2</sup> Kulturfläche. Für die Polymerisierung der Matrix existieren zwei Protokolle im Manual von StemCell™ Technologies (*Technical Manual Maintenance of Human Pluripotent Stem Cells in mTeSR™1* <https://cdn.stemcell.com/media/files/manual/MA29106-Maintenance Human Pluripotent Stem Cells mTeSR1.pdf>). Die Polymerisation der Matrigel-beschichteten Platten kann für mindestens 2 h bei RT (15-25°C) oder für mindestens 30 min bei 37°C (HERAcell 240i CO<sub>2</sub> Inkubator, Thermo Scientific) durchgeführt werden. Nach der vorgegebenen Inkubationszeit wurde überschüssiges Medium vorsichtig, ohne die Oberfläche zu beschädigen, abgesaugt. Das Matrigel wurde zügig mit TeSR™-E8™ überschichtet.

Humane iPS Zellen benötigen einen täglichen Mediumwechsel, der wie folgt durchgeführt wurde. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit DMEM/Ham's F12 (Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA) gewaschen und neues TeSR™-E8™ Medium in die Zellkultur Multiwellplatte pipettiert. Für die Kultivierung in Matrigel-beschichteten Zellkultur Multiwellplatten (6-well Format) wurde ein Volumen von 2 ml TeSR™-E8™ Medium pro Well verwendet. Die Subkultivierung von iPS Zellen wurde mit ReLeSR™ (StemCell™ Technologies) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. ReLeSR™ ist ein enzym-freies Reagenz, welches selektiv zur Ablösung von undifferenzierten iPS Kolonien führt und Aggregate optimaler Größe generiert. Zur Umsetzung der iPS Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1x D-PBS gewaschen. Nach Absaugen der Waschlösung wurde ReLeSR™ (StemCell™ Technologies) zugegeben. Es wurde darauf geachtet, dass die iPS Zellen nur mit einem dünnen Film des ReLeSR™ bedeckt waren. Die Kolonien wurden für 1 min bei RT (15-25°C) inkubiert. Das ReLeSR™ wurde abgesaugt und die iPS Kultur für 3-5 min bei 37°C (HERAcell 240i CO<sub>2</sub> Inkubator, Thermo Scientific) inkubiert. Nach Inkubation wurde TeSR™-E8™ zugegeben und die Zellen wurden durch vorsichtiges Antippen der Zellkultur Multiwellplatte für 30-60 sec abgelöst. Abgelöste iPS Zellen wurden mit einer 5 ml serologischen Pipette in ein 15 ml Falcongefäß transferiert und bei 300 x g für 5 min (RT) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in TeSR™-E8™ resuspendiert und die iPS Zellen in einem Verhältnis von 1:12 subkultiviert. Ein Passagierungsverhältnis von 1:12 zeigte sich



für die in dieser Arbeit verwendeten iPS Zellen optimal um nach 5-7 Tagen erneut eine 80%ige Konfluenz zu erreichen.

Für alle iPS Zellen wurden Bestandskulturen (engl. *stocks*) in niedriger Passage (p10-20) in einem Flüssigstickstofftank (Liquid Nitrogen System, Messer Griesheim) langzeitgelagert. Zur Kryokonservierung der iPS wurde mFreSR™ (StemCell™ Technologies) nach Herstellerangabe verwendet.

## **2.8 Humanes induziertes pluripotentes Stammzellmodell zur Untersuchung des Holt-Oram Syndroms**

In der vorliegenden Arbeit wurde ein HOS spezifisches humanes iPS Modell zur Untersuchung der kardialen Entwicklung des HOS etabliert. Die Verwendung von iPS Zellen ermöglicht die *in vitro* Untersuchung von regulatorischen Prozessen in der frühen Embryonalentwicklung. Die iPS Technologie ist zum augenblicklichen Stand der Forschung, das „optimalste“ *in vitro* Disease-Modell zur Untersuchung regulatorischer Prozesse im „gesunden“ wie auch im „betroffenen“ Organismus.

### **2.8.1 Reprogrammierung**

Zur Reprogrammierung der PBMC und AF wurde der CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der Kit basiert auf einem nicht-integrativen System (Fusaki *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2000; Seki *et al.*, 2010), welches Sendai Virus Vektoren verwendet, um iPS Zellen zu generieren.

Der Sendai Virus, welcher auch unter dem Namen *Hemagglutinating Virus of Japan* (HVJ) bekannt ist, ist ein Atemwegsvirus, der in Ratten und Mäusen vorkommt und erstmals in Sendai (Japan) in den frühen 1950er Jahren isoliert wurde (Kuroya *et al.*, 1953). Es handelt sich um einen Maus Parainfluenza Virus Typ I, welcher der Familie der *Paramyxoviridae* zugeordnet wird. Die Infektion des Virus erfolgt über den Sialylsäurerezeptor, der auf einer großen Anzahl von Zellen exprimiert wird. Somit ist der Virus geeignet, eine große Anzahl verschiedener Zelltypen (humane Fibroblasten, CD34<sup>+</sup> Nabelschnurblutzellen, PBMC) in verschiedenen Spezies zu transduzieren (Mensch, Maus, Ratte). Nennenswerter Vorteil der Reprogrammierung mit dem Sendai Virus ist seine Fähigkeit zur Reprogrammierung ohne in das Genom der Zielzelle zu integrieren. Die vier zur Reprogrammierung verwendeten viralen Transgene *Octamer-Binding Protein 4* (*OCT4*), *SRY* (*Sex Determining Region Y*)-*Box 2* (*SOX2*), *MYC proto-oncogene*, *bHLH transcription factor (c-MYC)* und *Kruppel like factor 4* (*KLF4*) werden in der somatischen Zielzelle exogen durch den Virus exprimiert. Nach Transduktion wird die Zielzelle zur konstitutiven endogenen Expression dieser vier Faktoren induziert. Neben der endogenen Expression dieser Faktoren werden weitere Gene, die den pluripotenten Status der Zellen aufrechterhalten, angeschaltet. Nach erfolgreicher Reprogrammierung der Zielzelle ist diese, auch nach Ausschleusung des Virus in der Lage ihren pluripotenten Status durch endogene Expression der entsprechenden Gene selbst aufrecht zu erhalten. Die Ausschleusung des Sendai Virus aus der Zielzelle ist nach Angabe

des Kits nach ca. fünf Passagen zu erwarten, wobei die Ausschleussung Zelltyp- und Klonabhängig variieren kann.

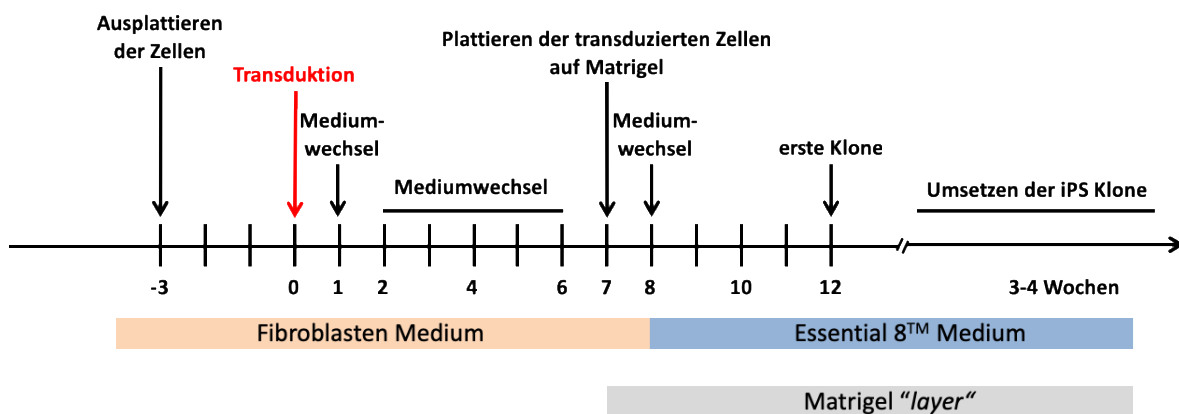
Die drei verwendeten CytoTune® 2.0 Reprogrammierungsvektoren sind der polycistronische Vektor CytoTune® 2.0 KOS, der die Transgene *hKlf4*, *hOct3/4* und *hSox2* trägt und die beiden monocistronischen Vektoren CytoTune® 2.0 *hc-Myc* und CytoTune® 2.0 *hKlf4*. Da die polycistronische Konfiguration des KOS Vektors eine zusätzliche Polymeraseaktivität benötigt, wird der monocistronische Vektor *hKlf4*, der diese Polymerase trägt verwendet. Zusätzlich steigert eine hohe Expression von *hKlf4*, welches auf zwei Vektoren liegt, die Reprogrammierungseffizienz (Angabe des Herstellers). Die Vektoren, ihre Spezifikation und die zu verwendende Multiplizität der Infektion (MOI) sind in Tabelle 39 angegeben.

**Tabelle 39: Reprogrammingsvektoren des CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kits**

Komponente	Faktor	GenBank Identifikation (ID)	Multiplizität der Infektion (MOI)
CytoTune® 2.0 KOS	humanes Klf4	BC029923.1	5
	humanes Oct3/4	NM_002701.4	
	humanes Sox2	NM_003106.2	
CytoTune® 2.0 hc-Myc	humanes c-Myc	K02276.1	5
CytoTune® 2.0 hKlf4	humanes Klf4	BC029923.1	3

### 2.8.1.1 Reprogrammierung humaner Fibroblasten

Die AF des Indexpatienten 1460 wurden mit dem CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit nach dem in Abbildung 1 gezeigten Workflow reprogrammiert.



**Abbildung 1: Workflow der Reprogrammierung von Fibroblasten.**

Ein Kryogefäß der eingefrorenen AF des HOS Indexpatienten 1460 in Passage p1 wurde zehn Tage vor Reprogramming nach der Anleitung des Reprogrammierungs-Kits (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) aufgetaut. Die AF wurden in eine T25 Zellkulturflasche (Kisker Biotech GmbH & Co. KG) gegeben und bis zur Konfluenz in MEF Medium kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle zwei Tage durchgeführt. Drei Tage vor anstehender Transduktion (D-3) wurde die Zellzahl bestimmt und die AF nach Angabe des CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kits in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  in Triplikaten (6-well Format, Zellkultur Multiwellplatte) in MEF Medium ohne Antibiotika ausgesät. Die

unterschiedlichen Ausgangszellzahlen wurden plattiert um am Tag der Transduktion (D0) die vorgegebene Zellzahl ( $2-3 \times 10^5$  Zellen) zu erreichen. Am Tag der Transduktion wurde die Zellzahl, der in verschiedenen Konzentrationen ausplattierten Fibroblasten bestimmt. Für die Transduktion wurden zwei Wells mit der, an Tag D0 ausplattierten Fibroblasten in einer Zellzahl von  $5 \times 10^4$ , verwendet. Die Zellzahl pro Well betrug  $5,75 \times 10^5$  Zellen. Die Transduktion mit den Vektoren des Sendai-Virus wurde unter Berücksichtigung des spezifisch angegebenen Titer jedes Vektors für die Lotnummer des verwendeten CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit in Abhängigkeit der Zellzahl nach folgenden Berechnung durchgeführt.

$$\text{Volumen des Virus } (\mu\text{l}) = \frac{\text{MOI (CIU/Zelle)} \times \text{Zellzahl}}{\text{Virustiter (CIU/ml)} \times 10^{-3} (\mu\text{l/ml})}$$

Die im Analysezertifikat angegebenen Titer sind in Tabelle 40 angegeben. Die Transduktion der Fibroblasten wurde im Verhältnis hKOS MOI = 5, hc-Myc MOI = 5 und hKlf4 MOI = 3 durchgeführt.

**Tabelle 40: Titer der Vektoren nach Angabe des Analysezertifikats für die Reprogrammierung der Fibroblasten des Indexpatienten 1460**

Vektor	Titer
CytoTune 2.0 hKOS	$1,5 \times 10^8$ CIU/ml
CytoTune 2.0 hc-Myc	$1,5 \times 10^8$ CIU/ml
CytoTune 2.0 hKlf4	$1,5 \times 10^8$ CIU/ml

Abkürzung: CIU: engl. *Cell Infectious Units*.

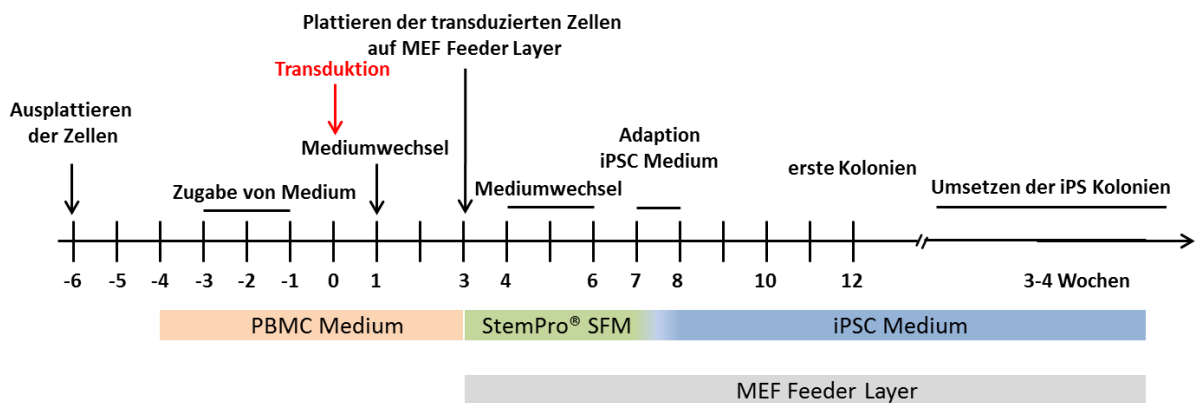
Einen Tag nach Transduktion wurde ein Mediumwechsel (MEF Medium) durchgeführt. Weitere Mediumwechsel erfolgten an den Tagen D2, D4 und D6. Am Tag D7 wurden die transduzierten Fibroblasten auf Matrigel-beschichtete Zellkultur Multiwellplatten (6-well Format) überführt. Hierzu wurden die Zellen mit 0,05% Trypsin/EDTA Lösung abgelöst, in MEF Medium aufgenommen und zentrifugiert ( $200 \times g$ , 4 min, RT). Das Pellet wurde in MEF Medium aufgenommen und eine Zellzahlbestimmung (siehe Punkt 2.4.1.) durchgeführt. Es wurden  $4 \times 10^4$  und  $2 \times 10^5$  Zellen auf je eine 6 cm Matrigel-beschichtete Zellkulturschale (Greiner Bio-One International GmbH) gegeben. Die restlichen Fibroblasten wurden kryokonserviert (siehe Punkt 2.4.2.3). Zu diesem Zeitpunkt der Reprogrammierung wurde eine RNA Lyse der transduzierten Fibroblasten durchgeführt. Nach RNA Isolation (siehe Punkt 2.4.4.3) und cDNA Produktion (siehe Punkt 2.4.5) wurde die Probe als Positivkontrolle zur Detektion des Sendai Virus in der qRT-PCR verwendet. Am Tag D8 nach Transduktion wurde das Medium auf TeSR™-E8™ Medium (StemCell™ Technologies) umgestellt. Die einzelnen iPS Klone des Indexpatienten 1460 wurden zwischen Tag D16 und D22 in Abhängigkeit von ihrer Größe manuell gepickt und auf Matrigel-beschichtete Zellkultur Multiwellplatten (24-well Format) umgesetzt. Es wurde darauf geachtet, dass keine Klone transferiert wurden, die Kontakt zu einem anderen Klon hatten. Somit wurde sichergestellt, dass keine Mischklone expandiert wurden. Drei der generierten iPS Klone, welche morphologisch flach, ohne differenzierende Bereiche in Kultur wuchsen, wurden expandiert, subkultiviert und charakterisiert. Alle weiteren Klone, wie auch die Mutterplatte der

Transduktion wurden zur Langzeitlagerung in einem Flüssigstickstofftank (Messer Griesheim) transferiert. Die Kryokonservierung der generierten iPS Klone erfolgte mit mFreSR™ (StemCell™ Technologies) nach Angabe des Herstellers.

Alle Schritte der Reprogrammierung wurden, mit Ausnahme der, für die Reprogrammierung erhöhten Ausgangszellzahl der Fibroblasten, des verwendeten MEF Mediums und des MEF-Kryokonservierungsmediums exakt nach Angaben des CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

### 2.8.1.2 Reprogrammierung peripherer mononukleärer Blutzellen

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die PBMC der Indexpatientin 804-K und ihrer gesunden Eltern (804-MU und 804-VA) reprogrammiert. Der Workflow der Reprogrammierung ist in Abbildung 2 gezeigt.



**Abbildung 2: Workflow der Reprogrammierung von PBMC.**

Zur Gewinnung der PBMC wurde Vollblut in ein BD Vacutainer® CPT™ Mononuclear Cell Preparation Tube - Sodium Heparin (BD Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences) durch einen Arzt abgenommen. Die Isolation und Kryokonservierung der PBMC ist unter Punkt 2.4.2.2 beschrieben. Ein Kryoröhrchen der eingefrorenen PBMC der HOS Indexfamilie 804 wurde zur anstehenden Reprogrammierung nach Anleitung des Reprogrammierungskits (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) aufgetaut. Die Lebendzellzahl wurde bestimmt (siehe Punkt 2.4.1) und  $5 \times 10^5$  Zellen wurden in einem Well einer Zellkultur Multiwellplatte (24-well Format) durch Zugabe der Zytokine SCF (finale Konzentration: 100 ng/μl), FLT-3 (finale Konzentration: 100 ng/μl), IL-3 (finale Konzentration: 20 ng/μl) und IL-6 (finale Konzentration: 20 ng/μl) in 1 ml StemPro-34 Medium (PBMC Medium) nach Anleitung des CytoTune® -iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kits kultiviert. Durch die Zugabe der Zytokine kommt es zur Zellaktivierung und Erhöhung der Affinität für die anstehende Transduktion. Die Zellen der Indexfamilie 804 erhielten täglich einen Mediumwechsel mit PBMC Medium und wurden zur Beurteilung der voranschreitenden Aktivierung mikroskopisch verfolgt.

Laut Protokoll des Reprogrammierungskits werden die PBMC für vier Tage aktiviert, bevor die Transduktion durchgeführt wird. Da die PBMC der Probandin 804-MU visuell eine verzögerte Aktivierung zeigten, wurde die Kultivierung der PBMC der Indexfamilie 804 für insgesamt

sechs Tage, statt der im Protokoll angegebenen vier Tage, bis zur Transduktion durchgeführt. Die Transduktion (D0) mit den Vektoren des Sendai-Virus erfolgte unter Berücksichtigung des spezifisch angegebenen Titers jedes Vektors für die Lotnummer des verwendeten CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit.

$$\text{Volumen des Virus } (\mu\text{l}) = \frac{\text{MOI (CIU/Zelle)} \times \text{Zellzahl}}{\text{Virustiter (CIU/ml)} \times 10^{-3} (\mu\text{l/ml})}$$

Die im Analysezertifikat angegebenen Titer sind in Tabelle 41 dokumentiert. Die Transduktion der PBMC wurde im Verhältnis hKOS MOI = 5, hc-Myc MOI = 5 und hKlf4 MOI = 3 durchgeführt.

**Tabelle 41: Titer der Vektoren nach Angabe des Analysezertifikats für die Reprogrammierung der PBMC der Indexfamilie 804**

Vektor	Titer
CytoTune 2.0 hKOS	1,4x10 <sup>8</sup> CIU/ml
CytoTune 2.0 hc-myc	1,0x10 <sup>8</sup> CIU/ml
CytoTune 2.0 hKlf4	1.5x10 <sup>8</sup> CIU/ml

Abkürzung: CIU: engl. *Cell Infectious Units*.

Nach Transduktion wurden die Zellen in 2 ml PBMC Medium aufgenommen und auf ein Well einer Zellkultur Multiwellplatte (12-well Format) transferiert. Einen Tag nach Transduktion wurde ein Mediumwechsel nach Anleitung des Kits durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit Medium in ein 15 ml Falcongefäß überführt und zentrifugiert (200 x g, 10 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 0,5 ml PBMC Medium aufgenommen und auf ein Well einer Zellkultur Multiwellplatte (24-well Format) überführt. Die Zellen wurden für zwei Tage ohne Mediumwechsel inkubiert. Am Tag D3 nach Transduktion wurden die Zellen in StemPro®34 SFM Medium (Gibco® by Life Technologies™, Thermo Fisher Scientific) auf Zellkultur Multiwellplatten (6-well Format), welche mit inaktivierten MEFs beschichtet waren (siehe Punkt 2.4.2.1), plattiert. Es wurden 1x10<sup>4</sup> bzw. 5x10<sup>4</sup> transduzierte Zellen für die Probanden 804-MU und 804-VA auf je 1 Well einer Zellkultur Multiwellplatte (6-well Format) gesetzt. Für die Indexpatientin 804-K wurden 1x10<sup>4</sup>, 8x10<sup>4</sup> und 5x10<sup>5</sup> Zellen auf je 1 Well einer Zellkultur Multiwellplatte (6-well Format) gesetzt. An Tag D4 und D6 wurde ein Mediumwechsel mit StemPro®34 SFM Medium nach Anleitung durchgeführt. Am Tag D7 nach Transduktion wurde eine Anpassung der Zellen auf iPSC Medium durchgeführt. Hierzu wurde die Hälfte des StemPro®34 SFM Medium durch iPSC Medium ersetzt. Ab Tag D8 wurde jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel mit iPSC Medium durchgeführt. Alle transduzierten Zellen wurden täglich mikroskopisch auf morphologische Veränderungen geprüft. Zwischen Tag D20 und Tag D24 nach Transduktion bildeten sich in allen drei Reprogrammierungen (804-MU, 804-VA und 804-K) iPS Klone, welche manuell gepickt und auf Matrigel-beschichtete Zellkultur Multiwellplatten (24-well Format) umgesetzt wurden. Es wurde darauf geachtet, dass keine Klone transferiert wurden, die Kontakt zu einem anderen Klon hatten. Somit wurde sichergestellt, dass keine Mischklone expandiert wurden. Drei der generierten iPS Klone pro Indexpatientin/Proband, welche morphologisch flach, ohne differenzierende Bereiche in Kultur wuchsen, wurden expandiert, subkultiviert und

charakterisiert. Alle weiteren Klone, wie auch die Mutterplatte der Transduktion wurden zur Langzeitlagerung in einem Flüssigstickstofftank (Messer Griesheim) transferiert. Die Kryokonservierung der generierten iPS Klone erfolgte mit mFreSR™ (StemCell™ Technologies) nach Angabe des Herstellers. Alle Schritte der Reprogrammierung wurden, mit Ausnahme der verlängerten Aktivierung der PBMC exakt nach Angaben des CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

### **2.8.2 Charakterisierung der generierten induzierten pluripotenten Stammzellen**

Zum Nachweis des pluripotenten Charakters der iPS Zellen wurden morphologische, molekulare und funktionelle Kriterien untersucht. Für jede Reprogrammierung wurde ein Klon, der alle Kriterien einer iPS Zelle erfüllte ausgewählt. Alle weiteren Experimente dieser Arbeit wurden mit diesem Klon durchgeführt.

#### Morphologische Kriterien

Während der initialen Expansion der einzelnen Klone wurde auf die Morphologie der Kolonien geachtet. Nur Klone, die kompakt als multizelluläre flache Kolonien mit definiertem Rand und ohne differenzierende Areale wuchsen, wurden expandiert und charakterisiert.

#### Molekulare Kriterien

Zur molekularen Charakterisierung der generierten iPS Klone wurden Transkriptionsmuster untersucht. Für alle qRT-PCR Ansätze wurde das Referenzgen *Actin Beta* (*ACTB*, NM\_001101.3) als Nachweis einer erfolgreich durchgeführten Amplifikation mitgeführt. Die für *ACTB* verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 9 angegeben. Die Negativkontrollen der Amplifikationen wurden mit *aq. bidest.* angesetzt.

- Nachweis der Ausschleusung des Sendai-Virus

Je drei der gepickten Klone wurden über mehrere Passagen kultiviert. Zwischen Passage p5 und p10 wurden die Klone auf Ausschleusung des Sendai-Virus getestet. Hierzu wurde die RNA isoliert, aufgereinigt und qualitativ überprüft (siehe Punkte 2.4.4.3, 2.4.4.4). cDNA wurde hergestellt (siehe Punkt 2.4.5) und die Amplifikation des SeV Produktes mit den in Tabelle 9 aufgeführten Oligonukleotiden, deren Sequenz im CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit vorgegeben ist, wie unter Punkt 2.4.7 beschrieben durchgeführt. Als Positivkontrolle für den SeV wurden die transduzierten Fibroblasten des HOS Indexpatienten 1460 verwendet. Die Amplifikationsprodukte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Punkt 2.4.4.5) und die Produktgröße mit Hilfe des mitgeführten Markers bestimmt.

- Nachweis der endogenen Transkriptionsfaktoren *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *c-MYC*

Die Sendai-Virus-freien iPS Klone wurden auf die endogene Expression der Reprogrammierungsfaktoren getestet. Hierzu wurde RNA isoliert und aufgereinigt (siehe Punkt 2.4.4.3). Die qualitativ überprüfte RNA wurde nach Konzentrationsbestimmung in cDNA umgeschrieben (siehe Punkte 2.4.4.4, 2.4.5). Die Amplifikation von *Pou class 5 homeobox 1* (*POU5F1* syn. *OCT4*, NM\_002701.5), *SRY-box2* (*SOX2*, NM\_003106.3), *Kruppel like factor 4* (*KLF4*, NM\_001314052.1) und *MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor*

(*c-MYC*, NM\_002467.5) wurden mit den in Tabelle 9 angegebenen Oligonukleotiden wie unter Punkt 2.4.7 beschrieben durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Punkt 2.4.5.5) und die Produktgröße mit Hilfe des mitgeführten Markers bestimmt.

- Nachweis der Pluripotenzmarker *NANOG* und *REX1*

Die Sendai-Virus-freien iPS Klone wurden auf die Expression der endogenen Pluripotenzmarker *Nanog Homeobox (NANOG, NM\_024865.3)* und *RNA exonuclease 1 (REX1, NM\_174900.4)* getestet. Die RNA wurde isoliert und aufgereinigt (siehe Punkt 2.4.4.3). Die qualitativ überprüfte RNA wurde nach Bestimmung der Konzentration (siehe Punkt 2.4.4.4) in cDNA umgeschrieben (siehe Punkt 2.4.5). Die Amplifikation der Pluripotenzmarker wurden mit den in Tabelle 9 angegebenen Oligonukleotiden wie unter Punkt 2.4.7 beschrieben durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Punkt 2.4.4.5) und die Größe des Amplifikationsproduktes mit Hilfe des mitgeführten Markers bestimmt.

- Untersuchung auf karyotypische Anomalien in iPS Zellen

Da bekannt ist (International Stem Cell Initiative, Amps *et al.*, 2011; Taapken *et al.*, 2011), dass es durch die genetische Veränderung von iPS Zellen zu karyotypischen Abnormalitäten kommen kann, wurden die iPS Zellen (HOS Indexpatient 1460, HOS Indexpatientin 804, Probanden 804-MU und 804-VA) mittels qRT-PCR Analyse auf verschiedene karyotypische Abnormalitäten, welche häufig in humanen ES Zellen und iPS Zellen beschrieben sind getestet (Baker *et al.*, 2016). Es wurde der *hPSC Genetic Analysis Kit (StemCell™ Technologies)* nach Anleitung des Herstellers verwendet. Der verwendete Kit enthält neun Oligonukleotid-Proben die karyotypische Anomalien auf den Chromosomen 1q, 4p, 8q, 10p, 12p, 17q, 18q, 20q und Xp detektiert, die gehäuft in humanen ES und iPS Zellen beschrieben sind. Eine interne Kontrolle, die keine karyotypischen Anomalien aufweist wurde als Referenz mitgeführt.

Die iPS Zellen wurden abgelöst, pelletiert (300 x g, 10 min, RT), der Überstand abgenommen und das Zellpellet bis zur DNA Isolation (siehe Punkt 2.4.4.2) bei -20°C eingefroren. Die DNA Konzentration wurde wie unter Punkt 2.4.4.4 beschrieben bestimmt und die Qualität der DNA überprüft (siehe Punkt 2.4.4.5).

Der *hPSC Genetic Analysis Kit* wurde wie folgt vorbereitet. Alle Oligonukleotid-Proben wurden nach Angabe des Herstellers rekonstituiert. Die genomische DNA Kontrolle wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 5 ng/µl eingestellt. Der Mastermix des Kits wurde mit der ROX Referenz nach Vorgabe versetzt. Alle Komponenten wurden aliquotiert und bei -20°C (Angabe des Herstellers) gelagert.

Die zu testenden DNA wurden auf eine Konzentration von 5 ng/µl eingestellt. Für jede Oligonukleotid-Probe (1q, 4p, 8q, 10p, 12p, 17q, 18q, 20q und Xp) wurde ein Mix mit der zu testenden DNA hergestellt. Die genomische DNA Kontrolle wurde äquivalent angesetzt. Alle zu testenden DNA Proben wurden als Oligonukleotid-Proben Mix, wie in Tabelle 42 gezeigt mit dem 2x qPCR Mix angesetzt. Alle Proben, wie auch die Kontrolle wurden in Triplikaten

gemessen. Die Bedingungen der qRT-PCR sind in Tabelle 43 zusammengefasst. Die qRT-PCR wurde auf einem Quant Studio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

**Tabelle 42: Reaktionsansatz zur Überprüfung karyotypischer Anomalien**

Komponente	Volumen/Reaktion	Finale Konzentration
Oligonukleotid-Proben Mix	3 µl	150ng
2x qPCR Mix	7 µl	

hPSC Genetic Analysis Kit (StemCell™ Technologies).

**Tabelle 43: Amplifikationsbedingungen zur Überprüfung karyotypischer Anomalien**

	Zyklen	Zeit	Temperatur
Initiale Aktivierung	1	3 min	95°C
Amplifikation	40		
		Denaturierung	15 s
		Annealing/Elongation	60 s
			95°C
			60°C

hPSC Genetic Analysis Kit (StemCell™ Technologies).

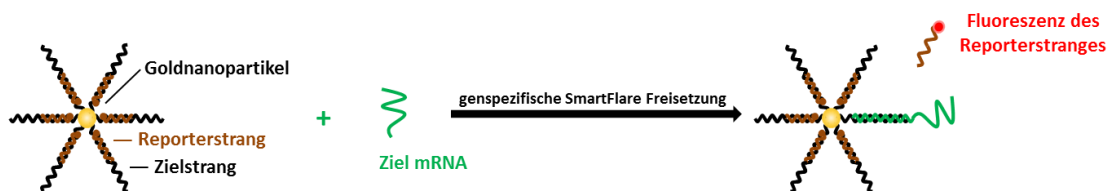
Die Auswertung und Beurteilung von karyotypischen Anomalien wurde unter Verwendung des Programms [www.stemcell.com/geneticanalysisapp](http://www.stemcell.com/geneticanalysisapp) durchgeführt.

- Immunzytochemischer Nachweis der Pluripotenzmarker TRA1-81, SOX2 und NANOG  
Für die generierten iPS Klone der Indexpatienten 804-K, 1460 und der Kontrollen 804-MU und 804-VA wurden immunzytochemische Färbungen der iPS Zellen von TRA1-81, SOX2 und NANOG wie in Punkt 2.4.9.2 beschrieben durchgeführt.

- Detektion der intrazellulären Genexpression von *NANOG* und *GDF3* in lebenden iPS Zellen unter Verwendung von Fluoreszenz-markierten Nanopartikeln

Zur weiteren Überprüfung des pluripotenten Charakters der generierten iPS Zellen wurde eine Technologie verwendet, die es erlaubt durch fluoreszenz-markierte Nanopartikel (engl. *Nanoflares*) die mRNA in lebenden Zellen spezifisch anzufärben. In Abbildung 3 ist die Technologie schematisch dargestellt.

A



B



C



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur und des Funktionsprinzips fluoreszenz-markierter Nanopartikel. (A) Genspezifisches Nanopartikel. (B) Scramble Kontrolle (Negativkontrolle). (C) Uptake Kontrolle (Positivkontrolle).** Adaptiert Lahm *et al.*, 2015a. © 2014 AlphaMed Press.



In Vorarbeiten konnten in der Abteilung der Experimentellen Chirurgie des DHM, zusammen mit der Firma Merck Millipore (Temecula, CA) SmartFlare™ Proben für das Haushaltsgen *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* (NM\_002046, humanes *GAPDH*) und die Pluripotenzmarker *Nanog Homeobox* (NM\_024865, humanes *NANOG*) und *Growth Differentiation Factor 3* (NM\_020634, humanes *GDF3*) entwickelt werden (Lahm *et al.*, 2015a).

Um spezifische SmartFlare™ Proben zu entwickeln, wurde ein multiples Sequenzalignment unter Verwendung des Programms CLUSTAL X Version 2.0 (*Multiple alignment of nucleic acid and protein sequences*, Conway Institute UCD Dublin, Dublin, Irland; <http://www.clustal.org/clustal2/>) (Larkin *et al.*, 2007) für die Sequenzen der Spezies Mensch, Maus und Schwein durchgeführt. Die benötigte Sequenz wurde im Homologiebereich zwischen den drei Spezies mit einer Länge von 26-27 bp gewählt (Anforderungen der Firma Merck Millipore). Das Sequenzalignment und die ausgewählten Reportersequenzen für *NANOG* und *GDF3* sind in Abbildung 4 gezeigt. Die SmartFlare™ Proben (SF-Proben) wurden von der Firma Merck Millipore entwickelt und synthetisiert und an die Abteilung der Experimentellen Chirurgie übergeben. Die lyophilisierten SF-Proben wurden mit sterilem *aq. bidest.* rekonstituiert und auf eine Stockkonzentration von 100 nM eingestellt. Rekonstituierte SF-Proben mit einer Konzentration von 100 nM sind bei RT im Dunklen für 12 Monate stabil (Angabe Merck Millipore).

In der aus dieser Kooperation resultierenden Publikation konnte gezeigt werden, dass die SmartFlare™ Proben zur Detektion von *GAPDH*, *NANOG* und *GDF3* in murinen, porcinen und humanen pluripotenten Zellen funktionieren (Lahm *et al.*, 2015a). In der vorliegenden Arbeit wurden die SmartFlare™ Proben, welche die Pluripotenzmarker *NANOG* (SF1) und *GDF3* (SF2) in lebenden Zellen nachweisen zur Charakterisierung der generierten iPS Zellen verwendet.

<u>NANOG</u>																		
			<b>AG CCTGTATTCT TCTACCAGTC CCAA (SF3)</b>															
NM_024865	(human)	371	CTCTCTCTCC	TTCTCTCATG	GATCTGCTTA	TTGAGGACAG	COCTGATTCT	TCTACCAGTC	CCAAAGGCAA	ACAAAC...CC	ACTTCTGCAG	AGGAGGTGT						
NM_028016	(mouse)	370	CTCTCTCTCC	TTCTCTCATG	GATCTGCTTA	TTGAGGACAG	COCTGATTCT	TCTACCAGTC	CCAAAGGCAA	GCTCTCATG	CTCTGAGCTG	ACAAAGGCTC						
NM_001129971	(pig)	348	CTCTCTCTCC	TTCTCTCATG	GATCTGCTTA	TTGAGGACAG	COCTGATTCT	TCTACCAGTC	CCAAAGGCAA	ACAAACTGCTC	ACTTCTGCAG	AGGAGGTGT						
													<b>CAG</b>					
NM_024865			CCCAAAAAG	GAGACAAGG	TCCCGTCAA	GAACAGAAAG	ACCAGAACTG	TGTTCTCTTC	CACCCAGCTG	TGTGTACTCA	ATGATGATT	TCAGAACAG						
NM_028016			TGAGAGGAG	GAGACAAGG	TCCCTGCCAG	GAACAGAAAG	ATGCGAACTG	TGTTCTCTCA	GCCCCAGCTG	TGTGTACTCA	AGACAGATT	TCAGAACAG						
NM_001129971			CAAGAGAAAG	GAGACAAGG	TCCCACTCAA	GAACAGAAAG	ATCAGAACTG	TGTTCTCTCA	GACCCAGCTC	TGTGTACTCA	AGACAGATT	TCAGAACAG						
													<b>CAG</b>					
			<b>TACTCA GCTCCAGCA GATCAAGAA CT (SF2)</b>															
			<b>AAATACCTCA GCTCCAGCA GATG (SF1)</b>															
NM_024865			AAATACCTCA	GCTCCAGCA	GATCAAGAA	CTCTCCAGCA	TCTGAACTCT	CAGCTACAAA	CAGGTGAAGA	CTTGGTTCCA	GAACAGAGA	ATGAAATCTA	667					
NM_028016			AAATACCTCA	GCTCCAGCA	GATCAAGAA	CTCTCCAGCA	TCTGAACTCT	CAGCTACAAA	CAGGTGAAGA	CTTGGTTCCA	GAACAGAGA	ATGAAATCTA	669					
NM_001129971			AAATACCTCA	GCTCCAGCA	GATCAAGAA	CTTCCAGCA	TCTGAACTCT	TAGCTACAAA	CAGGTGAAGA	CTTGGTTCCA	GAACAGAGA	ATGAAATCTA	644					
<u>GDF3</u>																		
			<b>TCTCTACTT TAACCTGTCT GCCATCA (SF1)</b>															
NM_020634	(human)	329	TTTCCCAAGC	TTCTCTCTGC	CTGCAAGAGC	TCTCTACTT	TAACCTGTCT	GCCATCA	AAGGGAACA	GTTGACATTG	GCCAGCTGG	GCTGGACTT	428					
NM_008108	(mouse)	401	CTTCCCAAGC	TGCTCTCTGC	CTGCAAGAGC	TCTCTACTT	TAACCTGTCT	GCCATCA	AAGGGAACA	GTTGACATTG	GCCAGCTGG	CTCTAGACTT	500					
NM_003126512	(pig)	293	ATCCCAAGC	TGCTCTCTGC	CTGCAAGAGC	TCTCTACTT	TAACCTGTCT	GTCATTAAG	AT...GAGCA	GTTGACATTG	GCCAGCTGG	CTCTGGACTT	389					
													<b>CATTAT GAAGCATGG TAGTCATGA (SF2)</b>					
NM_020634		1025	CCCCACCAAG	CTGTCTCCCA	TTTCAATGCT	CTACCAGAG	AATATGACA	ATGTCATTCT	ACGCATTAT	GAAGCATGG	TAGTCATGA	ATGTGGTGT	1125					
NM_008108		1100	CCCCACCAAG	CTGTCTCCCA	TTTCAATGCT	CTACCAGAG	AATATGACA	ATGTCATTCT	ACGCATTAT	GAAGCATGG	TAGTCATGA	ATGTGGTGT	1200					
NM_003126512		986	CCCCACCAAG	CTGTCTCCCA	TTTCAATGCT	CTACCAGAG	AATATGACA	ATGTCATTCT	ACGCATTAT	GAAGCATGG	TAGTCATGA	ATGTGGTGT	1086					

**Abbildung 4: Sequenzalignment der humanen, murinen und porcinen mRNA Sequenzen der Pluripotenzmarker *NANOG* und *GDF3*.** Rote Sequenzen zeigen die Sequenzen, die zur Generierung der SF-Proben verwendet wurden. Adaptiert Lahm *et al.*, 2015a. © 2014 AlphaMed Press.

Für die Detektion der mRNA von *NANOG* und *GDF3* unter Verwendung der Nanoflare Technologie wurden die iPS Zellen mit 0,5 mM EDTA/PBS Lösung (siehe Punkt 2.8.3.2) auf

eine Zellkultur Multiwellplatte (48-well Format) passagiert. Die iPS Zellen wurden für fünf Tage kultiviert. Jeden Tag wurde ein Mediumwechsel mit TeSR™-E8™ durchgeführt. Die Zugabe der SF-Proben erfolgte in TeSR™-E8™ in einer finalen Konzentration von 1 nM. Bis zur Detektion der Fluoreszenz wurden die Zellen (16 h) in einem HERACell 240i CO<sub>2</sub> Inkubator (Thermo Fisher Scientific) kultiviert. Es wurden eine Positivkontrolle (*Uptake* Kontrolle) und eine Negativkontrolle (*Scramble* Kontrolle) in TeSR™-E8™ in einer finalen Konzentration von 1 nM mitgeführt. Die Fluoreszenz wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss) unter Verwendung der Carl Zeiss™ Axio Vision Rel. 4.8.2 Software (Zeiss) dokumentiert.

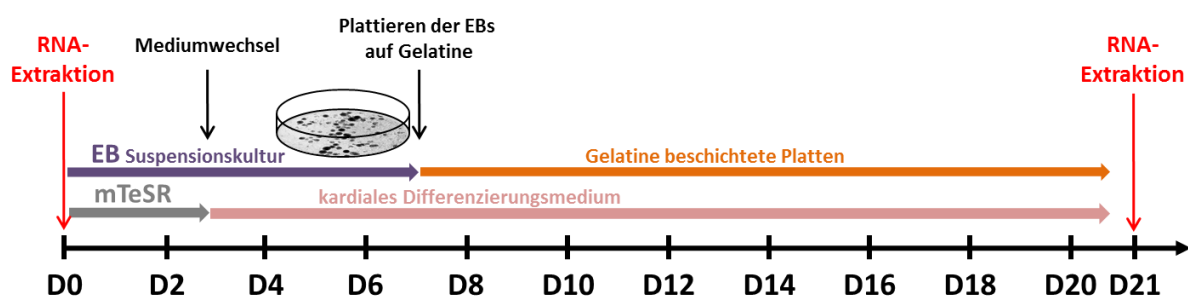
- Nachweis der identifizierten *de novo* Mutationen in den iPS Zellen

Die identifizierte *de novo* Mutation im *TBX5* Gen des HOS Indexpatienten 1460 und die identifizierte *de novo* Mutation im *THEMIS2* Gen der Indexpatientin 804-K wurden in den iPS Zellen nachgewiesen.

Die DNA der iPS Zellen wurde isoliert (siehe Punkt 2.4.4.2) und eine Amplifikation der relevanten Region der DNA durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 8 angegeben. Die Amplifikation wurde wie unter 2.4.6 beschrieben durchgeführt. Das Amplifikationsprodukt wurde aufgereinigt und sequenziert (siehe Punkt 2.4.8).

### Funktionelle Kriterien

Der pluripotente Charakter einer iPS Zelle definiert sich in der Fähigkeit während der Differenzierung Zellen aller drei Keimblätter (Mesoderm, Ektoderm, Endoderm) auszubilden. Als Beleg für den pluripotenten Charakter der iPS Zellen wurde die Genexpression keimblattspezifischer Marker in der spontanen Differenzierung gemessen. Die iPS Zellen wurden nach dem in Abbildung 5 gezeigten Protokoll über 21 Tage differenziert. Es wurde der Genexpressionsunterschied der ausgewählten Marker als Verhältnis der Genexpression an Tag D21 versus D0 nach Normalisierung durch das Haushaltsgen *ACTB* (NM\_001101.3) bestimmt.



**Abbildung 5: Workflow der spontanen Differenzierung zum Nachweis keimblattspezifischer Marker.** An den Tagen D0 und D21 wurde die RNA der Zellen isoliert und die Expression von Markern, welche spezifisch für die drei Keimblätter sind bestimmt.

An den Tagen D0 und D21 wurden die Zellen aus drei unabhängigen Differenzierungsansätzen in Duplikaten lysiert und die Lysate bei -20°C bis zur RNA Extraktion gelagert. Die RNA der Zellen wurde mit dem peqGOLD Total RNA Kit (S-Line, VWR

International) isoliert (siehe Punkt 2.4.4.3) und die Konzentration spektrophotometrisch gemessen (siehe Punkt 2.4.4.4). Die RNA wurde, wie unter Punkt 2.4.5 beschrieben in cDNA umgeschrieben. Für den Nachweis des endodermalen Keimblattes wurde die Expression von *Alpha Fetoprotein* (AFP, NM\_001134) (Moretti *et al.*, 2010b) und *SRY* (*Sex Determining Region Y*)-Box 7 (SOX7, NM\_031439) (Lahm *et al.*, 2015a) gemessen. Das mesodermale Keimblatt wurde durch *Alpha-Actin-2* (ACTA2, NM\_001141945) und *Myosin light chain 2* (MYL2, NM\_000432) charakterisiert (Lahm *et al.*, 2015a). Zellen des Ektoderms wurden durch die Expression von *Keratin 14* (KRT14, NM\_000526) und *Tyrosine Hydroxylase* (TH, NM\_199292) nachgewiesen (Lahm *et al.*, 2015a). Alle verwendeten Oligonukleotide zur Detektion der Marker sind in Tabelle 9 angegeben. Die Genexpression wurde mit dem QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit, (Qiagen) nach Anleitung des Kits, wie unter Punkt 2.4.7 beschrieben auf einem QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific) gemessen. Für alle Amplifikationsprodukte wurde eine Schmelzkurvenanalysen zur Überprüfung des Produktes und eine gelelektrophoretische Auftrennung zur Größenbestimmung und Quantifizierung des Amplifikationsproduktes durchgeführt (siehe Punkt 2.4.4.5). Die Quantifizierung der relativen Genexpression wurde wie unter Punkt 4.7 beschrieben berechnet. Die relative Genexpression der Keimblattmarker ist als n-fache Genexpression am Tag D21 gegen Tag D0 nach Normalisierung mit *ACTB* angegeben. Die Werte sind als Mittelwert dreier unabhängiger Differenzierungen mit Duplikaten berechnet. Für alle Expressionsunterschiede wurde der Standardfehler (engl. *standard error*) berechnet. Die Expressionsdaten wurden mit dem T-Test für verbundene Stichproben (engl. *paired Student's t-test*) auf Signifikanz geprüft.

### 2.8.3 Differenzierung von induzierten pluripotenten Stammzellen

Verschiedene Protokolle ermöglichen die Differenzierung von induzierten pluripotenten Stammzellen in Zellen des Mesoderms, Ektoderms und Endoderms. In der vorliegenden Arbeit wurden iPS Zellen spontan und gerichtet differenziert um *in vitro* einen kardialen Phäntyp zu definieren.

#### 2.8.3.1 Spontane Differenzierung

Alle in dieser Arbeit verwendeten iPS Zellen der HOS Indexpatienten und der Kontrollen wurden nach dem in Abbildung 6 gezeigten Workflow spontan differenziert. Das dabei verwendete Protokoll basiert auf der Publikation von Moretti und Kollegen (Moretti *et al.*, 2010b).

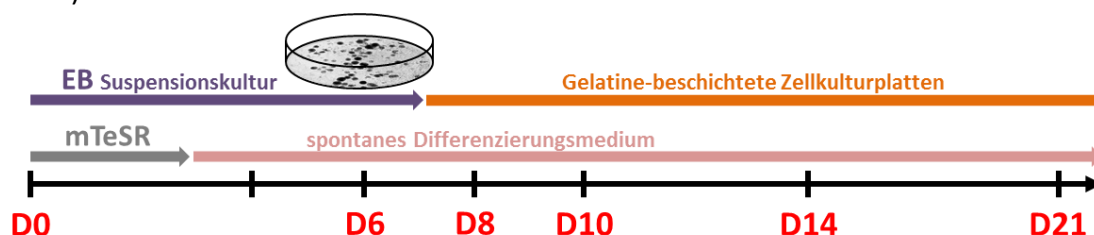


Abbildung 6: Workflow der spontanen Differenzierung humaner iPS Zellen.

Die iPS Zellen wurde für mindestens zwei Passagen von TeSR™-E8™ Medium auf mTeSR™1 (StemCell™ Technologies) umgestellt. Vorversuche hatten gezeigt, dass iPS Zellen, die vor spontaner Differenzierung in mTeSR™1 kultiviert wurden gesicherter Kontraktionen zeigten als iPS Zellen, die in TeSR™-E8™ Medium kultiviert wurden. Als Kriterium einer erfolgreichen spontanen Differenzierung wurde die mikroskopisch sichtbare spontane Kontraktion in der Differenzierung festgelegt.

Zwei konfluente Zellkultur Multiwellplatten (6-well Format) der iPS Zellen wurden zweimal mit DMEM/Ham's F12 (Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA) gewaschen. Dispase (StemCell™ Technologies) wurde für 3-5 min bei RT zugegeben. Nach Absaugen der Dispase wurden die iPS Zellen mit DMEM/Ham's F12 (Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA) überschichtet. Die iPS Zellen wurden durch vorsichtiges Spülen der Oberfläche abgelöst und auf ein 40 µm EASYstrainer™ Zellsieb (Greiner Bio-One International GmbH) überführt. Einzelzellen und Zellaggregate unter 40 µm Durchmesser passieren das Zellsieb und wurden verworfen. Für die spontane Differenzierung wurden nur Zellaggregate über 40 µm, die sich auf dem Sieb befanden und durch Invertierung und vorsichtiges Abspülen des Zellsiebs mit mTeSR™1 gewonnen wurden, verwendet. Die Zellaggregate wurden zur Ausbildung von EBs auf eine pHEMA-beschichtete Zellkulturplatte überführt. Am Tag D3 wurde das Kultivierungsmedium von mTeSR™1 auf das spontane Differenzierungsmedium umgestellt. Am Tag D5 wurde ein weiterer Mediumwechsel (spontanes Differenzierungsmedium) durchgeführt. Am Tag D7 wurden die gebildeten EBs in der Zellkultur Multiwellplatte gezählt, in spontanem Differenzierungsmedium aufgenommen und nach der, in Tabelle 44 angegebenen Dichte auf Gelatine-beschichtete Zellkultur Multiwellplatten überführt.

**Tabelle 44: Anzahl der ausplattierten EBs pro Wachstumsfläche**

Verwendete Zellkultur Multiwellplatte	Wachstumsfläche (cm <sup>2</sup> )/well	Anzahl der plattierten EBs/well	Verwendetes Volumen (ml)/well
96-well Format	0,32		0,3
48-well Format	1	10-20	0,5
24-well Format	2	20-30	1
12-well Format	4	40-60	1,5
6-well Format	9,5	95-142,5	3

Ab Tag D8 wurde das Differenzierungsmedium jeden zweiten Tag gewechselt. Vor jedem Mediumwechsel wurde ein Waschschriff mit DMEM/Ham's F12 (Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA) durchgeführt. Die im Differenzierungsmedium enthaltene Ascorbinsäure wurde bei jedem Mediumwechsel frisch in einer finalen Konzentration von 50 µg/ml zugegeben.

RNA Lyse Proben wurden für die Tage D0, D6, D8, D10, D14 und D21 genommen und bei -20°C bis zur RNA Isolation (siehe Punkt 2.4.4.3) gelagert. Nach Isolation und Konzentrationsbestimmung (siehe Punkt 2.4.4.4) der RNA wurde cDNA generiert (siehe Punkt 2.4.5) und die Genexpression der kardialen Transkriptionsfaktoren *NK2 Homeobox 5* (*NKX2.5*, NM\_004387.3), *T-Box 5* (*TBX5*, NM\_000192.3), *ISL LIM Homeobox 1* (*ISL1*, NM\_002202.2) und *T-Box 20* (*TBX20*, NM\_001077653.2), sowie die Genexpression des *Natriuretischen Peptids A* (engl. *Natriuretic Peptide A*, *NPPA*, NM\_006172.3) und *Troponin T2*

(engl. *Troponin T2, cardiac type, TNNT2*, NM\_000364.3) wie unter Punkt 2.4.7 beschrieben gemessen. Als Referenzgen wurde *Actin Beta (ACTB)*, NM\_001101.3) verwendet. Die iPS Zellen der Kontrollen (C, H, 804-MU und 804-VA) und der zwei HOS Indexpatienten (1460, 804-K) wurden in drei unabhängigen Experimenten spontan differenziert. Jeder Messzeitpunkt der Differenzierung lag als biologisches Duplikat vor.

### 2.8.3.2 Gerichtete Differenzierung

Spontane Differenzierungen zeigen eine geringe Ausbeute an sich differenzierenden CM. Aus diesem Grund wurde der, in der spontanen Differenzierung definierte Phänotyp in einem Protokoll der gerichteten Differenzierung untersucht.

Alle iPS Zellen (C, H, 804-MU, 804-VA, 1460 und 804-K) wurden nach dem Protokoll von Burrige und Kollegen kardial gerichtet differenziert (Burrige *et al.*, 2015a). Das Protokoll basiert auf der Verwendung von *small molecules*, welche den Wnt-Signalweg beeinflussen und zu einer Ausbeute von CM von über 80% führen (Burrige *et al.*, 2014; Gonzalez *et al.*, 2011; Lian *et al.*, 2012). Der Workflow der gerichteten Differenzierung ist in Abbildung 7 gezeigt.

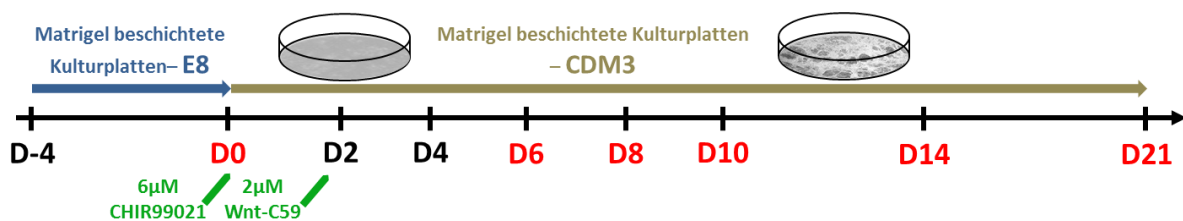


Abbildung 7: Workflow der gerichteten Differenzierung humaner iPS Zellen.

Als Ausgangspopulation für die Differenzierung einer kompletten Zellkultur Multiwellplatte (24-well Format) wurden zwei konfluente Zellkultur Multiwellplatten (6-well Format) der iPS Zellen in TeSR™-E8™ Medium verwendet. Die iPS Zellen wurden mit 0,5 mM EDTA/PBS Lösung wie folgt passagiert. Das Kulturmedium wurde abgenommen und 1 ml 0,5 mM EDTA/PBS Lösung für 5-8 min auf die Zellen in einem Well gegeben. Die ideale Inkubationszeit ist spezifisch für die iPS Zellen und wurde für jeden Indexpatienten/Probanden in Vorversuchen festgelegt. Die EDTA/PBS Lösung wurde abgesaugt und 1 ml TeSR™-E8™ mit 10 µM Y27632 ROCK Inhibitor (StemCell™ Technologies) zugegeben. Durch vorsichtiges Spülen mit Medium wurden die iPS Zellen von der Zellkulturplatte gelöst und dissoziiert. Die Einzellsuspension wurden auf eine Zellkultur Multiwellplatte (24-well Format) mit 1 ml TeSR™-E8™ pro Well ausgesät. Jeden Tag wurde ein Mediumwechsel mit TeSR™-E8™ durchgeführt. Vor jedem Mediumwechsel wurden die Zellen einmal mit DMEM/Ham's F12 (Biochrom, Merck Millipore, Merck KGaA) gewaschen. Nach zwei bis vier Tagen bilden die iPS Zellen eine konfluente Einzellschicht (engl. *monolayer*) und die gerichtete Differenzierung wurde gestartet. Am Tag D0 wurde das *small molecule* CHIR99021 (LC Laboratories) mit einer Konzentration von 2-6 µM in CDM3 Medium zugegeben. Für die gerichteten Differenzierungen, die in dieser Arbeit verwendeten

iPS Zellen, zeigte sich in Vorversuchen, dass einige iPS Zellen bei einer CHIR99021 Konzentration von 6  $\mu\text{M}$  eine sehr hohe Rate an Zelltod zeigten oder die Differenzierung nicht zu schlagenden Kardiomyozyten führte. Aus diesem Grund wurde die ideale Konzentration von CHIR99021 spezifisch für die iPS Zellen der Indexpatienten/Probanden ausgetestet und in allen Differenzierungen standardisiert verwendet. Am Tag D2 wurde das Medium abgenommen und CDM3 Medium mit 2  $\mu\text{M}$  des *small molecules* Wnt-C59 (Sellekchem) zugegeben. Ab Tag D4 wurde jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel (CDM3) durchgeführt. Ab Tag D8 waren die ersten kontrahierenden Bereiche zu sehen. Die Menge der kontrahierenden CM nahm bis Tag D14 stetig zu. Die Gewinnung und Aufarbeitung der Proben wurde, wie für die spontane Differenzierung (siehe Punkt 2.8.3.1) beschrieben durchgeführt.

Die iPS Zellen der vier verwendeten Kontrollen (C, H, 804-MU und 804-VA) und der zwei HOS Indexpatienten (1460, 804-K) wurden in drei unabhängigen Experimenten gerichtet differenziert. Jeder Messzeitpunkt der Differenzierung lag als biologisches Duplikat vor.

### **2.8.3.3 Statistik**

Zur Bestimmung von Ausreißern wurde das statistische Programm *SPSS Statistics 25* (IBM, Armonk NY) verwendet. Es wurde eine graphische Darstellung der Verteilung der einzelnen Variablen (Patient/Proband, spontane/gerichtete Differenzierung, Nummer der Differenzierung, Tag der Differenzierung) in Gruppen vergenommen und diese als Box-Whisker-Plots dargestellt. Als extreme Ausreißer wurden die Werte bestimmt, die mehr als das 3-fache des Interquartilsabstandes ( $3 \times \text{IQR}$ ) zeigten. Diese Werte wurden für die weiteren Auswertungen ausgeschlossen.

Die Induktion der Genexpression in der spontanen und gerichteten Differenzierung über Tag D0 wurde als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler nach Normalisierung mit *ACTB* berechnet. Für die Berechnung signifikanter Unterschiede wurde der T-Test für unverbundene Stichproben (engl. *unpaired Student's t-test*) verwendet. P-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant bewertet.

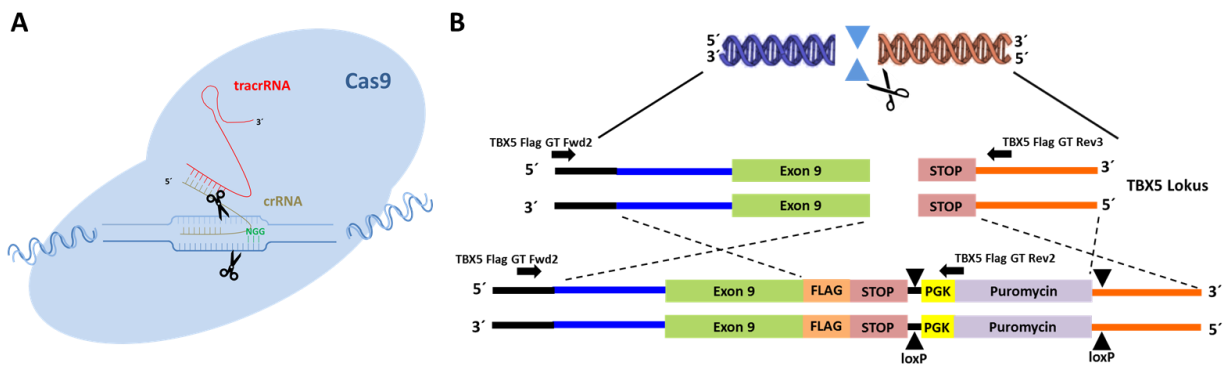
### **2.8.4 Untersuchung der Kardiomyozyten des Indexpatienten 1460**

Kardiomyozyten des Indexpatienten 1460 wurden an Tag D30 der gerichteten Differenzierung für den kardialen Marker Troponin T, die Strukturproteine  $\alpha$ -Myosin Heavy Chain ( $\alpha$ -MHC) und sarkomeres  $\alpha$ -Actinin sowie die Connexine 40 und 43, wie unter Punkt 2.4.9.4 beschrieben gefärbt. Die immunzytologische Untersuchung wurde durchgeführt um die Ausbildung der Strukturproteine und Connexine visuell zu beurteilen.

## **2.9 Genom-Editierung und CRISPR/Cas**

In der vorliegenden Arbeit wurde die CRISPR/Cas9 Technologie verwendet, um spezifisch ein Flag-Tag in *TBX5* Lokus von iPS Zellen eines gesunden Probanden einzubauen. Der

Mechanismus des CRISPR/Cas9 zum Editieren des Genoms ist in Abbildung 8A schematisch gezeigt.



**Abbildung 8: CRISPR/Cas9 Technologie.** (A) Dargestellt ist das CRISPR/Cas9 Protein, das sich an die DNA anlagert und durch Vorgabe der *single guide* RNA (sgRNA, bestehend aus crRNA und tracrRNA) und des PAM Motifs (NGG) an spezifischer Stelle die DNA schneidet. (B) Schematische Darstellung des Donorkonstruktes TBX5 Flag mit Resistenzkassette (Puromycin) und dessen Einbau in den *TBX5* Locus durch homologe Rekombination. Die Position der Oligonukleotide TBX5 Flag GT Fwd2/Rev3 zur Detektion der Wildtyp iPS Zellen und TBX5 Flag GT Fwd2/Rev2 zur Detektion der transgenen iPS Zellen ist durch schwarze Pfeile angezeigt.

Die Flag-Sequenz wurde durch homologe Rekombination hinter das Exon 9 des *TBX5* Gens direkt vor dem Stopcodon eingebaut. Das verwendete Konstrukt ist schematisch in Abbildung 8B gezeigt.

### 2.9.1 TBX5-Flag Donorkonstrukt

Das TBX5 Flag Donorkonstrukt 5'HA-TBX5 Exon 9 Flag-3'HA wurde unter Verwendung des Programms Benchling (<https://benchling.com/>) generiert (Abbildung S1). Die Sequenz des Konstruktes wurde von der Firma GenScript (Piscataway, NJ) in den Vektor pUC57-Simple kloniert. Die Karte des Vektors pUC57-Simple ist in Abbildung S2A dargestellt. Die Karte des Vektors mit der Position des integrierten Donorkonstrukts ist in Abbildung S2B abgebildet. Der analytische Restriktionsverdau des Vektors zur Überprüfung des korrekten Einbaus ist in Abbildung S2C gezeigt. Eine Sequenzierung des Vektors mit integriertem Konstrukt zur Überprüfung des korrekten Einbaus wurde von der Firma GenScript durchgeführt (Abbildung S3). Das synthetisierte Konstrukt wurde nach Angaben des Herstellers rekonstituiert und in kompetente *E. coli* transformiert (siehe Punkt 2.4.3.1). Es wurden Plasmidpräparationen (siehe Punkt 2.4.3.2) angefertigt. Nach Überprüfung der korrekten Sequenz durch Sequenzierung wurden Glycerolstocks angelegt (siehe Punkt 2.4.3.3).

### 2.9.2 sgRNA Design

Für die Genom-Editierung wurde der pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0 Vektor (Addgene), dessen Karte in Abbildung S4A gezeigt ist, verwendet. Unter Verwendung des Programms Benchling CRISPR gRNA Design (<https://benchling.com/>) wurden drei selbsthybridisierende RNA Stränge (engl. *single guide* RNA, sgRNA) definiert, die als sgRNA in Frage kommen (Abbildung S4B). Es wurde darauf geachtet, dass die Länge der sgRNAs mit einer Länge von

20 bp optimal war. In unmittelbarer Nähe der sgRNA Sequenz befand sich eine PAM Region (5'-NGG-3') als Erkennungssequenz. Die potentiell verursachten Doppelstrangbrüche lagen in unmittelbarer Nähe zur gewünschten, zu editierenden DNA Region. Die Oligonukleotide zur Generierung der drei sgRNAs sind in Tabelle 45 angegeben und wurden bei der Firma Ella Biotech GmbH (Martinsried, Deutschland) synthetisiert.

**Tabelle 45: Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung der sgRNAs**

Oligonukleotid	Sequenz
huTBX5_ Ex9 sg1 Fwd	5' caccGAGTTGGCATGGTCCAGAG 3'
huTBX5_ Ex9 sg1 Rev	5' aaacCTCTGGCACCATGCCAACTC 3'
huTBX5_ Ex9 sg2 Fwd	5' caccGTAGCTATTGTCGCTCCACTC 3'
huTBX5_ Ex9 sg2 Rev	5' aaacGAGTGGAGCGACAATAGCTAC 3'
huTBX5_ Ex9 sg3 Fwd	5' caccGAGCGACAATAGCTAAAGTG 3'
huTBX5_ Ex9 sg3 Rev	5' aaacCACTTTAGCTATTGTCGCTC 3'

Sequenz der sgRNA. Sequenz des Überhangs zum Klonieren der sgRNA.

Das Annealing der Oligonukleotide (Reaktion 1) wurde wie in Tabelle 46 angegeben durchgeführt. Die Bedingungen der Reaktion sind in Tabelle 47 gezeigt. Die Reaktion wurde in einem C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH) durchgeführt.

**Tabelle 46: Phosphorylierung und Annealing der Oligonukleotide (Reaktion 1)**

Komponente	Volumen [µl]	Finale Konzentration
Oligonukleotid forward [100 µM]	1	10 µM
Oligonukleotid reverse[100 µM]	1	10 µM
10x T4 Ligationspuffer (NEB)	1	1x
<i>aq. bidest</i>	6	
T4 Polynukleotid Kinase PNK 10.000 U/ml (NEB)	1	10 U

**Tabelle 47: Bedingungen des Oligonukleotid-Annealings**

Temperatur	Zeit [min]
37°C	30
95°C	5
95°C >25°C	5°C/min Rampenzeit

Die im Anschluss durchgeführte Ligation der sgRNA in den Vektor und der Verdau von Vektor ohne Insert (Reaktion 2) wurde, wie in Tabelle 48 angegeben angesetzt. Die gewählten Bedingungen der Reaktion sind in Tabelle 49 dokumentiert. Die Reaktion wurde in einem C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH) durchgeführt.

**Tabelle 48: Ligation (Reaktion 2)**

Komponente	Volumen [µl]	Finale Konzentration
pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0 Vektor (Addgene)	x	100 ng
Oligonukleotidduplex; 1:200 Verdünnung (Reaktion 1)	2	
10x Tango Puffer (Thermo Fisher Scientific)	2	1x
DTT, 10 mM (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific)	1	0,5 mM
ATP, 10 mM (Thermo Fisher Scientific)	1	0,5 mM
FastDigest BbsI (Thermo Fisher Scientific)	1	-
T7 DNA Ligase 3.000.000 U/ml (NEB)	0,5	1500 U
H <sub>2</sub> O, Nuclease-free (Thermo Fisher Scientific)	auf 20 µl	



**Tabelle 49: Bedingungen der Ligation**

	Temperatur	Zeit [min]	
<b>Ligation</b>			6 Zyklen
	37°C	5	
	23°C	5	
<b>Finale Inkubation</b>	4°C		∞

Nach Ligation wurde der Ansatz mit einer ATP-abhängigen DNase (Biozym Scientific GmbH) zum Abbau unspezifischer Rekombinationsprodukte wie in Tabelle 50 gezeigt für 30 min bei 37°C in einem Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf) inkubiert (Reaktion 3).

**Tabelle 50: Behandlung der Ligation mit der PlasmidSafe™ ATP-abhängigen DNase**

Komponente*	Volumen [µl]	Finale Konzentration
<b>Ligationsansatz (Reaktion 2)</b>	11	
<b>10x Plasmid Safe™ Puffer*</b>	1,5	1x
<b>ATP, 10 mM*</b>	1,5	1 mM
<b>PlasmidSafe DNase 10 U/µl*</b>	1	0,66 U

\*Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase (Biozym Scientific GmbH).

Es wurden 2 µl der, in den pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0 Vektor klonierten sgRNAs in kompetente *E. coli*, wie unter Punkt 2.4.3.1 beschrieben, transformiert. Für jede der klonierten sgRNAs wurden Klone gepickt und Plasmidpräparationen angefertigt (siehe Punkt 2.4.3.2). Die Plasmidpräparationen wurden zur Überprüfung des korrekten Einbaus der sgRNAs sequenziert (siehe Punkt 2.4.8). Dazu wurde das Oligonukleotid U6, dessen Sequenz in Tabelle 8 angegeben ist verwendet. Von Plasmiden, bei denen die sgRNA korrekt eingebaut war, wurden wie unter Punkt 2.4.3.3 beschrieben Glycerolstocks angelegt.

Zur Bestimmung der Schneideeffizienz wurden HEK 293 Zellen mit den Vektoren pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0\_sgRNA1 Klon 1, pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0\_sgRNA2 Klon 1 und pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0\_sgRNA3 Klon 1, wie folgt transfiziert. Zwei Tage vor anstehender Transfektion wurden HEK 293 Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in einem Well einer Zellkultur Multiwellplatte (6-well Format) in HEK 293 Medium ausgesät. Bei Erreichen einer 80%-igen Konfluenz wurde die Transfektion nach folgendem Ansatz mit dem Fugene Transfektion Reagenz (FuGENE® HD Transfektion Reagent, Promega Corporation) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

**Tabelle 51: Ansatz der Transfektion zur Bestimmung der Schneideeffizienz**

Komponente	Konzentration [µg/ml]
<b>pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0-sgRNA1; Klon 1</b>	2
<b>pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0-sgRNA2; Klon 1</b>	2
<b>pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0-sgRNA3; Klon 1</b>	2

Am Tag nach Transfektion wurde zur Selektion erfolgreich transfizierter HEK 293 Zellen eine Behandlung mit 0,5 µg/ml Puromycin (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) durchgeführt. Die DNA der transfizierten HEK 293 Zellen wurde, wie unter Punkt 2.4.4.2 beschrieben isoliert und eine Konzentrationbestimmung durchgeführt (siehe Punkt 2.4.4.4). Eine Amplifikation der genomischen DNA wurde wie in Tabelle 52 angegeben, mit dem FastStart™ High Fidelity PCR System (Sigma-Aldrich, Merck Millipore Merck KGaA)

durchgeführt. Die Bedingungen der PCR sind in Tabelle 53 gezeigt. Die Amplifikationen wurden auf einem C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH) durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 8 angegeben.

**Tabelle 52: Ansatz der Amplifikation genomischer DNA über die Schnittstellenregion der sgRNAs**

Komponente	Volumen/Reaktion	Finale Konzentration
FastStart High Fidelity Reaction Buffer*, 10x	2 µl	1x; 1,8 mM MgCl <sub>2</sub>
DMSO*	1 µl	1%
PCR Grade Nucleotide Mix*	0,4 µl	200 µM
Oligonukleotid (forward); 2 µM TBX5 Ex9 Flag F	2 µl	0,2 µM
Oligonukleotid (reverse); 2 µM TBX5 Ex9 Flag R1	2 µl	0,2 µM
Matrizen DNA	variabel	100 ng
Water, PCR Grade*	auf 20 µl	
FastStart High Fidelity Enzyme Blend (5 U/ µl)*	0,2 µl	1 U

\*FastStart™ High Fidelity PCR System (Sigma-Aldrich, Merck Millipore Merck KGaA)

**Tabelle 53: Bedingungen der Amplifikation genomischer DNA über die Schnittstellenregion der sgRNAs**

	Zyklen	Zeit	Temperatur
Initiale Aktivierung	1	2 min	95°C
Amplifikation	30-40		
	Denaturierung	30 s	95°C
	Annealing	30 s	60°C
	Elongation	60 s	72°C
Finale Elongation	1	10 min	72°C
Kühlung		∞	4°C

Die Amplifikationsprodukte wurden mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Sigma-Aldrich, Merck Millipore Merck KGaA) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

Die Sequenzierungen wurden von der Firma Source BioScience durchgeführt (siehe Punkt 2.4.8). Die Chromatogramme der Sequenzierungen wurden in die Software TIDE (<https://tide.deskgen.com/>) geladen und die Schneideeffizienz bestimmt. Als Referenz diente die Sequenzierung der Kontrolle (HEK 293 Zellen, untransfiziert).

### 2.9.3 Generierung TBX5-Flag editierter humaner induzierter pluripotenter Stammzellen

Zur Generierung TBX5Flag editierter iPS Zellen wurde die iPS Linie E5 in Passage 32 verwendet. Diese iPS Linie wurde im Labor von Joseph Wu (Stanford Cardiovascular Institute, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA) reprogrammiert, ist vollständig charakterisiert und bereits publiziert (Sun *et al.*, 2012). Die iPS Zellen wurden dem DHM in Kooperation mit Joseph Wu und Sean Wu (Institute of Stem Cell and Regenerative Medicine, Stanford, CA) zur Verfügung gestellt.

Für die Elektroporation der humanen iPS Linie E5 wurde der Human Stem Nucleofector® Kit 1 (Lonza Cologne GmbH) verwendet. Die iPS Zellen wurden mit 1x D-PBS gewaschen und mit Accutase (StemCell™ Technologies) für 5 min bei 37°C in einem HERACell 240i CO<sub>2</sub> Inkubator (Thermo Fisher Scientific) inkubiert. Die Accutase wurde mit der zweifachen Menge an TeSR™-E8™ (StemCell™ Technologies), supplementiert mit Rock Inhibitor Y-27632 (StemCell™ Technologies) in einer finalen Konzentration von 10 µM inaktiviert. Die Zellen wurden in ein 50 ml Falcongefäß überführt. Eine Einzelzellsuspension wurde durch

vorsichtiges Auf- und Abpipettieren erreicht. Die iPS Zellen wurden bei 115 x g für 5 min bei RT pelletiert und eine Lebendzellzahlbestimmung durchgeführt (siehe Punkt 2.4.1). Eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  wurde in 1 ml TeSR™-E8™ (StemCell™ Technologies), supplementiert mit Rock-Inhibitor Y-27632 (10 µM, StemCell™ Technologies) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (115 x g, 5 min) bei RT pelletiert und in 100 µl Nucleofector Solution (Lonza Cologne GmbH), nach Angabe des Herstellers (Lonza Cologne GmbH) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 1 µg des Donorkonstrukts pUC57-5'HA-TBX5 Exon 9 Flag-3'HA und 1 µg pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0-sgRNA3 Klon 1 versetzt. Der Ansatz wurde in eine Küvette des Kits transferiert und in einem Nucleofector™ II (Amaxa Biosystems, Lonza Cologne GmbH) mit dem Programm B-016 elektroporiert. Nach erfolgter Elektroporation wurde 1 ml TeSR™-E8™ (StemCell™ Technologies) supplementiert mit Rock-Inhibitor Y-27632 (10 µM, StemCell™ Technologies) zu den iPS Zellen gegeben und der Ansatz bei RT für 2-3 min inkubiert. Die Zellen wurden in ein Well einer Zellkultur Multiwellplatte (6-well Format), die mit Matrigel beschichtet wurde in einem finalen Volumen von 2 ml mTeSR™E8 (StemCell™ Technologies), supplementiert mit 10 µM Rock-Inhibitor Y-27632 (StemCell™ Technologies) aufgenommen und für zwei Tage ohne Mediumwechsel inkubiert.

Erfolgreich elektroporierte iPS Zellen haben die FLAG-Sequenz und das unter der Kontrolle des Phosphoglyceratkinase-Promotors stehende Puromygingen eingebaut. Zur Selektion erfolgreich elektroporierter iPS Zellen wurde Puromycin (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) in einer Konzentration von 0,3 µg/ml in TeSR™-E8™ (StemCell™ Technologies) verwendet. Die Puromyckonzentration von 0,3 µg/ml zur Selektion erfolgreich elektroporierter Klone, wurde in Vorversuchen als optimal bestimmt. Ein Mediumwechsel wurde täglich durchgeführt.

Sieben Tage nach Puromycinbehandlung wurden einzelne, isolierte Klone manuell gepickt. Die gepickten Kolonien wurden unter Puromygingabe kultiviert und bei 80% Konfluenz subkultiviert.

#### Identifikation der CRISPR/Cas9 editierten iPS Klone E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> und E5 TBX5Flag<sup>het</sup>

Alle nach Elektroporation gepickten Klone wurden durch eine PCR auf den korrekten Einbau der homologen Matrize 5'HA-TBX5 Exon 9 Flag-3'HA überprüft. Die DNA wurde wie unter Punkt 2.4.4.2 beschrieben isoliert. Unter Verwendung spezifisch entwickelter Oligonukleotide, welche zwischen dem Einbau (Transgen, TBX5Flag GT Fwd2/TBX5 Flag GT Rev2) oder der Abwesenheit (Wildtyp, TBX5Flag GT Fwd2/TBX5 Flag GT Rev3) des Konstruktes unterscheiden, wurde eine Amplifikation der genomischen DNA durchgeführt. Die Lage der verwendeten Oligonukleotide zur Unterscheidung von E5 Wildtyp Klonen und E5 TBX5Flag transgenen (heterozygoten/homozygoten) Klonen ist in Abbildung 8B gezeigt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 8 angegeben. Der Ansatz der Amplifikation ist in Tabelle 54 dokumentiert. Die Bedingungen der Reaktion sind in Tabelle 55 gezeigt. Die Amplifikationen wurden auf einem C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH) durchgeführt.

**Tabelle 54: Ansatz zur Amplifikation der Flag Region**

Komponente	Volumen/ Reaktion	Finale Konzentration
FastStart High Fidelity Reaction Buffer, 10x	2 µl	1x; 1,8 mM MgCl <sub>2</sub>
DMSO	1 µl	1%
PCR Grade Nucleotide Mix	0,4 µl	200 µM
Oligonukleotid (forward) 2 µM TBX5Flag GT Fwd2	2 µl	0,2 µM
Oligonukleotid (reverse); 2 µM TBX5Flag GT Rev2 (Transgen)/ Oligonukleotid (reverse); 5 µM TBX5Flag GT Rev3 (Wildtyp)	2 µl	0,2 µM
Matrizen DNA	variabel	100 ng
Water, PCR Grade	auf 20 µl	
FastStart High Fidelity Enzyme Blend (5 U/ µl)	0,2 µl	1 U

**Tabelle 55: Bedingungen der Amplifikation der Flag Region**

	Zyklen	Zeit	Temperatur
Initiale Aktivierung	1	2 min	95°C
Amplifikation	30-40		
Denaturierung		30 s	95°C
Annealing		30 s	60°C
Elongation		60 s	72°C
Finale Elongation	1	10 min	72°C
Kühlung		∞	4°C

Alle Amplifikationsprodukte wurden auf einem Agarosegel (2%) aufgetrennt (siehe Punkt 2.4.4.5). Die Amplifikationsprodukte wurden mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Die Sequenzierungsansätze wurden von der Firma Source BioScience nach Angabe, wie unter Punkt 2.4.8 beschrieben mit den Oligonukleotiden TBX5Flag GT Fwd2 und TBX5Flag GT Rev2/TBX5Flag GT Rev3 durchgeführt.

#### 2.9.4 Charakterisierung der CRISPR/Cas9 editierten iPS Zellen E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> 331

Für die weiteren Arbeiten wurde der mit dem Flag-Tag homozygot editierte Klon E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> 331 ausgewählt und charakterisiert. Der Klon wurde auf morphologische Kriterien untersucht. Die Expression der Pluripotenzmarker *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *NANOG* und *REX1*, wie unter Punkt 2.8.2 beschrieben überprüft. Die editierten iPS Zellen wurden auf karyotypische Anomalien, wie unter Punkt 2.8.2 beschrieben getestet. Immunzytochemische Färbungen der iPS Zellen wurden für TRA1-81, SOX2 und NANOG durchgeführt (siehe Punkt 2.4.9.2). Die sarkomeren Proteine  $\alpha$ -Actinin, Troponin T und die Connexine 40 und 43 wurden immunzytochemisch (siehe Punkt 2.4.9.4) an Tag D14 der gerichteten Differenzierung gefärbt. Die Reifung der CM wurden immunzytochemisch durch Troponin T, MLC2A und MLC2V an Tag D30 und D60 visualisiert (siehe Punkt 2.4.9.4). Die Frequenz der Troponin T-, MLC2A- und MLC2V-positiven CM wurde an Tag D30 und D60 durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Punkt 2.4.10). Ein immunzytochemischer Nachweis für  $\alpha$ -Actinin,  $\alpha$ -MHC, CX40, CX43 und Troponin T wurde an Tag D60 der Differenzierung geführt (siehe Punkt 2.4.9.4).

Der *in vitro* Phänotyp der editierten iPS Zellen wurde in der gerichteten Differenzierung untersucht. Hierfür wurden die iPS Zellen E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> 331 dreimal unabhängig

differenziert (siehe Punkt 2.8.3.2). Für jeden Messzeitpunkt der Differenzierung wurden biologische Duplikate genommen. Die Induktion der Genexpression von *NKX2.5*, *TBX5*, *ISL1* und *TBX20*, *Troponin T* und *NPPA* an den Tagen D6, D8, D10, D14 und D21 über Tag D0 wurde als Mittelwert (n=6) ± Standardfehler angegeben. Als Referenzgen wurde *ACTB* verwendet. Für die Berechnung signifikanter Unterschiede wurde der T-Test für verbundene Stichproben (engl. *paired Student's t-test*) verwendet. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet.

## 2.9.5 Nachweis der Flag Funktionalität

Der Nachweis der Flag Expression wurde auf Genexpressionsebene und auf Proteinebene in der Durchflusszytometrie und Immunzytochemie erbracht.

### 2.9.5.1 Flag Genexpression

Der Klon E5 *TBX5Flag<sup>hom</sup>* 331 wurde gerichtet differenziert. Die Genexpression des Flag-Tags wurde an den Tagen D0, D6, D8, D10, D14 und D21 durch Flag-spezifische Oligonukleotide gemessen. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass das reverse Oligonukleotid an die Flagsequenz bindet. Die Sequenz der verwendeten Oligonukleotide *TBX5 F2141/FlagR2242* ist in Tabelle 9 angegeben.

Da die Expression von *Flag* nur gegeben ist, wenn *TBX5* exprimiert wird wurde die Expression von *TBX5* mit den Oligonukleotiden *TBX5 F888/R953*, deren Sequenz in Tabelle 9 angegeben ist, mit der Expression von *Flag* (*TBX5 F2141/FlagR2242*) verglichen. Die Expression von *Flag* und *TBX5* wurde in drei unabhängigen gerichteten Differenzierung mit biologischen Duplikaten, wie unter Punkt 2.8.3.2 beschrieben, an den Tagen D6, D8, D10, D14 und D21 als Induktion über Tag D0 bestimmt. Als Referenzgen wurde *ACTB* verwendet. Für die Berechnung signifikanter Unterschiede wurde der T-Test für verbundene Stichproben (engl. *paired Student's t-test*) verwendet. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet.

### 2.9.5.2 Western Blot

Der Western Blot, welcher auch als *Immunoblotting* bezeichnet wird, ist eine Technik zur spezifischen Identifizierung von Proteinen aus Proteingemischen. Die Proteine werden, basierend auf ihrem Molekulargewicht gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Spezifische Antikörper detektieren das Zielprotein auf der Membran. Der Ablauf des Western Blots ist wie folgt:

Probenvorbereitung und Bestimmung der Proteinkonzentration → Gelelektrophorese → Transfer der Proteine auf eine Membran → Immundetektion mit spezifischen Antikörpern.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Flag Konstrukt in mit *TBX5<sup>wt</sup>Flag* und *TBX5<sup>mut</sup>Flag* transfizierten HEK 293 Zellen nachgewiesen. Der *TBX5Flag<sup>hom</sup>* CRISPR/Cas9 editierte E5 iPS Klon 331 wurde gerichtet differenziert. Die Expression des Flag Proteins wurde an den Tagen D8, D10 und D12 in der gerichteten Differenzierung überprüft. Als Negativkontrollen wurden

untransfizierte HEK 293 Zellen, der undifferenzierte E5 TBX5Flag Klon 331 und die nicht editierten iPS Zellen E5 mitgeführt.

Zur Isolation der Proteine wurden die Zellen wie folgt lysiert. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und die Zellen mit kaltem 1x D-PBS gewaschen. Die Zellen des E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Klons 331 an Tag D8, D10 und D12 der gerichteten Differenzierung wurden mit TrypLE<sup>TM</sup> Select Enzym 10x (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers abgelöst. Undifferenzierte iPS Zellen wurden mit ReLeSR<sup>TM</sup> (StemCell<sup>TM</sup> Technologies) gewonnen. HEK 293 Zellen wurden durch Abspülen mit 1x D-PBS abgelöst. Die Zellen wurden bei 14.000 x *g* für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 100 µl kaltem RIPA Puffer (Cell Signaling Technology Inc.) nach Angabe des Herstellers aufgenommen. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde eine vollständige Lyse der Zellen sichergestellt. Das Zelllysate wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Eine Zentrifugation für 15 min bei 16.000 x *g* (4°C) führte zur Abtrennung der Proteine im Überstand. Die Proteinkonzentration der Proben wurden mit dem Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit (Pierce Technology, Thermo Fisher Scientific) nach Angabe des Herstellers in einem Infinite<sup>®</sup> 200 PRO (Tecan, Tecan Group AG) unter Verwendung der i-control<sup>TM</sup> Microplate Reader Software, 2.0. (Tecan, Tecan Group AG) bei einer Wellenlänge von 562 nm kolorimetrisch bestimmt. Als Standard wurde das Pierce<sup>TM</sup> Bovine Serum Albumin Standard Ampules (Pierce Technology, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der Standard wurde mit Nuklease-freiem Wasser (*Nuclease Free H<sub>2</sub>O*, Invitrogen<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific) verdünnt. Die Standardreihe wurde in Duplikaten in einem Bereich von 2 µg bis 25 µg Protein angesetzt. Alle Proteinkonzentrationen wurden durch Messungen in Duplikaten bestimmt.

Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurden 50 µg Protein mit 4x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories GmbH) unter Zugabe der reduzierenden Chemikalie β-Mercaptoethanol (Laemmli Sample Buffer/β-Mercaptoethanol 9:1) auf ein Gesamtvolumen von 50 µl gebracht. Die Proben wurden bei 95°C für 5 min in einem Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf) denaturiert. 50 µg reduziertes, denaturiertes Gesamtprotein wurde auf ein Polyacrylamidgel Mini-Protean<sup>®</sup> TGX Stain-Free<sup>TM</sup> Protein Gel (Bio-Rad Laboratories GmbH), welches für die Auftrennung von Proteinen mit einer Größe von 2-400 kDa geeignet ist, aufgetragen. Um eine gleichmäßige Auftrennung der Proteine im Gel zu erreichen, wurde in alle Geltaschen ohne Probe Wasser und Laemmli Sample Buffer gegeben. Als Marker wurde der Color Prestained Protein Standard, Broad Range (New England Biolabs NEB), welcher für die Detektion von Proteinen zwischen 11-245 kDa geeignet ist, verwendet. Die Gele wurden in ein Bio-Rad Mini Protean<sup>®</sup> Tetra Cell System (Bio-Rad Laboratories GmbH) gegeben und mit 1x Tris/Glycine/SDS Buffer (10x Tris/Glycine/SDS Buffer, Bio-Rad Laboratories GmbH) befüllt. Die Gelelektrophorese wurde bei 300 V für 20 min durchgeführt.

Der Transfer der aufgetrennten Proteine erfolgte auf eine 0,2 µm PVDF Membran mit dem Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>TM</sup> Mini PVDF Transfer Pack (Bio-Rad Laboratories GmbH) und wurde unter Verwendung des Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>TM</sup> Transfer Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH) nach Angabe des Hersteller durchgeführt. Nach erfolgtem Proteintransfer wurden verbleibende freie Stellen auf der Membran mit 5%-iger Milchpulverlösung bei RT für 1 h geblockt, sodass

eine weitere Bindung von Proteinen auf der Membran unterbunden wurde. Die Membran wurde zweimal mit VE-Wasser gespült.

Die Detektion des Flag Proteins erfolgte durch Immunkonjugation. Der monoklonalen Maus IgG<sub>2a</sub> Anti-DDK (FLAG) Antikörper (Clone OTI4C5, OriGene Technologies, Inc.) wurde 1:500 in 1x PBS-T mit 3% BSA verdünnt. Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht in einem 50 ml Falcongefäß bei 4°C auf einem Stuart™ Analogue Rocker & Roller Mixer (Sigma-Aldrich, Merck KGaA) mit 33 rpm. Nach drei Waschschrritten mit 1x PBS-T für 5 min bei RT, erfolgte die Inkubation mit einem Reporterenzym-gekoppelten Sekundärantikörper. Die Verwendung eines gekoppelten Sekundärantikörpers, anstelle eines direkt gekoppelten Primärantikörpers wurde gewählt, da der polyklonale Sekundärantikörper an mehrere Fc Bereiche des Primärantikörpers binden kann und es somit zu einer Signalverstärkung durch Gruppierung vieler Reporterenzyme kommt. Der in dieser Arbeit verwendete polyklonale IgG Sekundärantikörper goat-Anti-Mouse IgG H&R (HRP) (Abcam) trägt eine Meerrettichperoxidase (engl. *horseradisch peroxidase*, HRP). Wird der Peroxidase ein geeignetes Substrat angeboten, kommt es zur Chemolumineszenzreaktion und somit zur Bildung von Reaktionsprodukten, die sichtbar gemacht werden können. Der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:100.000 in 2,5%-igem Milchpulver verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT auf einem Heidolph Polymax 1040 Schüttel-& Mischgerät (ProfiLab24 GmbH). Die Membran wurde dreimal für 15 min mit 1x PBS-T gewaschen. Die Chemilumineszenzreaktion wurde mit dem SuperSignal™ West Dura Extend Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific), welches ein Chemilumineszenz-verstärktes (engl. *enhancer*, ECL) HRP-Substrat auf Luminolbasis enthält, nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Die Luminenszenz wurde in einem ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Life Sciences, General Electric Company) unter Verwendung der Software Image Quant LAS 4000 detektiert.

### **2.9.5.3 Durchflusszytometrie**

Die Expression des Flag-Tags des E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Klons 331 wurde am Tag D10 der gerichteten Differenzierung durchflusszytometrisch bestimmt. HEK 293 Zellen, die mit TBX5<sup>wt</sup> Flag transfiziert wurden, wurden ebenfalls durchflusszytometrisch auf die Expression des Flag-Tags untersucht. Die Wildtyp iPS Linie E5, undifferenzierte Zellen des E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Klons 331, untransfizierte HEK 293 Zellen und Fibroblasten wurden als Negativkontrollen mitgeführt. Die Durchflusszytometrie wurde wie bereits beschrieben (siehe Punkt 2.4.10) durchgeführt.

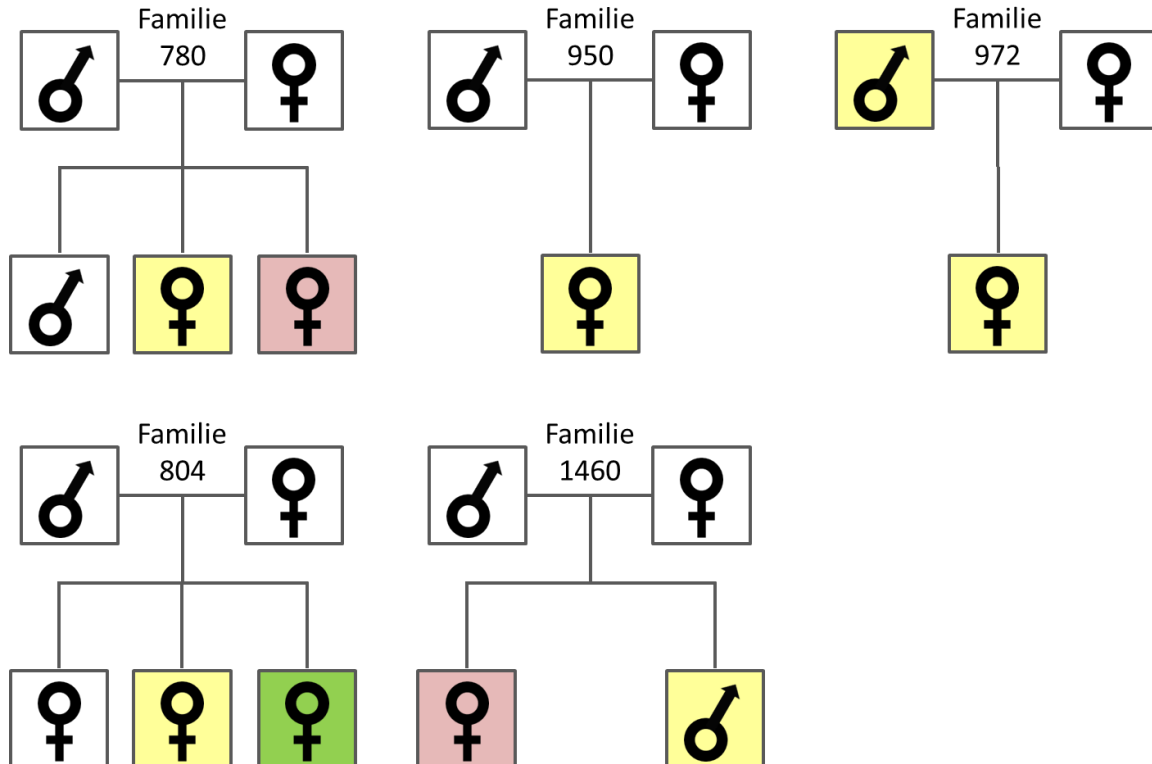
### **2.9.5.4 Immunzytochemie**

Die Expression des Flag Proteins wurde in dem CRISPR/Cas9 editierten iPS Klon E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> 331 am Tag D16 der gerichteten Differenzierung immunzytochemisch wie unter Punkt 2.4.9.3 beschrieben, nachgewiesen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Anamnese der HOS Indexfamilien

In Abbildung 9 sind die Familienstammbäume der HOS Indexpatienten 780, 950, 972, 804 und 1460 dargestellt.



**Abbildung 9: Stammbäume der HOS Indexfamilien 780, 950, 972, 804 und 1460.** Diagnose Holt-Oram Syndrom (HOS): gelb. Diagnose Atriumseptumdefekt (ASD): rosa. Diagnose Analatriesie: grün.

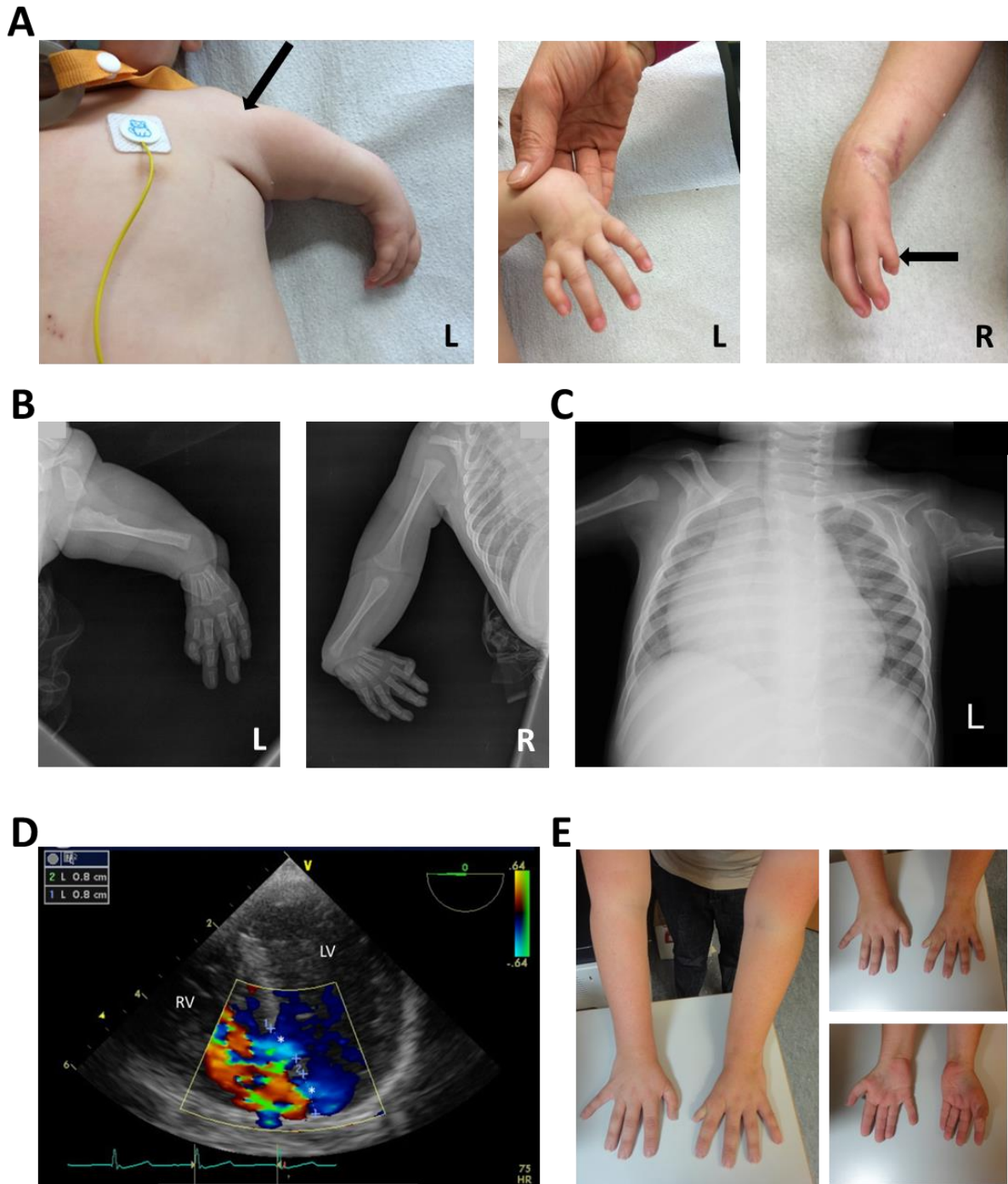
Die HOS Indexpatientin 780 wurde erstmals im Alter von sieben Monaten im Deutschen Herzzentrum München (DHM) vorgestellt. Während dieses Klinikaufenthalts wurde ein Pulmonalarterien-Banding durchgeführt und die Diagnosen multiple, muskuläre Ventrikelseptumdefekte (VSD), pulmonale Hypertonie und der Verdacht auf ein HOS gestellt. Es wurde eine starke Streckung des Gelenks (Hyperextension), bei der sich die Daumen beidseitig in fraglicher Fehlstellung befinden, vermerkt. Die Eltern der Indexpatientin 780 sind phänotypisch gesund, haben keine kardialen Beschwerden und keine offensichtlichen Missbildungen der oberen Extremitäten. Der Bruder der Indexpatientin ist gesund. Die Schwester hat einen Vorhofseptumdefekt (ASD).

Die HOS Indexpatientin 950 ist das einzige Kind phänotypisch gesunder Eltern und wurde erstmals im Alter von 41 Jahren im DHM auf Grund von rezidivierendem Vorhofflattern, bei bekanntem HOS, aufgenommen. Zu diesem Zeitpunkt wurden eine Mitralklappeninsuffizienz, eine eingeschränkte linksventrikuläre Funktion und eine mittelgradige Trikuspidalklappeninsuffizienz diagnostiziert. Im Alter von sieben Jahren wurde ein ASD vom Secundum-Typ (ASD II) mittels eines herzchirurgischen Eingriffes verschlossen. Die HOS Indexpatientin 972 ist das einzige Kind einer phänotypisch gesunden Mutter und eines Vaters mit diagnostiziertem HOS. Bereits im Alter von zwei Monaten wurde ein



Ductusverschluss und ein Pulmonalarterien-Banding in der Universitätsklinik Erlangen durchgeführt. Die Indexpatientin wurde im Alter von drei Jahren und sieben Monaten im DHM mit den Diagnosen multiple muskuläre VSD, valvuläre Pulmonalstenose, ASD und atrioventrikulärer Block (AV-Block) Grad I aufgenommen. Im DHM wurde der Patchverschluss des VSDs über einen transventrikulären Zugang, das Debanding der Pulmonalarterie, eine Patcherweiterung der zentralen Pulmonalarterie und eine Pulmonalklappenkommissurotomie durchgeführt. Die Indexpatientin leidet an einer Aplasie des linken Daumens und einer rechtsseitigen Syndactylie des I./II. Fingers. Eine Hyperplasie des ersten Strahls an beiden Armen ist vorhanden.

Für die HOS Indexpatientin 804 und den HOS Indexpatienten 1460 konnte das Krankheitsbild dokumentiert werden und ist in Abbildung 10 gezeigt. Der HOS Indexpatient 1460 ist das Kind phänotypisch gesunder Eltern und wurde im Alter von 14 Monaten erstmals mit den kardialen Diagnosen „Swiss cheese“ VSD, persistierendem Foramen ovale (PFO), Trikuspidalklappeninsuffizienz Grad III bei vorliegendem HOS, vorgestellt. Der Indexpatient hat ausgeprägte Missbildungen der oberen Extremitäten, die wie folgt diagnostiziert sind: Hypoplasie des linken Oberarms, radiale Flexion der beiden Hände, Daumen Agenesie auf der rechten Seite, Daumendeformation an der linken Seite und Aplasie der Radialis auf der rechten Seite (Abb. 10A und B). Bereits im Alter von zehn Monaten wurde in der Universitätsklinik Repro im Department für Pädiatrische Kardiologie (Zagreb, Kroatien) ein Pulmonalarterien-Banding durchgeführt. Im Alter von 14 Monaten wurden im DHM ein transatrialer und transventrikulärer VSD-Patchverschluss, ein Debanding und Re-Banding bei weiterem Rest-VSD und eine Trikuspidalklappenplastik, sowie der PFO Verschluss durchgeführt. Im Alter von 19 Monaten wurde der Indexpatient ein weiteres Mal im DHM aufgenommen. Es wurde ein erneuter VSD-Patchverschluss, ein Debanding der Pulmonalarterie und eine zweite Trikuspidalklappenplastik durchgeführt. Der Herz/Thorax-Quotient dient zur Beurteilung der Herzgröße und wurde für den Indexpatienten 1460 mit 0,75 bestimmt. Da der Quotient größer als 0,5 ist, was als Normalreferenz bei gesunden Personen angegeben wird, wurde eine Kardiomegalie diagnostiziert (Abb. 10C). In Abbildung 10D sind echokardiographisch die VSD des Patienten vor dem zweiten herzchirurgischen Eingriff am DHM mit einem Durchmesser von 0,8 cm dargestellt. Bezüglich der Missbildungen der oberen Extremitäten wurde eine Zentralisierung der rechten Hand durch Platzierung eines Drahtes durch Ulna und Os metacarpalis III durchgeführt. Der Indexpatient 1460 hat eine Schwester bei der ein ASD diagnostiziert ist. Die HOS Indexpatientin 804 ist die Tochter phänotypisch gesunder Eltern. Die Patientin stellte sich im Alter von 26 Jahren im DHM vor. Es wurde ein perimembranöser VSD bei vorhandenem HOS diagnostiziert. Bereits im Alter von sechs Jahren wurden in Monaco ein direkter VSD-Verschluss und eine Resektion der subinfundibulären Pulmonalstenose durchgeführt. An beiden Händen sind Fehlbildungen ersichtlich (Abb. 10E). Die Indexpatientin 804 hat eine phänotypisch gesunde Schwester und eine Schwester, bei der eine Analatresie vorliegt. Im Familienstammbaum wird von einem männlichen Vorfahren in der fünften Generation zurück berichtet, der eine Missbildung der Hand aufwies. Diese Missbildung ist in der Familiengeschichte nicht näher beschrieben.



**Abbildung 10: Dokumentation des Krankheitsbildes der HOS Indexpatienten 1460 und 804. (A)** Missbildungen der oberen Extremitäten des Indexpatienten 1460. **(B)** Röntgenbilder der oberen Extremitäten des Indexpatienten 1460. **(C)** Röntgenbild des Thorax des Indexpatienten 1460. **(D)** Echokardiogramm des Indexpatienten 1460 mit Darstellung der Ventrikelseptumdefekte (VSD). \* zeigt die Position der VSD. **(E)** Darstellung der Missbildungen der oberen Extremitäten der Indexpatientin 804. L: links. R: rechts. RV: rechter Ventrikel, LV: linker Ventrikel. Adaptiert Dreßen *et al.*, 2016. © 2016 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals, Inc.

### 3.2 Genetische Untersuchungen der HOS Indexpatienten und ihrer Verwandten ersten Grades

Da über 70% der diagnostizierten Holt-Oram Syndrome auf eine Mutation im *T-BOX 5* Gen (*TBX5*) zurückzuführen sind (Lichiardopol *et al.*, 2007), wurden genetische Untersuchungen der HOS Indexpatienten und ihrer Eltern durchgeführt. In Abbildung 11A ist der Workflow der genetischen Untersuchungen der HOS Indexpatienten dargestellt.

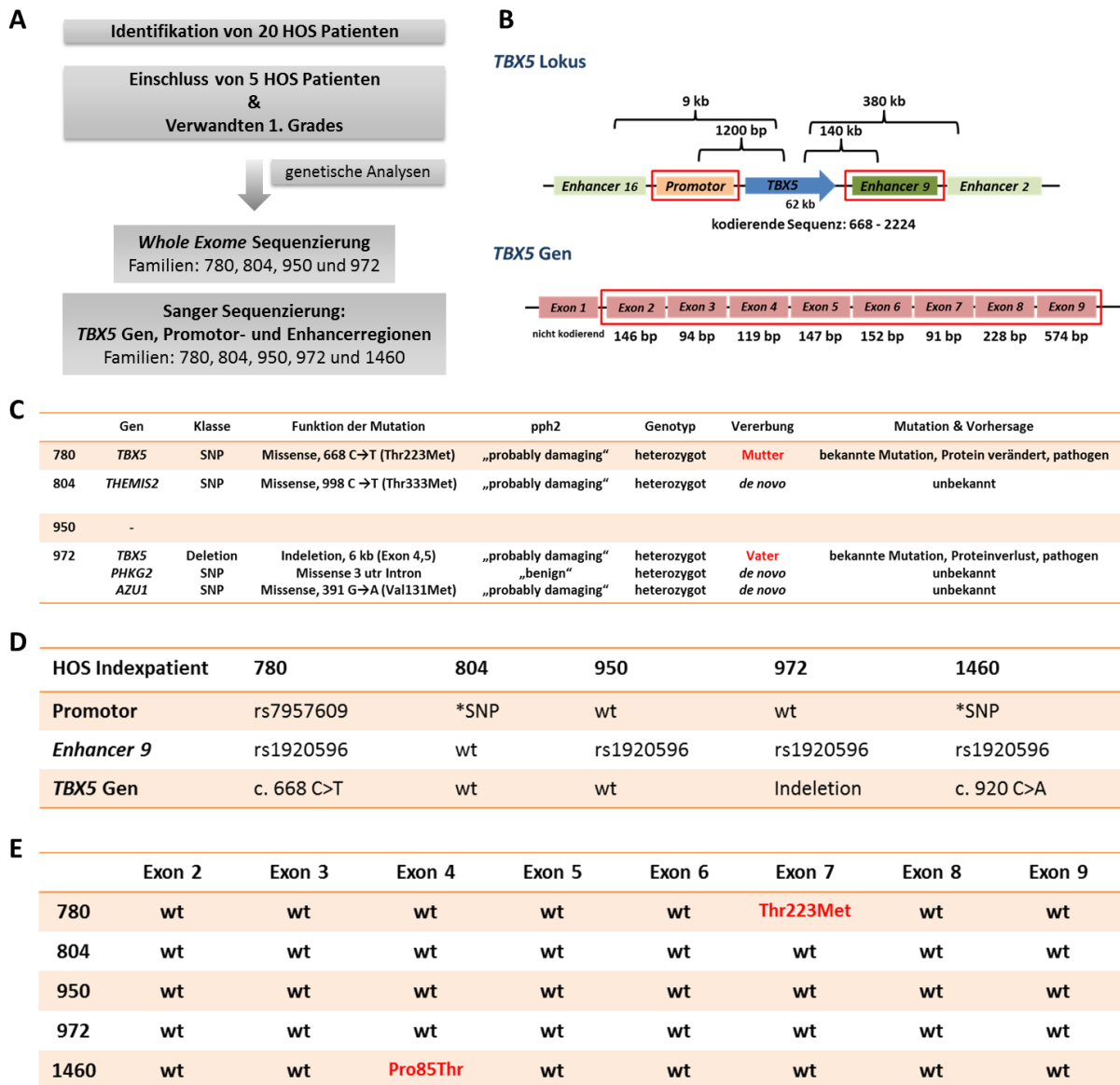
Von 20 in der kardiovaskulären Biobank des Deutschen Herzzentrums Münchens (KaBi-DHM) identifizierten HOS Patienten konnten fünf Indexpatienten und ihre Verwandten ersten Grades (Vater, Mutter) in weiterführende Untersuchungen eingeschlossen werden. Die Indexpatienten 780, 950, 972 und 804 wurden zur Identifizierung genetischer Veränderungen in kodierenden Bereichen des Genoms einer Exom Sequenzierung (WES) in Kooperation mit Prof. Dr. T. Meitinger (Helmholtz Zentrum München, *German Research Center for Environmental Health Institute of Human Genetics*, Neuherberg, Deutschland) unterzogen. Die Auswertungen wurden im Institut für Integrative und Experimentelle Genomik an der Universität zu Lübeck durchgeführt. Für die Familie 1460 wurde keine WES durchgeführt, da dieser Indexpatient und seine Familie erst zu einem späteren Zeitpunkt in die KaBi-DHM eingeschlossen wurden. Für alle fünf Indexpatienten wurden die kodierenden Bereiche des *TBX5* Gens, wie auch regulatorische Regionen des *TBX5* Locus sequenziert, um genetische Veränderungen, die in der Literatur als beeinflussend für die Expression des *TBX5* Gens beschrieben sind, zu überprüfen.

*TBX5* ist ein Transkriptionsfaktor (TF), der auf dem langen Arm des Chromosoms 12 lokalisiert ist (12q24.1). Der Aufbau des *TBX5* Gens und die Lage des Gens in Korrelation zu den, in dieser Arbeit untersuchten *Enhancer*- und Promotorregionen ist in Abbildung 11B schematisch dargestellt. Das *TBX5* Gen ist 62 Kilobasen (kb) groß und aus 9 Exonen aufgebaut, von denen die Exone 2 bis 9 kodierend sind. In Abbildung 11B ist die Länge der kodierenden Exone in Basenpaaren (bp) angegeben. Es existieren mehrere Isoformen von *TBX5*, wobei die Isoform 1 (NM\_00192) mit einer mRNA Länge von 3921 bp als längste Isoform in der Datenbank *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) hinterlegt ist. Die kodierende Sequenz des *TBX5* Gens liegt zwischen den Nukleotidpositionen 668 und 2224. Der Transkriptionsfaktor *TBX5* spielt in der Entwicklung des Herzens und der oberen Extremitäten eine wichtige Rolle (Takeuchi *et al.*, 2003; Liberatore *et al.*, 2000). Mutationen im *TBX5* Gen sind heterozygot beschrieben und in den allermeisten Fällen mit dem Auftreten von HOS assoziiert (Bruneau *et al.*, 1999; Basson *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997b; Holt & Oram, 1960), sodass ein dosis-abhängiger Einfluss von *TBX5* postuliert wird.

#### 3.2.1 Identifikation von *de novo* Mutationen in Patienten mit HOS

Eine WES zeigt genetische Veränderungen wie Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP), die mit einer Frequenz von über 1% in der Bevölkerung definiert sind, Mutationen, Deletionen, Insertionen und Indeletionen der Probanden an. Bei einer vergleichenden WES zwischen Eltern und Kind können identifizierte genetische Veränderungen eindeutig auf die Vererbung durch Mutter und/oder Vater zurückgeführt

werden. Eine vergleichende WES zwischen Eltern und Kind identifiziert zudem genetische Veränderungen, die im Kind neu auftreten und nicht durch Vater oder Mutter vererbt sind. Diese *de novo* auftretenden Varianten im „betroffenen“ Kind können bei phänotypisch gesunden Eltern als genetische Ursache für die Entwicklung einer Erkrankung in Betracht gezogen werden.



**Abbildung 11: Genetische Analysen der HOS Indexfamilien. (A)** Workflow zum Einschluss der fünf HOS Indexfamilien. **(B)** Schematische Genkarte des *TBX5* Locus, des Promotors und der *Enhancer*. Aufbau des *TBX5* Gens mit allen Exonen. **(C)** Ergebnisse der gefundenen *de novo* Mutationen in der Exom Sequenzierung (WES) der HOS Indexpatienten 780, 804, 950 und 972. **(D)** Überblick der gefundenen Varianten im *TBX5* Gen und den untersuchten Bereichen des *TBX5* Promotors und des *Enhancers* 9. Alle amplifizierten Bereiche des Promotors und *Enhancers* wurden in 5′→3′ und 3′→5′ Richtung sequenziert. **(E)** Darstellung der Ergebnisse der Sanger Sequenzierung der kodierenden Exone des *TBX5* Gens der fünf HOS Indexpatienten. Alle Amplifikationsprodukte wurden in 5′→3′ und 3′→5′ Richtung sequenziert. \*SNP: nicht in der Literatur beschriebener Einzelnukleotidpolymorphismus, engl. *single nucleotide polymorphism*. wt: Wildtyp.

Die HOS Indexpatientin 780 zeigt eine heterozygote Mutation im *TBX5* Gen (NC\_000012.12), die von der Mutter vererbt wurde. Da die Mutter phänotypisch gesund ist, wurde eine

zusätzliche DNA Probe aus „zweiter Quelle“ (Speichelprobe) untersucht, sodass die Mutter gesichert als Mosaikträgerin der Mutation verifiziert werden konnte. Die identifizierte Mutation c.668 C>T liegt heterozygot vor, führt zu einem Aminosäureaustausch an Position 223 (Thr223Met) und ist als *Missense* Mutation klassifiziert und beschrieben (Brassington *et al.*, 2003).

Die HOS Indexpatientin 804 hat eine *Missense* Mutation im Gen *Thymocyte selection associated family member 2* (*THEMIS2*, NC\_000001.11). Die identifizierte Mutation c.998 C>T liegt heterozygot vor und führt zu einem Aminosäureaustausch an Position 333 von Threonin zu Methionin.

Die WES identifizierte keine *de novo* Mutation für die HOS Indexpatientin 950.

Die HOS Indexpatientin 972 trägt zwei *de novo* Mutationen und eine 6 kb große Deletion im *TBX5* Gen, welche heterozygot vorliegt und durch den Vater vererbt wurde. Die Mutationen in den Genen *Phosphorylase kinase catalytic subunit gamma 2* (*PHKG2*, NC\_000016.10) und *Azurocidin1* (*AZU1*, NC\_000019.10) liegen heterozygot vor. Die *de novo* Mutation im *PHKG2* Gen ist in der 3`untranslatierten Region im Intron lokalisiert und als benigne eingestuft. Die Mutation im *AZU1* Gen ist eine *Missense* Mutation an Position c.391G>A und führt zu einem Aminosäureaustausch an Position 131 von Valin zu Methionin. Die identifizierten *de novo* Mutationen und vorhandene Mutationen im *TBX5* Gen der vier HOS Indexpatienten sind in Abbildung 11C zusammengefasst und charakterisiert.

### **3.2.2 Genotypisierung des *TBX5* Lokus der HOS Indexpatienten 780, 950, 972, 804 und 1460**

Regulatorische Regionen im *TBX5* Lokus, wie *Enhancer* und Promotoren steuern die Expression von *TBX5*. Genetische Varianten in diesen regulatorischen Elementen können daraus resultierend zu Veränderungen der *TBX5* Expression führen. Aus diesem Grund wurden genetische Varianten in regulatorischen Bereichen des *TBX5* Gens, die in der Literatur mit einer veränderten Genexpression beschrieben sind, untersucht. Die Promotorregion des *TBX5* Gens wurde in Anlehnung an die Publikation von Shan und Kollegen (Shan *et al.*, 2012) sequenziert. In dieser Arbeit wurden zwei heterozygote Varianten (g.4303C>G, g.4900C>T; *Genebank accession no.* NG\_007373) in der Promotorregion von Patienten mit VSD identifiziert, die nicht in gesunden Kontrollen gefunden wurden. Funktionelle Untersuchungen zeigten, dass die identifizierten Varianten die Aktivität des Promotors beeinflussten (Shan *et al.*, 2012). In der Arbeit von Smemo und Kollegen wird ein SNP in der Region des *cis*-regulatorischen Elements (engl. *cis-regulatory element*, CES) Enhancer 9 beschrieben (hg19, chr12:114704515, G>T), der in einem Patienten mit VSD homozygot gefunden wurde (Smemo *et al.*, 2012). Diese Variante führte sowohl im Mausmodell, wie auch im Zebrafischmodell zu einer veränderten Regulationsaktivität (Smemo *et al.*, 2012).

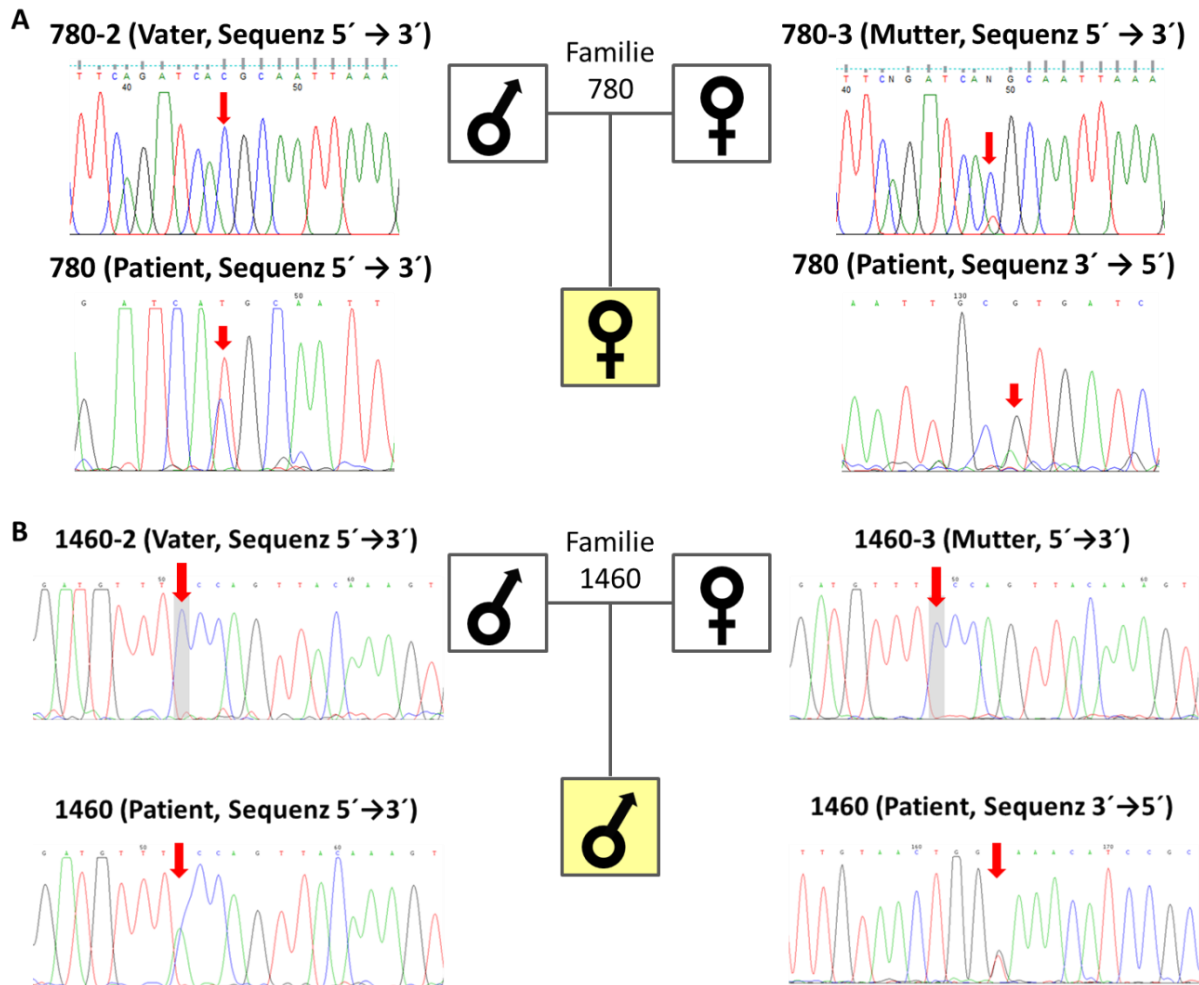
Die sequenzierten Bereiche des *TBX5* Promotors zeigten für die Indexpatientin 780 den SNP g.4112C>T (rs7957609) heterozygot vorliegend. Diese Variante ist in der Arbeit von Shan mit gleich auftretender Frequenz bei Patienten mit VSD und gesunden Kontrollen beschrieben

(Shan *et al.*, 2012). In den Indexpatienten 804 und 1460 wurde ein weiterer SNP an der genomischen Position chr12:114846292 (Chromosom 12, hg19) gefunden. Beide Patienten tragen die heterozygote Variante G>A. Die Indexpatientinnen 950 und 972 zeigten in den sequenzierten Bereichen des *TBX5* Promotors keine Varianten. Keine der Varianten, die in der Arbeit von Shan mit veränderter Regulation identifiziert wurden, konnten in den fünf HOS Indexpatienten nachgewiesen werden.

In den HOS Patienten 780, 950, 972 und 1460 wurde eine Variante an der chromosomalen Position chr12:114704412 (Chromosom 12, hg19) mit der rs-Nummer 1920596 in der Sequenz des *Enhancers 9* gefunden, die als häufige Genvariante beschrieben ist (Smemo *et al.*, 2012). Die Indexpatientin 804 zeigte in den sequenzierten Bereichen des *Enhancers 9* keine Varianten. Die in der Arbeit von Smemo und Kollegen gefundene Variante im *Enhancer 9* (hg19, chr12:114704515, G>T), welche eine veränderte Regulationsaktivität für *TBX5* zeigte, wurde in keinem der HOS Indexpatienten identifiziert. In Abbildung 11D sind die Ergebnisse der Sequenzierungen für die untersuchte Promotorregion und die untersuchte Region des *Enhancers 9* zusammengefasst.

Alle HOS Indexpatienten wurden auf genetische Varianten in den kodierenden Bereichen des *TBX5* Gens mittels Sanger Sequenzierung untersucht. Für die Indexpatienten, die einer WES unterzogen wurden, diente die Sanger Sequenzierung zur Validierung der gefundenen Ergebnisse. Für den Indexpatienten 1460, bei dem keine WES durchgeführt wurde, diente die Sanger Sequenzierung zur Identifikation einer potentiell vorliegenden *TBX5* Mutation. Die Ergebnisse der Sanger Sequenzierung der Indexpatienten 780, 804, 950, 972 und 1460 sind in Abbildung 11D und E zusammengefasst.

Für die Indexpatientin 780 und den Indexpatienten 1460 ist die Identifikation der *TBX5* Mutation in Abbildung 12 gezeigt. Für die Indexpatientin 780 wurde die bereits in der WES identifizierte Mutation c.668 C>T im Exon 7, welche zum Aminosäureaustausch von Threonin zu Methionin an der Aminosäureposition 223 (Thr223Met) führt, verifiziert. Für die Indexpatientin 780 sind die Chromatogramme (5'→3' und 3'→5') für den Bereich der Mutation in Abbildung 12A gezeigt. Für die Eltern der Indexpatientin 780 (Vater: 780-2, Mutter: 780-3) sind exemplarisch die Ergebnisse der Sequenzierung in 5'→3' Richtung als Ausschnitte des Chromatogramms dargestellt (Abb. 12A). Die Mutter 780-3 wurde als Trägerin der Mutation validiert (Abb. 12A). Der Vater 780-2 trägt keine Mutation an dieser Position (Abb. 12A). Für den Indexpatienten 1460 konnte eine Mutation im Exon 4 an Position c.920C>A identifiziert werden (Abb. 12B). Die Mutation liegt heterozygot vor und tritt *de novo* auf. Beide Elternteile (Vater: 1460-2, Mutter: 1460-3) tragen die Wildtypsequenz für *TBX5*. Für die Eltern des Indexpatienten 1460 sind die Ergebnisse der Sequenzierung in 5'→3' Richtung als Ausschnitte des Chromatogramms dargestellt (Abb. 12B). Die gefundene Mutation c.920C>A führt zu einem Aminosäureaustausch an Position 85 von Prolin zu Threonin (Pro85Thr).



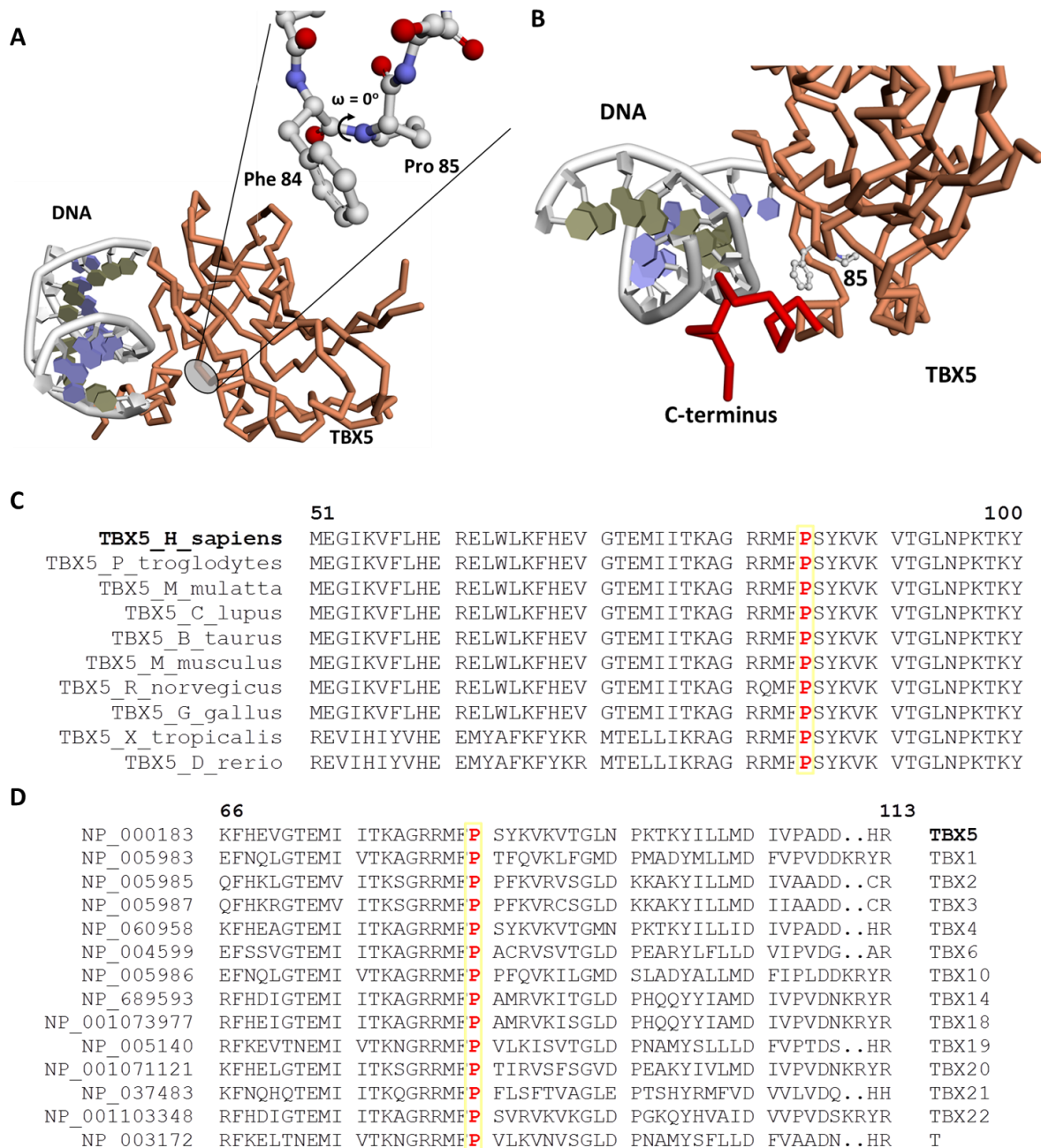
**Abbildung 12: Identifikation der *TBX5* Mutationen der HOS Indexpatienten 780 und 1460. (A)** Chromatogramm des Exons 7 der Indexpatientin 780 und der Eltern 780-2 (Vater) und 780-3 (Mutter). Identifikation der Mutation c.668\_C>T der Indexpatientin 780 und der Mutter 780-3 als Trägerin der Mutation. Das Chromatogramm des Vaters (780-2) identifiziert den Vater als Wildtyp für die gefundene Mutation. Die identifizierte Mutation (c.668\_C>T) führt zum Aminosäureaustausch Thr223Met. Rote Pfeile markieren die gefundene Mutation bzw. die entsprechende Position in der Wildtyp Sequenz. Für die Indexpatientin sind die Chromatogramme der Sequenzierungen in 5'→3' und in 3'→5'Richtung gezeigt. Für die Eltern der Indexpatientin sind die Chromatogramme exemplarisch in 5'→3' Richtung gezeigt. **(B)** Chromatogramm des Exons 4 des Indexpatienten 1460 und der Eltern 1460-2 (Vater) und 1460-3 (Mutter). Identifikation der *de novo* *TBX5* Mutation c.920\_C>A des Indexpatienten 1460. Darstellung der Eltern des Indexpatienten als Wildtyp für die Position c.920. Die gefundene *de novo* Mutation führt zum Aminosäureaustausch Pro85Thr. Für den Indexpatienten 1460 sind die Chromatogramme der Sequenzierungen in 5'→3' und in 3'→5'Richtung gezeigt. Für die Eltern des Indexpatienten sind die Chromatogramme exemplarisch in 5'→3' Richtung gezeigt. Rote Pfeile markieren die gefundene Mutation bzw. die entsprechende Position in der Wildtyp Sequenz. Adaptiert Dreßen *et al.*, 2016. © 2016 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals, Inc.

### 3.3 Charakterisierung der neu identifizierten *de novo* Mutation p.Pro85Thr des HOS Indexpatienten 1460 im *TBX5* Protein

Die im Indexpatienten 1460 gefundene *de novo* Mutation war zum Zeitpunkt der Verifikation nicht in der Literatur beschrieben oder in den entsprechenden Datenbanken hinterlegt. Aus diesem Grund wurde die Mutation genauer untersucht und die Ergebnisse konnten erfolgreich publiziert werden (Dreßen *et al.*, 2016).

### 3.3.1 3-dimensionale Strukturanalyse der TBX5-DNA Interaktion und Relevanz der Position Prolin an Aminosäureposition 85 des TBX5 Proteins

Unter Verwendung der Datenbank *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics – Protein Data Bank* (RCSB PDB) (Berman *et al.*, 2000) und der Software *Discovery Studio Visualizer 4.5* wurde die dreidimensionale Struktur der TBX5-DNA Interaktion dargestellt (Abb. 13A und B).



**Abbildung 13: Charakterisierung der p.Pro85Thr Mutation des Indexpatienten 1460. (A)** Drei-dimensionale Struktur der TBX5-DNA Interaktion. Darstellung der p.85Pro Region und die daraus resultierenden *cis-peptide* Bindung. **(B)** Detailaufnahme der Phe84-Pro85 Bindung und des TBX5 C-Terminus mit Interaktion in der DNA-Bindung. **(C)** Darstellung der hochkonservierten Aminosäureposition 85 für Prolin über die Speziesgrenzen. **(D)** Darstellung der konservierten Aminosäureposition 85 in der die *T-Box* Genfamilie. Adaptiert Dreßen *et al.*, 2016. © 2016 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals, Inc.



Liegt das TBX5 Protein als Wildtyp vor, wird durch die Aminosäuren Phenylalanin an Position 84 und Prolin an Position 85 eine seltene *cis-peptide* Konformation ausgebildet, welche mit einer Frequenz von unter 0,3% in Proteinstrukturen auftritt. Der dabei ausgebildete Torsionswinkel  $\omega$  zwischen den zwei Aminosäuren Phenylalanin und Prolin liegt bei  $0^\circ$  (Abb. 13A und B). In mehr als 90% dieser selten auftretenden *cis-peptide* Konformation liegt die Aminosäure Prolin vor. Die Abfolge der *cis-peptide* Konformation ist dabei Xaa-Pro, wobei Xaa jede beliebige Aminosäure sein kann. Die Mutation c.920C>A im *TBX5* Gen führt zu einem Aminosäureaustausch von Prolin nach Threonin (p.Pro85Thr) und wirkt sich auf die räumliche Struktur des Proteins aus. Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit kann der Torsionswinkel  $\omega = 0^\circ$  nicht mehr ausgebildet werden und die in Proteinen weitverbreitete *trans-peptide* Konformation, bei der ein Torsionswinkel  $\omega$  mit  $180^\circ$  vorliegt, wird an dieser Position im Protein eingenommen. Die Veränderung der Konformation führt zu einer lokalen, bzw. überregionalen veränderten Proteinfaltung und somit sehr wahrscheinlich zur Beeinflussung der Proteinfunktion.

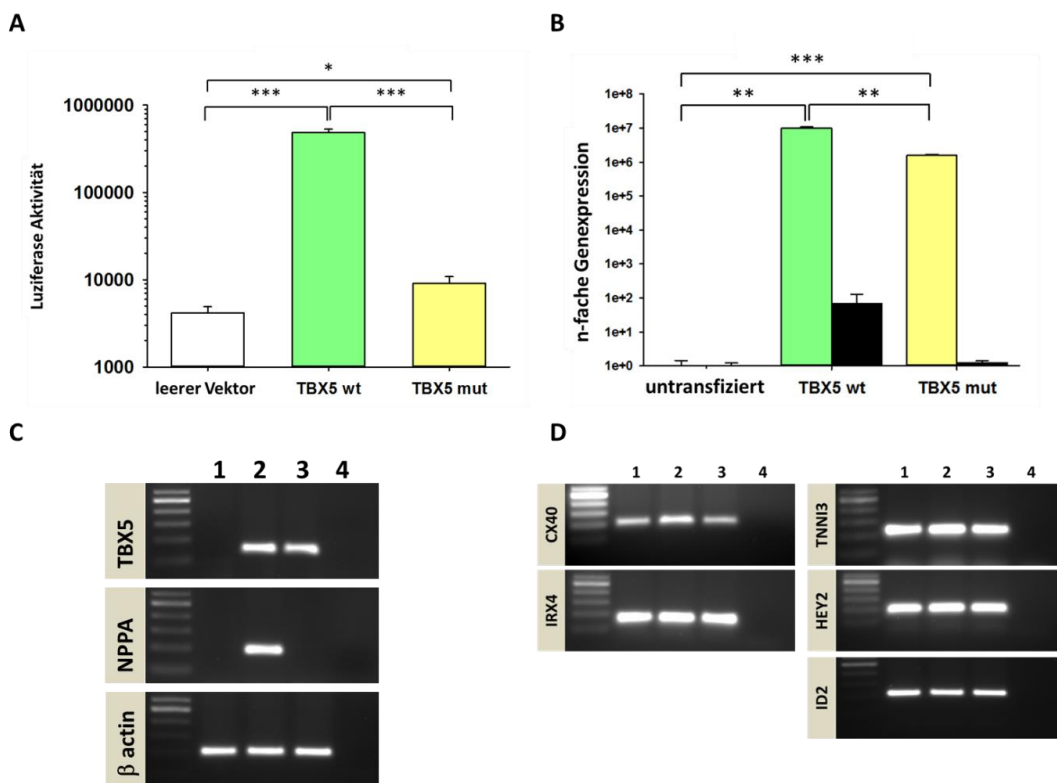
Ein Vergleich der Aminosäureabfolge des TBX5 Proteins über verschiedene Spezies zeigte, dass die Aminosäure Prolin an Position 85 hochkonserviert ist und über die Klasse der Säugetiere (Mammalia) hinaus erhalten ist (Abb. 13C). Die Aminosäureposition 85 mit Prolin an dieser Position ist auch innerhalb der T-Box Genfamilie hochkonserviert (Abb. 13D).

Der Einfluss der Mutation p.Pro85Thr auf die Funktion des Proteins wurde mit den Programmen PolyPhen-2 und Mutation Taster vorhergesagt. Das Programm PolyPhen-2 beurteilt Substitutionen von Aminosäuren in humanen Proteinen bezüglich der Struktur und Funktion des Proteins. Die Bewertung der Vorhersage liegt dabei in einem Intervall von 1-1.000, wobei 1.000 als hohe Sicherheit für die Bewertung eingestuft wird. Das Programm PolyPhen-2 schätzt die Funktion des mutierten Proteins als „damaging“ mit einer Wertung von 1.000 ein. Das Programm MutationTaster wurde ebenfalls zur Beurteilung des Aminosäureaustausches p.Pro85Thr verwendet. Es wurde eine krankheitsauslösende Veränderung des Proteins mit einer Wertung von 0,999 voraus. Ein Wert von 1 gibt dabei eine hohe Sicherheit für die Bewertung der Veränderung an.

### **3.3.2 Auswirkungen der p.Pro85Thr Mutation auf die Aktivierung des *NPPA* Promotors**

Das atriale natriuretische Peptid (ANP) ist ein Peptidhormon, das unter anderem von Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) des Vorhofs (Atrium) ausgeschieden wird. Es wird durch das Gen *NPPA* (engl. *natriuretic peptide A*, NM\_006172) kodiert, welches ein bekanntes Zielgen des Transkriptionsfaktors TBX5 ist (Hiroi *et al.*, 2001). Um die funktionale Aktivität der p.Pro85Thr TBX5 Mutante zu verifizieren, wurde die Aktivität des Wildtyp TBX5 (TBX5<sup>wt</sup>) bzw. des mutierten TBX5 (TBX5<sup>mut</sup>) auf den *NPPA*-Promotor in einem Luziferase-Assay gemessen. Die Mutation c.920C>A wurde unter Verwendung eines PCR-basierenden *site-directed Mutagenesis Kits* in den Expressionsvektor pAW48 (backbone pcDNA3.1) eingebracht, welcher die Wildtypsequenz des *TBX5* Gens und eine FLAG Sequenz vor der *TBX5* Sequenz trägt. Eine Sanger Sequenzierung verifizierte die Wildtyp bzw. mutierte

Sequenz des *TBX5* in den entsprechenden Expressionsvektoren. Das Reporterplasmid (pALI-Lva/ANF-luciferase) enthielt den *NPPA* Promotor, welcher die Luziferaseaktivität reguliert. HEK 293 Zellen wurden mit den Expressionsvektoren *TBX5*<sup>wt</sup>/ *TBX5*<sup>mut</sup>/ leerer Vektor und dem Reporterplasmid mittels FuGENE HD transfiziert. In Abbildung 14A ist die Luziferaseaktivität dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass *TBX5*<sup>wt</sup> zu einer mehr als 100-fachen, signifikanten Aktivierung der Luziferase im Vergleich zur Transfektion mit dem leeren Expressionsvektor ( $p < 0,001$ ) führt. Die Transfektion der mutierten *TBX5* Variante *TBX5*<sup>mut</sup> (p.Pro85Thr) führte zu einer um mehr als 95% reduzierten Aktivität der Luziferase im Vergleich zum Wildtyp *TBX5*<sup>wt</sup> ( $p < 0,001$ ). Diese geringe Aktivität ist mit der gemessenen Aktivierung, induziert durch den leeren Expressionsvektor vergleichbar.



**Abbildung 14: Funktionelle Analyse der p.Pro85Thr Mutation im *TBX5* Gen. (A)** Aktivierung der *NPPA*-Promotor gesteuerten Luziferaseaktivität in HEK 293 Zellen. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (4 unabhängige Experimente, biologische Triplikate). pAW48 Vektor leer (weißer Balken). *TBX5*<sup>wt</sup> (grüner Balken). *TBX5*<sup>mut</sup> (gelber Balken). \* $P < 0,05$ . \*\*\* $P < 0,001$ . **(B)** Ergebnisse der qRT-PCR Analyse der *TBX5* (NM\_000192) und *NPPA* (NM\_006172) Expression in HEK 293 Zellen. Die Genexpression wurde nach Normalisierung mit *ACTB* (NM\_001101) als interne Kontrolle berechnet. Darstellung der Ergebnisse aus Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (2 unabhängige Experimente, biologische Duplikate). *TBX5*<sup>wt</sup> (grüner Balken). *TBX5*<sup>mut</sup> (gelber Balken). *NPPA* (schwarzer Balken). \*\* $P < 0,01$ . \*\*\* $P < 0,001$ . **(C)** Induktion der *NPPA* Expression in HEK 293 Zellen nach Transfektion mit *TBX5*<sup>wt</sup> und *TBX5*<sup>mut</sup>. 1: untransfizierte HEK 293 Zellen. 2: *TBX5*<sup>wt</sup>. 3: p.Pro85Thr *TBX5* (*TBX5*<sup>mut</sup>). 4: Negativkontrolle. Zur Bestimmung der Größe der Amplifikationsprodukte wurde die *GeneRuler*<sup>TM</sup> 50bp DNA Ladder verwendet. **(D)** Effekte auf die Expression von *TBX5* Zielgenen: *CX40* (NM\_005266), *IRX4* (NM\_001278635), *TNNI3* (NM\_000363), *HEY2* (NM\_012259) und *ID2* (NM\_002166.4) nach Transfektion mit *TBX5*<sup>wt</sup> und *TBX5*<sup>mut</sup> in HEK 293 Zellen. 1: untransfizierte HEK 293 Zellen. 2: *TBX5*<sup>wt</sup>. 3: p.Pro85Thr *TBX5* (*TBX5*<sup>mut</sup>). 4: Negativkontrolle. Zur Bestimmung der Größe der Amplifikationsprodukte wurde die *GeneRuler*<sup>TM</sup> 50bp DNA Ladder verwendet. Adaptiert Dreßen *et al.*, 2016. © 2016 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals, Inc.

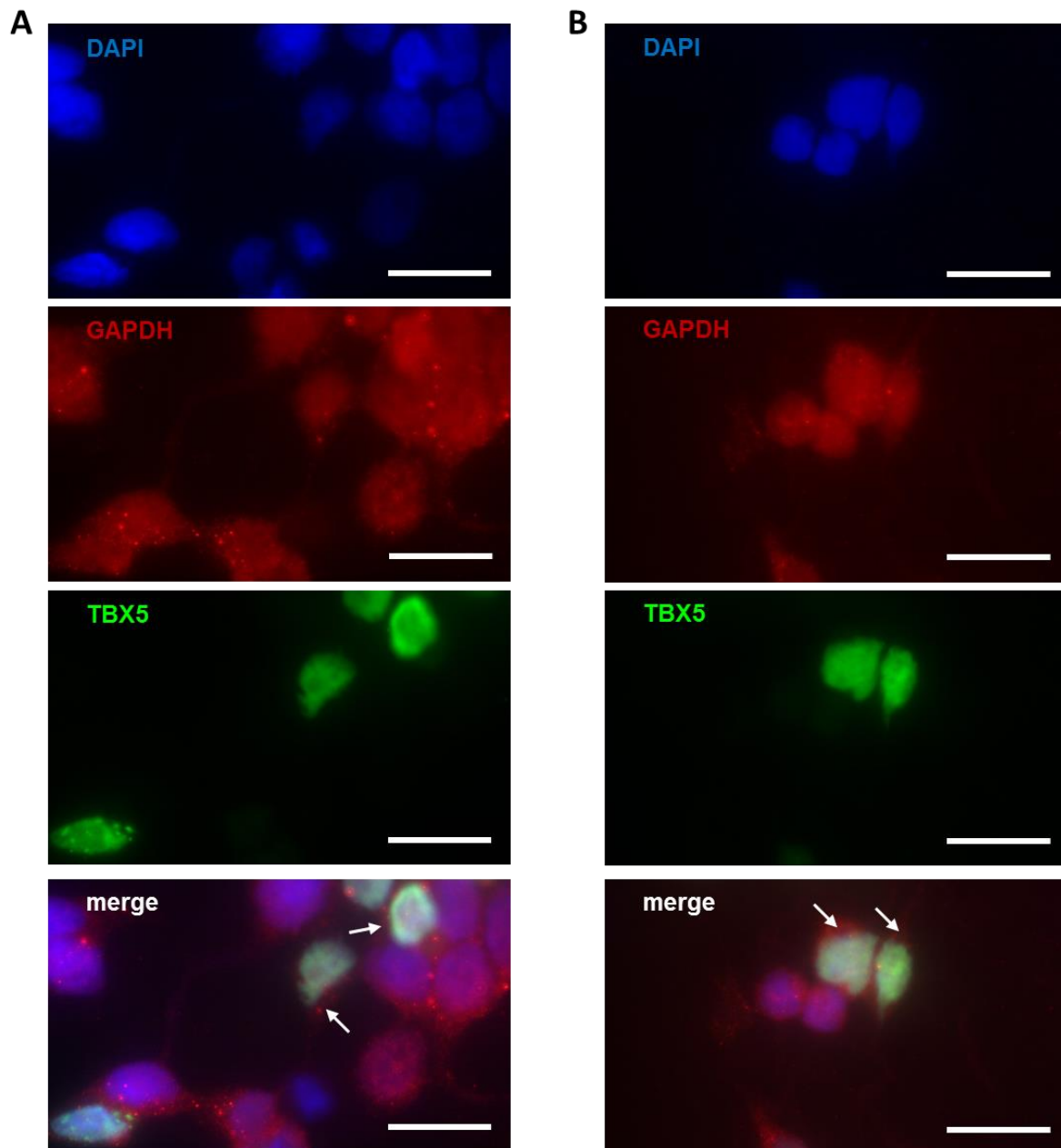
### 3.3.3 Effekte der p.Pro85Thr Mutation auf die Expression von TBX5 Zielgenen

Die Aktivität von TBX5<sup>mut</sup> auf die Expression von Zielgenen wurde mit quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR, engl. *quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction*, qRT-PCR) gemessen. Es konnte eine sehr geringe endogene Expression von *TBX5* und *NPPA* in untransfizierten HEK 293 Zellen detektiert werden (Abb. 14B), welche als Produkt in der Gelelektrophorese aufgrund der geringen Menge visuell nicht sichtbar war (Spur 1, Abb. 14C). Eine Transfektion mit *TBX5*<sup>wt</sup> oder *TBX5*<sup>mut</sup> zeigte eine um mehr als 10<sup>6</sup>-fach erhöhte *TBX5* Expression im Vergleich zu untransfizierten Zellen (*TBX5*<sup>wt</sup>: p<0,01; *TBX5*<sup>mut</sup>: p<0,001) und ist in Abbildung 14B gezeigt. *TBX5*<sup>wt</sup> transfizierte 293 Zellen zeigten eine 69,3-fache Aufregulation der *NPPA* Expression (Abb. 14B). Die Transfektion mit *TBX5*<sup>mut</sup> zeigte einen 1,24-fachen Unterschied der *NPPA* Expression im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Abb. 14B). Die Genexpressionsunterschiede für *NPPA* waren nicht signifikant. Gelelektrophoretisch konnte *NPPA* nur in den mit *TBX5*<sup>wt</sup> transfizierten HEK 293 Zellen nachgewiesen werden (Spur 2, Abb. 14C). Als Referenzgen zur Normalisierung und zum Nachweis der erfolgreich durchgeführten Amplifikation wurde humanes *Actin Beta* (*ACTB*, NM\_001101) verwendet (Abb. 14C).

Weitere bekannte Zielgene von TBX5 wurden auf ihre Genexpression und mögliche Regulation evaluiert. Untransfizierte, *TBX5*<sup>wt</sup> und *TBX5*<sup>mut</sup> transfizierte 293 Zellen zeigten eine endogene Expression von *Connexin 40* (*CX40*, NM\_005266), *Iroquois Homeobox 4* (*IRX4*, NM\_001278632), *Troponin I3 - kardialer Typ* (*TNNI3*, NM\_000363), *hes related family bHLH transcription factor with YRPW motif 2* (*HEY2*, NM\_012259) und *Inhibitor of DNA binding 2* (*ID2*, NM\_002166), welche in Abbildung 14D gelelektrophoretisch nach Amplifikation gezeigt ist. Aufgrund der hohen endogenen Expression der HEK 293 Zellen für die untersuchten Zielgene *CX40*, *IRX4*, *TNNI3*, *HEY2* und *ID2* konnten keine Unterschiede für die mit *TBX5*<sup>wt</sup> und *TBX5*<sup>mut</sup> transfizierten Zellen verifiziert werden.

### 3.3.4 Identifikation der subzellulären Lokalisation der p.Pro85Thr Mutante

Transkriptionsfaktoren, wie TBX5 müssen zur Aktivierung ihrer Zielgene im Zellkern lokalisiert sein. Für einige *TBX5* Mutationen konnte gezeigt werden, dass das mutierte TBX5 Protein nicht mehr kerngängig ist (Fan *et al.*, 2003). Um die Kerngängigkeit der p.Pro85Thr Mutante zu überprüfen, wurden HEK 293 Zellen mit dem Expressionsvektor pAW48 (*backbone* pcDNA3.1), der entweder die *TBX5*<sup>wt</sup> oder die *TBX5*<sup>mut</sup> Sequenz trug, transfiziert. Der Expressionsvektor trägt ein, der TBX5 Sequenz vorgeschaltetes FLAG-Tag, sodass das *TBX5*<sup>wt</sup> bzw. *TBX5*<sup>mut</sup> Protein über einen FLAG Antikörper detektiert werden kann. Für die klare Darstellung der Zellkompartimente wurde Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) zur Darstellung des Zytoplasmas und 4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zur Identifizierung des Nukleus verwendet. In Abbildung 15 sind die Bilder der immunzytologischen Färbung gezeigt.



**Abbildung 15: Darstellung der subzellulären Lokalisation von (A) TBX5<sup>wt</sup> und (B) TBX5<sup>mut</sup> Protein.** Die Lokalisation von TBX5<sup>wt</sup> und TBX5<sup>mut</sup> wurde durch immunzytologische Färbung mit einem anti-FLAG Antikörper analysiert. Die übereinander gelagerten Bilder (engl. *merge*) zeigen die Dreifachfärbung für den Zellkern (blau), das Zytoplasma (rot) und TBX5 (grün). Weiße Pfeile markieren die Zytoplasmaregion um den Zellkern, der TBX5 exprimiert. Der Längenstandard repräsentiert 20  $\mu\text{m}$ . Adaptiert Dreßen *et al.*, 2016. © 2016 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals, Inc.

Die übereinander gelagerten Bilder (engl. *merge*) zeigen die Dreifachfärbung für den Zellkern (blau), das Zytoplasma (rot) und TBX5 (grün), welches durch das FLAG-Tag markiert ist. Weiße Pfeile markieren die zytoplasmatische Region um den Zellkern, in dem TBX5 lokalisiert ist. Für TBX5<sup>mut</sup> konnte eine nukleare Lokalisation gezeigt werden (Abb. 15B), welche sich nicht von der Lokalisation des TBX5<sup>wt</sup> unterscheidet (Abb. 15A).

### **3.4 Humanes HOS-spezifisches induziertes pluripotentes Stammzellmodell**

Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS Zellen) sind reprogrammierte somatische Zellen, welche durch selektive Induktion von Genen wieder in einen pluripotenten Status versetzt werden, welcher dem pluripotenten Status embryonaler Stammzellen (ES Zellen) ähnelt. Im Jahre 2007 gelang erstmals die Generierung von humanen iPS Zellen in der Arbeitsgruppe von Yamanaka (Takahashi & Yamanaka, 2007). Im Jahre 2012 erhielten Gurdon und Yamanaka für ihre Arbeit zur zellulären Reprogrammierung den Nobelpreis für Medizin. Induzierte pluripotente Stammzellen können durch die selektive Induktion von Genen mittels verschiedener Strategien, wie der virus-basierten Induktion von Genen oder auch durch chemische Induktion generiert werden. Die vier dabei verwendeten Transkriptionsfaktoren *Octamer-Binding Protein 4 (OCT4)*, *SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2 (SOX2)*, *MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor (c-MYC)* und *Kruppel like factor 4 (KLF4)* werden in den somatischen Zellen exogen überexprimiert und bringen die Zellen dazu, diese Faktoren endogen zu exprimieren. Die Zellen schalten ein endogenes Programm, welches für die Aufrechterhaltung des pluripotenten Charakters der iPS Zellen essentiell ist an und können auch nach Ausschleusung des Virus ihren pluripotenten Status eigenständig aufrechterhalten.

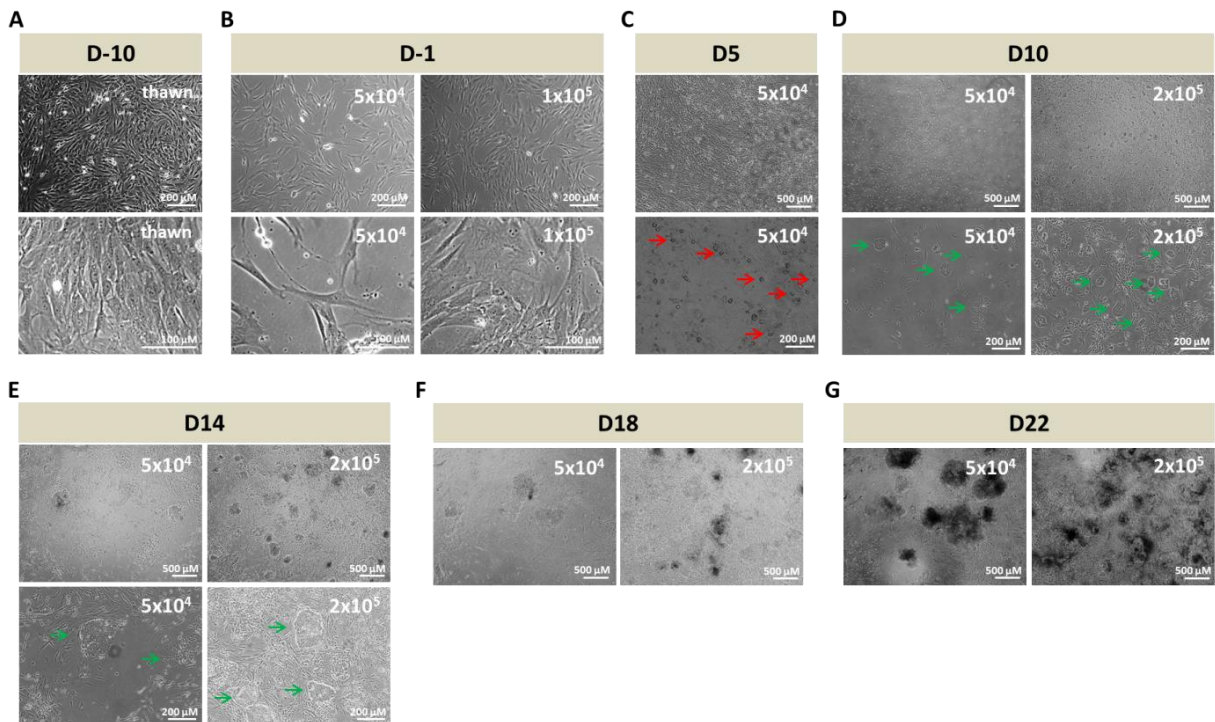
#### **3.4.1 Generierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen**

Die in dieser Arbeit generierten iPS Zellen wurden mit dem CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit hergestellt. Der hier verwendete Virus integriert nicht in das Genom, sodass unerwünschte, nicht beeinflussbare Nebeneffekte, die aufgrund der Integration von Retro- oder Lentiviren auftreten können, ausgeschlossen werden. *Off-target* Effekte durch willkürliche Integration in das Genom, wie in anderen zur Reprogrammierung verwendeten Systemen vorkommend, werden weitestgehend ausgeschlossen. Die Zellen sind nach Ausschleusung des Virus in der Lage ihren pluripotenten Status eigenständig aufrecht zu erhalten.

##### **3.4.1.1 Generierung der iPS Zellen des HOS Indexpatienten 1460 aus Fibroblasten**

Der HOS Indexpatient 1460 wurde im DHM einem herzchirurgischen Eingriff unterzogen. Im Rahmen dieser Operation wurde eine Fettprobe entnommen, aus der adipöse Fibroblasten (AF) angezüchtet wurden. Die AF wurden expandiert und für die anstehende Reprogrammierung in einem Flüssigstickstoff-System kryokonserviert.

Die Dokumentation der Reprogrammierung adipöser Fibroblasten des HOS Indexpatienten und die Entwicklung der iPS Klone sind in Abbildung 16 zusammengefasst.



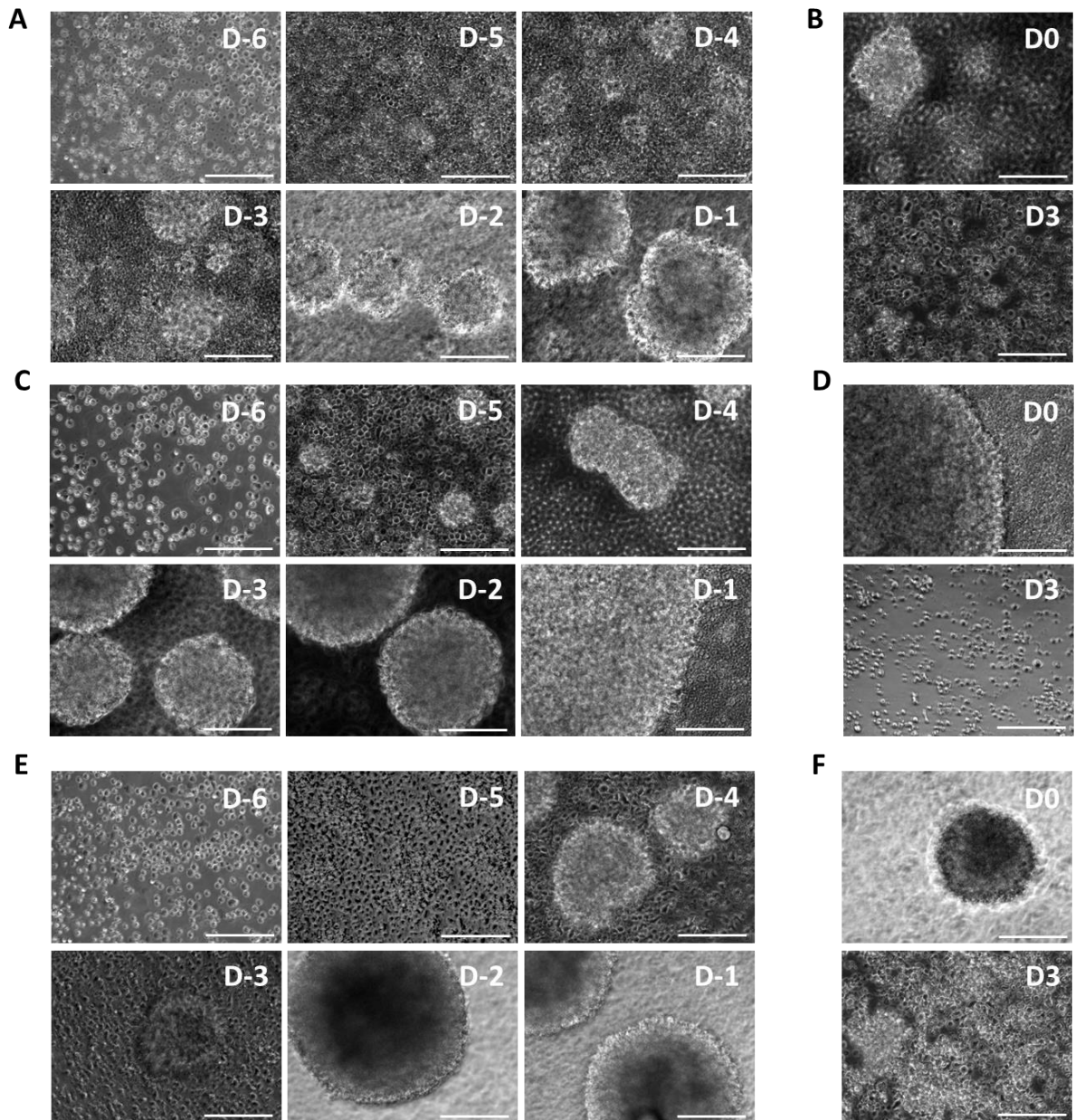
**Abbildung 16: Dokumentation der Reprogrammierung adipöser Fibroblasten und der sich daraus entwickelnden iPS Klone des HOS Indexpatienten 1460. (A)** AF des Indexpatienten 1460 am Tag D-10 vor Reprogrammierung (Tag des Auftauens). **(B)** AF am Tag D-1 vor Reprogrammierung (D0). **(C)** Reprogrammierte AF am Tag D5 nach Transduktion. Rote Pfeile markieren morphologisch veränderte Zellen. Die morphologische Veränderung impliziert eine erfolgreiche Transduktion. **(D)** Transduzierte Fibroblasten der zwei Ansätze ( $5 \times 10^4$  und  $2 \times 10^5$ ) an Tag D10 auf Matrigel beschichteten Zellkulturplatten. **(E)** Dokumentation sich formierender iPS Klone an Tag D14 nach Reprogrammierung. Grüne Pfeile markieren die sich bildenden iPS Klone des HOS Indexpatienten 1460. **(F)** iPS Klone an Tag D18 nach Transduktion. **(G)** iPS Klone an Tag D22 nach Transduktion.

Für die anstehende Reprogrammierung wurden, zehn Tage vor Transduktion,  $1 \times 10^6$  AF (p1) des Indexpatienten aufgetaut und in Kultur genommen (Abb. 16A). Drei Tage (D-3) vor der Transduktion wurde die Zellzahl der Fibroblasten bestimmt und diese nach Angabe des CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kits in unterschiedlicher Dichte ausgesät. In Abbildung 16B sind die Kulturen mit verschiedener Ausgangszellzahl ( $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ) für den Tag vor der Reprogrammierung (D-1) gezeigt. Am Tag der Transduktion (D0) wurde je ein Well der, mit  $5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  ausplattierten Zellen, mit Trypsin abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Die mit  $5 \times 10^4$  Zellen gestartete Kultur erreichte eine Zellzahl von  $5,75 \times 10^5$  Zellen, die mit  $1 \times 10^5$  Zellen gestartete Kultur eine Zellzahl von  $9 \times 10^5$  Zellen. Für die Transduktion wurden zwei Wells mit der an Tag D0 vorhandenen Zellzahl von  $5,75 \times 10^5$  verwendet. Die Transduktion wurde unter Berücksichtigung des im Analysezertifikat angegebenen Titters der Vektoren vorgenommen. Wie in Abbildung 16C gezeigt, war fünf Tage nach Reprogrammierung (D5) eine erste Veränderung der Zellmorphologie zu erkennen, die eine Proliferation der Zellen anzeigt und charakteristisch für eine erfolgreiche Transduktion ist. Am Tag D7 wurden die transduzierten Fibroblasten auf Matrigel-beschichtete Zellkultur Multiwellplatten überführt. Hierzu wurden die Zellen abgelöst und die Zellzahl mit  $1,16 \times 10^6$  bestimmt. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  und  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well einer Zellkultur Multiwellplatte ausgesät. Am Tag D10 nach Transduktion zeigten sich in beiden

Ansätzen die ersten sich bildenden iPS Klone, welche in Abbildung 16D durch grüne Pfeile markiert sind. Die iPS Klone entwickelten sich kontinuierlich (Abb. 16E, grüne Pfeile) und wurden zwischen Tag D16 und D22 in Abhängigkeit ihrer Größe manuell gepickt. Die Abbildungen 16F und G zeigen das Wachstum der individuellen iPS Klone. Insgesamt konnten über 50 iPS Klone für den Indexpatienten 1460 gepickt werden. Drei Klone wurden expandiert, passagiert und charakterisiert. Alle weiteren Klone, wie auch die Mutterplatte der Transduktion wurden zur Langzeitlagerung in ein Flüssigstickstoff-System transferiert.

### **3.4.1.2 Generierung der iPS Zellen der HOS Indexpatientin 804-K und ihrer gesunden Eltern 804-MU und 804-VA aus peripheren mononukleären Blutzellen**

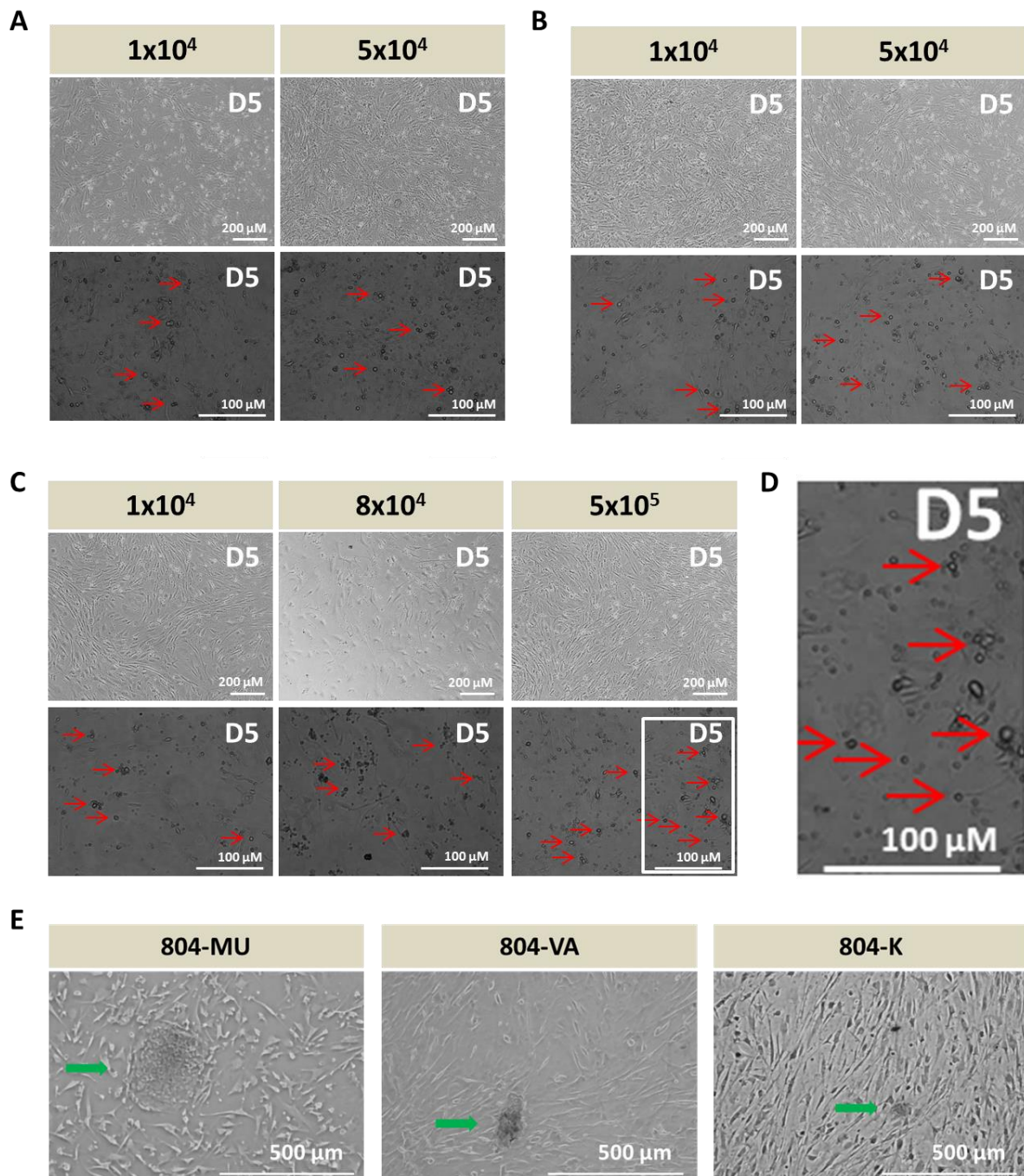
Die Generierung der iPS Zellen der HOS Indexpatientin 804 und ihrer gesunden Eltern 804-MU und 804-VA mit dem oben genannten Kit wurde aus peripheren mononukleären Blutzellen (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) durchgeführt. Zur Gewinnung von PBMC wurde Vollblut in ein BD Vacutainer® CPT™ Mononuclear Cell Preparation Tube - Sodium Heparin durch einen Arzt abgenommen. Nach erfolgreicher Isolation wurden die PBMC (804-K:  $7 \times 10^6$ , 804-MU:  $2,5 \times 10^7$ , 804-VA:  $1 \times 10^7$ ) bis zur Reprogrammierung mit einer Zellzahl von  $3-5 \times 10^6$  pro Kryogefäß in einem Flüssigstickstoff-System gelagert. Sechs Tage vor Reprogrammierung (D-6) wurden die PBMC aufgetaut (804-K:  $3,5 \times 10^6$  Zellen/Kryoröhrchen, 804-MU:  $5 \times 10^6$  Zellen/Kryoröhrchen, 804-VA:  $5 \times 10^6$  Zellen/Kryoröhrchen), die Lebendzellzahl bestimmt (804:  $5,5 \times 10^5$ , 804-MU:  $2 \times 10^6$ , 804-VA:  $2,26 \times 10^6$ ) und die Kultivierung der Zellen in PBMC Medium, welches durch Zytokine supplementiert wurde, nach Vorgabe des CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kits durchgeführt. Die Zytokine, die verwendet wurden waren der humane Stammzellfaktor (engl. *Stem cell factor*, SCF), der humane Fms-related Tyrosin Kinase 3 Ligand (engl. *Fms-related tyrosine kinase 3 ligand*, FLT-3), das humane Interleukin-3 (IL-3) und das humane Interleukin-6 (IL-6). Durch die Zugabe der Zytokine kommt es zu einer Aktivierung der Zellen, welche für die anstehende Transduktion affiner werden. Zur Beurteilung der voranschreitenden Aktivierung wurden die PBMC der Indexfamilie 804 mikroskopisch verfolgt. Abbildung 17 fasst die Aktivierung der Zellen (D-6 bis D-1) der Mutter 804-MU (Abb. 17A), des Vaters 804-VA (Abb. 17C) und der HOS Indexpatientin 804 (Abb. 17E) zusammen. Visuell war zu erkennen, dass die Aktivierung der Zellen durch die Zugabe von Zytokinen zu einer Akkumulation der Zellen führte. Eine voranschreitende Aktivierung ist durch die Zunahme der Größe der Zellhaufen zu erkennen und war visuell zu verfolgen. Am Tag D0 erfolgte die Transduktion mit den Vektoren des Sendai-Virus, unter Berücksichtigung des spezifisch angegebenen Titers jedes Vektors für die Lotnummer des verwendeten CytoTune®-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kits. In den Abbildungen 17B, D und F sind die Zellen am Tag der Transduktion (D0) und drei Tage nach Transduktion (D3) für die Mutter 804-MU, den Vater 804-VA und die HOS Indexpatientin 804 gezeigt. Am Tag D3 wurden die transduzierten Zellen nach Vorgabe des Kits in StemPro®34 SFM Medium auf Multiwell Zellkulturplatten, welche zuvor mit inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) beschichtet wurden, ausplattiert.



**Abbildung 17: Dokumentation der Morphologie der aktivierten PBMC der Indexfamilie 804 bis Tag D3 nach Transduktion.** (A) Probandin 804-MU: Verlauf der Aktivierung der PBMC zu den Zeitpunkten Tag D-6 bis D-1 vor Reprogrammierung. (B) Aktivierte PBMC der Probandin 804-MU am Tag der Reprogrammierung (D0). Darstellung der reprogrammierten PBMC am Tag D3 nach Transduktion. (C) Proband 804-VA: Verlauf der Aktivierung der PBMC zu den Zeitpunkten Tag D-6 bis D-1 vor Reprogrammierung. (D) Aktivierte PBMC des Probanden 804-VA am Tag der Reprogrammierung (D0). Darstellung der reprogrammierten PBMC am Tag D3 nach Transduktion. (E) Indexpatientin 804 (804-K): Verlauf der Aktivierung der PBMC zu den Zeitpunkten Tag D-6 bis D-1 vor Reprogrammierung. (F) Aktivierte PBMC der Indexpatientin 804 (804-K) am Tag der Reprogrammierung (D0). Darstellung der reprogrammierten PBMC am Tag D3 nach Transduktion. Der Längenstandard repräsentiert 100 µm. 804-MU: Mutter der Indexpatientin 804. 804-VA: Vater der Indexpatientin 804. 804-K: Kind, Indexpatientin 804.



In Abbildung 18 sind die transduzierten Zellen der Indexfamilie 804 an Tag D5 nach Zugabe der Sendai-Vektoren gezeigt.



**Abbildung 18: Dokumentation der Morphologie der sich entwickelnden iPS Klone der Indexfamilie 804.** (A) Ausplattierte Zellen ( $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ) der Probandin 804-MU am Tag D5 nach Reprogrammierung. Rote Pfeile markieren morphologisch veränderte Zellen. Die morphologische Veränderung impliziert eine erfolgreiche Transduktion. (B) Ausplattierte Zellen ( $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ) des Probanden 804-VA am Tag D5 nach Reprogrammierung. Rote Pfeile markieren morphologisch veränderte Zellen. (C) Ausplattierte Zellen ( $1 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$  und  $5 \times 10^5$ ) der HOS Indexpatientin 804-K am Tag D5 nach Reprogrammierung. Rote Pfeile markieren morphologisch veränderte Zellen. (D) Vergrößerung der durch die Transduktion morphologisch veränderten Zellen der Indexpatientin 804-K. Rote Pfeile markieren morphologisch veränderte Zellen. (E) Darstellung der sich bildenden iPS Klone auf MEF beschichteten Zellkultur Multiwellplatten. Grüne Pfeile markieren die sich formierenden iPS Klone. 804-MU: Mutter der HOS Indexpatientin 804. 804-VA: Vater der HOS Indexpatientin 804. 804-K: Kind, HOS Indexpatientin 804.

Mikroskopisch war eine morphologische Veränderung der Zellen zu beobachten, welche die erfolgreiche Transduktion anzeigt (Abb. 18A-D). Diese morphologische Veränderung visualisierte die proliferierenden Zellen und ist in den Abbildungen 18A-D durch rote Pfeile gekennzeichnet.

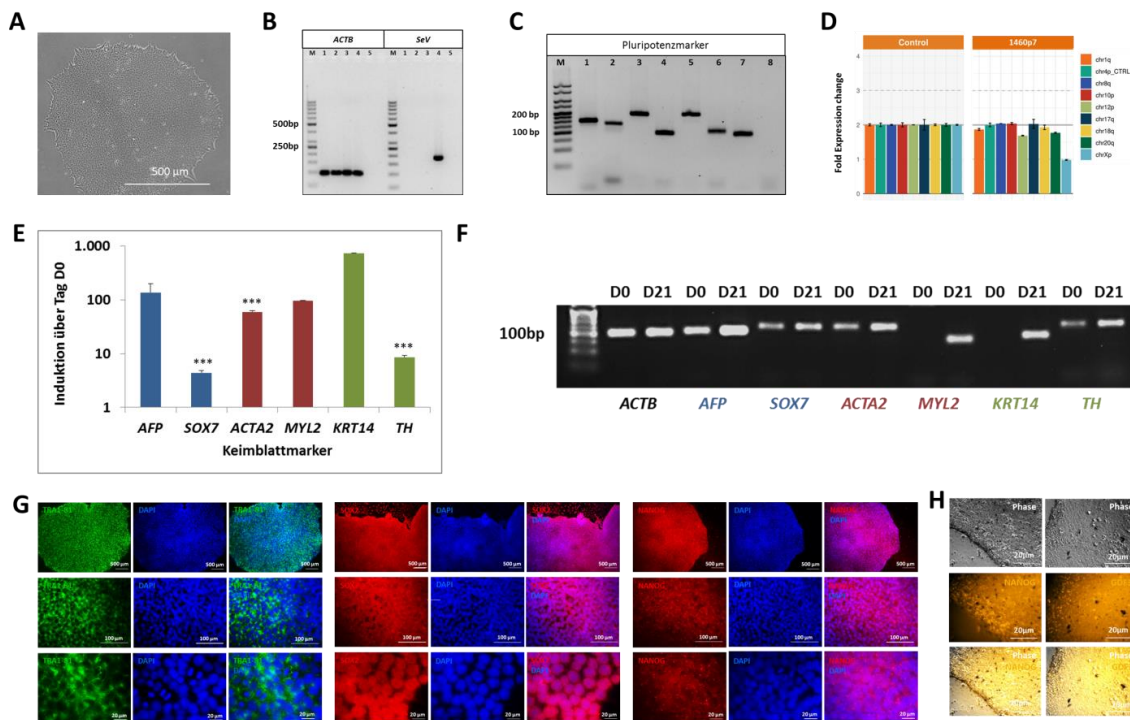
Ab Tag D7 wurde mit der Adaption des Mediums auf humanes iPS Medium begonnen. Ab Tag D9 erhielten die transduzierten Zellen ausschließlich humanes iPS Medium. Zwischen Tag D20 und Tag D24 nach Transduktion bildeten sich in allen drei Ansätzen (804-MU, 804-VA und 804-K) iPS Klone (Abb. 18E), die manuell gepickt und auf Matrigel-beschichtete Kulturplatten umgesetzt wurden. Die manuell gepickten Klone wurden klonspezifisch expandiert. Je drei der generierten iPS Klone pro Proband/Indexpatientin, welche morphologisch flach und ohne differenzierende Bereiche in Kultur wuchsen, wurden expandiert, passagiert und charakterisiert. Die zusätzlich generierten Klone (804-MU: 18 Klone, 804-VA: 15 Klone, 804-K: 15 Klone), wie auch die Mutterplatten wurden bei erreichter Konfluenz zur Langzeitlagerung in ein Flüssigstickstoff-System überführt.

### **3.4.2 Charakterisierung der generierten iPS Zellen**

Je drei der isolierten und expandierten Klone der iPS Zellen des Indexpatienten 1460, der Probanden 804-MU und 804-VA und der Indexpatientin 804-K wurden nach morphologischen Kriterien ausgewählt. Zeigten die ausgewählten Klone die Ausschleusung des Sendai Virus, wurden die Klone spontan differenziert. Für jeden Probanden/Indexpatienten wurde ein Klon ausgewählt, der kontrahierende Bereiche in der Differenzierung zeigte. Die weitere Charakterisierung der iPS Zellen wurde für einen selektierten Klon durchgeführt. Der vollständig charakterisierte Klon jedes Indexpatienten/Probanden wurde für alle weiteren, in dieser Arbeit durchgeführten Experimente verwendet.

## Charakterisierung der iPS Zellen des Indexpatienten 1460

In Abbildung 19 ist die Charakterisierung des Klons 36 des Indexpatienten 1460 dargestellt.



**Abbildung 19: Charakterisierung der iPS Zellen des HOS Indexpatienten 1460.** (A) Dokumentation der Morphologie der iPS Zellen des Klons 36. (B) Nachweis der Ausschleusung des Sendai-Virus. Geldokumentation der Amplifikationsprodukte *ACTB* (NM\_001101, Kontrolle) und *SeV* (M69046) für die Klone 36p7 (Spuren 1), 34p7 (Spuren 2) und 43p7 (Spuren 3) der iPS Zellen des Indexpatienten 1460. Als Positivkontrolle (Spuren 4) wurden die mit Sendai-Virus transduzierten Fibroblasten des Indexpatienten 1460 verwendet. Die Spuren 5 zeigen die Negativkontrolle (*aq. bidest.*). Als Marker zur Bestimmung Größe der Amplifikationsprodukte wurde die *50 bp GeneRuler™ DNA Ladder* verwendet. (C) Nachweis der Pluripotenzmarker *OCT4* (NM\_002701, Spur 1), *KLF4* (NM\_001314052, Spur 2), *SOX2* (NM\_003106, Spur 3), *c-MYC* (NM\_002467, Spur 4), *NANOG* (NM\_024865, Spur 5), *REX1* (NM\_174900, Spur 6) in Passage p7 des Klons 36. Als interne Kontrolle wurde *ACTB* (Spur 7) verwendet. Die Spur 8 zeigt die Negativkontrolle als Mix aller Negativkontrollen. Als Marker zur Bestimmung der Größe der Amplifikationsprodukte wurde der Quantitas DNA Marker 25 - 500bp verwendet. (D) Identifikation von karyotypischen Anomalien. Darstellung des *Fold Changes* definierter Chromosomenregionen mit dem *hPSC Genetic Analysis Kit* nach Amplifikation. (E) Nachweis der Ausbildung aller drei Keimblätter in der spontanen Differenzierung durch *AFP* (NM\_001134) und *SOX7* (NM\_031439) als endodermale Marker, *ACTA2* (NM\_001141945, NM\_001613) und *MYL2* (NM\_000432.3) als mesodermale Marker und *KRT14* (NM\_000526) und *TH* (NM\_199292, NM\_000360, NM\_199293) als ektodermale Marker. Dargestellt ist die Induktion der Genexpression am Tag D21 über D0 nach Normalisierung mit *ACTB* (NM\_001101) aus drei unabhängigen Differenzierungen mit biologischen Duplikaten. Die Abweichungen der Genexpression sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Signifikanz: \*\*\*:  $p < 0,001$ . (F) Geldokumentation der amplifizierten Keimblattmarker für D0 und D21 der spontanen Differenzierung des Klons 36 der iPS Zellen des Indexpatienten 1460 einer spontanen Differenzierung. Als Marker zur Bestimmung der Größe der Amplifikationsprodukte wurde der Quantitas DNA Marker 25 - 500bp verwendet. (G) Immunzytologische Färbung der Pluripotenzmarker TRA1-81 (grün), *SOX2* (rot) und *NANOG* (rot) der iPS Zellen des Klons 36. Dargestellt sind die Einzelfärbungen und DAPI (blau) zur Visualisierung des Zellkerns, wie auch das aus diesen beiden Bildern übereinander gelagerte Bild. Für jede Färbung ist eine Aufnahme in 40-facher, 100-facher und 1000-facher Vergrößerung gezeigt. (H) Nachweis der Pluripotenzmarker *NANOG* (orange) und *GDF3* (orange) durch SmartFlares™ in den iPS Zellen des Klons 36. Für beide Färbungen sind das Phasenkontrastbild, die Färbung und das übereinander gelagerte Bild gezeigt.

Abbildung 19A zeigt eine iPS Kolonie des Klons 36 in Passage p22. Die iPS Zellen wachsen als kompakte, multizelluläre flache Kolonie mit definiertem Rand, ohne differenzierende Bereiche aufzuweisen und entsprechen daraus resultierend den morphologischen Kriterien von humanen iPS Zellen.

Für die Charakterisierung der iPS Zellen wurde die Ausschleusung des Sendai-Virus (SeV) überprüft. In Abbildung 19B ist die Amplifikation für *Beta Actin* (*ACTB*, NM\_001101) und den Sendai Virus (SeV, M69046.1) für drei ausgewählte Klone des Indexpatienten 1460 (36p7, 34p7, 43p7), sowie die Positivkontrolle (SeV-transfizierte AF des HOS Indexpatienten 1460) und die Negativkontrolle nach gelelektrophoretischer Auftrennung gezeigt. Der in dieser Arbeit verwendete Klon 36 war in Passage p7 nach Transduktion Sendai-Virus frei (Spur 1). Die Expression von *ACTB* für den Klon 36 ist in Spur 1 gezeigt. Die Signale der Positivkontrolle (SeV) sind in den Spuren 4 zu sehen. Die Negativkontrollen der Amplifikation für *ACTB* und SeV gaben keine Signale (Spuren 5).

Die endogene Expression von *Pou class 5 homeobox 1* (*POU5F1*, Synonym *OCT4*, NM\_112957; Spur 1), *Kruppel like factor 4* (*KLF4*, NM\_001314052; Spur 2), *SRY-box2* (*SOX2*, NM\_003106; Spur 3) und *proto-oncogene bHLH transcription factor (c-MYC)* (*c-MYC*, NM\_002467; Spur 4) in den iPS Zellen des Klons 36p7 nach Ausschleusung des Sendai-Virus ist in Abbildung 19C nach Amplifikation der Gene und gelelektrophoretischer Auftrennung gezeigt. Die Expression der Pluripotenzfaktoren *Nanog Homeobox* (*NANOG*, NM\_024865) und *RNA exonuclease 1* (*REX1*, NM\_174900) konnte für den Klon 36 nach Amplifikation und gelelektrophoretischer Auftrennung nachgewiesen werden (Abb. 19C, Spur 5 und 6). Die Amplifikation von *ACTB* als interne Kontrolle einer erfolgreichen Amplifikation ist in Spur 7 (Abb. 19C) zu sehen. Für alle amplifizierten Gene wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Der Mix aller Negativkontrollen ist in Spur 8 (Abb. 19C) zu sehen. Es konnte gezeigt werden, dass die iPS Zellen des Indexpatienten 1460 in der Lage sind ihren pluripotenten Charakter eigenständig aufrecht zu erhalten.

Embryonale Stammzellen und iPS Zellen können vermehrt karyotypische Anomalien (International Stem Cell Initiative, Amps et al., 2011; Taapken et al., 2011) aufweisen. Aus diesem Grund wurde der Klon 36 der iPS Zellen des Indexpatienten 1460 auf, in der Literatur (Baker et al., 2016) gehäuft vorkommende Anomalien unter Verwendung des *hPSC Genetic Analysis Kits* getestet. Es konnten keine, in diesem Test geprüften Anomalien in den iPS Zellen des Indexpatienten 1460 gefunden werden (Abb. 19D).

Induzierte pluripotente Stammzellen müssen sich in Zellen aller drei Keimblätter (Mesoderm, Ektoderm, Endoderm) differenzieren lassen. Um die Fähigkeit des Klons 36, Zellen aller drei Keimblätter auszubilden, zu überprüfen, wurde dieser spontan in drei unabhängigen Differenzierungen über 21 Tage differenziert. Für den Nachweis des endodermalen Keimblattes wurde die Expression von *Alpha Fetoprotein* (*AFP*, NM\_001134) (Moretti et al., 2010b) und *SRY (Sex Determining Region Y)-Box 7* (*SOX7*, NM\_031439) gemessen (Lahm et al., 2015a). Das mesodermale Keimblatt wurde durch die Expression von *Alpha-Actin-2* (*ACTA2*, NM\_001141945) und *Homo sapiens myosin light chain 2* (*MYL2*, NM\_000432) charakterisiert (Lahm et al., 2015a). Zellen des Ektoderms wurden durch die Expression von *Keratin 14* (*KRT14*, NM\_000526) und *Tyrosin Hydroxylase* (*TH*, NM\_199292)

nachgewiesen (Lahm *et al.*, 2015a). An Tag D0 und D21 jeder spontanen Differenzierung wurden biologische Duplikate genommen, die Zellen lysiert, RNA isoliert, cDNA generiert und die n-fache Induktion an D21 versus D0 nach Normalisierung mit *Beta Actin* (*ACTB*, NM\_0011101) als Referenz bestimmt (Abb. 19E). Der endodermale Marker *AFP* zeigte eine 136-fache Induktion, während der endodermale Marker *SOX7* eine geringere Induktion über Tag D0 zeigte. Es konnte ein 96-facher Anstieg des mesodermalen Markers *MYL2* und eine 59-fache erhöhte Expression von *ACTA2* über Tag D0 gezeigt werden. Der ektodermale Marker *KRT14* war mit einer 729-fachen Induktion am Tag D21, im Gegensatz zu *TH* (8-fach) im Verlauf der spontanen Differenzierung deutlich stärker aufreguliert. Die Genexpressionsunterschiede des Klon 36 in der spontanen Differenzierung waren für *SOX7*, *ACTA2* und *TH* signifikant ( $p < 0,001$ ). Die Amplifikationsprodukte der Keimblattmarker wurden für Tag D0 und D21 einer spontanen Differenzierung gelelektrophoretisch aufgetrennt und sind in Abb. 19F gezeigt. Mit Ausnahme von *ACTB*, welches als Referenzgen keiner Regulation in der spontanen Differenzierung unterworfen ist, sind für alle keimblattspezifischen Marker an Tag D21 deutlich kräftigere Banden, die eine vermehrte Expression anzeigen im Vergleich zu Tag D0 zu sehen. Marker aller drei Keimblätter wurden im Verlauf der spontanen Differenzierung der iPS Zellen des Indexprobanden 1460 exprimiert.

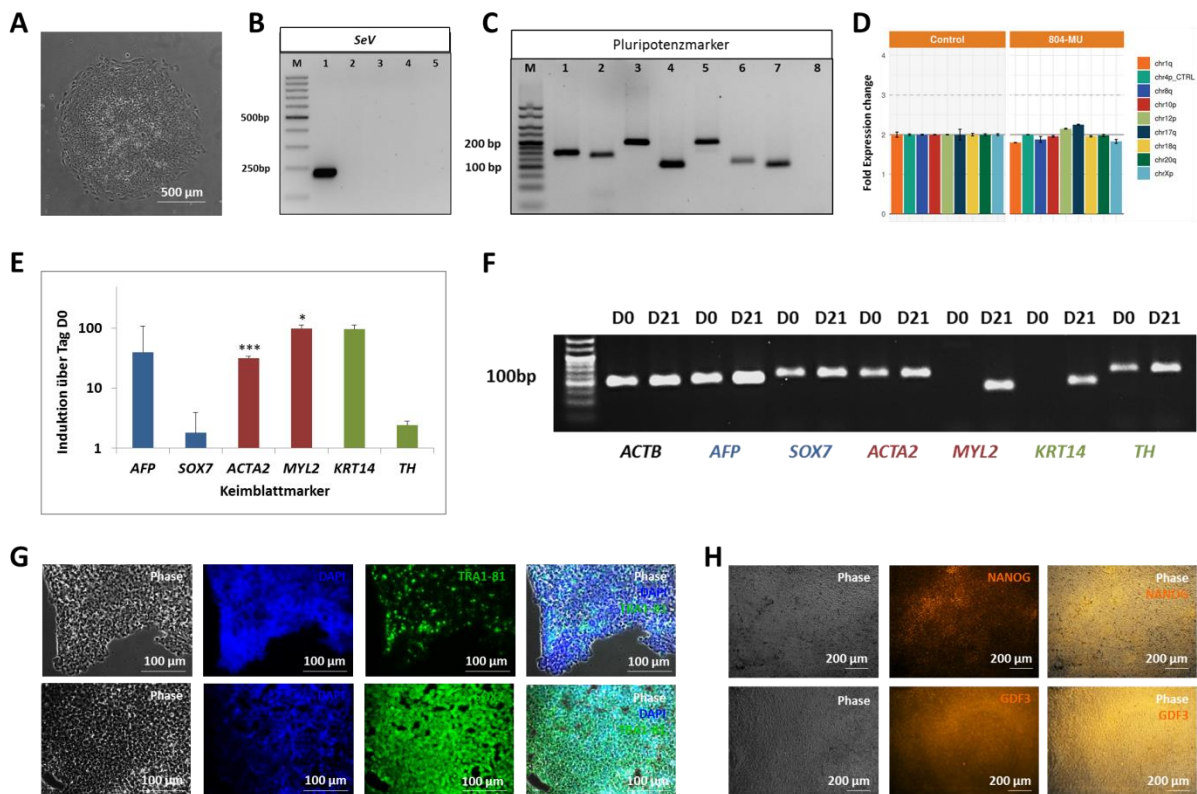
Immunzytochemische Färbungen sind für die Pluripotenzmarker TRA1-81, der ein Pluripotenz-assoziiertes Typ I Laktosamin-Epitop (Natunen *et al.*, 2011) erkennt, Sex determining region Y (SRY)-box 2 (SOX2) und Homöoboxprotein NANOG in Abbildung 19G gezeigt. Die Anwesenheit aller drei Marker konnte für die iPS Zellen des Indexpatienten 1460 (Klon 36) nachgewiesen werden.

In Abbildung 19H ist die Expression der Gene *NANOG* und *Growth Differentiation Factor 3* (*GDF3*) unter Verwendung von Nanopartikeln, welche einen direkten intrazellulären Nachweis der Genexpression durch Fluoreszenz in lebenden Zellen ermöglicht, gezeigt.

Die Verifikation der *TBX5* Mutation in den generierten iPS Zellen des Indexpatienten 1460 ist in der Abbildung S5 gezeigt.

## Charakterisierung der iPS Zellen der Indexprobandin 804-MU

In Abbildung 20 ist die Charakterisierung der iPS Zellen des Klons 11 der Probandin 804-MU gezeigt.



**Abbildung 20: Charakterisierung der iPS Zellen der Probandin 804-MU.** (A) Dokumentation der Morphologie des Klons 11 der iPS Zellen der Probandin 804-MU. (B) Nachweis der Ausschleusung des Sendai-Virus. Geldokumentation des Amplifikationsproduktes SeV für die Klone 2 p1/8 (Spur 2), 11 p3/4 (Spur 3) und 14 p1/7 (Spur 4) der iPS Zellen der Indexprobandin 804-MU. Als Positivkontrolle (Spur 1) wurden die mit Sendai-Virus transduzierten Fibroblasten des Indexpatienten 1460 verwendet. Spur 5 zeigt die Negativkontrolle (*aq. bidest.*). Als Marker zur Bestimmung der Größe der Amplifikationsprodukte wurde die *50 bp GeneRuler™ DNA Ladder* verwendet. (C) Nachweis der Pluripotenzmarker *OCT4* (Spur 1), *KL4* (Spur 2), *SOX2* (Spur 3), *c-MYC* (Spur 4), *NANOG* (Spur 5), *REX1* (Spur 6) der iPS Zellen des Klons 11 in Passage p3/4. Als interne Kontrolle wurde *ACTB* (Spur 7) verwendet. Spur 8 zeigt die Negativkontrolle als Mix aller Negativkontrollen. Als Marker zur Bestimmung der Größe der Amplifikationsprodukte wurde der Quantitas DNA Marker: 25 - 500bp verwendet. (D) Identifikation von karyotypischen Anomalien. Darstellung des *Fold Changes* definierter Chromosomenregionen mit dem *hPSC Genetic Analysis Kit* nach Amplifikation. (E) Nachweis der Ausbildung aller drei Keimblätter in der spontanen Differenzierung durch *AFP* und *SOX7* als endodermale Marker, *ACTA2* und *MYL2* als mesodermale Marker und *KRT14* und *TH* als ektodermale Marker. Dargestellt ist die Induktion der Genexpression am Tag D21 über D0 nach Normalisierung mit *ACTB* aus drei unabhängigen Differenzierungen mit biologischen Duplikaten. Die Abweichungen der Genexpression sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Signifikanzen: \*\*\*:  $p < 0,001$ . \*:  $p < 0,05$ . (F) Geldokumentation der amplifizierten Keimblattmarker für D0 und D21 einer spontanen Differenzierung des Klons 11 der Zellen der Indexprobandin 804-MU. Als Marker zur Bestimmung der Größe der Amplifikationsprodukte wurde der Quantitas DNA Marker: 25 - 500bp verwendet. (G) Immunzytologische Färbung von TRA1-81 (grün) und SOX2 (grün) der iPS Zellen des Klons 11. Dargestellt sind jeweils die Phasenkontrastaufnahmen, die Einzelfärbung, DAPI (blau) zur Visualisierung des Zellkerns und das aus diesen Bildern übereinander gelagerte Bild. (H) Nachweis der Pluripotenzmarker *NANOG* (orange) und *GDF3* (orange) durch SmartFlares in den iPS Zellen des Klons 11. Für beide Färbungen sind das Phasenkontrastbild, die Färbung und das übereinander gelagerte Bild gezeigt.

Abbildung 20A zeigt iPS Zellen der Probandin 804-MU (p3/13). Die iPS Zellen wachsen als kompakte, multizelluläre, flache Kolonie mit definierten Rand und erfüllen somit die morphologischen Kriterien von humanen iPS Zellen.

Die Ausschleusung des Sendai-Virus (SeV) ist in Abbildung 20B dargestellt. Spur 1 zeigt die Positivkontrolle (SeV-transfizierte AF des HOS Indexpatienten 1460). In Spur 2, 3 und 4 sind die drei ausgewählten Klone der Probandin 804-MU, die expandiert und die morphologischen Kriterien von iPS Zellen erfüllten dargestellt (Spur2: Cl2 p1/8, Spur 3: Cl11 p3/4, Spur 4: Cl14 p1/7). In Spur 7 ist die Negativkontrolle der Amplifikation gezeigt. Für alle drei Klone konnte die erfolgreiche Ausschleusung des SeV in den Passagen p7 bis p9 gezeigt werden.

Die endogene Expression von *OCT4* (Spur 1), *KLF4* (Spur 2), *SOX2* (Spur 3) und *c-MYC* (Spur 4) in den iPS Zellen der Indexpatientin 804-MU (Klon 11) in Passage p3/4 ist nach Amplifikation und gelelektrophoretischer Auftrennung in Abbildung 20C gezeigt. Die Spuren 5 und 6 zeigen die Expression der Pluripotenzfaktoren *NANOG* und *REX1*. Die Expression von *ACTB*, welche die erfolgreich durchgeführte Amplifikation zeigt ist in Spur 7 gezeigt. Der Mix aller Negativkontrollen ist in Spur 8 aufgetragen. Die iPS Zellen der Probandin 804 exprimieren charakteristische Pluripotenzmarker von iPS Zellen.

Die iPS Zellen des Klons 11 der Probandin 804-MU wurden mit Hilfe *des hPSC Genetic Analysis Kits* auf karyotypische Anomalien bei iPS und ES Zellen getestet (Baker *et al.*, 2016). Es konnten keine, in diesem Kit geprüften Anomalien in den iPS Zellen der Probandin 804-MU gefunden werden (Abb. 20D).

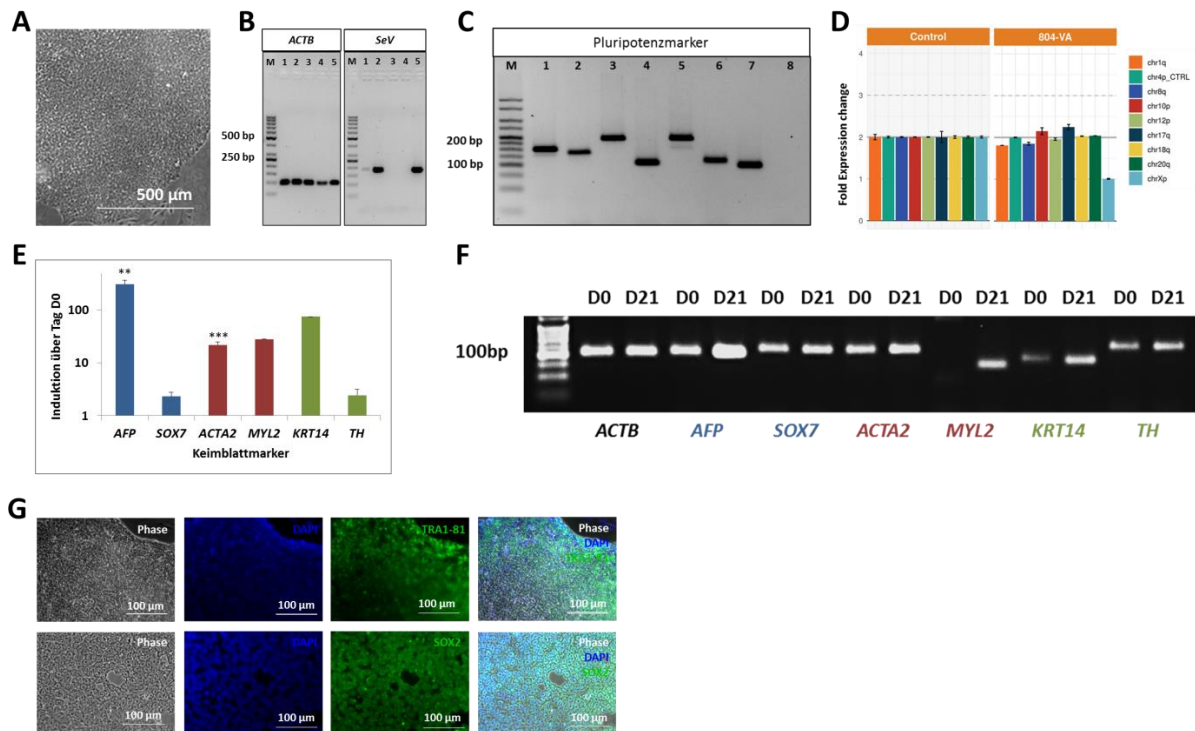
Zum Nachweis der Fähigkeit Zellen alle drei Keimblätter auszubilden, wurden die iPS Zellen der Probandin 804-MU spontan differenziert. Die Expression von *AFP*, *SOX7* (endodermales Keimblatt), *ACTA2*, *MYL2* (mesodermales Keimblatt) und *KRT14*, *TH* (ektodermales Keimblatt) wurde für Tag D21 als n-fache Genexpression über D0 nach Normalisierung mit *ACTB* in drei unabhängigen Differenzierungen mit biologischen Duplikaten bestimmt (Abb. 20E). Der endodermale Marker *AFP* war an Tag D21 40-fach erhöht exprimiert. *SOX7* zeigte eine geringer erhöhte Regulation an Tag D21 versus D0. Der mesodermale Marker *ACTA2* zeigte eine 32-fache erhöhte Expression. Die *MYL2* Expression für den Tag D21 war 100-fach erhöht. Die endodermalen Marker wurden mit 96-facher (*KRT14*) und 2-facher (*TH*) Induktion an Tag D21 versus Tag 0 gemessen. Signifikante Unterschiede zwischen Tag D21 und D0 wurden für die Marker *ACTA2* ( $p < 0,001$ ) und *MYL2* ( $p < 0,05$ ) erreicht. Die Produkte der Amplifikation der drei Keimblätter wurden für eine spontane Differenzierung für D0 und D21 gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 20F). Für alle Keimblattmarker waren an D21 stärkere Banden im Vergleich zu D0 auf dem Agarosegel zu erkennen. Marker aller drei Keimblätter wurden im Verlauf der spontanen Differenzierung der iPS Zellen der Probandin 804-MU exprimiert.

Die Pluripotenzmarker TRA1-81 und SOX2 wurden immunzytochemisch positiv in Passage 3/10 der iPS Zellen der Probandin 804-MU gefärbt (Abb. 20G).

In Abbildung 20H ist die vorhandene Genexpression von *NANOG* und *GDF3* unter Verwendung von Nanopartikeln in den iPS Zellen des Klons 11 (804-MU) gezeigt.

## Charakterisierung der iPS Zellen des Indexprobanden 804-VA

Abbildung 21 zeigt die Charakterisierung der iPS Zellen des Probanden 804-VA (Klon 11).



**Abbildung 21: Charakterisierung der iPS Zellen des Probanden 804-VA.** (A) Dokumentation der Morphologie des Klon 11 der iPS Zellen des Probanden 804-VA. (B) Nachweis der Ausschleusung des Sendai-Virus. Geldokumentation des Amplifikationsproduktes *ACTB* und *SeV* für die Klone 18 p11 (Spuren 3) und 11 p11 (Spuren 4) der iPS Zellen. Als Positivkontrolle (Spuren 5) wurden die mit Sendai-Virus transduzierten Fibroblasten des Indexpatienten 1460 verwendet. Als Marker zur Bestimmung der Größe der Amplifikationsprodukte wurde die *GeneRuler*™ 500bp DNA Ladder verwendet. (C) Nachweis der Pluripotenzmarker *OCT4* (Spur 1), *KLF4* (Spur 2), *SOX2* (Spur 3), *c-MYC* (Spur 4), *NANOG* (Spur 5), *REX1* (Spur 6) der iPS Zellen des Klon 11. Als interne Kontrolle wurde *ACTB* (Spur 7) verwendet. Die Spur 8 zeigt die Negativkontrolle als Mix aller Negativkontrollen. Als Marker zur Bestimmung der Größe der Amplifikationsprodukte wurde der Quantitas DNA Marker: 25 - 500bp verwendet. (D) Identifikation von karyotypischen Anomalien. Darstellung des *Fold Changes* definierter Chromosomenregionen mit dem *hPSC Genetic Analysis Kit* nach Amplifikation. (E) Nachweis der Ausbildung aller drei Keimblätter in der spontanen Differenzierung durch *AFP* und *SOX7* als endodermale Marker, *ACTA2* und *MYL2* als mesodermale Marker und *KRT14* und *TH* als ektodermale Marker. Dargestellt ist die Induktion der Genexpression am Tag D21 über D0 nach Normalisierung mit *ACTB* aus drei unabhängigen Differenzierungen mit biologischen Duplikaten. Die Abweichungen der Genexpression sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Signifikanzen: \*\*\*: p < 0,001. \*\*: p < 0,01. (F) Geldokumentation der amplifizierten Keimblattmarker für D0 und D21 einer spontanen Differenzierung des Klon 11 der iPS Zellen des Indexprobanden 804-VA. Als Marker zur Bestimmung der Größe der Amplifikationsprodukte wurde der Quantitas DNA Marker: 25 - 500bp verwendet. (G) Immunzytologische Färbung von TRA1-81 (grün) und SOX2 (grün) der iPS Zellen. Dargestellt ist jeweils die Phasenkontrastaufnahme, die Einzelfärbung, DAPI (blau) zur Visualisierung des Zellkerns, wie auch das aus diesen beiden Bildern übereinander gelagerte Bild.

In Abbildung 21A ist das kompakte, multizelluläre, flache Wachstum mit definiertem Rand für die iPS Zellen 804-VA gezeigt. Die iPS Zellen erfüllen damit die morphologisch relevanten Kriterien.

Die Ausschleusung des Sendai-Virus (*SeV*) wurde nach spezifischer Amplifikation und gelelektrophoretischer Auftrennung überprüft (Abb. 21B). In den Spuren 3 ist das Produkt *ACTB* und *SeV* der iPS Zellen des Klon 18p11 (804-VA) gezeigt. In den Spuren 4 ist der Klon



11 (p11) der iPS Zellen gezeigt. Beide Klone der iPS Zellen des Probanden 804-VA zeigten kein Produkt für die Amplifikation des Sendai Virus (SeV) in den getesteten Passagen und gelten somit als Sendai-Virus frei. Die Positivkontrolle (Spur 5, SeV transduzierte AF des Indexpatienten 1460) zeigte ein Amplifikationsprodukt. *ACTB* wurde zum Nachweis der Amplifikation mitgeführt.

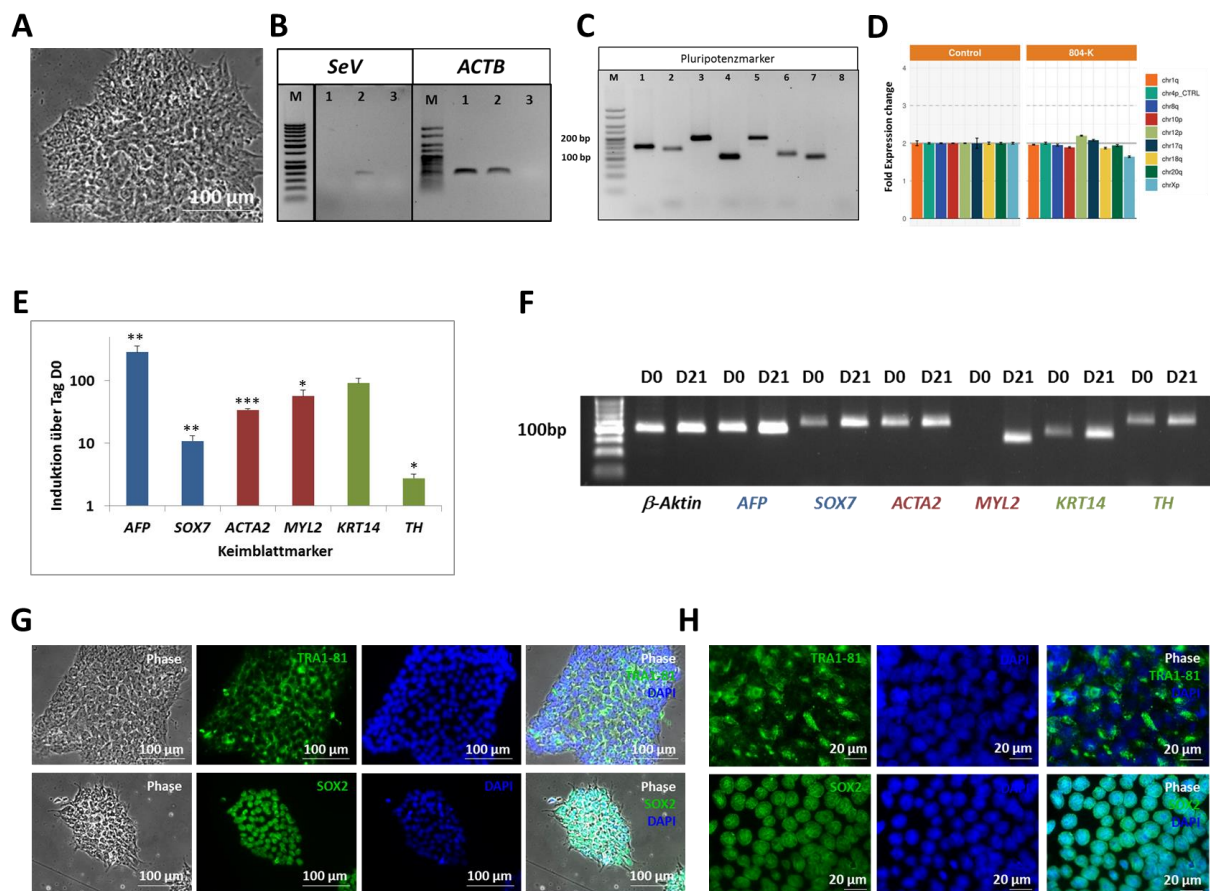
Die endogene Expression von *OCT4* (Spur 1), *KLF4* (Spur 2), *SOX2* (Spur 3) und *c-MYC* (Spur 4) in den iPS Zellen des Indexprobanden 804-VA (Klon 11) in Passage p11 ist nach Amplifikation und gelelektrophoretischer Auftrennung in Abbildung 21C gezeigt. In den Spuren 5 und 6 ist die Expression von *NANOG* und *REX1* gezeigt. Die Expression von *ACTB* (Spur 7) zeigt die erfolgreich durchgeführte Amplifikation an. In Spur 8 sind die Negativkontrollen als Mix aufgetragen. Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten SeV-freien iPS Zellen des Klons 11 (804-VA), durch eigenständige Expression der Reprogrammierungsfaktoren *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* und *c-MYC* wie auch *NANOG* und *REX1* in der Lage sind ihren pluripotenten Charakter aufrecht zu erhalten.

Die iPS Zellen des Klons 11 des Indexprobanden 804-VA wurden mit Hilfe des *hPSC Genetic Analysis Kits* auf karyotypische Anomalien analysiert. Es konnten keine, in diesem Kit geprüften Anomalien in den iPS Zellen des Probanden 804-VA gefunden werden (Abb. 21D). In Abbildung 21E ist die Expression der Keimblattmarker als n-fache Induktion an D21 versus D0 in drei unabhängig durchgeführten spontanen Differenzierungen in biologischen Duplikaten nach Normalisierung mit *ACTB* gezeigt. Der endodermale Marker *AFP* war an Tag D21 309-fach erhöht exprimiert. *SOX7* zeigte eine 2-fach erhöhte Expression an Tag D21. Die mesodermalen Marker *ACTA2* (22-fach) und *MYL2* (28-fach) zeigten eine deutliche Induktion an Tag D21. Die ektodermalen Marker wurden mit 19-facher (*KRT14*) und 13-facher (*TH*) Induktion an Tag 21 bestimmt. Die Genexpressionsunterschiede zwischen D21 und D0 waren für die Marker *AFP* ( $p < 0,01$ ) und *ACTA2* ( $p < 0,001$ ) signifikant unterschiedlich. Die Amplifikationsprodukte der Keimblattmarker einer spontanen Differenzierung der iPS Zellen (804-VA) wurden für D0 und D21 gelelektrophoretisch aufgetrennt und sind in Abbildung 21F gezeigt. Für alle Amplifikationsprodukte an D21 waren stärkere Banden auf dem Agarosegel im Vergleich zu D0 zu sehen. Marker aller drei Keimblätter wurden im Verlauf der spontanen Differenzierung der iPS Zellen des Probanden 804-VA exprimiert.

Die Pluripotenzmarker *TRA1-81* und *SOX2* wurden immunzytochemisch in Passage p44 gefärbt und sind in Abbildung 21G gezeigt. Die iPS Zellen des Indexprobanden 804-VA exprimieren *TRA1-81* und *SOX2* und sind in der Lage, auch in höheren Passagen ihren pluripotenten Charakter aufrecht zu erhalten.

## Charakterisierung der iPS Zellen der Indexpatientin 804-K

Abbildung 22 zeigt die Charakterisierung der iPS Zellen des Klons 11 der Indexpatientin 804-K.



**Abbildung 22: Charakterisierung der iPS Zellen der Indexpatientin 804-K.** (A) Dokumentation der Morphologie der iPS Zellen der Indexpatientin 804-K. (B) Nachweis der Ausschleusung des Sendai-Virus. Geldokumentation des Amplifikationsproduktes *ACTB* und des *SeV* für den Klon in Passage p10 (Spuren 1). Als Positivkontrolle (Spuren 2) wurden die mit Sendai-Virus transduzierten Fibroblasten des Indexpatienten 1460 verwendet. Als Marker zur Bestimmung Größe der Amplifikationsprodukte wurde die 50 bp *GeneRuler™ DNA Ladder* verwendet. Spur 3 zeigt die Negativkontrolle der Amplifikation. (C) Nachweis der Pluripotenzmarker *OCT4* (Spur 1), *KLF4* (Spur 2), *SOX2* (Spur 3), *c-MYC* (Spur 4), *NANOG* (Spur 5), *REX1* (Spur 6) der iPS Zellen des Klons 11 der Indexpatientin. Als interne Kontrolle wurde *ACTB* (Spur 7) verwendet. Die Spuren 8 zeigen die Negativkontrolle als Mix aller Negativkontrollen. Als Marker zur Bestimmung der Größe der Amplifikationsprodukte wurde der Quantitas DNA Marker: 25 - 500bp verwendet. (D) Darstellung des *Fold Changes* definierter Chromosomenregionen mit dem *hPSC Genetic Analysis Kit* nach Amplifikation. (E) Nachweis der Ausbildung aller drei Keimblätter in der spontanen Differenzierung durch *AFP* und *SOX7* als endodermale Marker, *ACTA2* und *MYL2* als mesodermale Marker und *KRT14* und *TH* als ektodermale Marker. Dargestellt ist der Induktion der Genexpression am Tag D21 über D0 nach Normalisierung mit *ACTB* (NM\_001101) aus drei unabhängigen Differenzierungen mit biologischen Duplikaten. Die Abweichungen der Genexpression sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Signifikanzen: \*\*\*: p < 0,001. \*\*: p < 0,01. \*: p < 0,05. (F) Geldokumentation der amplifizierten Keimblattmarker für D0 und D21 einer spontanen Differenzierung des Klons 11 der iPS Zellen der Indexpatientin 804-K. Als Marker zur Bestimmung der Größe der Amplifikationsprodukte wurde der Quantitas DNA Marker: 25 - 500bp verwendet. (G) Immunzytologische Färbung von TRA1-81 (grün) und SOX2 (grün) der iPS Zellen des Klons 11. Dargestellt ist jeweils die Phasenkontrastaufnahme, die Einzelfärbung, DAPI (blau) zur Visualisierung des Zellkerns, wie auch das, aus diesen Bildern übereinander gelagerte Bild. 400-fache Vergrößerung. (H) Immunzytologische Färbung von TRA1-81 (grün) und SOX2 (grün) der iPS Zellen des Klons 11. Dargestellt ist die Einzelfärbung, DAPI (blau) zur Visualisierung des Zellkerns, wie auch das aus diesen beiden Bildern übereinander gelagerte Bild. 1000-fache Vergrößerung.

In Abbildung 22A ist das kompakte, multizelluläre, flache Wachstum mit definiertem Rand gezeigt. Die iPS Kolonien des Klons 11 erfüllen damit alle morphologischen Kriterien von humanen iPS Zellen.

Die Ausschleusung des Sendai-Virus (SeV) wurde nach spezifischer Amplifikation und gelelektrophoretischer Auftrennung überprüft und ist in Abbildung 22B gezeigt. In den Spuren 1 ist das Produkt *ACTB* und SeV der iPS Zellen des Klons (p10) gezeigt. Die Positivkontrolle (Spuren 2, SeV transduzierte AF des Indexpatienten 1460) zeigte ein positives Signal für die Amplifikation des Virus und für *ACTB*. Die Negativkontrollen (Spuren 3 zeigten kein Amplifikationsprodukt.

Die endogene Expression von *OCT4* (Spur 1), *KLF4* (Spur 2), *SOX2* (Spur 3) und *c-MYC* (Spur 4) in den iPS Zellen der HOS Indexpatientin ist nach Amplifikation der Gene und gelelektrophoretischer Auftrennung in Abbildung 22C gezeigt. Die Expression der Pluripotenzmarker *NANOG* (Spur 5) und *REX1* (Spur 6) konnten in den iPS Zellen nachgewiesen werden. In Spur 7 ist die Expression von *ACTB* gezeigt und zeigt die erfolgreich durchgeführte Amplifikation an. Alle Negativkontrollen der Amplifikation wurden als Mix in Spur 8 aufgetragen. Es konnte gezeigt werden, dass die iPS Zellen der Indexpatientin 804-K, die endogenen Reprogrammierungsfaktoren, welche den pluripotenten Charakter nachweisen, wie auch die Pluripotenzmarker *NANOG* und *REX1* exprimieren und somit in der Lage sind, ihre Pluripotenz eigenständig aufrecht zu erhalten.

Die iPS Zellen der Indexpatientin 804-K (Klon 11) wurden mit dem *hPSC Genetic Analysis Kit* auf karyotypische Anomalien überprüft. Es konnten keine, in diesem Kit hinterlegte Anomalien in den iPS Zellen der Indexpatientin gefunden werden (Abb. 22D).

Abbildung 22E zeigt den Nachweis für die Expression von Markern, welche die drei Keimblätter repräsentieren. Die Marker wurden in drei unabhängigen spontanen Differenzierungen mit biologischen Duplikaten an Tag D0 und D21 gemessen. Die endodermalen Marker *AFP* (285-fach) und *SOX7* (10-fach) zeigten am Tag D21 eine erhöhte Expression im Vergleich zu D0. Die Induktion der mesodermalen Marker *ACTA2* (33-fach) und *MYL2* (56-fach) im Verlauf der spontanen Differenzierung war gegeben. Die ektodermalen Marker wurden mit 91-facher (*KRT14*) und 2-facher (*TH*) Expression an Tag D21 versus Tag 0 gemessen. Signifikante Unterschiede in der Genexpression lagen für die Gene *AFP* ( $p < 0,01$ ), *SOX2* ( $p < 0,01$ ), *ACTA2* ( $p < 0,001$ ) und *MYL2* ( $p < 0,05$ ) vor. In Abbildung 22F wurden die Amplifikationsprodukte der Keimblattmarker einer spontanen Differenzierung für die Tage D0 und D21 gelelektrophoretisch aufgetrennt. Auf dem Gel ist für alle Marker mehr Amplifikationsprodukt an D21 im Vergleich zu D0 zu sehen. Marker aller drei Keimblätter wurden im Verlauf der spontanen Differenzierung der iPS Zellen der Indexpatientin 804-K exprimiert.

Die Pluripotenzmarker TRA1-81 und SOX2 wurden positiv immunozytochemisch gefärbt. Die Expression der Marker ist in Abbildung 22G in 400-facher Vergrößerung und in Abbildung 22H in 1000-facher Vergrößerung gezeigt.

### 3.4.3 Funktionelle Analysen des Holt-Oram Syndroms in einem humanen iPS Modell

In der vorliegenden Arbeit wurde ein humanes, patientenspezifisches zelluläres HOS Modell entwickelt, um molekulare Mechanismen des Transkriptionsfaktors *TBX5* in der kardialen Entwicklung untersuchen zu können. Ein patientenspezifisches iPS Modell hat den Vorteil, dass ein gesicherter und bekannter Phänotyp im Patienten existiert. Es wurden iPS Zellen des HOS Indexpatienten 1460, der heterozygot eine *de novo* Mutation im *TBX5* trägt und einen massiven Phänotyp zeigt (Abb. 10A-D) für das HOS iPS Modell ausgewählt. Die iPS Zellen der HOS Indexpatientin 804-K, für die ein HOS diagnostiziert wurde, die keine *TBX5* Mutation trägt und einen weniger ausgeprägten Phänotyp zeigt, wurden ebenfalls in diesem Modell untersucht. Die Etablierung eines humanen patientenspezifischen HOS Modells ermöglicht eine Vielzahl an entwicklungsbiologischen Fragestellungen weitreichend abzudecken.

Um einen *in vitro* Phänotyp für das HOS zu definieren, wurde die Expression der kardialen Transkriptionsfaktoren *NK2 homeobox 5* (*NKX2.5*; NM\_004387), *ISL LIM homeobox 1* (*ISL1*; NM\_002202), *T-BOX 5* (*TBX5*; NM\_000192) und *T-BOX 20* (*TBX20*; NM\_001077653) in der spontanen Differenzierung der HOS iPS Zellen (1460, 804-K) auf ihre Induktion über Tag D0 untersucht. Weitere Gene, deren Expression gemessen wurde, waren der kardiale Marker *Troponin T2*, *cardiac type* (*TNNT2*; NM\_000364) und das *TBX5* Zielgen *Natriuretic peptide A* (*NPPA*; NM\_006172). Das Referenzgen *ACTB* zeigte sich zwischen den zu untersuchenden Gruppen nicht differentiell reguliert. Für alle, in der vorliegenden Arbeit erstellten linearen Regressionsgeraden konnte ein  $R^2 > 0,99$  bestimmt werden, so dass von einem idealen Modell ausgegangen werden kann.

Als Kontrollen wurden die iPS Zellen von zwei gesunden unabhängigen Indexprobanden (C, H), welche vollständig charakterisiert sind und die iPS Zellen der Eltern der HOS Indexpatientin 804-K (804-MU, 804-VA) verwendet. Die iPS Zellen der Kontrolle C mit vollständiger Charakterisierung sind bereits publiziert (Lahm *et al.*, 2015a). Die iPS Zellen der Kontrolle H wurde im Rahmen eines Kooperationsprojektes der Experimentellen Chirurgie des DHMs in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. A. Moretti (1. Department Medizin, Kardiologie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Deutschland) generiert und sind vollständig charakterisiert (nicht publiziert).

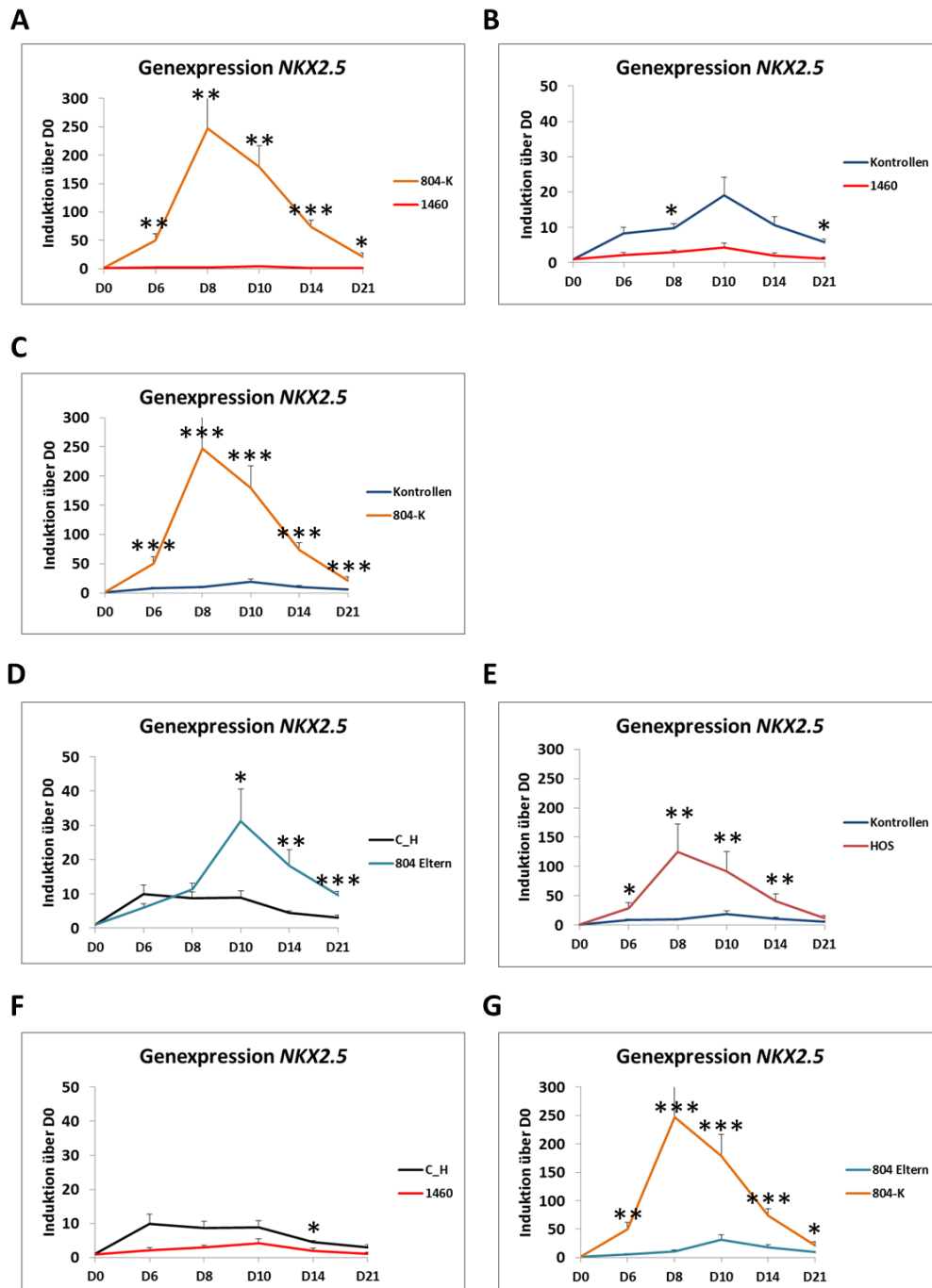
#### 3.4.3.1 Identifikation eines *in vitro* Phänotyps basierend auf der spontanen Differenzierung von HOS patienten-spezifischen iPS Zellen mit und ohne Mutation im *TBX5* Gen

Für die spontane *in vitro* Differenzierung wurden die iPS Zellen der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K über einen Zeitraum von 21 Tagen differenziert. An den Tagen D0, D6, D8, D10, D14 und D21 wurden Proben für die Genexpressionsanalyse abgenommen (Abbildung 6). Als Kontrollen dienten sowohl die iPS Zellen der Eltern der Indexpatientin 804-K (804-MU, 804-VA), wie auch zwei unabhängige Kontrollen (C, H), die äquivalent differenziert wurden.

*NKX2.5*, *TBX5*, *ISL1* und *TBX20* wurden aufgrund ihrer Funktion als bekannte kardiale Transkriptionsfaktoren untersucht. Die Expression von *NPPA* wurde untersucht, da *NPPA* ein bekanntes, direktes Zielgen von *TBX5* ist. *TNNT2* wurde in seiner Funktion als kardialer Marker untersucht. Dargestellt ist die Induktion der untersuchten Marker im Verlauf der spontanen Differenzierung über Tag D0 (Abbildung 23-28).

## Induktion des Transkriptionsfaktors *NKX2.5* in der spontanen Differenzierung

In Abbildung 23 ist die Induktion des kardialen Transkriptionsfaktors *NKX2.5* (NM\_004387) im Verlauf der spontanen Differenzierung gezeigt.



**Abbildung 23: Genexpressionsanalyse der spontanen Differenzierung für humanes *NKX2.5*.** Dargestellt ist die Induktion von *NKX2.5* über Tag D0 nach Normalisierung mit *ACTB*. **(A)** Vergleich der Genexpression der iPS Zellen der HOS Indexpatienten 804-K und 1460. **(B)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(C)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. **(D)** Vergleich der Genexpression der beiden unabhängigen Kontrollen (C, H) mit den abhängigen Kontrollen (804-MU und 804-VA: Eltern der Indexpatientin 804-K). **(E)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit den HOS Indexpatienten (1460, 804-K). **(F)** Vergleich der Genexpression der unabhängigen Kontrollen C und H mit dem HOS Indexpatienten 1460.

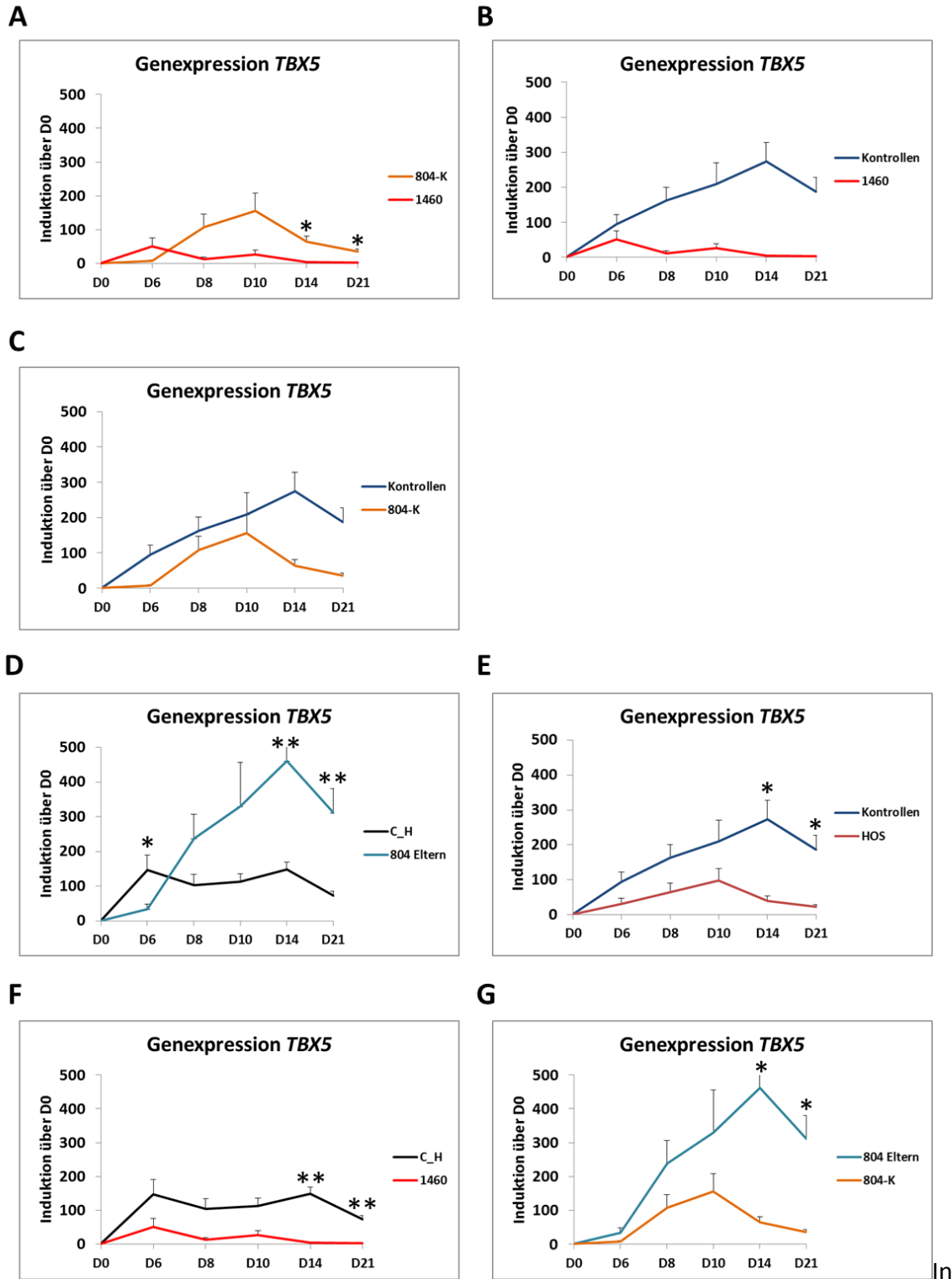
**(G)** Vergleich der Genexpression der Eltern (804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. Kontrollen: iPS Zellen der Probandin C (gesund), des Probanden H (gesund), der Probandin 804-MU (gesund) und des Probanden 804-VA (gesund). C: iPS Zellen der Probandin C (gesund). H: iPS Zellen des Probanden H (gesund). C\_H: iPS Zellen der Probanden C und H (gesund). 804 Eltern: iPS Zellen der Probanden 804-MU und 804-VA (gesund). 804-K: iPS Zellen der Indexpatientin 804 (Kind, HOS Patientin). 1460: iPS Zellen des Indexpatienten 1460 (HOS Patient). Die Genexpressionen wurden für mindestens zwei unabhängige Differenzierungen jedes Probanden/Indexpatienten in Duplikaten/Triplikaten gemessen. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler angegeben. Signifikanzen: \*\*\*:  $p < 0,001$ . \*\*:  $p < 0,01$ . \*:  $p < 0,05$ .

Vergleicht man die Induktion von *NKX2.5* in den iPS Zellen der HOS Indexpatienten ist für den Patienten 1460 eine, für alle Zeitpunkte signifikant geringere Induktion zu sehen (Abb. 23A). In Abbildung 23B ist die Induktion von *NKX2.5* für die im *TBX5* Gen mutierten iPS Zellen (1460) im Vergleich zu den vier Kontrollen gezeigt. Die Induktion von *NKX2.5* in den iPS Zellen des Indexpatienten 1460 ist über den gesamten Verlauf der spontanen Differenzierung erniedrigt und ist für D21 signifikant ( $p < 0,05$ ). Die iPS Zellen der Indexpatientin 804-K (keine *TBX5* Mutation) zeigen im Vergleich zu den vier Kontrollen eine, für alle Zeitpunkte signifikant erhöhte Induktion von *NKX2.5* ( $p < 0,001$ ) (Abb. 23C). Vergleicht man die unabhängigen (C, H) und die abhängigen Kontrollen (804-MU, 804-VA) bezüglich ihrer *NKX2.5* Induktion, ist für die späteren Zeitpunkte (D10, D14 und D21) der spontanen Differenzierung zu sehen, dass die iPS Zellen der abhängigen Kontrollen (804-MU/804-VA) signifikant mehr *NKX2.5* exprimieren (Abb. 23D). Abbildung 23E zeigt die *NKX2.5* Induktion aller Kontrollen im Vergleich zu den beiden HOS Indexpatienten. Es ist eine erhöhte Induktion für *NKX2.5* in den HOS iPS Zellen vorhanden, die für die Zeitpunkte D6, D8 und D10 signifikant ist. Die iPS Zellen des Indexpatienten 1460 zeigen im Vergleich zu den unabhängigen Kontrollen (C, H) eine erniedrigte Induktion für *NKX2.5* im Verlauf der spontanen Differenzierung, die für D14 signifikant ist ( $p < 0,05$ ; Abb. 23F). Vergleicht man die Induktion des TF *NKX2.5* zwischen der Indexpatientin 804-K und ihren phänotypisch gesunden Eltern, ist eine signifikant erhöhte Induktion für alle Zeitpunkte zu sehen (Abb. 23G).

Für die Induktion von *NKX2.5* in der spontanen Differenzierung zeigte sich im iPS Modell eine erniedrigte Induktion für den Indexpatienten 1460, bei dem das *TBX5* Gen mutiert ist. Die erniedrigte Induktion war sowohl im Vergleich mit den unabhängigen, wie auch allen vier Kontrollen zu sehen. Die Induktion von *NKX2.5* für die iPS Zellen (804-K) ohne *TBX5* Mutation war in der spontanen Differenzierung signifikant erhöht. Dies zeigte sich sowohl im Vergleich mit den abhängigen Kontrollen, wie auch im Vergleich mit allen vier Kontrollen.

## Induktion des Transkriptionsfaktors *TBX5* in der spontanen Differenzierung

Die Induktion für *TBX5* (NM\_000192) in der spontanen Differenzierung ist in Abbildung 24 gezeigt.



**Abbildung 24: Genexpressionsanalyse der spontanen Differenzierung für humanes *TBX5*.** Dargestellt ist die Induktion von *TBX5* über Tag D0 nach Normalisierung mit *ACTB*. **(A)** Vergleich der Genexpression der iPS Zellen der HOS Indexpatienten 804-K und 1460. **(B)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-

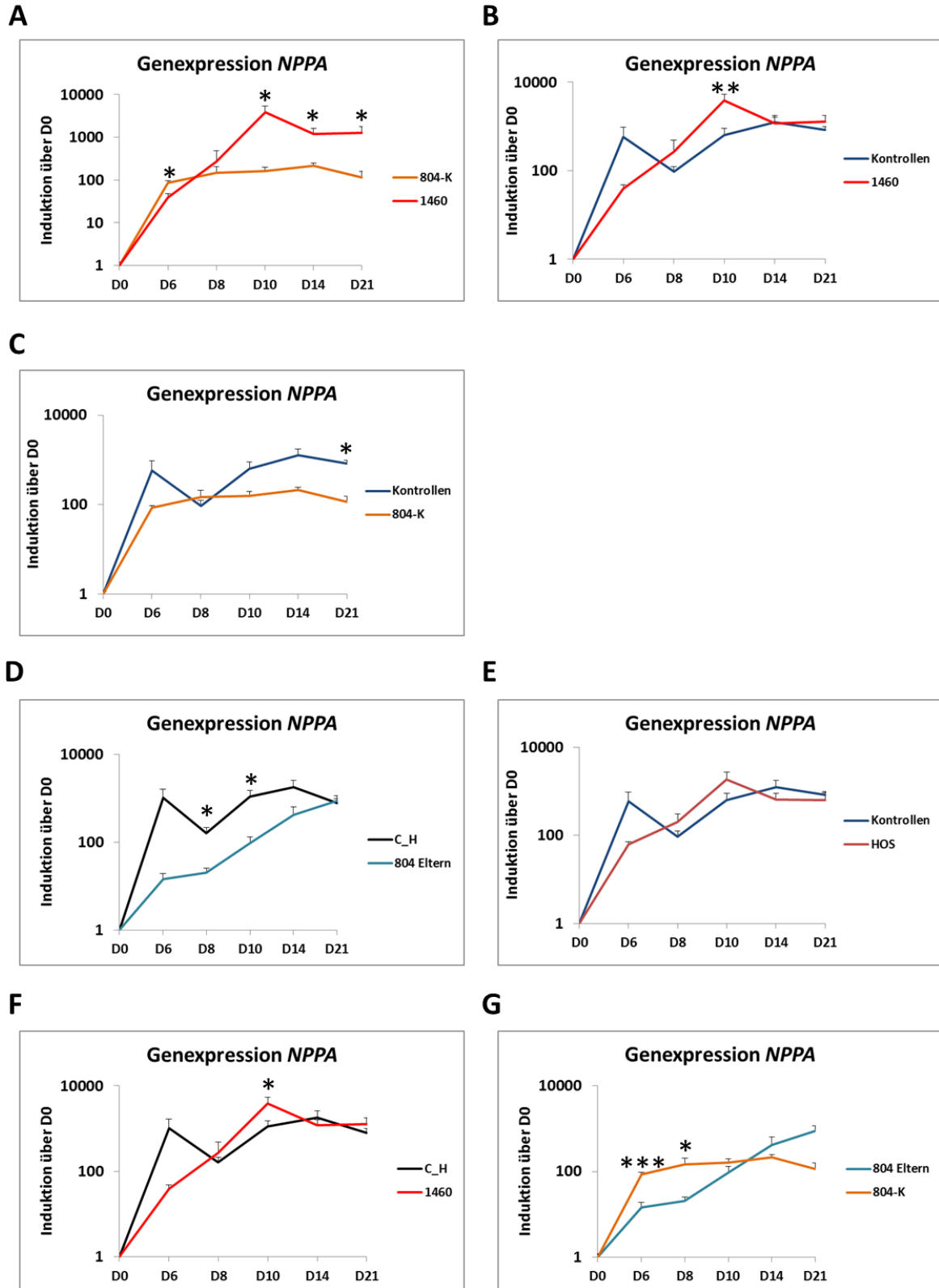
VA) mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(C)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. **(D)** Vergleich der Genexpression der beiden unabhängigen Kontrollen (C, H) mit den abhängigen Kontrollen (804-MU und 804-VA: Eltern der Indexpatientin 804-K). **(E)** Vergleich der Genexpression der Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit den HOS Indexpatienten (1460, 804-K). **(F)** Vergleich der Genexpression der unabhängigen Kontrollen C und H mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(G)** Vergleich der Genexpression der Eltern (804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. Kontrollen: iPS Zellen der Probandin C (gesund), des Probanden H (gesund), der Probandin 804-MU (gesund) und des Probanden 804-VA (gesund). C: iPS Zellen der Probandin C (gesund). H: iPS Zellen des Probanden H (gesund). C\_H: iPS Zellen der Probanden C und H (gesund). 804 Eltern: iPS Zellen der Probanden 804-MU und 804-VA (gesund). 804-K: iPS Zellen der Indexpatientin 804 (Kind, HOS Patientin). 1460: iPS Zellen des Indexpatienten 1460 (HOS Patient). Die Genexpressionen wurden für mindestens zwei unabhängige Differenzierungen jedes Probanden/Indexpatienten in Duplikaten/Triplikaten gemessen. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler angegeben. Signifikanzen: \*\*:  $p < 0,01$ . p\*:  $p < 0,05$ .

In Abbildung 24A ist die vergleichende Genexpressionsanalyse von *TBX5* in den beiden iPS Zellen der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K gezeigt. Die iPS Zellen des Indexpatienten 1460 zeigten, mit Ausnahme des Tags D6, eine niedrigere *TBX5* Induktion als die iPS Zellen der Indexpatientin 804-K, die für die Tage D14 und D21 signifikant ist ( $p < 0,05$ ). Die *TBX5* Induktion des HOS Indexpatienten 1460 im Vergleich zu den vier Kontrollen war im Verlauf der spontanen Differenzierung zu allen Zeitpunkten erniedrigt, ohne eine Signifikanz zu erreichen (Abb. 24B). Die Induktion von *TBX5* in den iPS Zellen der HOS Indexpatientin 804-K war im Vergleich zu den vier Kontrollen ebenfalls erniedrigt, ohne eine Signifikanz zu erreichen (Abb. 24C). In Abbildung 24D ist die *TBX5* Genexpression über Tag D0 im Verlauf der spontanen Differenzierung der unabhängigen Kontrollen im Vergleich zu den abhängigen Kontrollen dargestellt. Die iPS Zellen der Eltern (804-MU, 804-VA) zeigten im Verlauf der spontanen Differenzierung eine für den Zeitpunkt D14 und D21 signifikant erhöhte Induktion von *TBX5* im Vergleich zu den unabhängigen Kontrollen ( $p < 0,01$ ). Für den frühen Zeitpunkt D6 zeigten die iPS Zellen der Eltern der Indexpatientin 804-K eine geringere *TBX5* Induktion ( $p < 0,05$ ). Die Induktion von *TBX5* beider HOS Indexpatienten war im Vergleich zu den vier Kontrollen erniedrigt und erreichte für die Tage D14 und D21 eine Signifikanz ( $p < 0,05$ ; Abb. 24E). Die iPS Zellen des HOS Indexpatienten 1460 zeigten eine niedrigere Induktion für *TBX5* in der spontanen Differenzierung im Vergleich zu den beiden unabhängigen Kontroll-iPS Zellen (Abb. 24F). Dieser Unterschied war für die Tage D14 und D21 signifikant ( $p < 0,01$ ). Die Induktion von *TBX5* in der spontanen Differenzierung der iPS Zellen der Indexpatientin 804-K (keine *TBX5* Mutation) war im Vergleich zu den iPS Zellen ihrer Eltern ebenfalls erniedrigt und erreichte für die Tage D14 und D21 einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ; Abb. 24G). Für beide HOS Indexpatienten konnte *in vitro* eine, über den kompletten Verlauf der spontanen Differenzierung erniedrigte Induktion für *TBX5* im Vergleich zu den Kontrollen gezeigt werden.



Induktion des TBX5 Zielgens *NPPA* in der spontanen Differenzierung

Die Induktion von *NPPA* (NM\_006172) in der spontanen Differenzierung ist in Abbildung 25 gezeigt.



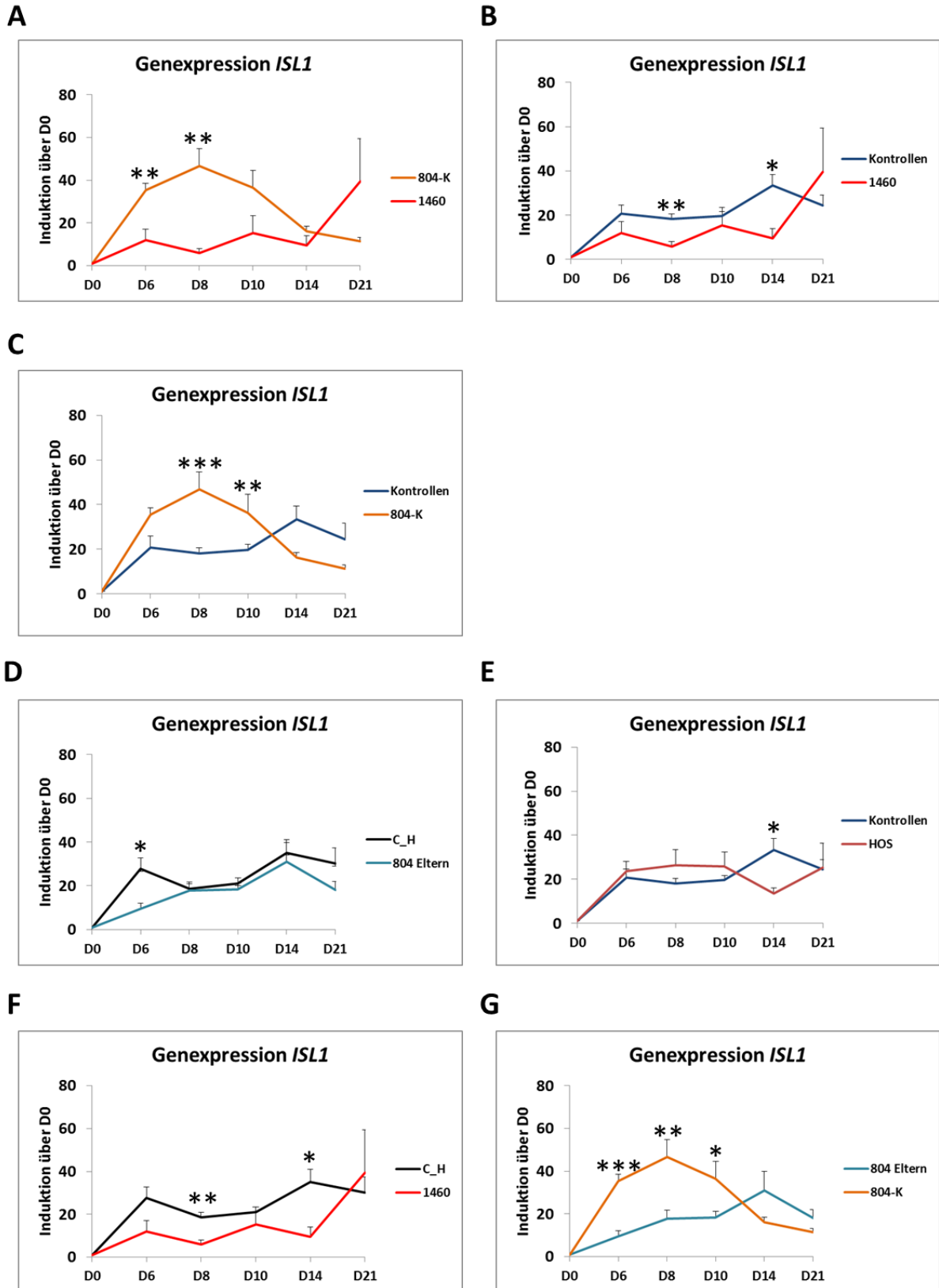
**Abbildung 25: Genexpressionsanalyse der spontanen Differenzierung für humanes *NPPA*.** Dargestellt ist die Induktion von *NPPA* über Tag D0 nach Normalisierung mit *ACTB*. **(A)** Vergleich der Genexpression der iPS Zellen der HOS Indexpatienten 804-K und 1460. **(B)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(C)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. **(D)** Vergleich der Genexpression der beiden unabhängigen Kontrollen (C, H) mit den abhängigen Kontrollen (804-MU und 804-VA: Eltern der Indexpatientin 804-K). **(E)** Vergleich der Genexpression der Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit den HOS Indexpatienten (1460, 804-K). **(F)** Vergleich der Genexpression der unabhängigen Kontrollen C und H mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(G)** Vergleich der Genexpression der Eltern (804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. Kontrollen: iPS Zellen der Probandin C (gesund), des Probanden H (gesund), der Probandin 804-MU (gesund) und des Probanden 804-VA (gesund). C: iPS Zellen der Probandin C (gesund). H: iPS Zellen des Probanden H (gesund). C\_H: iPS Zellen der Probanden C und H (gesund). 804 Eltern: iPS Zellen der Probanden 804-MU und 804-VA (gesund). 804-K: iPS Zellen der Indexpatientin 804 (Kind, HOS Indexpatientin). 1460: iPS Zellen des Indexpatienten 1460 (HOS Indexpatient). Die Genexpressionen wurden für mindestens zwei unabhängige Differenzierungen jedes Probanden/Indexpatienten in Duplikaten/Triplikaten gemessen. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler angegeben. Signifikanzen: \*\*\*:  $p < 0,001$ . \*\*:  $p < 0,01$ . \*:  $p < 0,05$ .

Der Vergleich der *NPPA* Induktion der HOS Indexpatienten ist in Abbildung 25A gezeigt. Die iPS Zellen des Indexprobanden 1460 exprimierten in der frühen Differenzierung (D6) signifikant weniger *NPPA* als die iPS Zellen der Indexpatientin 804-K ( $p < 0,05$ ). Im Verlauf der Differenzierung stieg die *NPPA* Induktion deutlich an, und erreichte ab Tag D10 signifikant höhere Werte ( $p < 0,05$ ). In Abbildung 25B und C ist die *NPPA* Induktion der HOS Indexpatienten im Vergleich zu den vier Kontrollen gezeigt. Die iPS Zellen beider HOS Indexpatienten zeigten zu Beginn der Differenzierung eine niedrigere *NPPA* Induktion. Im Verlauf der Differenzierung nahm die *NPPA* Induktion des Indexpatienten 1460 zu und erreichte bzw. überschritt das Induktionsniveau der Kontrollen, mit Signifikanz ( $p < 0,01$ ) für Tag D10 (Abb. 25B). Die iPS Zellen der Indexpatientin 804-K induzierten, mit Ausnahme des Tags D8 weniger *NPPA* als die Kontrollen (D21:  $p < 0,05$ ; Abb. 25C). In Abbildung 25D ist die *NPPA* Induktion für die unabhängigen und abhängigen Kontrollen gezeigt. Die unabhängigen Kontrollen zeigten über den Verlauf der Differenzierung eine höhere *NPPA* Induktion als die iPS Zellen 804-MU und 804-VA. Für die Zeitpunkte D8 und D10 war dieser Unterschied signifikant ( $p < 0,01$ ). Abbildung 25E zeigt die ähnliche Induktion von *NPPA* der HOS Indexpatienten im Vergleich zu allen Kontrollen und ist mit der höheren *NPPA* Induktion des Patienten 1460 (Abb. 25B) und der niedrigeren Induktion der Patientin 804 (Abb. 25C) zu erklären. Die Induktion von *NPPA* der iPS Zellen des Indexpatienten 1460 ist in Abbildung 25F im Vergleich zu den unabhängigen Kontrollen gezeigt. Zu Beginn der Differenzierung war eine niedrigere Induktion für den Indexpatienten 1460, zu späteren Zeitpunkten eine ähnliche *NPPA* Induktion zu sehen (D10:  $p < 0,05$ ). Vergleicht man die *NPPA* Induktion für die Indexpatientin 804-K mit der Induktion der Eltern, sah man eine signifikant höhere *NPPA* Induktion (D6:  $p < 0,001$ ; D8:  $p < 0,05$ ) für die Indexpatientin zu den frühen Zeitpunkten der Differenzierung (Abb. 25G).

Betrachtet man die *NPPA* Induktion im Verlauf der spontanen Differenzierung waren keine deutlichen Unterschiede zwischen den iPS Zellen der HOS Indexpatienten und den iPS Zellen der Kontrollen zu erkennen. Die iPS Zellen des Indexpatienten 1460 zeigten im Vergleich zur HOS Indexpatientin ohne *TBX5* Mutation eine erhöhte Induktion von *NPPA* im Verlauf der spontanen Differenzierung.

Induktion des Transkriptionsfaktors *ISL1* in der spontanen Differenzierung

In Abbildung 26 ist die Induktion von *ISL1* (NM\_002202) im Verlauf der spontanen Differenzierung gezeigt.

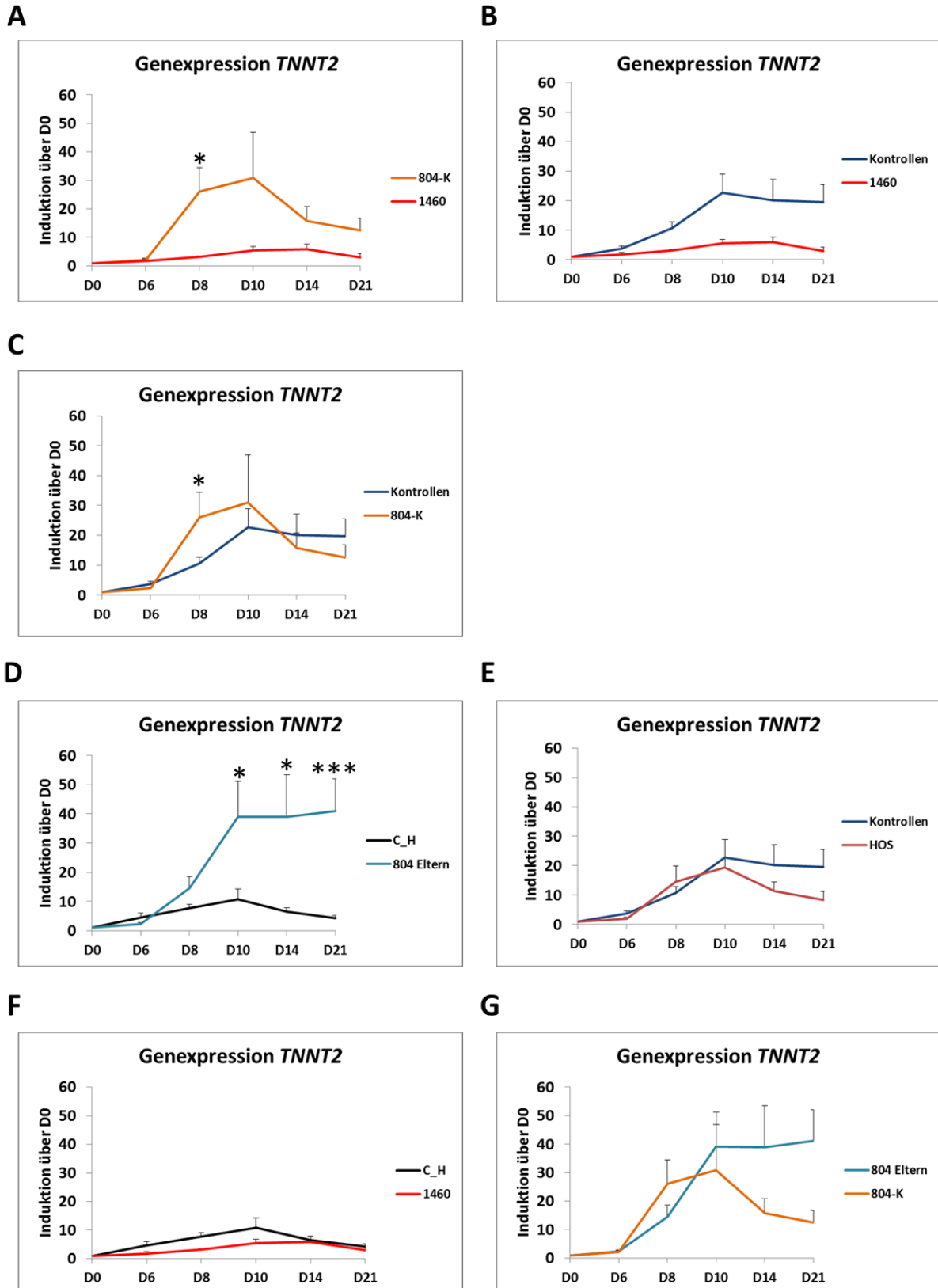


**Abbildung 26: Genexpressionsanalyse der spontanen Differenzierung für humanes *ISL1*.** Dargestellt ist die Induktion von *ISL1* über Tag D0 nach Normalisierung mit *ACTB*. **(A)** Vergleich der Genexpression der iPS Zellen der HOS Indexpatienten 804-K und 1460. **(B)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(C)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. **(D)** Vergleich der Genexpression der beiden unabhängigen Kontrollen (C, H) mit den abhängigen Kontrollen (804-MU und 804-VA: Eltern der Indexpatientin 804-K). **(E)** Vergleich der Genexpression der Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit den HOS Indexpatienten (1460, 804-K). **(F)** Vergleich der Genexpression der unabhängigen Kontrollen C und H mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(G)** Vergleich der Genexpression der Eltern (804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. Kontrollen: iPS Zellen der Probandin C (gesund), des Probanden H (gesund), der Probandin 804-MU (gesund) und des Probanden 804-VA (gesund). C: iPS Zellen der Probandin C (gesund). H: iPS Zellen des Probanden H (gesund). C\_H: iPS Zellen der Probanden C und H (gesund). 804 Eltern: iPS Zellen der Probanden 804-MU und 804-VA (gesund). 804-K: iPS Zellen der Indexpatientin 804 (Kind, HOS Patientin). 1460: iPS Zellen des Indexpatienten 1460 (HOS Patient). Die Genexpressionen wurden für mindestens zwei unabhängige Differenzierungen jedes Probanden/Indexpatienten in Duplikaten/Triplikaten gemessen. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler angegeben. Signifikanzen: \*\*\*:  $p < 0,001$ . \*\*:  $p < 0,01$ . \*:  $p < 0,05$ .

Ein Vergleich der Induktion von *ISL1* zwischen den iPS Zellen der beiden HOS Indexpatienten, zeigte eine stärkere Induktion für die Indexpatientin 804-K (Abb. 26A), die für die Tage D6 und D8 signifikant war ( $p < 0,01$ ). Der signifikante Unterschied der beiden HOS Indexpatienten spiegelte sich, bei getrennter Betrachtung der *ISL1* Induktion im Vergleich zu den vier Kontrollen in Abbildung 26B und C wider. Die iPS Zellen des Indexpatienten 1460 zeigten eine im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigte *ISL1* Induktion, die für die Zeitpunkte D8 und D14 das Signifikanzniveau erreichte (D8:  $p < 0,01$ ; D14:  $p < 0,05$ ; Abb. 25B). Die iPS Zellen der Indexpatientin 804-K zeigten zu den frühen Zeitpunkten der Differenzierung (D6, D8 und D10) eine höhere *ISL1* Induktion, die für D8 und D10 signifikant war (D8:  $p < 0,001$ ; D10:  $p < 0,01$ ; Abb. 26C). In Abbildung 26D ist die *ISL1* Induktion der Kontrollen verglichen. Die Induktion für *ISL1* war im Verlauf der spontanen Differenzierung der abhängigen und unabhängigen Kontrollen ähnlich und zeigte nur für Tag D6 eine signifikant höhere Induktion der unabhängigen Kontrollen ( $p < 0,05$ ). Abbildung 26E zeigt den Vergleich der *ISL1* Induktion beider HOS Indexpatienten mit den vier Kontrollen. Für den Tag D14 war eine signifikant erniedrigte Induktion für *ISL1* in den Differenzierungen der HOS Indexpatienten im Vergleich zu den Kontrollen zu sehen ( $p < 0,05$ ). Die *ISL1* Induktion für den HOS Indexpatienten 1460 gegen die unabhängigen Kontroll-Linien (C, H) ist in Abbildung 26F gezeigt. Die iPS Zellen des Indexpatienten zeigten über den Verlauf der spontanen Differenzierung eine erniedrigte *ISL1* Induktion, die für die Tage D8 und D14 signifikant war (D8:  $p < 0,01$ ; D14:  $p < 0,05$ ). In Abbildung 26G ist die *ISL1* Induktion der Indexpatientin 804-K mit der ihrer Eltern verglichen. Die iPS Zellen der Indexpatientin 804-K zeigten bis zum Tag D10 eine deutlich höhere Induktion für *ISL1* im Vergleich zu den iPS Zellen der Eltern, die für die Zeitpunkte D6, 8 und 10 signifikant war (D6:  $p < 0,001$ ; D8:  $p < 0,01$ ; D10:  $p < 0,05$ ; Abb. 26G). Die *ISL1* Induktion für die HOS Indexpatienten war im Vergleich zu den Kontrollen gegensätzlich. Die iPS Zellen des Indexpatienten 1460 zeigten im Verlauf der spontanen Differenzierung eine erniedrigte Induktion, die iPS Zellen der Indexpatientin 804-K eine erhöhte Induktion im Vergleich zu den Kontrollen.

## Induktion von *TNNT2* in der spontanen Differenzierung

Die Induktion des kardialen Markers Troponin T (*TNNT2*, NM\_000364) in der spontanen Differenzierung ist in Abbildung 27 zusammengefasst.



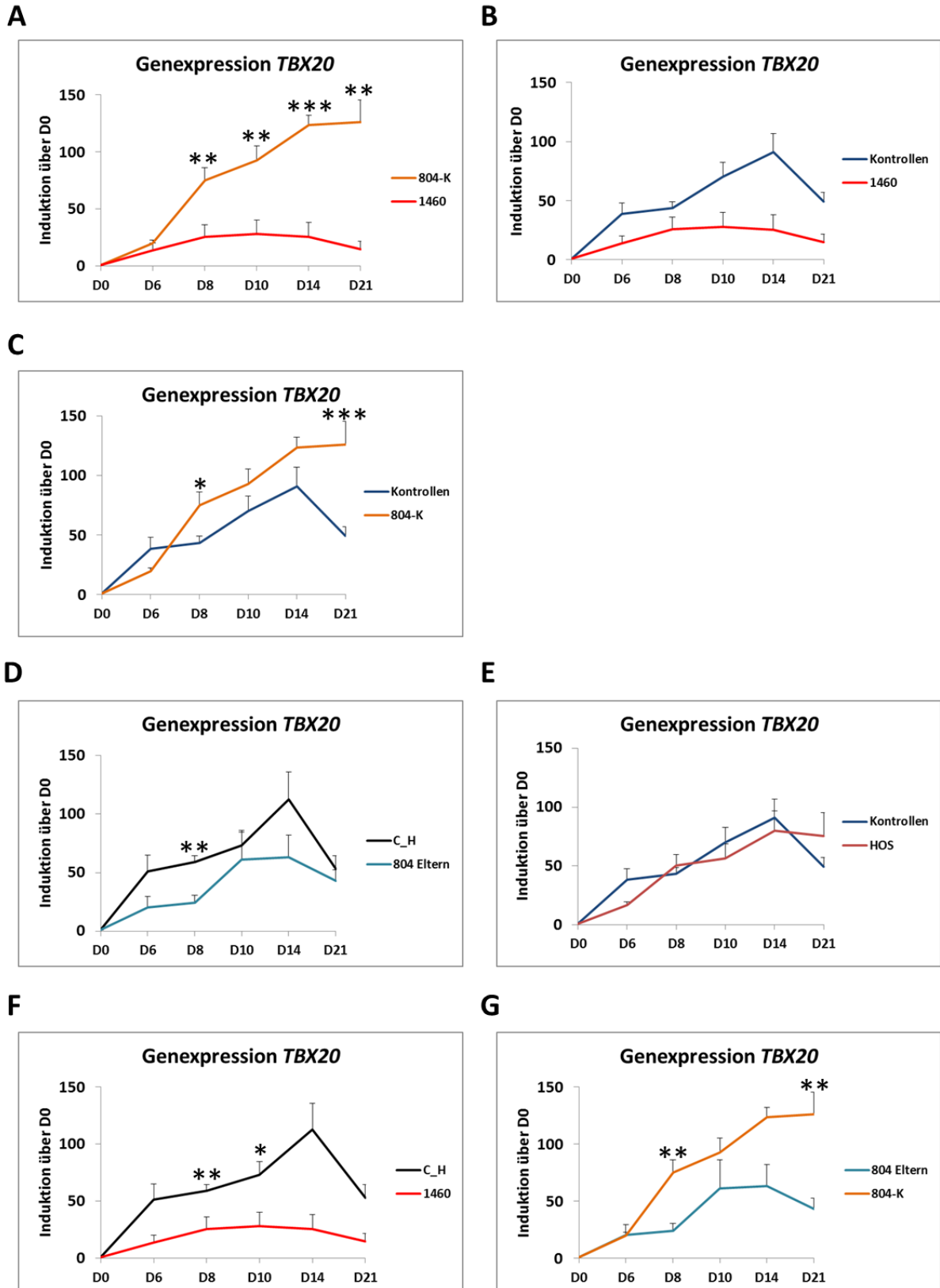
**Abbildung 27: Genexpressionsanalyse der spontanen Differenzierung für humanes *TNNT2*.** Dargestellt ist die Induktion von *TNNT2* über Tag D0 nach Normalisierung mit *ACTB*. **(A)** Vergleich der Genexpression der iPS Zellen der HOS Indexpatienten 804-K und 1460. **(B)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(C)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. **(D)** Vergleich der Genexpression der beiden unabhängigen Kontrollen (C, H) mit den abhängigen Kontrollen (804-MU und 804-VA: Eltern der Indexpatientin 804-K). **(E)** Vergleich der Genexpression der Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit den HOS Indexpatienten (1460, 804-K). **(F)** Vergleich der Genexpression der unabhängigen Kontrollen C und H mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(G)** Vergleich der Genexpression der Eltern (804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. Kontrollen: iPS Zellen der Probandin C (gesund), des Probanden H (gesund), der Probandin 804-MU (gesund) und des Probanden 804-VA (gesund). C: iPS Zellen der Probandin C (gesund). H: iPS Zellen des Probanden H (gesund). C\_H: iPS Zellen der Probanden C und H (gesund). 804 Eltern: iPS Zellen der Probanden 804-MU und 804-VA (gesund). 804-K: iPS Zellen der Indexpatientin 804 (Kind, HOS Patientin). 1460: iPS Zellen des Indexpatienten 1460 (HOS Patient). Die Genexpressionen wurden für mindestens zwei unabhängige Differenzierungen jedes Probanden/Indexpatienten in Duplikaten/Triplikaten gemessen. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler angegeben. Signifikanzen: \*\*\*:  $p < 0,001$ . \*:  $p < 0,05$ .

Teilabbildung 27A vergleicht die *TNNT2* Induktion zwischen den iPS Zellen der beiden HOS Indexpatienten 1460 und 804-K. Die iPS Zellen des Indexpatienten 1460 zeigten im kompletten Verlauf der spontanen Differenzierung eine niedrigere Induktion für *TNNT2*, die für den Tag D8 signifikant war ( $p < 0,05$ ). Abbildung 27B zeigt die niedrigere Induktion der iPS Zellen des HOS Indexpatienten 1460 im Vergleich zu den Kontrollen. Vergleicht man die Induktion von *TNNT2* in der spontanen Differenzierung der Indexpatientin 804-K mit den Kontrollen, war zu Beginn der Differenzierung (D8, D10) eine erhöhte Induktion, die für den Tag D8 signifikant war ( $p < 0,05$ ; Abb. 27C), zu sehen. In Abbildung 27D ist die *TNNT2* Induktion zwischen den unabhängigen und abhängigen Kontrollen gezeigt. Die abhängigen Kontrollen zeigten eine deutlich höhere *TNNT2* Expression, die für die Zeitpunkte D10, D14 und D21 signifikant war (D10:  $p < 0,05$ ; D14:  $p < 0,05$ ; D21:  $p < 0,001$ ). In Abbildung 27E ist die *TNNT2* Induktion der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K gegen die vier Kontrollen dargestellt. Da die erniedrigte *TNNT2* Induktion des Indexpatienten 1460 (Abb. 27B) die erhöhte Induktion der Indexpatientin 804-K (Abb. 27C) ausgleicht, waren keine signifikanten Unterschiede zwischen der Induktion von *TNNT2* in den HOS iPS Zellen im Vergleich zu den Kontrollen zu sehen (Abb. 27E). Vergleicht man die *TNNT2* Induktion des HOS Indexpatienten 1460 mit den unabhängigen Kontrollen (C, H), war eine vergleichbare Induktion von *TNNT2* zu sehen (Abb. 27F). Abbildung 27G zeigt den Vergleich der *TNNT2* Induktion der Indexpatientin 804-K mit den iPS Zellen ihrer Eltern. Zu den späteren Zeitpunkten der Differenzierung (D10, D14, D21) war *TNNT2* in den sich differenzierenden iPS Zellen der HOS Indexpatientin geringer induziert als in den iPS Zellen ihrer Eltern.

Die Induktion für *TNNT2* war in der spontanen Differenzierung für die HOS Indexpatienten im Vergleich zu den Kontrollen entgegengesetzt. Der Indexpatient 1460 zeigte eine erniedrigte Induktion im Vergleich zu den Kontrollen. Die Indexpatientin 804-K zeigt eine initial erhöhte *TNNT2* Induktion, die sich für die späteren Zeitpunkte der Induktion der Kontrollen annäherte.

Induktion des Transkriptionsfaktors *TBX20* in der spontanen Differenzierung

Die Genexpressionsanalyse von *TBX20* in der spontanen Differenzierung als Induktion über Tag D0 ist in Abbildung 28 gezeigt.



**Abbildung 28: Genexpressionsanalyse der spontanen Differenzierung für humanes *TBX20*.** Dargestellt ist die Induktion von *TBX20* über Tag D0 nach Normalisierung mit *ACTB*. **(A)** Vergleich der Genexpression der iPS Zellen der HOS Indexpatienten 804-K und 1460. **(B)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(C)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. **(D)** Vergleich der Genexpression der beiden unabhängigen Kontrollen (C, H) mit den abhängigen Kontrollen (804-MU und 804-VA: Eltern der Indexpatientin 804-K). **(E)** Vergleich der Genexpression der Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit den HOS Indexpatienten (1460, 804-K). **(F)** Vergleich der Genexpression der unabhängigen Kontrollen C und H mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(G)** Vergleich der Genexpression der Eltern (804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. Kontrollen: iPS Zellen der Probandin C (gesund), des Probanden H (gesund), der Probandin 804-MU (gesund) und des Probanden 804-VA (gesund). C: iPS Zellen der Probandin C (gesund). H: iPS Zellen des Probanden H (gesund). C\_H: iPS Zellen der Probanden C und H (gesund). 804 Eltern: iPS Zellen der Probanden 804-MU und 804-VA (gesund). 804-K: iPS Zellen der Indexpatientin 804 (Kind, HOS Patientin). 1460: iPS Zellen des Indexpatienten 1460 (HOS Patient). Die Genexpressionen wurden für mindestens zwei unabhängige Differenzierungen jedes Probanden/Indexpatienten in Duplikaten/Triplikaten gemessen. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler angegeben. Signifikanzen: \*\*\*:  $p < 0,001$ . \*\*:  $p < 0,01$ . \*:  $p < 0,05$ .

Abbildung 28A vergleicht die *TBX20* Induktion zwischen den iPS Zellen der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K. Die sich differenzierenden iPS Zellen der Indexpatientin 804-K zeigten eine deutlich höhere *TBX20* Induktion, die ab dem Zeitpunkt D8 signifikant war (D8:  $p < 0,01$ ; D10:  $p < 0,01$ ; D14:  $p < 0,001$ ; D21:  $p < 0,01$ ). Vergleicht man die Induktion von *TBX20* für den HOS Indexpatienten 1460 mit den vier Kontrollen war eine erniedrigte *TBX20* Induktion für den kompletten Verlauf der spontanen Differenzierung zu sehen (Abb. 28B). Die *TBX20* Induktion für die HOS Indexpatientin 804-K ist in Abbildung 28C im Vergleich zu den vier Kontrollen gezeigt. Ab Tag D8 der spontanen Differenzierung zeigten die iPS Zellen der Indexpatientin 804-K eine höhere Induktion für *TBX20*. Die unterschiedliche Induktion war für die Tage D8 und D21 signifikant (D8:  $p < 0,01$ ; D21:  $p < 0,001$ ). Die *TBX20* Induktion der spontanen Differenzierung der Kontrollen ist in Abbildung 28D gezeigt. Die unabhängigen Kontrollen induzierten, im Vergleich zu den abhängigen Kontrollen, mehr *TBX20*. Dieser Unterschied war nur für den Zeitpunkt D8 signifikant ( $p < 0,01$ ). In Abbildung 28E ist die *TBX20* Induktion der HOS iPS Zellen mit den iPS Zellen der Kontrollen verglichen. Für beide Gruppen zeigte sich über den Verlauf der spontanen Differenzierung eine ähnliche, nicht signifikant unterschiedliche *TBX20* Induktion, welche auf die konträre Induktion von *TBX20* für die iPS Zellen der beiden HOS Indexpatienten zurückzuführen ist. Vergleicht man die Induktion von *TBX20* in den sich differenzierenden iPS Zellen des Indexpatienten 1460 mit den unabhängigen Kontrollen C und H, war eine erniedrigte *TBX20* Induktion über den kompletten Verlauf der spontanen Differenzierung für den Indexpatienten zu sehen, die für die Zeitpunkte D8 und D10 signifikant war (D8:  $p < 0,01$ ; D10:  $p < 0,05$ ; Abb. 28F). Die iPS Zellen der Indexpatientin 804-K zeigten im Vergleich zu den iPS Zellen der Eltern eine über die Differenzierung erhöhte *TBX20* Induktion, die für die Zeitpunkte D8 und D21 signifikant war ( $p < 0,01$ ; Abb. 28G).

Die Induktion von *TBX20* war für die sich differenzierenden iPS Zellen der HOS Indexpatienten im Vergleich zu den Kontrollen konträr. Die iPS Zellen des Indexpatienten 1460 zeigten in der spontanen Differenzierung eine erniedrigte Induktion, die Zellen der Indexpatientin 804-K eine erhöhte Induktion im Vergleich zu den Kontrollen.



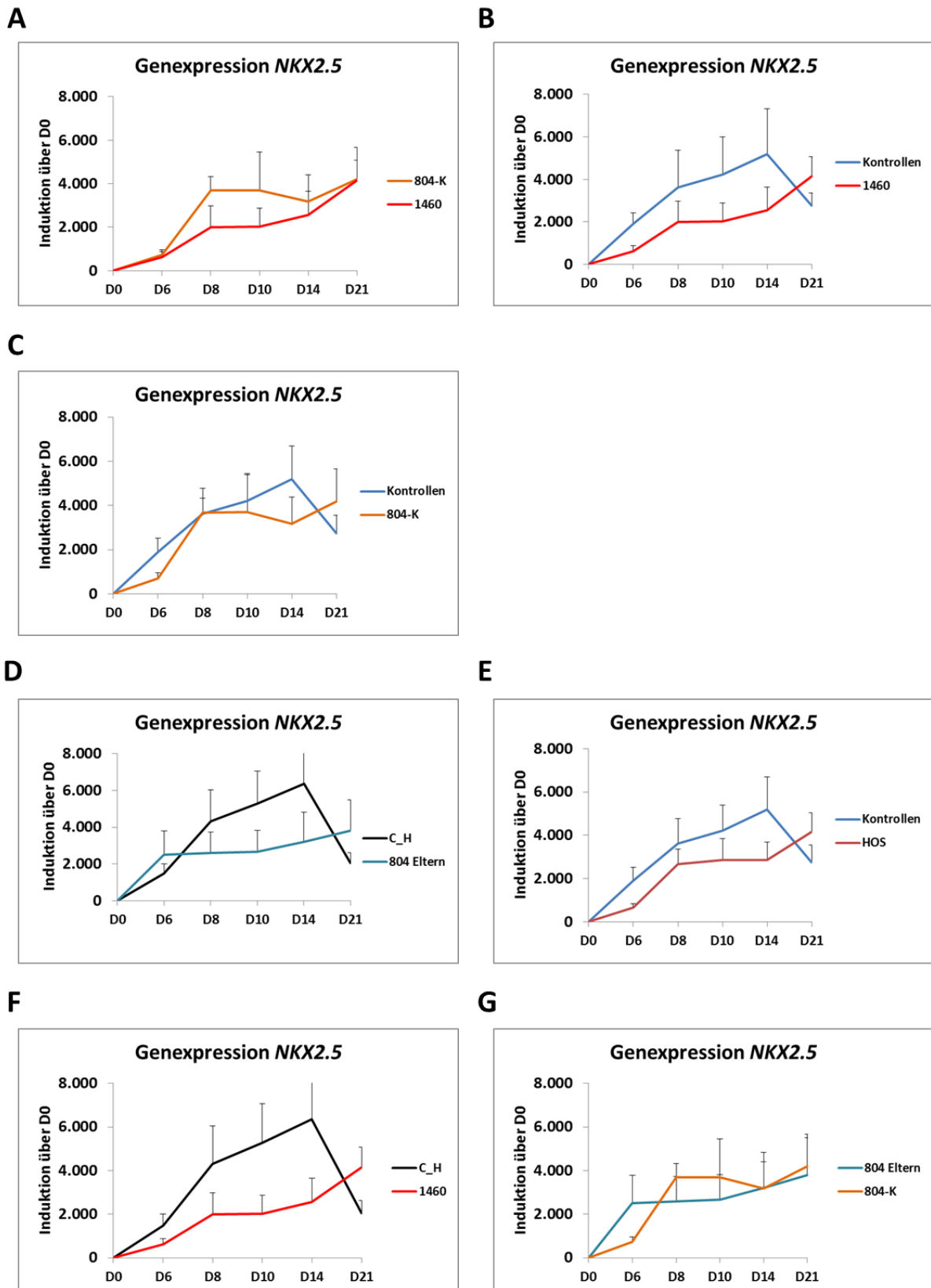
### 3.4.3.2 Verifikation der identifizierten differentiell exprimierten Gene als Schlüsselregulatoren der kardialen Differenzierung in einem gerichteten Differenzierungsprotokoll

Da die spontane *in vitro* Differenzierung pluripotenter Stammzellen lediglich zu einem sehr niedrigen Anteil an Kardiomyozyten (1-3%) führt, wurde nach der molekularen Definition des *in vitro* Phänotyps in der spontanen Differenzierung ein Protokoll zur gerichteten Differenzierung von iPS Zellen verwendet. Das verwendete Protokoll der gerichteten Differenzierung moduliert durch die Verwendung von *small molecules* den Wnt-Signalweg und es entstehen Kardiomyozyten mit einem Anteil von über 80% der Zellen (Burridge *et al.*, 2014). Die Verifikation der, in der spontanen Differenzierung differentiell regulierten Gene, in einem gerichteten Differenzierungsprotokoll ist in den Abbildungen 29-34 zusammengefasst.

Für die Indexpatientin 804 wurde in der WES eine *de novo* Mutation im Gen *THEMIS2* identifiziert. *De novo* Mutationen im Patienten, bei gesunden Eltern, sind als potentiell ursächlich für die Entstehung der Erkrankung zu berücksichtigen. Eine Induktion der Genexpression in der gerichteten kardialen Differenzierung ist ein Hinweis für die Relevanz des Gens in der kardialen Entwicklung. Die Induktion des *THEMIS2* Gens wurde als Induktion über Tag D0 nach Normalisierung mit *ACTB* in der kardial gerichteten Differenzierung von iPS Zellen einer gesunden Kontrolle gemessen. Die Expression von *THEMIS2* war für alle Zeitpunkte (D0, D6, D8, D10, D14 und D21) gegeben (Abbildung S6B), zeigte sich aber nicht unterschiedlich im Verlauf der Differenzierung. Es konnte keine Induktion des *THEMIS2* nachgewiesen werden (Abbildung S6B). Das Amplifikationsprodukt *THEMIS2* ist nach gelelektrophoretischer Auftrennung in der Abbildung S6C gezeigt.

## Induktion des Transkriptionsfaktors *NKX2.5* in der gerichteten Differenzierung

Die Induktion für *NKX2.5* in der gerichteten Differenzierung ist in Abbildung 29 gezeigt.



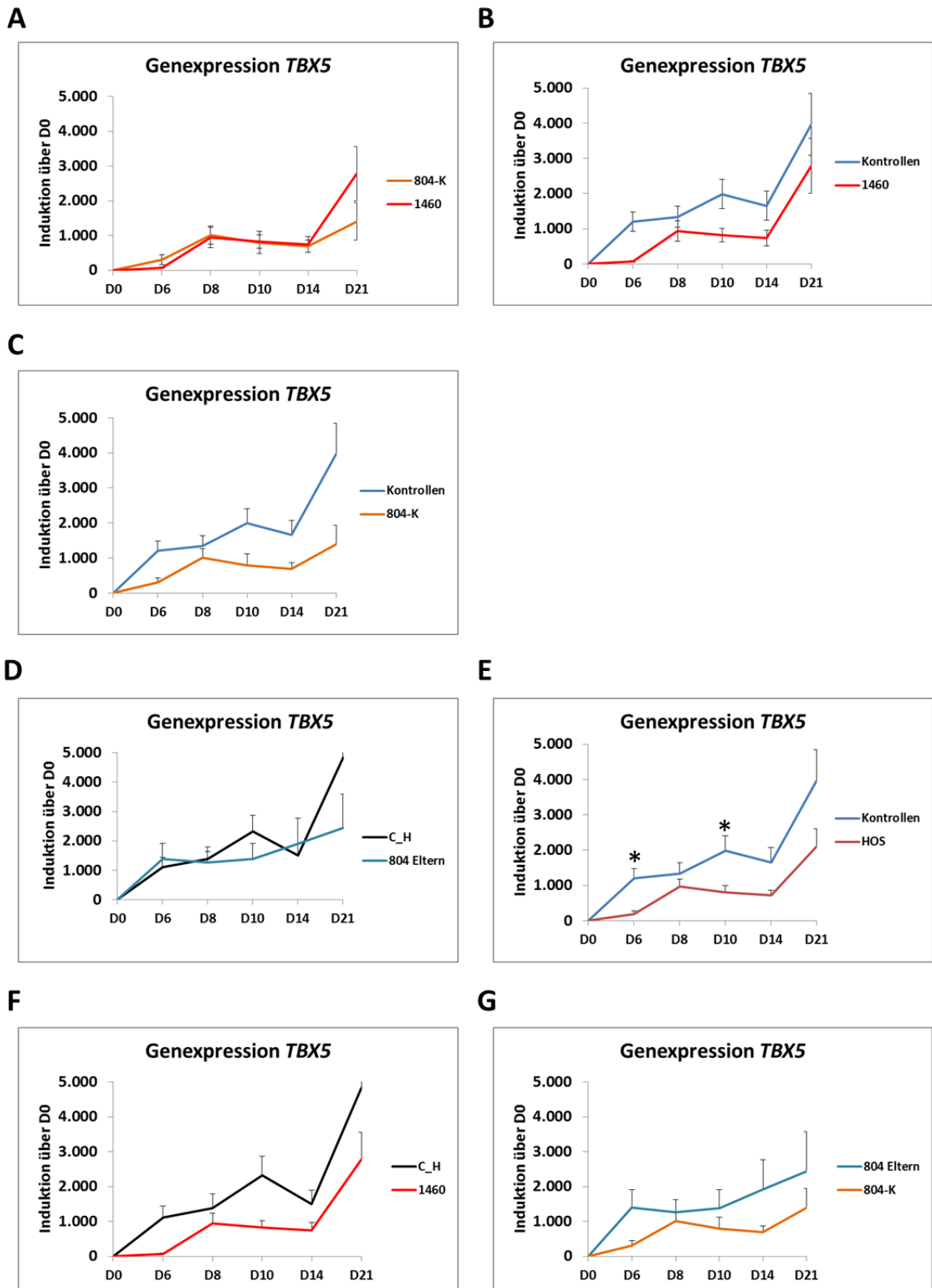
**Abbildung 29: Genexpressionsanalyse der gerichteten Differenzierung für humanes *NKX2.5*.** Dargestellt ist die Induktion von *NKX2.5* über Tag D0 nach Normalisierung mit *ACTB*. **(A)** Vergleich der Genexpression der iPS Zellen der HOS Indexpatienten 804-K und 1460. **(B)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(C)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. **(D)** Vergleich der Genexpression der beiden unabhängigen Kontrollen (C, H) mit den abhängigen Kontrollen (804-MU und 804-VA: Eltern der Indexpatientin 804-K). **(E)** Vergleich der Genexpression der Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit den HOS Indexpatienten (1460, 804-K). **(F)** Vergleich der Genexpression der unabhängigen Kontrollen C und H mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(G)** Vergleich der Genexpression der Eltern (804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. Kontrollen: iPS Zellen der Probandin C (gesund), des Probanden H (gesund), der Probandin 804-MU (gesund) und des Probanden 804-VA (gesund). C: iPS Zellen der Probandin C (gesund). H: iPS Zellen des Probanden H (gesund). C\_H: iPS Zellen der Probanden C und H (gesund). 804 Eltern: iPS Zellen der Probanden 804-MU und 804-VA (gesund). 804-K: iPS Zellen der Indexpatientin 804 (Kind, HOS Patientin). 1460: iPS Zellen des Indexpatienten 1460 (HOS Patient). Die Genexpressionen wurden für mindestens zwei unabhängige Differenzierungen jedes Probanden/Indexpatienten in Duplikaten/Triplikaten gemessen. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler angegeben.

Abbildung 29A vergleicht die Induktion von *NKX2.5* für die iPS Zellen der Indexpatienten. Beide Indexpatienten zeigten eine Induktion von *NKX2.5* ab Tag D6. Die Induktion für *NKX2.5* erreichte für die Zellen der Indexpatientin 804-K an den Tagen D8, D10 und D14 ein deutlich höheres Niveau als die Zellen des Indexpatienten 1460. In Abbildung 29B ist die Induktion für *NKX2.5* des Indexpatienten 1460 mit den Kontrollen verglichen. Die Induktion in den Zellen des Indexpatienten 1460 war deutlich niedriger und relativierte sich erst an Tag D21. Die gerichtete Differenzierung der iPS Zellen der Indexpatientin 804-K zeigte eine, für die Tage D6, D10 und D14 erniedrigte Induktion im Vergleich zu den vier Kontrollen (Abb. 29C). Abbildung 29D zeigt die Induktion von *NKX2.5* in den beiden Kontrollgruppen (unabhängige und abhängige Kontrollen). Die iPS Zellen der unabhängigen Kontrollen zeigten ab Tag D8 der Differenzierung eine höhere Induktion von *NKX2.5* als die abhängigen Kontrollen, die sich erst am Tag D21 aufhob. In Abbildung 29E ist die Induktion der HOS Indexpatienten zusammengefasst und gegen alle vier Kontrollen dargestellt. Im Verlauf der gerichteten Differenzierung war die Induktion von *NKX2.5* in den iPS Zellen der HOS Indexpatienten im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt. Vergleicht man die *NKX2.5* Induktion der iPS Zellen des Indexpatienten 1460 in der gerichteten Differenzierung mit den unabhängigen Kontrollen zeigte sich, mit Ausnahme des Tags D21, über die ganze Differenzierung eine niedrigere *NKX2.5* Induktion für den Indexpatienten 1460 (Abb. 29F). Die iPS Zellen der Indexpatientin 804-K zeigten für die frühe Differenzierung (D6) eine niedrigere *NKX2.5* Induktion als die iPS Zellen der Eltern (Abb. 29G). Spätere Zeitpunkte der gerichteten Differenzierung zeigten eine erhöhte (D8, D10) bzw. gleiche (D14, D21) Induktion von *NKX2.5* für die iPS Zellen der Indexpatientin 804-K (Abb. 29G).

Die Induktion von *NKX2.5* in der gerichteten Differenzierung war für beide HOS Indexpatienten niedriger als für die Kontrollen. Die niedrigere *NKX2.5* Induktion der iPS Zellen der HOS Indexpatienten war bei den iPS Zellen des Indexpatienten 1460 deutlich ausgeprägter.

Induktion des Transkriptionsfaktors *TBX5* in der gerichteten Differenzierung

In Abbildung 30 ist die *TBX5* Induktion in der gerichteten Differenzierung gezeigt.



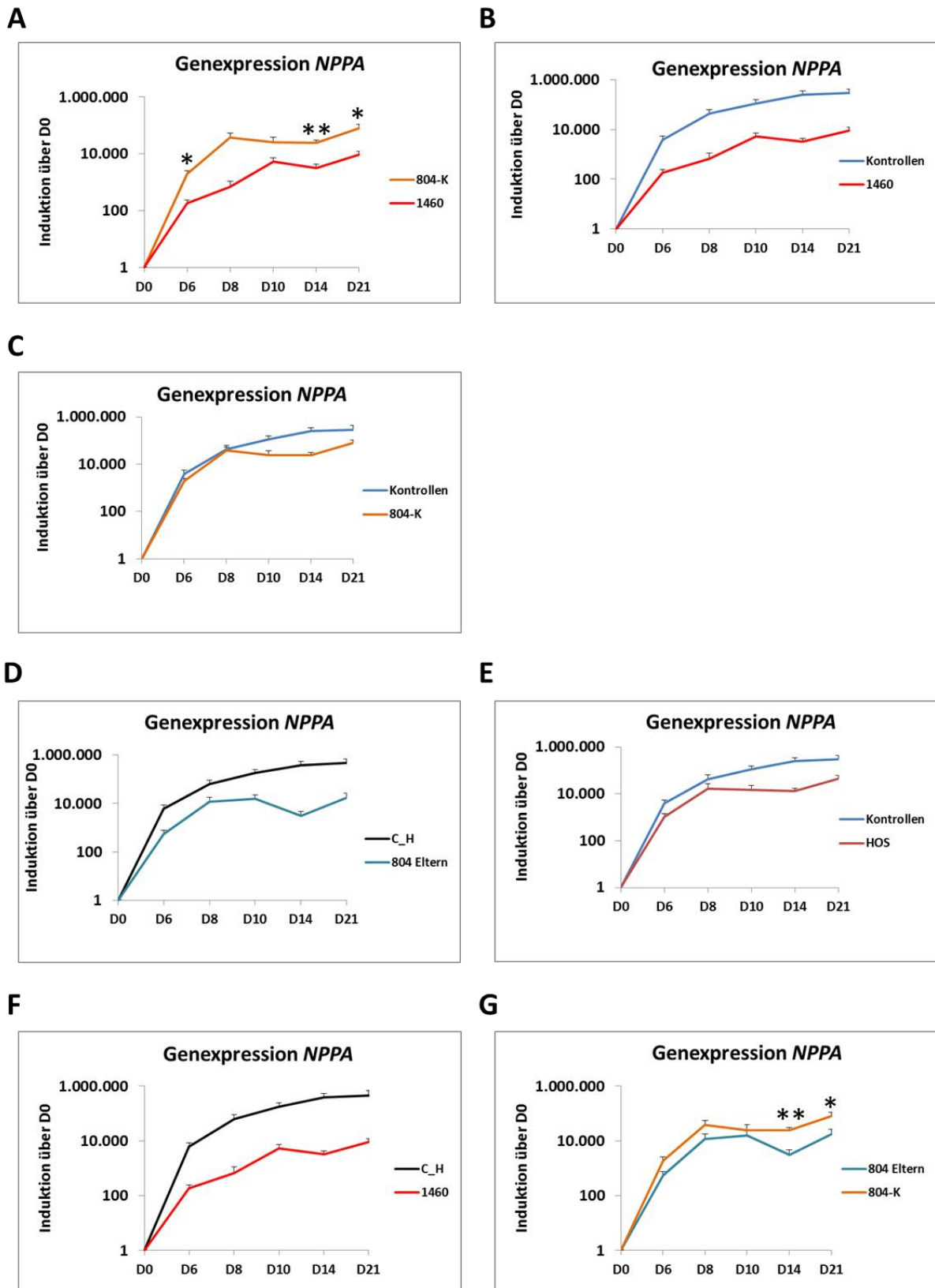
**Abbildung 30: Genexpressionsanalyse der gerichteten Differenzierung für humanes *TBX5*.** Dargestellt ist die Induktion von *TBX5* über Tag D0 nach Normalisierung mit *ACTB*. **(A)** Vergleich der Genexpression der iPS Zellen der HOS Indexpatienten 804-K und 1460. **(B)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(C)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. **(D)** Vergleich der Genexpression der beiden unabhängigen Kontrollen (C, H) mit den abhängigen Kontrollen (804-MU und 804-VA: Eltern der Indexpatientin 804-K). **(E)** Vergleich der Genexpression der Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit den HOS Indexpatienten (1460, 804-K). **(F)** Vergleich der Genexpression der unabhängigen Kontrollen C und H mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(G)** Vergleich der Genexpression der Eltern (804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. Kontrollen: iPS Zellen der Probandin C (gesund), des Probanden H (gesund), Probandin 804-MU (gesund) und des Probanden 804-VA (gesund). C: iPS Zellen der Probandin C (gesund). H: iPS Zellen des Probanden H (gesund). C\_H: iPS Zellen der Probanden C und H (gesund). 804 Eltern: iPS Zellen der Probanden 804-MU und 804-VA (gesund). 804-K: iPS Zellen der Indexpatientin 804 (Kind, HOS Patientin). 1460: iPS Zellen des Indexpatienten 1460 (HOS Patient). Die Genexpressionen wurden für mindestens zwei unabhängige Differenzierungen jedes Probanden/Indexpatienten in Duplikaten/Triplikaten gemessen. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler angegeben. Signifikanz: \*:  $p < 0,05$ .

Abbildung 30A zeigt die sehr ähnlich verlaufende Induktion der *TBX5* Expression der iPS Zellen der HOS Indexpatienten. Vergleicht man die Induktion der *TBX5* Expression in der Differenzierung des Indexpatienten 1460 mit den vier Kontrollen, war eine, über die komplette Differenzierung niedrigere Induktion für die iPS Zellen des Indexpatienten 1460 zu sehen (Abb. 30B). Abbildung 30C zeigt die Induktion von *TBX5* in der Differenzierung der iPS Zellen der Indexpatientin 804-K im Vergleich mit den vier Kontrollen. Die *TBX5* Induktion der HOS Indexpatientin lag für alle Zeitpunkte unter der Induktion der Kontrollen. In Abbildung 30D ist die *TBX5* Induktion der gerichteten Differenzierungen der abhängigen und unabhängigen Kontrollen gezeigt. Die Kontrollgruppen induzieren *TBX5* ähnlich, ohne signifikante Unterschiede. Abbildung 30E fasst die Induktion für die beiden HOS Patienten zusammen und vergleicht die Unterschiede in der Genexpression mit den vier Kontrollen. Die *TBX5* Expression der HOS Indexpatienten lag unter dem Expressionsniveau der Kontrollen. Für die Zeitpunkte D6 und D10 waren diese Unterschiede signifikant ( $p < 0,05$ ). Die *TBX5* Induktion des Indexpatienten 1460 ist in Abbildung 30F mit den unabhängigen Kontrollen verglichen. Für den gesamten Zeitraum der gerichteten Differenzierung wurde eine niedrigere *TBX5* Induktion für die sich differenzierenden iPS Zellen des Indexpatienten 1460 gemessen (Abb. 30F). Die Induktion von *TBX5* für die Indexpatientin 804-K zeigte über den Zeitraum der Differenzierung ein niedrigeres Niveau als die abhängigen Kontrollen (Abb. 30G).

Die Induktion von *TBX5* in der gerichteten Differenzierung der iPS Zellen der HOS Indexpatienten war über den ganzen Zeitraum der gerichteten Differenzierung niedriger als in der Differenzierung der Kontrollen.

Induktion des TBX5 Zielgens *NPPA* in der gerichteten Differenzierung

Abbildung 31 zeigt die Induktion von *NPPA* in der gerichteten Differenzierung.



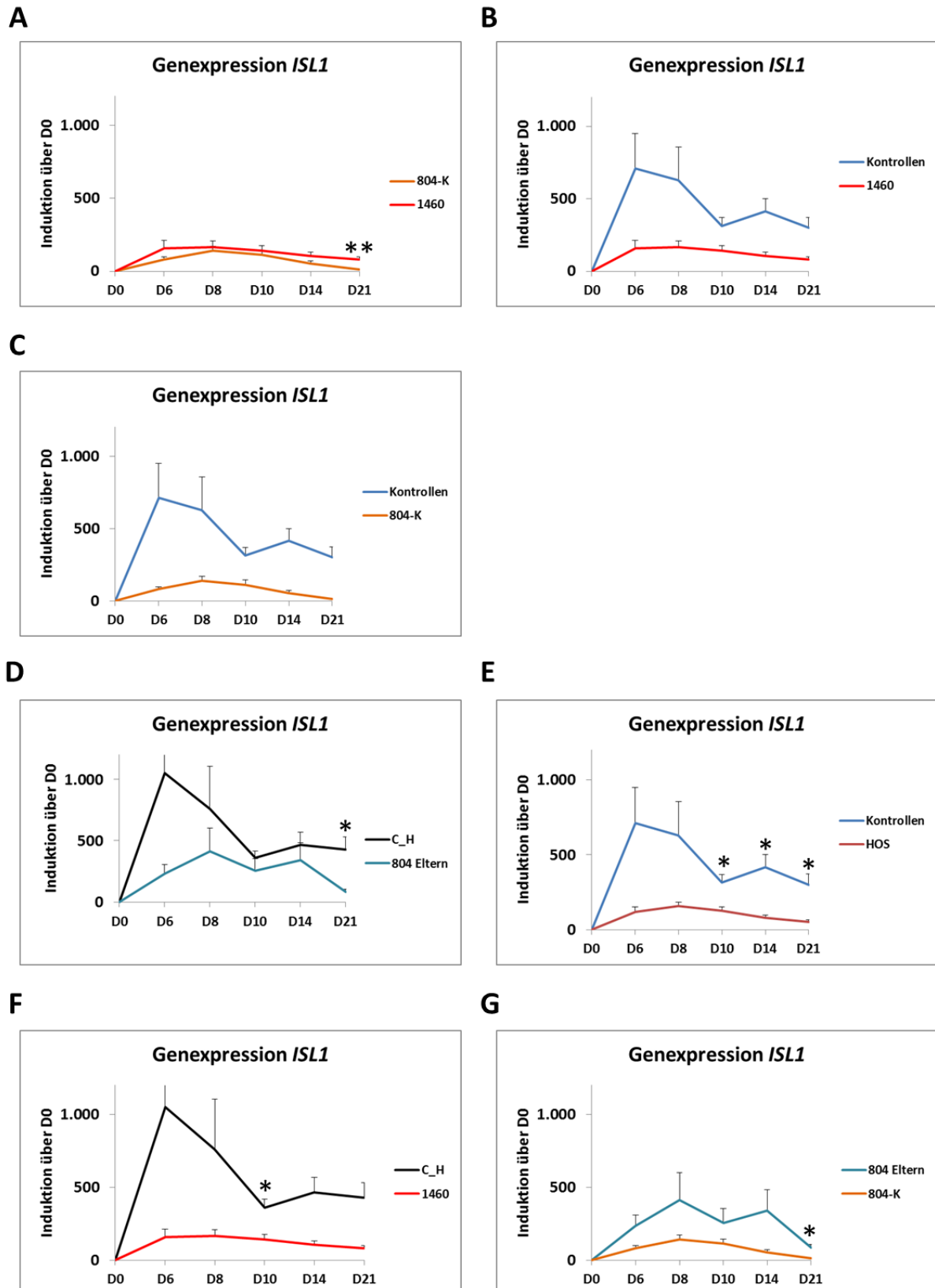
**Abbildung 31: Genexpressionsanalyse der gerichteten Differenzierung für humanes *NPPA*.** Dargestellt ist die Induktion von *NPPA* über Tag D0 nach Normalisierung mit *ACTB*. **(A)** Vergleich der Genexpression der iPS Zellen der HOS Indexpatienten 804-K und 1460. **(B)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(C)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. **(D)** Vergleich der Genexpression der beiden unabhängigen Kontrollen (C, H) mit den abhängigen Kontrollen (804-MU und 804-VA: Eltern der Indexpatientin 804-K). **(E)** Vergleich der Genexpression der Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit den HOS Indexpatienten (1460, 804-K). **(F)** Vergleich der Genexpression der unabhängigen Kontrollen C und H mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(G)** Vergleich der Genexpression der Eltern (804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. Kontrollen: iPS Zellen der Probandin C (gesund), des Probanden H (gesund), der Probandin 804-MU (gesund) und des Probanden 804-VA (gesund). C: iPS Zellen der Probandin C (gesund). H: iPS Zellen des Probanden H (gesund). C\_H: iPS Zellen der Probanden C und H (gesund). 804 Eltern: iPS Zellen der Probanden 804-MU und 804-VA (gesund). 804-K: iPS Zellen der Indexpatientin 804 (Kind, HOS Patientin). 1460: iPS Zellen des Indexpatienten 1460 (HOS Patient). Die Genexpressionen wurden für mindestens zwei unabhängige Differenzierungen jedes Probanden/Indexpatienten in Duplikaten/Triplikaten gemessen. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler angegeben. Signifikanzen: \*\*:  $p < 0,01$ . \*:  $p < 0,05$ .

Die Induktion von *NPPA* war für die iPS Zellen des Indexpatienten 1460 im Vergleich zur den iPS Zellen der Indexpatientin 804-K erniedrigt, mit Signifikanzen für die Tage D6, D14 und D21 (D6:  $p < 0,05$ ; D14:  $p < 0,01$ ; D21:  $p < 0,05$ ; Abb. 31A). Die Induktion von *NPPA* in der gerichteten Differenzierung der iPS Zellen der einzelnen HOS Indexpatienten, im Vergleich mit den vier Kontrollen zeigte eine niedrigere Induktion für beide Indexpatienten, die für den HOS Indexpatienten 1460 deutlich stärker ausgeprägt war (Abb. 31B und C). Die Induktion von *NPPA* in der gerichteten Differenzierung der abhängigen Kontrollen (804-MU, 804-VA) war im Vergleich zu den unabhängigen Kontrollen niedriger, ohne einen signifikanten Unterschied zu zeigen (Abb. 31D). Ein Vergleich der *NPPA* Induktion der HOS Indexpatienten (1460, 804-K) mit den vier Kontrollen zeigte eine geringere *NPPA* Expression im Verlauf der Differenzierung (Abb. 31E). Der Vergleich der Induktion von *NPPA* in der gerichteten Differenzierung des Indexpatienten 1460 mit den unabhängigen Kontrollen zeigte eine deutlich niedrigere *NPPA* Induktion für den Indexpatienten (Abb. 31F). Abbildung 31G zeigt den Vergleich der *NPPA* Induktion in der gerichteten Differenzierung der Indexpatientin 804-K mit der ihrer Eltern (804-MU, 804-VA). Die Induktion von *NPPA* in der Differenzierung der iPS Zellen der Indexpatientin 804-K war, im Vergleich mit den Eltern über den kompletten Verlauf der Differenzierung erhöht und war für die Tage D14 und D21 signifikant (D14:  $p < 0,01$ ; D21:  $p < 0,05$ ).

Die *NPPA* Induktion in der gerichteten Differenzierung war für die HOS Indexpatienten niedriger als in den Differenzierungen der Kontrollen. Die geringere Induktion von *NPPA* war in der Differenzierung des Indexpatienten 1460 deutlicher ausgeprägt. Die abhängigen Kontrollen (804-MU, 804-VA) zeigten für *NPPA* eine niedrigere Induktion als die unabhängigen Kontrollen.

## Induktion des Transkriptionsfaktors *ISL1* in der gerichteten Differenzierung

Die gerichtete Differenzierung der iPS Zellen mit Evaluierung der *ISL1* Expression als Induktion über die Zeit ist in Abbildung 32 gezeigt.





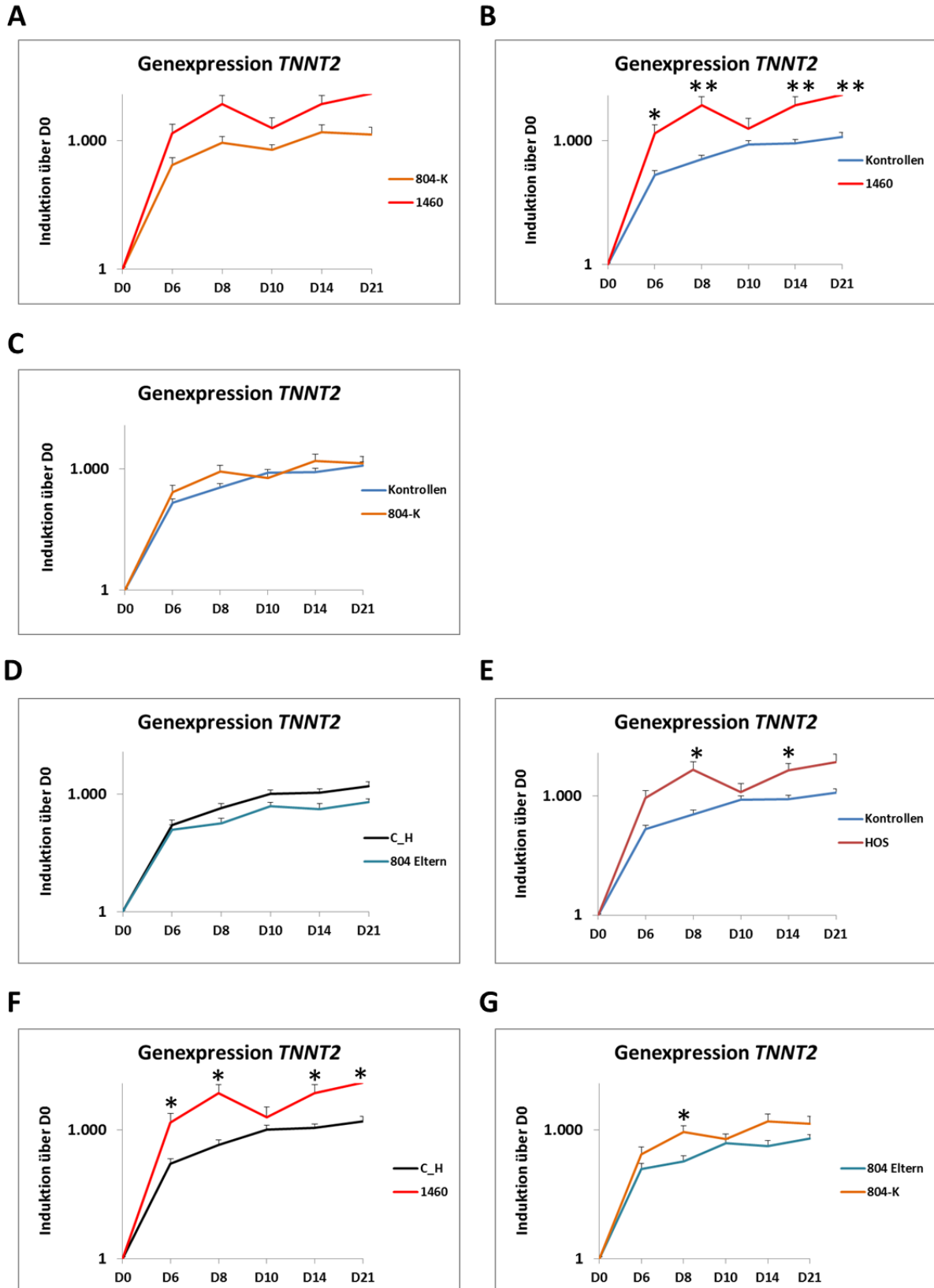
**Abbildung 32: Genexpressionsanalyse der gerichteten Differenzierung für humanes *ISL1*.** Dargestellt ist die Induktion von *ISL1* über Tag D0 nach Normalisierung mit *ACTB*. **(A)** Vergleich der Genexpression der iPS Zellen der HOS Indexpatienten 804-K und 1460. **(B)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(C)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. **(D)** Vergleich der Genexpression der beiden unabhängigen Kontrollen (C, H) mit den abhängigen Kontrollen (804-MU und 804-VA: Eltern der Indexpatientin 804-K). **(E)** Vergleich der Genexpression der Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit den HOS Indexpatienten (1460, 804-K). **(F)** Vergleich der Genexpression der unabhängigen Kontrollen C und H mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(G)** Vergleich der Genexpression der Eltern (804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. Kontrollen: iPS Zellen der Probandin C (gesund), des Probanden H (gesund), der Probandin 804-MU (gesund) und des Probanden 804-VA (gesund). C: iPS Zellen der Probandin C (gesund). H: iPS Zellen des Probanden H (gesund). C\_H: iPS Zellen der Probanden C und H (gesund). 804 Eltern: iPS Zellen der Probanden 804-MU und 804-VA (gesund). 804-K: iPS Zellen der Indexpatientin 804 (Kind, HOS Patientin). 1460: iPS Zellen des Indexpatienten 1460 (HOS Patient). Die Genexpressionen wurden für mindestens zwei unabhängige Differenzierungen jedes Probanden/Indexpatienten in Duplikaten/Triplikaten gemessen. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler angegeben. Signifikanzen: \*\*:  $p < 0,01$ . \*:  $p < 0,05$ .

In Abbildung 32A ist die Induktion für die iPS Zellen der beiden HOS Indexpatienten in der Differenzierung gezeigt. Die *ISL1* Induktion zeigte einen ähnlichen Verlauf, der nur für den Zeitpunkt D21 der iPS Zellen des Indexpatienten 1460 signifikant erhöht war ( $p < 0,01$ ). Die *ISL1* Genexpression über Tag D0 für die gerichteten Differenzierungen der beiden HOS Indexpatienten im Vergleich zu den vier Kontrollen war für beide Indexpatienten über den ganzen Verlauf der Differenzierung deutlich erniedrigt (Abb. 32B und C). Der Vergleich der abhängigen Kontrollen mit den unabhängigen Kontrollen zeigte eine niedrigere *ISL1* Induktion für die abhängigen Kontrollen (804-MU, 804-VA) und war für den Tag D21 signifikant ( $p < 0,05$ ; Abb. 32D). Abbildung 32E zeigt den Vergleich der HOS Indexpatienten mit den vier Kontrollen. Die *ISL1* Induktion der HOS Indexpatienten war im Vergleich mit den vier Kontrollen niedriger und für die Tage D10, D14 und D21 signifikant ( $p < 0,05$ ; Abb. 32E). Die *ISL1* Induktion der sich differenzierenden iPS Zellen des Indexpatientin 1460 war im Vergleich zu den unabhängigen Kontrollen im Verlauf der gerichteten Differenzierung niedriger und für den Tag D8 signifikant ( $p < 0,05$ ; Abb. 32F). Die iPS Zellen der Indexpatientin 804-K induzierten im Vergleich zu den abhängigen Kontrollen (804-MU, 804-VA) in der gerichteten Differenzierung weniger *ISL1* (Abb. 32G). Dieser Unterschied war für den Tag D21 signifikant ( $p < 0,05$ ).

Die Induktion von *ISL1* war in den gerichteten Differenzierungen für beide Indexpatienten gleich. Die Induktion von *ISL1* in der gerichteten Differenzierung der iPS Zellen der Indexpatienten zeigte sich im Vergleich mit den Kontrollen niedriger. Die abhängigen Kontrollen zeigten in der gerichteten Differenzierung im Vergleich zu unabhängigen Kontrollen eine niedrigere Induktion von *ISL1*.

Induktion von *TNNT2* in der gerichteten Differenzierung

Die *TNNT2* Expression über Tag D0 in der gerichteten Differenzierung ist in Abbildung 33 zusammengefasst.



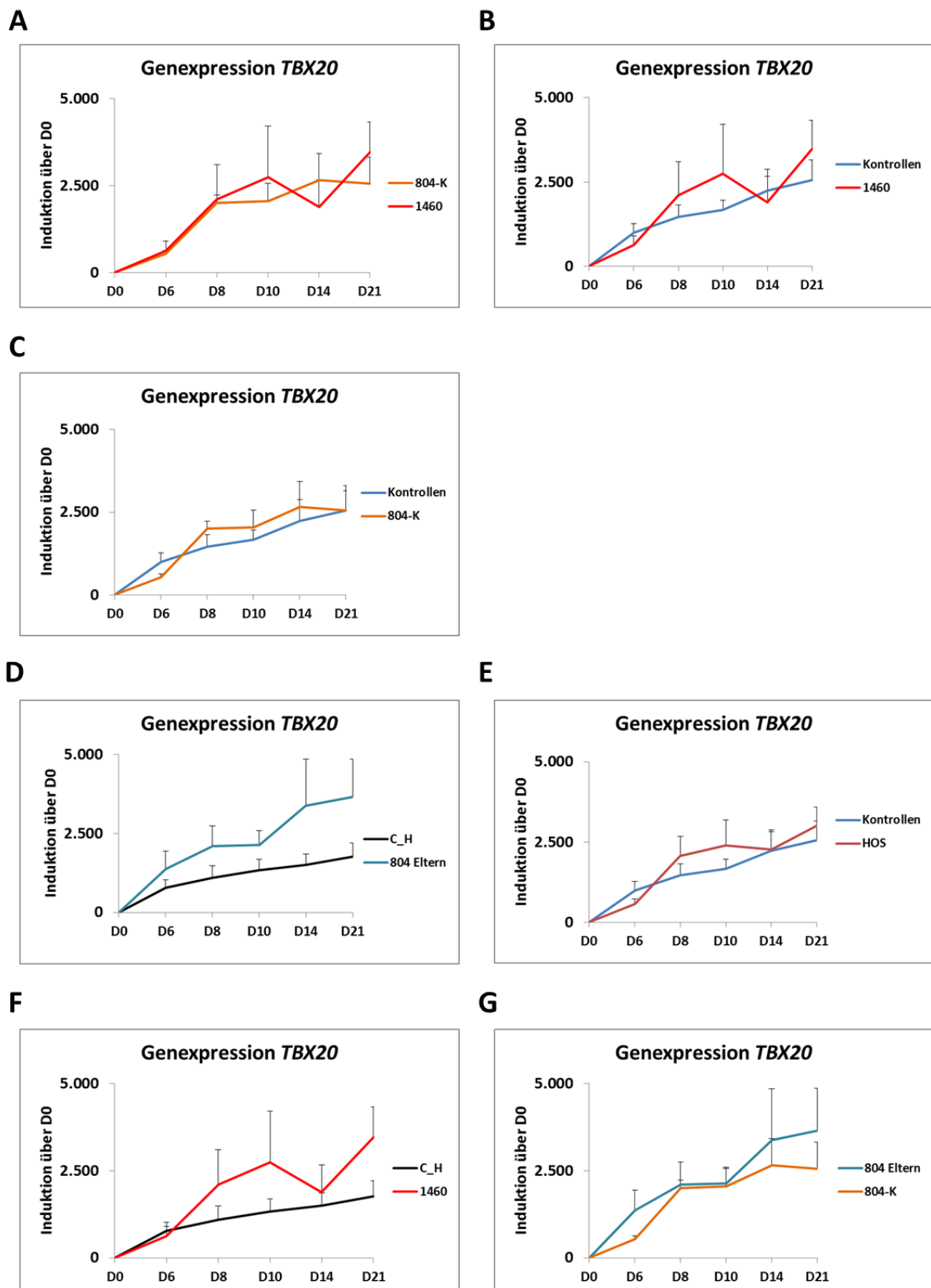
**Abbildung 33: Genexpressionsanalyse der gerichteten Differenzierung für humanes *TNNT2*.** Dargestellt ist die Induktion von *TNNT2* über Tag D0 nach Normalisierung mit *ACTB*. **(A)** Vergleich der Genexpression der iPS Zellen der HOS Indexpatienten 804-K und 1460. **(B)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(C)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. **(D)** Vergleich der Genexpression der beiden unabhängigen Kontrollen (C, H) mit den abhängigen Kontrollen (804-MU und 804-VA: Eltern der Indexpatientin 804-K). **(E)** Vergleich der Genexpression der Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit den HOS Indexpatienten (1460, 804-K). **(F)** Vergleich der Genexpression der unabhängigen Kontrollen C und H mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(G)** Vergleich der Genexpression der Eltern (804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. Kontrollen: iPS Zellen der Probandin C (gesund), des Probanden H (gesund), der Probandin 804-MU (gesund) und des Probanden 804-VA (gesund). C: iPS Zellen der Probandin C (gesund). H: iPS Zellen des Probanden H (gesund). C\_H: iPS Zellen der Probanden C und H (gesund). 804 Eltern: iPS Zellen der Probanden 804-MU und 804-VA (gesund). 804-K: iPS Zellen der Indexpatientin 804 (Kind, HOS Patientin). 1460: iPS Zellen des Indexpatienten 1460 (HOS Patient). Die Genexpressionen wurden für mindestens zwei unabhängige Differenzierungen jedes Probanden/Indexpatienten in Duplikaten/Triplikaten gemessen. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler angegeben. Signifikanzen: \*\*:  $p < 0,01$ . \*:  $p < 0,05$ .

In Abbildung 33A ist die *TNNT2* Induktion der gerichteten Differenzierung der beiden Indexpatienten 1460 und 804-K gezeigt. *TNNT2* ist in der Differenzierung der iPS Zellen des Indexpatienten 1460 kontinuierlich höher induziert. Der Vergleich der *TNNT2* Induktion des Indexpatienten 1460 gegen alle vier Kontrollen zeigte eine höhere *TNNT2* Induktion des Indexpatienten, die für die Tage D6, D8, D14 und D21 signifikant war (D6:  $p < 0,05$ ; D8:  $p < 0,01$ ; D14:  $p < 0,01$ ; D21:  $p < 0,01$ ; Abb. 33B). In Abbildung 33C ist das ähnliche Induktionsniveau für *TNNT2* der Indexpatientin 804-K im Vergleich zu den Kontrollen in der gerichteten Differenzierung gezeigt. Die Expression von *TNNT2* über Tag D0 der beiden Kontrollgruppen ist in Abbildung 33D gezeigt. Beide Gruppen induzierten *TNNT2* im Verlauf der gerichteten Differenzierung ähnlich. In Abbildung 33E ist die Induktion von *TNNT2* für die Differenzierungen der beiden HOS Indexpatienten zusammengefasst und gegen die vier Kontrollen gerechnet. Die HOS Indexpatienten lagen in ihrer *TNNT2* Induktion über dem Niveau der Kontrollen mit signifikanten Unterschieden für die Tage D8 und D14 ( $p < 0,05$ ). Die *TNNT2* Induktion der gerichteten Differenzierung der iPS Zellen des Indexpatienten 1460 zeigte eine stärkere Induktion im Vergleich zu den unabhängigen Kontroll-Linien (C, H), die signifikant für die Tage D6, D8, D14 und D21 war ( $p < 0,05$ ; Abb. 33F). Die Induktion von *TNNT2* war im Verlauf der gerichteten Differenzierung der iPS Zellen der Indexpatientin 804-K im Vergleich zu den Differenzierungen ihrer Eltern erhöht und für den Zeitpunkt D8 signifikant ( $p < 0,05$ ; Abb. 33G).

Die gerichteten Differenzierungen der HOS Indexpatienten zeigten einen ähnlichen Verlauf für die Induktion von *TNNT2*. Die Induktion von *TNNT2* in den iPS Zellen des Indexpatienten 1460 war stärker ausgeprägt und lag über dem Induktionslevel der Kontrollen.

## Induktion des Transkriptionsfaktors *TBX20* in der gerichteten Differenzierung

Die Ergebnisse der *TBX20* Genexpression als Induktion über D0 sind in Abbildung 34 gezeigt.



**Abbildung 34: Genexpressionsanalyse der gerichteten Differenzierung für humanes *TBX20*.** Dargestellt ist die Induktion von *TBX20* über Tag D0 nach Normalisierung mit *ACTB*. **(A)** Vergleich der Genexpression der iPS Zellen der HOS Indexpatienten 804 und 1460. **(B)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(C)** Vergleich der Genexpression aller Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. **(D)** Vergleich der Genexpression der beiden unabhängigen Kontrollen (C, H) mit den abhängigen Kontrollen (804-MU und 804-VA: Eltern der Indexpatientin 804-K). **(E)** Vergleich der Genexpression der Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) mit den HOS Indexpatienten (1460, 804-K). **(F)** Vergleich der Genexpression der unabhängigen Kontrollen C und H mit dem HOS Indexpatienten 1460. **(G)** Vergleich der Genexpression der Eltern (804-MU, 804-VA) mit der HOS Indexpatientin 804-K. Kontrollen: iPS Zellen der Probandin C (gesund), des Probanden H (gesund), der Probandin 804-MU (gesund) und des Probanden 804-VA (gesund). C: iPS Zellen der Probandin C (gesund). H: iPS Zellen des Probanden H (gesund). C\_H: iPS Zellen der Probanden C und H (gesund). 804 Eltern: iPS Zellen der Probanden 804-MU und 804-VA (gesund). 804-K: iPS Zellen der Indexpatienten 804 (Kind, HOS Patientin). 1460: iPS Zellen des Indexpatienten 1460 (HOS Patient). Die Genexpressionen wurden für mindestens zwei unabhängige Differenzierungen jedes Probanden/Indexpatienten in Duplikaten/Triplikaten gemessen. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler angegeben.

In Abbildung 34A ist die Induktion von *TBX20* in den gerichteten Differenzierungen der iPS Zellen der HOS Indexpatienten gezeigt. Die Differenzierungen zeigten eine Induktion, die bis Tag D8 identisch verlief und im weiteren Verlauf ohne signifikanten Unterschied war. In Abbildung 34B ist die *TBX20* Induktion der gerichteten Differenzierungen des HOS Indexpatienten 1460 im Vergleich zu den vier Kontrollen gezeigt. Die gerichtete Differenzierung des Patienten 1460 zeigte eine leicht verzögerte Induktion von *TBX20*, die an D8, D10 und D21 über dem Induktionslevel der Kontrollen lag. Die gerichtete Differenzierung der HOS Indexpatientin 804-K zeigte, im Vergleich mit den vier Kontrollen, eine ähnliche Induktion und ist in Abbildung 34C gezeigt. In Abbildung 34D ist die *TBX20* Induktion zwischen den beiden Kontrollgruppen gezeigt. Die abhängigen Kontrollen zeigten im Verlauf der Differenzierung eine höhere Induktion des *TBX20*, die keine Signifikanz erreichte.

Abbildung 34E zeigt den Vergleich der *TBX20* Induktion der beiden HOS Indexpatienten in der gerichteten Differenzierung mit den Kontrollen. Die Induktion von *TBX20* war für Tag D6 in den Differenzierungen der Indexpatienten verzögert. Im Verlauf der Differenzierung war eine leicht erhöhte *TBX20* Expression für die Differenzierungen der Indexpatienten zu sehen, welche keine Signifikanz erreichte. In Abbildung 34F ist die *TBX20* Induktion der gerichteten Differenzierung des Indexpatienten 1460 mit den unabhängigen Kontrollen verglichen. Die *TBX20* Induktion verlief zu Beginn der gerichteten Differenzierung ähnlich. Im Verlauf der Differenzierung war die *TBX20* Induktion für den Indexpatienten 1460 höher. Die *TBX20* Induktion in der gerichteten Differenzierung der HOS Indexpatientin 804-K zeigte im Vergleich zur Induktion der Eltern eine Verzögerung an Tag D6 und lag im Verlauf der Differenzierung etwas unter dem Induktionsniveau der Eltern (Abb. 34G).

Für beide HOS Indexpatienten war die *TBX20* Induktion in der gerichteten Differenzierung im Vergleich zu den Kontrollen verzögert, wurde dann aber stärker induziert und lag ab Tag D8 für beide Patienten über dem Induktionslevel der Kontrollen.

In Abbildung 35 sind die Ergebnisse der spontanen und der gerichteten Differenzierung für die Induktion der Transkriptionsfaktoren *NKX2.5*, *TBX5*, *ISL1* und *TBX20*, wie auch *NPPA* und *TNNT2* der iPS Zellen der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K im Vergleich zu den vier Kontrollen zusammengefasst.

Gen	1460, spontane Differenzierung	1460, gerichtete Differenzierung	804-K, spontane Differenzierung	804-K, gerichtete Differenzierung
<i>NKX2.5</i>	↓	↓	↑	↓
<i>TBX5</i>	↓	↓	↓	↓
<i>NPPA</i>	↑, verzögert	↓	↓	↓
<i>ISL1</i>	↓	↓	↑ bis D14, dann ↓	↓
<i>TNNT2</i>	↓	↑	↑ bis D8, dann ↓	→
<i>TBX20</i>	↓	→	↑, verzögert	→

**Abbildung 35: Zusammenfassung der Induktion für die spontanen und gerichteten Differenzierungen der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K im Vergleich zu den vier gesunden Kontrollprobanden.** Grüne Pfeile zeigen eine höhere Induktion des HOS Indexpatienten über Tag D0 im Vergleich zu den Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) nach Normalisierung mit *ACTB* in der jeweiligen Differenzierung an. Rote Pfeile zeigen eine niedrigere Induktion des HOS Indexpatienten über Tag D0 im Vergleich zu den Kontrollen (C, H, 804-MU, 804-VA) an. Graue Pfeile signalisieren eine ähnliche Induktion des HOS Indexpatienten im Vergleich zu den Kontrollen.

In der spontanen Differenzierung des Indexpatienten 1460 konnte eine erniedrigte Induktion für die TF *NKX2.5*, *TBX5* und *ISL1* gezeigt werden. Diese verminderte Induktion war in der gerichteten Differenzierung im Vergleich zu den Kontrollen gleichermaßen zu sehen. Die Induktion von *TBX20* war in der spontanen Differenzierung für den Indexpatienten 1460, im Vergleich zu den Kontrollen niedriger. In der frühen gerichteten Differenzierung der iPS Zellen des Indexpatienten 1460 war die Induktion von *TBX20* ebenfalls geringer, zeigte aber im weiteren Verlauf ein ähnliches bzw. erhöhtes Niveau. Das Zielgen *NPPA* des TF *TBX5* wurde in der spontanen Differenzierung der iPS-Zellen des Indexpatienten 1460 verzögert induziert, zeigte aber im weiteren Verlauf ein ähnliches, leicht höheres Induktionsniveau als die Kontrollen. In der gerichteten Differenzierung war die *NPPA* Induktion des HOS Indexpatienten 1460 im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt. Der kardiale Marker *TNNT2* wurde in der spontanen Differenzierung der iPS Zellen des Indexpatienten 1460 im Vergleich zu den Kontrollen geringer induziert. In der gerichteten Differenzierung war die Induktion für *TNNT2* für den Indexpatienten 1460 höher als in den Kontrollen.

Für die HOS Indexpatientin 804-K zeigte der kardiale TF *NKX2.5* eine deutlich erhöhte Induktion in der spontanen Differenzierung im Vergleich zu den Kontrollen. Dieser Phänotyp war in der gerichteten Differenzierung für *NKX2.5* nicht erhalten. Der TF *TBX5* zeigte sowohl in der spontanen, wie auch der gerichteten Differenzierung, eine niedrigere Induktion als die Kontrollen. Für das *TBX5*-abhängige Zielgen *NPPA* konnte der, in der spontanen Differenzierung identifizierte Phänotyp einer erniedrigten Induktion gegenüber den Kontrollen für die gerichtete Differenzierung bestätigt werden. Die *ISL1* Induktion war in der

spontanen Differenzierung bis D14 höher als die Induktion der Kontrollen, fiel dann aber unter das Induktionslevel der Kontrollen. In der gerichteten Differenzierung war die Induktion für *ISL1* im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt. *TNNT2* als kardialer Marker zeigte in der gerichteten Differenzierung der Indexpatientin 804-K eine im Vergleich zu den Kontrollen ähnliche Induktion. Die Induktion von *TNNT2* war in der spontanen Differenzierung im Vergleich zu den Kontrollen moderat erhöht. Die Induktion für *TBX20* zeigte sich für die spontane Differenzierung der Indexpatientin 804-K anfangs verzögert, erreichte dann aber ein höheres Niveau als die Kontrollen. Die *TBX20* Induktion der gerichteten Differenzierung zeigte für die Indexpatientin 804-K im Vergleich zu den Kontrollen ein ähnliches Bild.

In Abbildung 36 ist die Induktion der untersuchten Gene der beiden HOS Indexpatienten 1460 und 804-K in der spontanen und gerichteten Differenzierung im Vergleich dargestellt.

Gen	1460 vs 804-K spontane Differenzierung	1460 vs 804-K gerichtete Differenzierung
<i>NKX2.5</i>	↓	↓
<i>TBX5</i>	↓	→
<i>NPPA</i>	↓ bis D6, dann ↑	↓
<i>ISL1</i>	↓	→
<i>TNNT2</i>	↓	↑
<i>TBX20</i>	↓	→

**Abbildung 36: Zusammenfassung der Induktion für die spontane und gerichtete Differenzierung des HOS Indexpatienten 1460 im Vergleich zu der HOS Indexpatientin 804-K.** Grüne Pfeile zeigen eine höhere Induktion des HOS Indexpatienten 1460 über Tag D0 im Vergleich zu der HOS Indexpatientin 804-K nach Normalisierung mit *ACTB* in der jeweiligen Differenzierung an. Rote Pfeile zeigen eine niedrigere Induktion des HOS Indexpatienten 1460 über Tag D0 im Vergleich zu der HOS Indexpatientin 804-K an. Graue Pfeile signalisieren eine ähnliche Induktion der beiden HOS Indexpatienten.

Die Induktion von *NKX2.5*, *TBX5*, *ISL1*, *TNNT2* und *TBX20* war in der spontanen Differenzierung des HOS Indexpatienten 1460 niedriger als für die Indexpatientin 804-K. Die Induktion für *NPPA* war bis D6 ebenfalls niedriger, erreichte aber dann ein höheres Induktionslevel. Für die gerichtete Differenzierung zeigten die beiden HOS Indexpatienten für *TBX5*, *ISL1*, und *TBX20* ein ähnliches Induktionsniveau. *NKX2.5* und *NPPA* waren in der gerichteten Differenzierung des Indexpatienten 1460 geringer induziert. Die Induktion von

*TNNT2* in der gerichteten Differenzierung war deutlich höher als für die Indexpatientin 804-K. Der Vergleich der beiden HOS Indexpatienten zeigte einen deutlich stärker ausgeprägten Phänotyp für den Indexpatienten 1460, bei dem eine *TBX5* Mutation vorliegt.

In den Abbildungen S7-S18 sind die Induktionen für jede durchgeführte spontane (Supplement Abbildung S7-12) und gerichtete (Abbildung S13-18) Differenzierung einzeln für die HOS Indexpatienten 1460 und 804-K, sowie die Kontrollen C, H, 804-MU und 804-VA gezeigt. In der Abbildung S19 ist der Vergleich der spontanen und gerichteten Differenzierung des HOS Indexpatienten 1460 gegen die unabhängigen Kontrollen (C, H) und der HOS Indexpatientin 804-K gegen die abhängigen Kontrollen (Eltern) zusammengestellt. In Abbildung S20 ist die Induktion für alle Gene in der spontanen und gerichteten Differenzierung für die abhängigen und unabhängigen Kontrollen zusammengefasst.

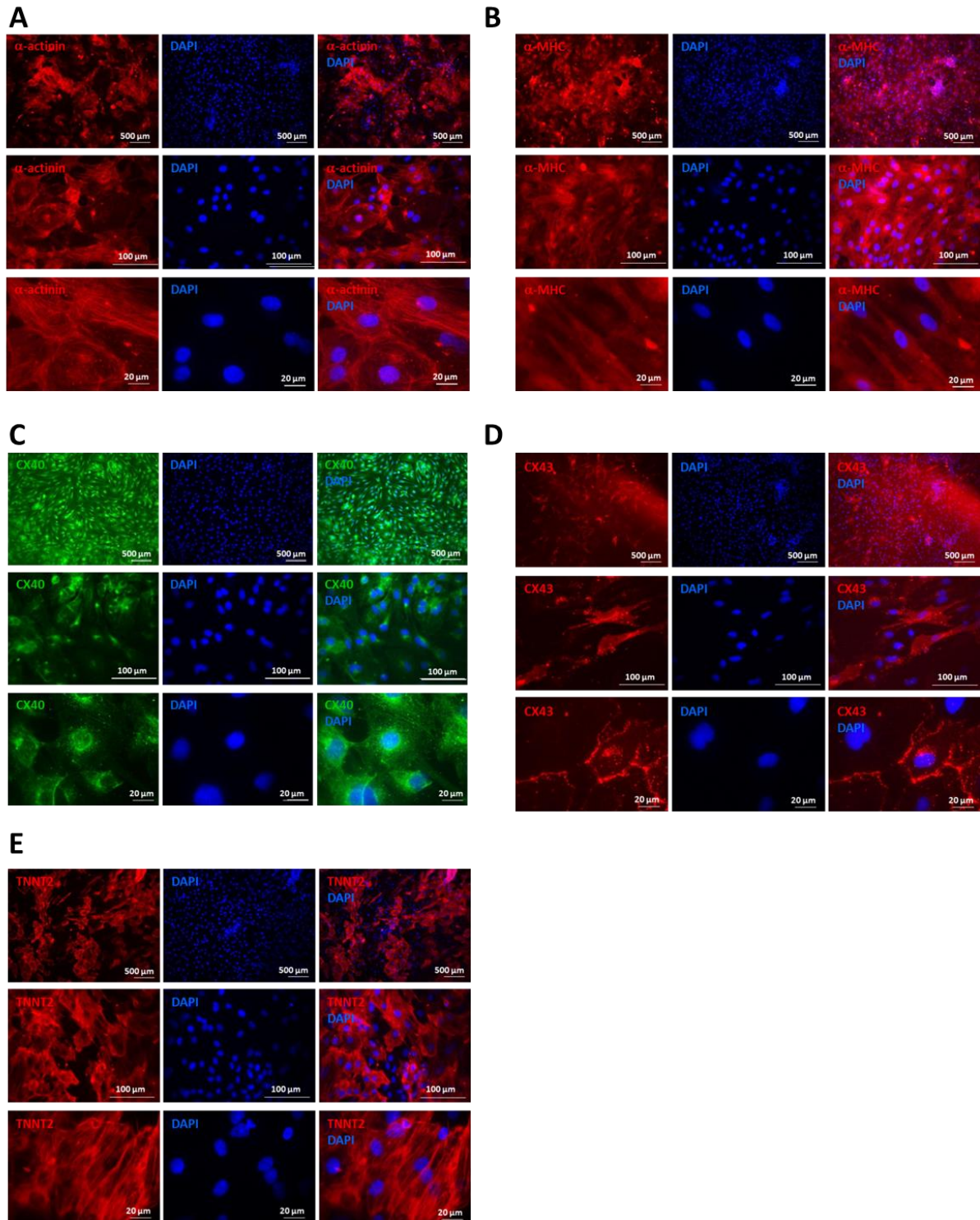
Der *in vitro* Phänotyp der iPS Zellen des HOS Indexpatienten 1460 wurde final, wie folgt definiert: Es liegt eine Dysregulation der Transkriptionsfaktoren *NKX2.5*, *TBX5* und *ISL1* in der spontanen und gerichteten Differenzierung vor. Die Induktion der Transkriptionsfaktoren ist im Vergleich zu Kontrollen erniedrigt. Das Zielgen *NPPA* ist verzögert induziert (spontane Differenzierung) bzw. niedriger induziert (gerichtete Differenzierung). Der Transkriptionsfaktor *TBX20* ist dysreguliert. Der kardiale Marker *TNNT2* ist in der spontanen Differenzierung erniedrigt induziert. Betrachtet man die Induktion von *TNNT2* in der gerichteten Differenzierung, bei der in großer Anzahl Kardiomyozyten entstehen, sieht man eine erhöhte Induktion von *TNNT2*.

Aus diesem Grund wurde die Maturierung der Kardiomyozyten des HOS Indexpatienten 1460 in immunzytologische Färbungen untersucht.



### 3.4.3.3 Maturierung der Kardiomyozyten des HOS Indexpatienten 1460

In Abbildung 37 sind die immunzytologischen Färbungen der Kardiomyozyten in der gerichteten Differenzierung für den HOS Indexpatienten 1460 an Tag D30 gezeigt.



**Abbildung 37: Immunzytochemische Färbungen der gerichteten Differenzierung der iPS Zellen des Indexpatienten 1460 an Tag D30. (A)** Färbung für  $\alpha$ -Actinin (rot). **(B)** Färbung für  $\alpha$ -Myosin Heavy Chain (MHC) (rot). **(C)** Färbung für Connexin 40 (grün). **(D)** Färbung für Connexin 43 (rot). **(E)** Färbung für kardiales Troponin T (TNNT2) (rot). Dargestellt sind jeweils die Einzelfärbungen und DAPI (blau) zur Visualisierung des Zellkerns wie

auch das übereinander gelagerte Bild. Für jede Färbung sind Aufnahmen in 40-facher, 100-facher und 1000-facher Vergrößerung gezeigt.

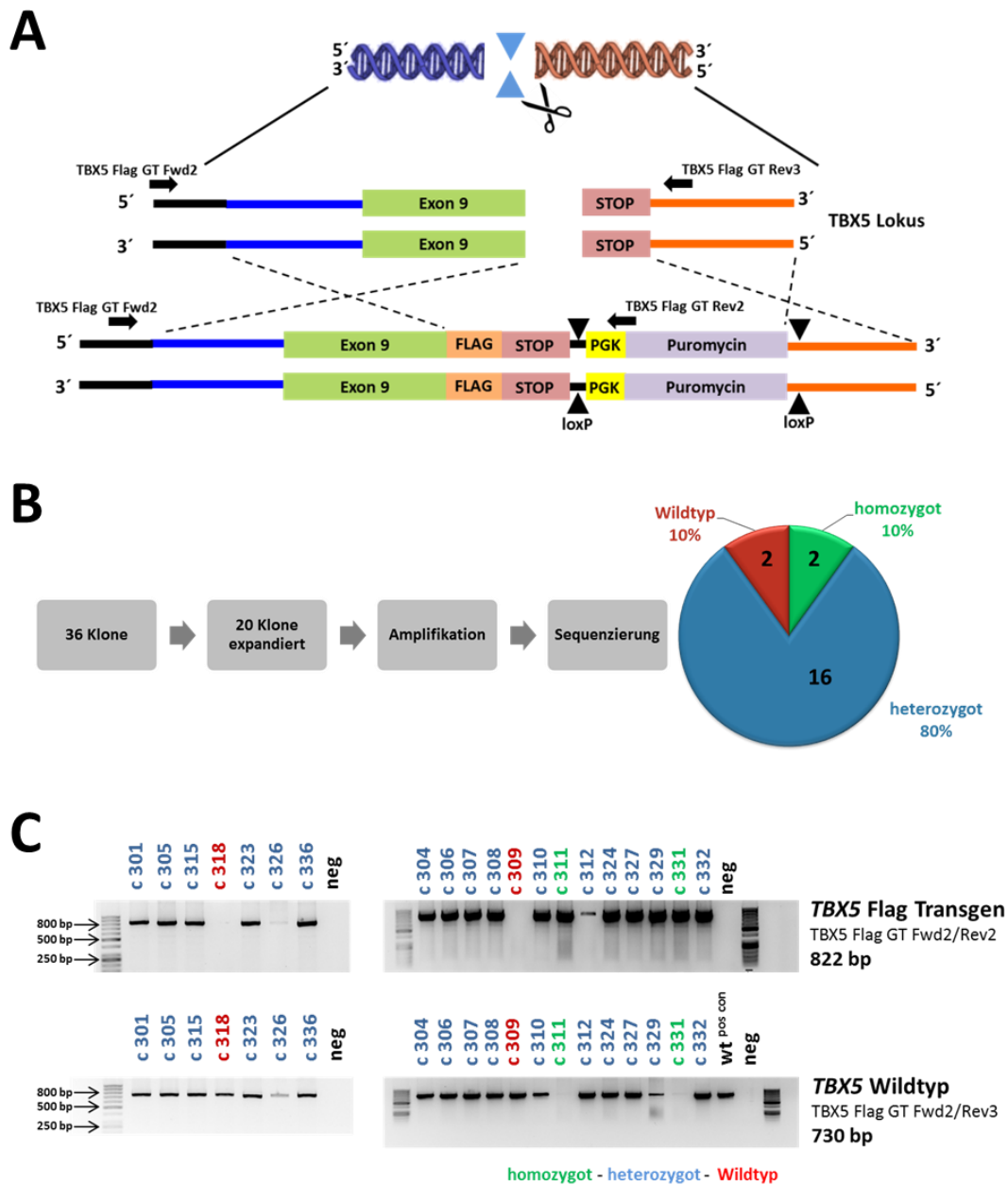
In Abbildung 37A ist die Färbung für das sarkomere  $\alpha$ -Actinin (rot) gezeigt. Es ist eine Ausbildung des Sarkomers durch die als Monolayer vorliegenden Kardiomyozyten zu sehen. Abbildung 37B zeigt die immunzytochemische Färbung für  $\alpha$ -Myosin Heavy Chain ( $\alpha$ -MHC, rot), welches die schwere Kette des  $\alpha$ -Myosins bildet. Es konnte gezeigt werden, dass in einem Monolayer aus Kardiomyozyten Myosin als wesentlicher Bestandteil des Muskels ausgebildet wird. Im Weiteren wurden die Connexine 40 und 43, welche zur Ausbildung von *gap junctions* nötig sind, immunzytochemisch nachgewiesen (Abb. 37C und D). Abbildung 37E zeigt die Ausbildung von Troponin T als kardialen Marker in Kardiomyozyten an Tag 30 der gerichteten Differenzierung.

### **3.5 Genom-Editierung von humanen iPS Zellen**

Genauere Einblicke in die Regulationsmechanismen von TBX5 in der kardialen Entwicklung sind essentiell, um Dysregulationen und daraus resultierend die Entstehung von AHF rekapitulieren zu können.

#### **3.5.1 Generierung TBX5Flag markierter iPS Zellen**

Bislang existieren keine guten Antikörper für den Transkriptionsfaktor TBX5, die für jede molekularbiologische Untersuchung des Transkriptionsfaktors eingesetzt werden können. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die iPS Zellen eines gesunden Probanden unter Verwendung von CRISPR/Cas9 genetisch editiert, sodass es möglich ist TBX5 über ein Flag-Tag zu detektieren. Es wurden drei sgRNAs zur Editierung der iPS Zellen generiert und in den Vektor pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0 kloniert. Je ein Klon jeder sgRNA wurde zur Bestimmung der Schneideeffizienz ausgewählt. Der korrekte Einbau der sgRNA1, sgRNA2 und sgRNA3 in den Vektor wurde durch Sequenzierung geprüft und verifiziert und ist in der Abbildung S21 gezeigt. Die Schneideeffizienz der klonierten sgRNAs ist in Abbildung S22 gezeigt. Für die sgRNA2 konnte keine Schneideeffizienz berechnet werden, da das verwendete Programm (<https://tide.deskgen.com/>) eine Berechnung nur für sgRNAs mit einer optimalen Länge von 20 Nukleotiden ermöglicht. Die sgRNA2 wurde mit dem Programm Benchling CRISPR gRNA Design (<https://benchling.com/>) mit einer optimalen Länge von 21 Nukleotiden berechnet. Für die sgRNA1 wurde eine Schneideeffizienz von 32,5% berechnet. Die sgRNA3 zeigte eine Schneideeffizienz von 47,5%, sodass diese sgRNA für die Editierung der iPS Zellen verwendet wurde.



**Abbildung 38: CRISPR/Cas 9 Editierung der iPS Zellen des gesunden Probanden E5 mit einem Flag-Tag im *TBX5* Gen. (A)** Schematische Darstellung der Editierung. Das Flag wurde hinter dem letzten Exon (Exon 9) direkt vor dem Stopcodon des *TBX5* Gens eingebaut. Die eingebaute Puromycinresistenz steht unter der Kontrolle des Phosphoglyceratkinase-Promotors (PGK, konstitutiv). Die zur Identifikation der transgenen (homo-/heterozygot) oder Wildtyp Klone verwendeten Oligonukleotide (TBX5 Flag GT Fwd2/Rev2: Detektion des Transgens. TBX5 Flag GT Fwd2/Rev3: Detektion des Wildtyps) sind an den entsprechenden Stellen durch Pfeile eingezeichnet. **(B)** Workflow und Effizienz der Genom-Editierung. **(C)** Gelelektrophoretische Darstellung der Amplifikationsprodukte zur Unterscheidung von Wildtyp- und transgenen Klonen nach CRISPR/Cas9 Editierung. TBX5 Flag GT Fwd2/Rev2: Detektion des Transgens. TBX5 Flag GT Fwd2/Rev3: Detektion des Wildtyps. Als Marker zur Bestimmung der Größe der Amplifikationsprodukte wurde die 50 bp *GeneRuler™ DNA Ladder* verwendet. Grün: homozygot editierter Klon. Blau: heterozygot editierter Klon. Rot: Wildtyp.

Abbildung 38A zeigt schematisch die Editierung mit CRISPR/Cas9. Das *TBX5* Gen wurde mit einer Flag-Sequenz nach dem Exon 9 des *TBX5* Gens versehen. Zur Selektion erfolgreich editierten iPS Zellen wurde zusätzlich eine Puromycinresistenz hinter das Stop Codon des *TBX5* Gens eingebaut. Nach erfolgter Elektroporation konnten durch Puromycinbehandlung

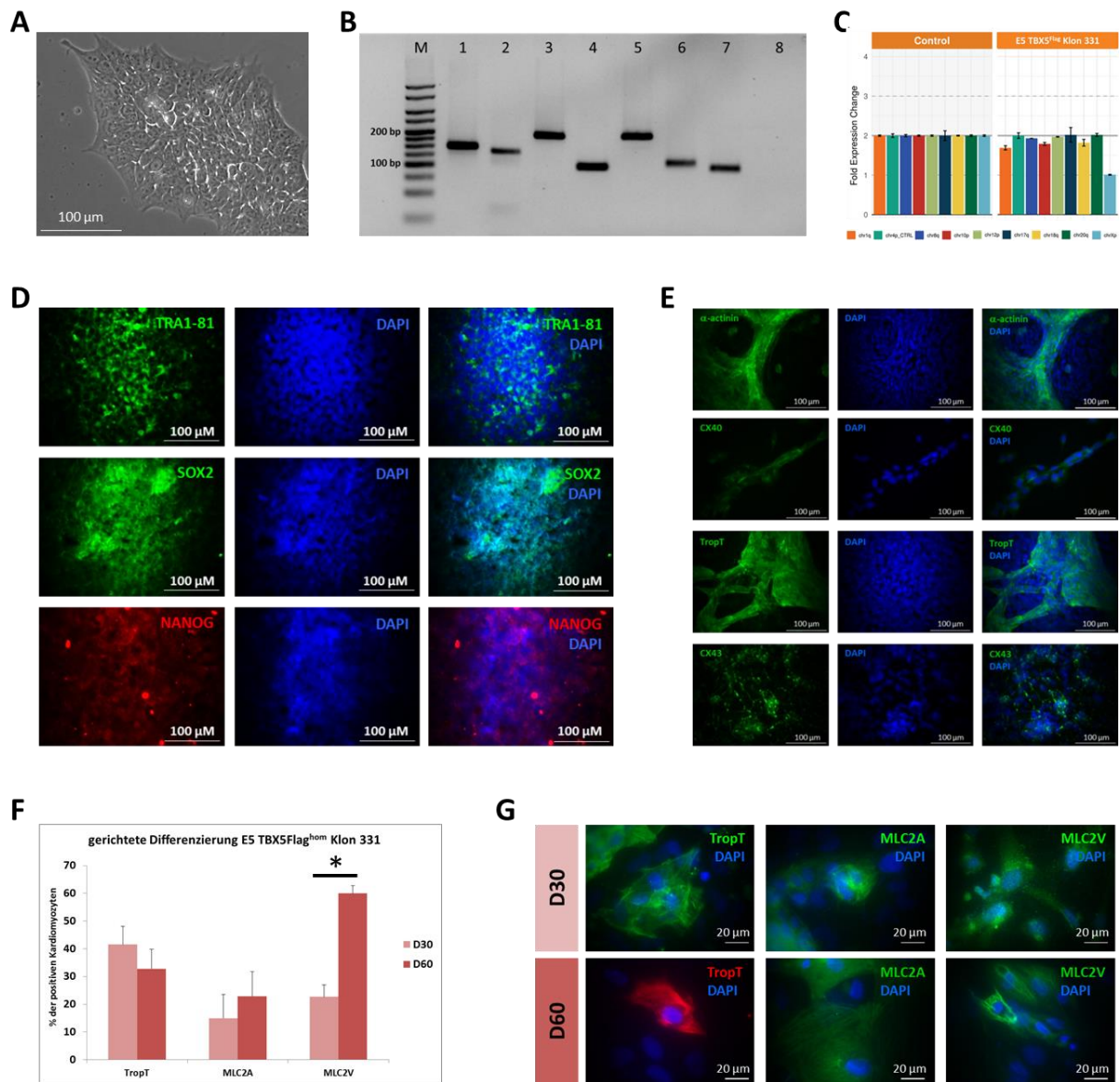
die iPS Zellen abgetötet werden, die das Donorkonstrukt auf dem sich die Flag-Sequenz und die Puromycinresistenz befinden nicht in ihr Genom eingebaut hatten. Die für die Generierung der TBX5Flag Linie verwendeten iPS Zellen des gesunden Probanden (E5) sind charakterisiert und publiziert (Sun *et al.*, 2017).

Die iPS Zellen wurden mit dem Donorkonstrukt und der spezifisch entwickelten sgRNA3 elektroporiert. Das Cas9 Protein wird zusammen mit der sg3 auf dem Vektor pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0 exprimiert. Nach zwei Tagen wurde, für insgesamt sieben Tage, eine Puromycinselektion durchgeführt. In Abbildung 38B ist der Ablauf nach Elektroporation der iPS Zellen und die Effizienz der CRISPR/Cas9 Editierung gezeigt. Es konnten 36 Klone, die eine geeignete Größe aufwiesen, gepickt werden. Für 20 Klone konnte eine erfolgreiche Subkultivierung und Expansion über mehrere Passagen durchgeführt werden. Unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden, die zwischen einer transgenen iPS Zelle, welche das Konstrukt eingebaut hat und einer Wildtyp iPS Zelle, die das Konstrukt nicht eingebaut hat, unterscheiden, wurde eine Amplifikation der genomischen DNA durchgeführt. Die Position an der die spezifischen Oligonukleotide binden ist in Abbildung 38A gezeigt. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikationsprodukte für die Detektion des Transgens bzw. Wildtyps ist in Abbildung 38C gezeigt. Die Amplifikationsprodukte wurden zur Verifizierung der Ergebnisse sequenziert.

Im Kreisdiagramm der Abbildung 38B ist das Ergebnis der Editierung zusammengefasst. Zwei der expandierten 20 Klone (10%) hatten das Konstrukt nicht eingebaut. Sechzehn der 20 Klone (80%) zeigten einen heterozygoten Einbau des Konstrukts. Zwei der 20 Klone (10%) hatten das Konstrukt homozygot eingebaut. Für die weitere Charakterisierung wurde der homozygote Klon 331 verwendet.

### 3.5.2 Charakterisierung der TBX5Flag markierten iPS Zellen

In Abbildung 39 ist die Charakterisierung der homozygot CRISPR/Cas9 editierten iPS Zellen E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Klon 331 gezeigt.



**Abbildung 39: Charakterisierung der CRISPR/Cas9 editierten iPS Zellen des homozygoten Klon 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup>.** (A) Morphologie des Klon 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup>. (B) Nachweis der Pluripotenzmarker *OCT4* (1), *KLF4* (2), *SOX2* (3), *cMYC* (4), *NANOG* (5), *REX1* (6) nach Amplifikation und gelelektrophoretischer Auftrennung der Amplifikationsprodukte. Als interne Kontrolle wurde *ACTB* (7) verwendet. Spur 8 zeigt die Negativkontrolle als Mix aller Negativkontrollen. Als Marker zur Bestimmung der Größe der Amplifikationsprodukte wurde der Quantitas DNA Marker: 25 - 500bp verwendet. (C) Identifikation von karyotypischen Anomalien. Darstellung des *Fold Changes* definierter Chromosomenregionen mit dem *hPSC Genetic Analysis Kit* nach Amplifikation. (D) Immunzytologische Färbung der Pluripotenzmarker TRA1-81 (grün), SOX2 (grün) und NANOG (rot). Dargestellt sind jeweils die Einzelfärbungen und DAPI (blau) zur Visualisierung des Zellkerns wie auch das übereinander gelagerte Bild. (E) Immunzytologische Färbung für  $\alpha$ -Actinin (grün), CX40 (grün), Troponin T (grün) und CX43 (grün) an Tag D14 der gerichteten Differenzierung. Dargestellt sind jeweils die Einzelfärbungen, DAPI (blau) zur Visualisierung des Zellkerns und das übereinander gelagerte Bild. (F) Durchflusszytometrische Analyse des E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Klon 331 an den Tagen D30 und D60 der gerichteten Differenzierung für Troponin T (TropT), Myosin Light Chain 2A (MLC2A) und Myosin Light Chain 2V (MLC2V). Darstellung der Frequenz positiv markierter Kardiomyozyten als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängigen Differenzierungen. Zur Berechnung signifikanter Unterschiede wurde der T-Test für verbundene Stichproben verwendet.

Signifikanz: \*:  $p < 0,05$ . **(G)** Immunzytologische Färbung für Troponin T (D30: grün, D60: rot), MLC2A (grün) und MLC2V (grün) an den Tagen D30 und D60 der gerichteten Differenzierung. Dargestellt sind jeweils die Einzelfärbungen, DAPI (blau) zur Visualisierung des Zellkerns und das übereinander gelagerte Bild.

Abbildung 39A zeigt eine iPS Kolonie des Klons 331 der iPS Zellen E5 TBX5Flag<sup>hom</sup>. Die iPS Zellen wachsen als kompakte, multizelluläre, flache Kolonie mit definiertem Rand ohne differenzierende Bereiche aufzuweisen.

Die endogene Expression von *OCT4* (Spur 1), *KLF4* (Spur 2), *SOX2* (Spur 3), *c-MYC* (Spur 4), *NANOG* (Spur 5) und *REX1* (Spur 6) ist nach Amplifikation und gelelektrophoretischer Auftrennung in Abbildung 39B gezeigt. Die Amplifikation von *ACTB* als interne Kontrolle einer erfolgreichen Amplifikation ist in Spur 7 zu sehen. Für alle amplifizierten Gene wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Der Mix aller Negativkontrollen ist in Spur 8 gezeigt.

Zum Ausschluss von karyotypischen Anomalien nach Genom-Editierung wurden die iPS Zellen unter Verwendung des *hPSC Genetic Analysis Kit* auf gehäuft vorkommende Anomalien (Baker *et al.*, 2016) getestet. Es konnten keine in diesem Test geprüften Anomalien in dem Klon 331 der E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> iPS Zellen gefunden werden (Abb. 39C).

Die immunzytochemischen Färbungen für die Pluripotenzmarker TRA1-81 (grün), SOX2 (grün) und NANOG (rot) sind in Abbildung 39D gezeigt. Die Anwesenheit aller drei Marker konnte für den Klon 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> nachgewiesen werden.

Die iPS Zellen E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Klon 331 wurden gerichtet differenziert und an Tag D14 für  $\alpha$ -Actinin (grün), Troponin T (grün), CX40 (grün) und CX43 (grün) immunzytochemisch gefärbt (Abb. 39E). Das sarkomere Protein  $\alpha$ -Actinin, der kardiale Marker Troponin T und die Connexine 40 und 43 konnten an Tag D14 der gerichteten Differenzierung nachgewiesen werden. Um eine Beeinflussung der Maturierung der Kardiomyozyten durch die Editierung auszuschließen, wurden die Kardiomyozyten des E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Klons 331 an Tag D30 und Tag D60 in drei unabhängigen gerichteten Differenzierungen durchflusszytometrisch für Troponin T, MLC2A und MLC2V analysiert (Abb. 39F). Troponin T (TropT) ist ein kardialer Marker, MLC2A ist in der Literatur als atrialer bzw. früher Kardiomyozytenmarker beschrieben (BurrIDGE *et al.*, 2014) und MLC2V gilt als Marker für ventrikuläre bzw. zunehmend reifere Kardiomyozyten (BurrIDGE *et al.*, 2014). Für Tag D30 zeigten 41,5% der Kardiomyozyten die Expression von TropT, für Tag D60 32,8% der Kardiomyozyten. Der Unterschied der Troponin T positiven Kardiomyozyten zwischen Tag D30 und D60 war nicht signifikant. MLC2A wurde in 14,9% der Kardiomyozyten an Tag D30 und in 22,8% der Kardiomyozyten an D60 der Differenzierung exprimiert. Der Unterschied der MLC2A exprimierenden Kardiomyozyten für D30 und D60 war nicht signifikant. An Tag D30 zeigten 22,6% der Kardiomyozyten ein positives Signal für MLC2V. An Tag D60 waren 59,9% der Kardiomyozyten MLC2V positiv. Der Unterschied der MLC2V positiven Kardiomyozyten war signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ). Die durchflusszytometrische Analyse der E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Kardiomyozyten zeigte eine zunehmende Maturierung im Verlauf der gerichteten Differenzierung. Die Expression von Troponin T, MLC2A und MLC2V wurde für die Kardiomyozyten an Tag D30 und D60 immunzytochemisch nachgewiesen und ist in Abbildung 39G gezeigt. Die E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Kardiomyozyten an Tag D30 der gerichteten Differenzierung exprimierten Troponin T (grün), MLC2A (grün) und MLC2V (grün). An Tag D60

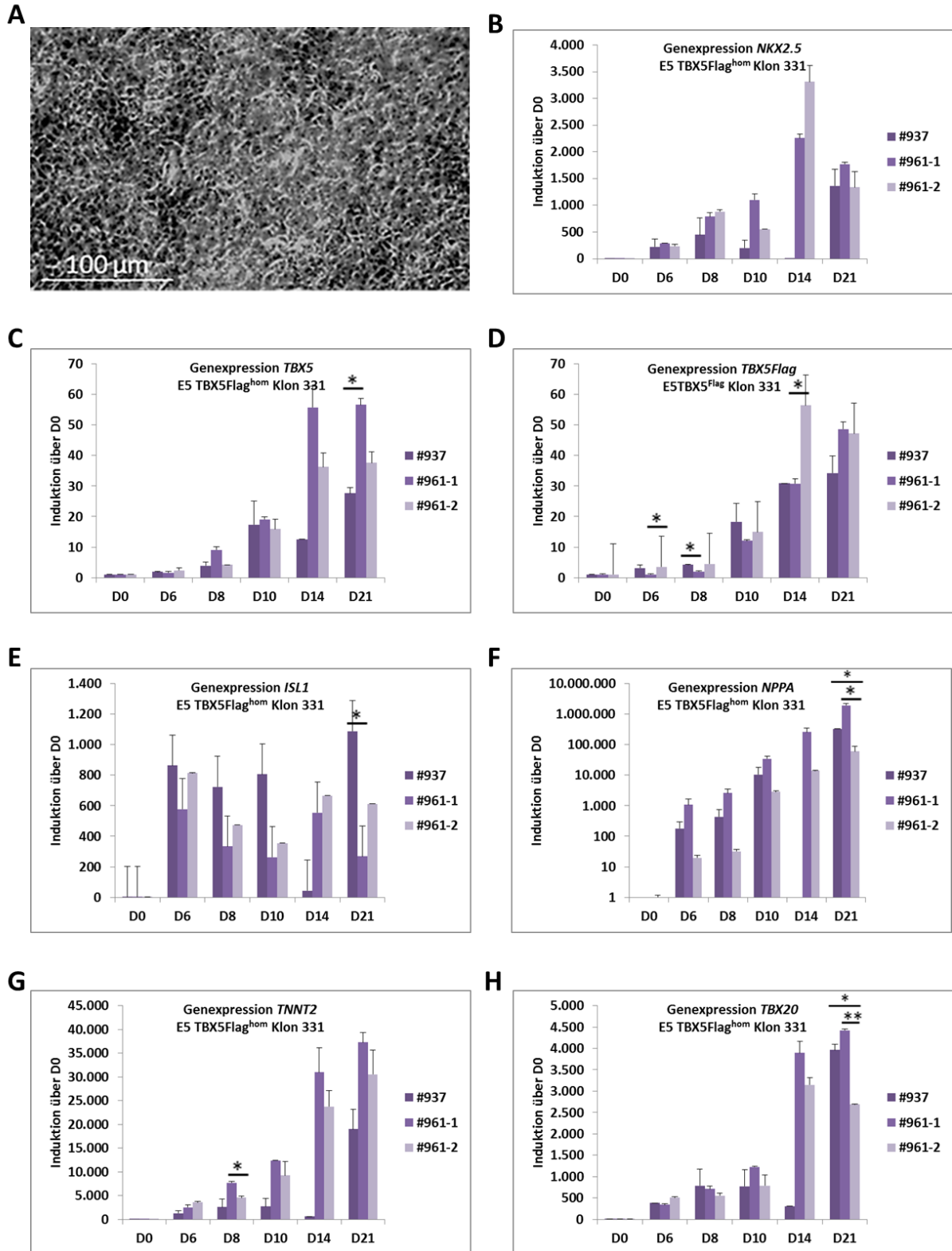
der Differenzierungen zeigten die Kardiomyozyten ebenfalls ein positives Signal für Troponin T (rot), MLC2A (grün) und MLC2V (grün). Die Färbung für MLC2V zeigte für D60 ein deutlich stärker strukturiertes Muster (Abb. 39G). Für alle immunzytochemischen Färbungen wurden die Zellkerne mit DAPI (blau) visualisiert. In Abbildung S23 sind weitere immunzytochemische Färbungen für kardiale Marker ( $\alpha$ -Actinin,  $\alpha$ MHC, Connexin 40, Connexin 43, Troponin T) der E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Kardiomyozyten an Tag D60 gezeigt.

### **3.5.3 Untersuchung des Induktionsprofils von *in vitro* differentiell regulierten Genen in den editierten iPS Zellen E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Klon 331 unter Verwendung eines gerichteten Differenzierungsprotokoll**

Die Identifikation von Zielgenen des TBX5 setzt ein bekanntes Expressionsprofil des Transkriptionsfaktors voraus, das in seinem zeitlichen Verlauf und innerhalb von unabhängigen Differenzierungen stabil ist. Des Weiteren muss sichergestellt werden, dass das Expressionsprofil für kardiale Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls für die Kardiogenese relevant sind und in einigen Fällen auch mit TBX5 interagieren, klar definiert und stabil über unabhängige Differenzierungen ist.

Die CRISPR/Cas9 editierten E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> iPS Zellen (Klon 331) wurden auf ihre Expression von *NKX2.5*, *TBX5*, *NPPA*, *ISL1*, *TNNT2* und *TBX20* in der gerichteten Differenzierung untersucht. Abbildung 40A zeigt eine Phasenkontrastaufnahme der gerichteten Differenzierung an Tag D14 des E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Klons 331. Die Differenzierungen zeigten visuell keinen Unterschied zu anderen durchgeführten gerichteten Differenzierungen.

In Abbildung 40B-H sind die Ergebnisse der gerichteten Differenzierung (drei unabhängige Differenzierungen mit biologischen Duplikaten) zusammengefasst.



**Abbildung 40: Charakterisierung der gerichteten Differenzierung für den E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Klon 331.** (A) Phasenkontrastbild der gerichteten Differenzierung an Tag D14. (B-H) Induktion von (B) *NKX2.5*, (C) *TBX5*, (D) *TBX5Flag*, (E) *ISL1*, (F) *NPPA*, (G) *TNNT2* und (H) *TBX20* über Tag D0 nach Normalisierung mit *ACTB*. Die Genexpression wurde in drei unabhängige Differenzierungen mit biologischen Duplikaten bestimmt. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Signifikanzen: \*\*:  $p < 0,01$ . \*:  $p < 0,05$ .



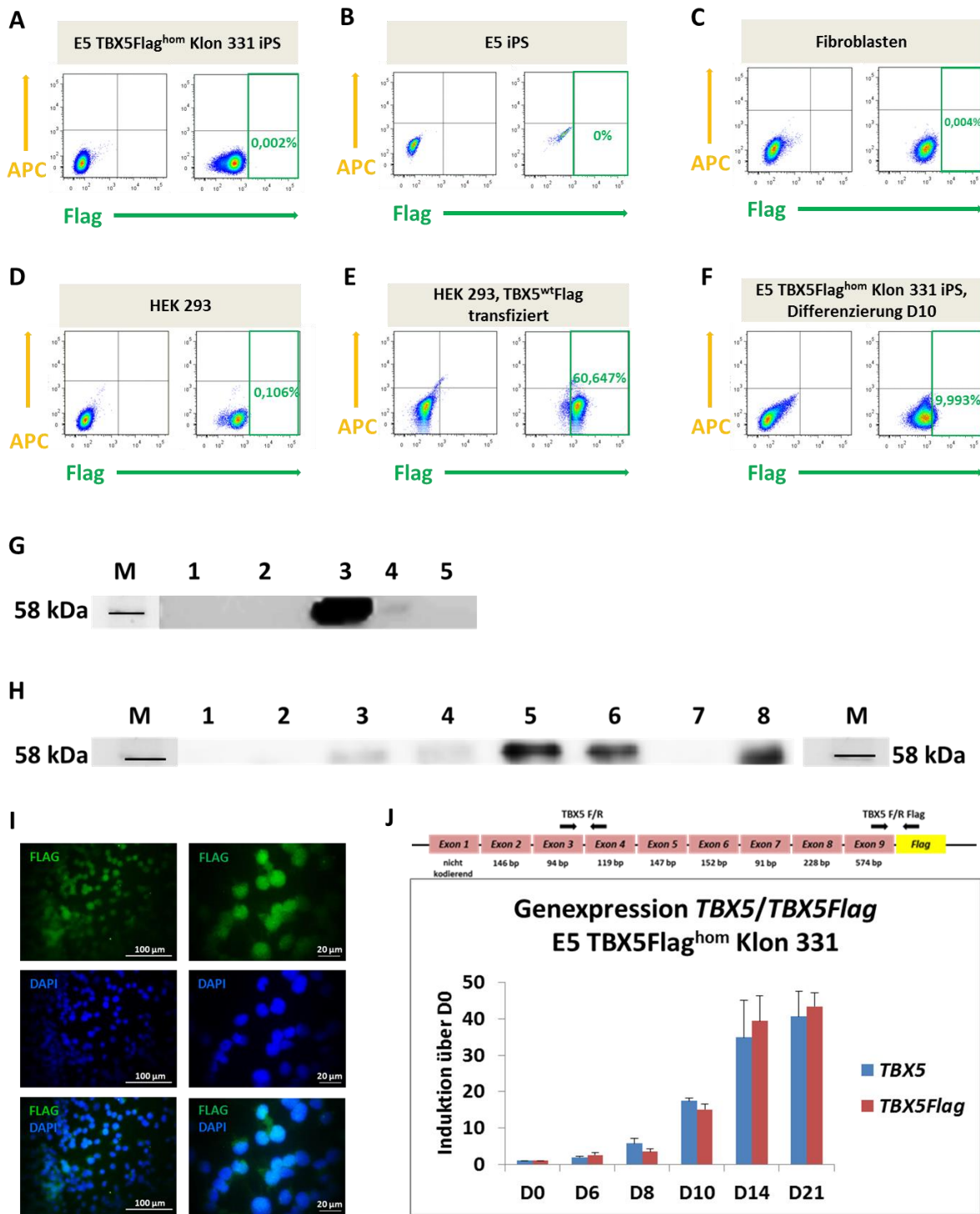
In Abbildung 40B ist die Induktion von *NKX2.5* gezeigt. *NKX2.5* wurde ab Tag D6 der Differenzierung induziert und stieg kontinuierlich bis Tag D14 an. Tag D21 zeigte eine abnehmende Induktion des Transkriptionsfaktors. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei unabhängig durchgeführten Differenzierungen. Abbildung 40C zeigt die *TBX5* Induktion. *TBX5* wurde ab Tag D6 induziert und stieg kontinuierlich bis Tag D14 an. Tag D21 zeigte eine vergleichbare Induktion des Transkriptionsfaktors, wie Tag D14. Innerhalb der drei unabhängig durchgeführten Differenzierungen gab es für D21 für zwei der drei Differenzierungen einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ). In Abbildung 40D ist die *TBX5* Expression mit Oligonukleotiden nachgewiesen, die komplementär zu der Flag-Sequenz im *TBX5* Locus sind und die *TBX5* Wildtyp-Sequenzen nicht amplifizieren. Die gemessene Induktion über Tag D0 zeigte einen vergleichbaren Verlauf wie die gemessene Induktion mit Oligonukleotiden, die spezifisch *TBX5* Wildtyp-Sequenzen erkennen, nicht aber die Flag-Sequenz (Abb. 40C). Signifikante Unterschiede zwischen den unabhängigen Differenzierungen waren für zwei Differenzierungen an den Tagen D6, D8 und D14 ( $p < 0,05$ ) zu sehen. Die Induktion für *ISL1* ist in Abbildung 40E gezeigt. *ISL1* wurde ab Tag D6 induziert und zeigte über den Verlauf der Differenzierung eine kontinuierliche Induktion. Am Tag D21 war für zwei Differenzierungen ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zu sehen. Abbildung 40F zeigt die Induktion von *NPPA*. Das Zielgen von *TBX5* war ab Tag D6 messbar, stieg stetig im Verlauf der Differenzierung an und zeigt nur für Tag D21 signifikante Unterschiede in den Differenzierungen ( $p < 0,05$ ). Für *TNNT2* zeigte sich eine Induktion ab Tag D6, die kontinuierlich im Verlauf der Differenzierung anstieg (Abb. 40G). Für Tag D8 war in zwei der Differenzierungen ein signifikanter Unterschied in der Induktion von *TNNT2* zu sehen ( $p < 0,05$ ). *TBX20* zeigte ab Tag D6 der gerichteten Differenzierung eine Induktion, die kontinuierlich zunahm. Signifikante Unterschiede zwischen den Differenzierungsansätzen waren für den Tag D21 ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ) zu sehen (Abb. 40H).

Die Genexpressionsanalyse der gerichteten Differenzierung des E5 *TBX5*Flag<sup>hom</sup> (Klon 331) zeigte eine stabile, der Kardiogenese entsprechende Induktion der untersuchten Transkriptionsfaktoren, sowie für *NPPA* und *TNNT2*. Die Amplifikation des *TBX5* Gens ist für Oligonukleotide, die am Flag-Tag des *TBX5* Gens des homozygoten Klons binden vergleichbar mit der Amplifikation durch für *TBX5* Wildtyp spezifische Oligonukleotide.

Die unabhängig durchgeführten Differenzierungen sind vergleichbar und zeigen kaum signifikante Unterschiede. Die Differenzierungen laufen stabil und reproduzierbar ab. Alle gemessenen Faktoren zeigen Induktionen, wie sie in iPS Zellen zu erwarten sind.

### 3.5.4 Nachweis der Funktionalität des TBX5Flag-Tags

Die Identifikation von Regulationsmechanismen des Transkriptionsfaktors TBX5 in der kardialen Entwicklung setzt voraus, dass Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors identifiziert werden können. Die iPS Zellen des E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Klon 331 tragen ein Flag-Tag, über das die Detektion von TBX5 indirekt möglich ist. Die Funktionalität des Flag-Tags wurde durchflusszytometrisch, im Western Blot und immunzytochemisch geprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 41 gezeigt.



**Abbildung 41: Nachweis der Funktionalität des TBX5-Flag Tags. (A)** Durchflusszytometrische Analyse der iPS Zellen des Klons 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup>. **(B)** Durchflusszytometrische Analyse der iPS Zellen E5. **(C)** Durchflusszytometrische Analyse von Fibroblasten. **(D)** Durchflusszytometrische Analyse von HEK 293 Zellen. **(E)** Durchflusszytometrische Analyse der mit TBX5<sup>wt</sup>Flag transfizierten HEK 293 Zellen. **(F)** Durchflusszytometrische Analyse der gerichteten Differenzierung an Tag D10 des Klons 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup>. **(G)** Western Blot zum Nachweis der Detektion des Flag-Tags. Verwendet wurde der monoklonale Maus Antikörper Anti-DDK (Flag), Clone OTI4C5 (#TA50011, OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD), in einer Verdünnung von 1:500. M: Color Prestained Protein Standard, Broad Range. Spur 1: iPS Zellen E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Klon 331 p32/13. Spur 2: iPS Zellen E5 p38. Spur 3: HEK 293 Zellen, transfiziert mit TBX5<sup>wt</sup>Flag. Spur 4: HEK 293 Zellen transfiziert mit TBX5<sup>mut</sup>Flag. Spur 5: HEK 293 Zellen, untransfiziert. **(H)** Western Blot zur Detektion des Flag-Tags. Verwendet wurde der monoklonale Maus Antikörper Anti-DDK (Flag), Clone OTI4C5 (#TA50011, OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD), in einer Verdünnung von 1:500. M: Color Prestained Protein Standard, Broad Range. Spur 1: E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Klon 331 p32/13. Spur 2: Zellen der gerichteten Differenzierung #962 an Tag D8 des Klons 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup>. Spur 3: Zellen der gerichteten Differenzierung #962 an Tag D10 des Klons 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup>. Spur 4: Zellen der gerichteten Differenzierung #962 an Tag D12 des Klons 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup>. Spur 5: Zellen der gerichteten Differenzierung #964 an Tag D8 des Klons 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup>. Spur 6: Zellen der gerichteten Differenzierung #964 an Tag D10 des Klons 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup>. Spur 7: iPS Zellen E5 p38 (Negativkontrolle). Spur 8: HEK 293 Zellen, transfiziert mit TBX5<sup>wt</sup>Flag (Positivkontrolle). **(I)** Immunzytochemische Färbung von Zellen der gerichteten Differenzierung Tag D10 des Klons 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup>. Es wurde der monoklonale Maus Antikörper Anti-Flag<sup>®</sup>M2, Clone M2 (1:200, #F1804, Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. FLAG (grün). DAPI (blau). Dargestellt sind jeweils die Einzelfärbungen und DAPI zur Visualisierung des Zellkerns, wie auch das übereinander gelagerte Bild. Für jede Färbung sind Aufnahmen in 100-facher und 1000-facher Vergrößerung gezeigt. **(J)** Induktion von TBX5 in der gerichteten Differenzierung der iPS Zellen des Klons E5 TBX5 Flag<sup>hom</sup> Klon 331. Die Amplifikation von TBX5 erfolgte mit den Oligonukleotiden TBX5 (TBX5F888/R953) und TBX5Flag (F2141/FlagR2242). Die TBX5Flag Oligonukleotide erkennen das Flag-Tag, welches in den Lokus des TBX5 Gens eingebaut wurde.

In den Abbildungen 41A-F ist die durchflusszytometrische Quantifizierung von Flag unter Verwendung des monoklonalen Maus Antikörpers anti-DDK (Flag), Clone OTI4C5 (#TA50011, OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD) gezeigt. In Abbildung 41A ist die Detektion von Flag in undifferenzierten iPS Zellen E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> (Klon 331) dargestellt. Es konnten keine Flag-positiven Zellen (0,002%) detektiert werden. Als Negativkontrolle wurden iPS Zellen des Probanden E5 quantifiziert, dessen Zellen als Ausgangszellen für die Genom-Editierung verwendet wurden (Abb. 41B). Es konnten keine Flag-positiven iPS Zellen (0%) detektiert werden. Fibroblasten (0,004%, Abb. 41C) und HEK 293 Zellen (0,106%, Abb. 41D) gaben in der durchflusszytometrischen Analyse ebenfalls kein positives Signal für Flag. Die Analyse von HEK 293 Zellen, die mit TBX5<sup>wt</sup>Flag transfiziert wurden, zeigte dagegen 60,647% Flag-positive Zellen (Abb. 41E). An Tag D10 der gerichteten Differenzierung des E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> (Klon 331) wurden 9,993% Flag-positive Zellen detektiert (Abb. 41F). Die Expression des TBX5-Flag Proteins, das mit einer Größe von 59 kDa berechnet wurde, ist im Western Blot mit dem monoklonalen Maus Antikörper anti-DDK Flag gezeigt (Abb. 41G und H). Für den Western Blot wurde Protein isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Der Primärantikörper wurde 1:500 verdünnt und mittels HRP-markiertem Sekundärantikörper visualisiert. Abbildung 41G zeigt iPS Zellen des E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Klon 331 (Spur 1), iPS Zellen des E5p38 (Spur 2), HEK 293 Zellen, die mit TBX5<sup>wt</sup>Flag transfiziert wurden (Spur 3), HEK 293 Zellen, die mit TBX5<sup>mut</sup>Flag transfiziert wurden (Spur 4) und untransfizierte HEK 293 Zellen (Spur 5). Das TBX5-Flag Protein konnte in HEK 293 Zellen, die mit TBX5<sup>wt</sup>Flag transfiziert wurden (Spur 3) und in HEK 293 Zellen, die mit TBX5<sup>mut</sup>Flag transfiziert wurden (Spur 4) detektiert werden. Abbildung 41H zeigt E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Klon 331

p32/13 (Spur 1), Zellen der gerichteten Differenzierung #962 an Tag D8 des Klons 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> (Spur 2), Zellen der gerichteten Differenzierung #962 an Tag D10 des Klons 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> (Spur 3), Zellen der gerichteten Differenzierung #962 an Tag D12 des Klons 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> (Spur4), Zellen der gerichteten Differenzierung #964 an Tag D8 des Klons 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> (Spur 5), Zellen der gerichteten Differenzierung #964 an Tag D10 des Klons 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> (Spur 6), iPS Zellen E5 p38 (Spur 7) und HEK 293 Zellen, transfiziert mit TBX5<sup>wt</sup>Flag (Spur 8). Das TBX5-Flag Protein wurde in sich differenzierenden E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Zellen in zwei unabhängigen Differenzierungen (#962, #964) für die Tage D10 (Spur 3) und D12 (Spur4) bzw. die Tage D10 (Spur 5) und D12 (Spur 6) nachgewiesen.

Abbildung 41I zeigt die immunzytochemische Färbung von Zellen der gerichteten Differenzierung an Tag D10 des Klons 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup>. Es wurde der monoklonale Maus Antikörper Anti-Flag<sup>®</sup>M2, Clone M2 (1:200, #F1804, Sigma-Aldrich, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Visualisierung des Zellkerns wurden die Zellen mit DAPI gefärbt. Das FLAG (grün) konnte erfolgreich in der gerichteten Differenzierung des Klons 331 E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> nachgewiesen werden und zeigt eine Überlagerung mit der Kernfärbung. Dargestellt sind jeweils die Einzelfärbungen und DAPI zur Visualisierung des Zellkerns, wie auch das übereinander gelagerte Bild. Für jede Färbung sind Aufnahmen in 100-facher und 1000-facher Vergrößerung gezeigt.

Zum Ausschluss einer Beeinflussung der *TBX5* Expression durch das Flag-Tag auf die *TBX5* Expression wurde die Induktion von *TBX5* in der gerichteten Differenzierung der iPS Zellen des Klons E5 TBX5 Flag<sup>hom</sup> Klon 331 mit Oligonukleotiden, die nur *TBX5* Wildtyp-Sequenzen amplifizieren (TBX5 F888/R953) und Oligonukleotiden, die spezifisch die Flag-editierten Sequenzen im *TBX5* Gen amplifizieren (TBX5 F2141/FlagR2242) verglichen (Abb. 41J). Die Induktion von *TBX5* zeigte keine signifikanten Unterschiede und verlief über den Verlauf der gerichteten Differenzierung absolut vergleichbar.

Die Funktionalität und Spezifität des Flag-Tags zur Detektion von *TBX5* konnte durchflusszytometrisch, im Western Blot und in der Immunzytochemie gezeigt werden. Es wurde keine unspezifische Detektion gesehen. Darüber hinaus hatte das Flag-Tag keinen Einfluss auf die Expression des *TBX5* Gens.

## 4 Diskussion

Angeborene Herzfehler (AHF) sind die häufigste Organfehlbildung und machen etwa ein Drittel der dokumentierten angeborenen Fehlbildungen aus (Dolk *et al.*, 2011; Reller *et al.*, 2008; Hoffmann & Kaplan, 2002; Wren *et al.*, 2000). In den letzten Jahrzehnten wurden große Fortschritte im Bereich der AHF erreicht. Dennoch lässt sich die Entstehung in den wenigsten Fällen ursächlich eindeutig klären und es ist allgemein anerkannt, dass die Entstehung von AHF multifaktorielle Ursachen hat (Fahed *et al.*, 2013). Das Säugerherz ist ein komplexes Organ, welches eine komplexe Morphogenese durchläuft und sich aus verschiedenen Zellpopulationen, wie atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen (Brade *et al.*, 2013), epikardialen Zellen, Zellen des Reizleitungssystems, Zellen der Herzklappen und Bindegewebszellen zusammensetzt. Die Kardiogenese mit ihrer zugrundeliegenden komplexen Entwicklung und der Menge an involvierten Zelltypen lässt eine Vielzahl an Ursachen zu, die zu Fehlbildungen des Herzens führen können.

Das HOS gehört zu den Herz-Hand Syndromen und ist durch Missbildungen der oberen Extremitäten und AHF charakterisiert (Newbury-Ecob *et al.*, 1996; Basson *et al.*, 1994). Die kardiale Manifestation des Phänotyps ist variabel und reicht von einfachen bis komplexen ASD und VSD bis hin zu komplexen Anomalien wie der Fallot'schen Tetralogie und dem hypoplastischen Linksherzsyndrom (Bruneau *et al.*, 1999; Newbury-Ecob *et al.*, 1996; Basson *et al.*, 1994). Elektrophysiologische Defekte, wie der AV-Block sind ebenfalls beschrieben (Basson *et al.*, 1994). Mutationen im *TBX5* Gen, die kein HOS verursachen waren lange nicht beschrieben (Goldmuntz *et al.*, 2004). Inzwischen sind Mutationen im *TBX5* Gen bekannt, die nicht syndromal sind und mit Vorhofflimmern (Guo *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2016; Baban *et al.*, 2014; Postma *et al.*, 2008) und dilatativer Kardiomyopathie (Zhang *et al.*, 2015) assoziiert sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf Patienten, bei denen ein HOS diagnostiziert wurde, genau charakterisiert. Die Diagnose für das HOS wurde strikt nach den durch McDermott publizierten Kriterien durchgeführt: „Patienten, bei denen ein HOS diagnostiziert wird, müssen Missbildungen der präaxialen Strahlen mindestens eines oberen Gliedmaßens und eine individuelle oder familiäre Anamnese von Septumdefekten und/oder Defekten des atrioventrikulären Reizleitungssystems aufweisen“ (McDermott *et al.*, 2005). Wie in der Charakterisierung der HOS Patienten gezeigt, waren alle Kriterien des HOS nach McDermott gegeben.

Es existieren eine Reihe von Studien zum HOS (Basson *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1997b; Basson *et al.*, 1997), das in 75% der Fälle auf eine Mutation im *TBX5* Gen zurückgeführt werden kann (McDermott *et al.*, 2005; Basson *et al.*, 1999; Basson *et al.*, 1997) und somit zu den wenigen AHF gehört dessen Ursache, bei vorhandener *TBX5* Mutation, eindeutig geklärt ist. Punktmutationen oder Duplikationen/Deletionen des *TBX5* Gens bzw. einzelner Exone führen zu einer Veränderung der Gendosis und sind ursächlich für das Syndrom (Bruneau *et al.*, 2001; Vaughan *et al.*, 2000). Auch Mutationen in der 5'-regulatorischen Sequenz oder im T-box DNA Bindemotiv des *Tbx5* Gens können zu einer Reduktion der Gendosis führen und das HOS verursachen (Fan *et al.*, 2003). In der Literatur sind mehr als 90 Mutationen im *TBX5*

Gen beschrieben, die eine Dysfunktion des Proteins zur Folge haben und zur Haploinsuffizienz führen (Kimura *et al.*, 2015; Bruneau *et al.*, 2001; Basson *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997b; Basson *et al.*, 1994).

Grundlegende Mechanismen der Herzentwicklung sind in Vertebraten und Invertebraten konserviert. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass genetische Netzwerke, welche die Herzentwicklung regulieren, weitgehend konserviert sind, sodass auch Modellsysteme niederer Organismen zur Untersuchung der Kardiogenese verwendet werden können (Fahed *et al.*, 2013; Moorman & Christoffels, 2003). Die Einordnung der genetisch unabhängigen und abhängigen Ätiologie von AHF wurde in verschiedenen Modellorganismen, wie *Drosophila melanogaster* (Su *et al.*, 1999; Bodmer *et al.*, 1998; Olson & Srivastava, 1996), *Danio rerio* (Hill *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2009; Garrity *et al.*, 2002; Begemann & Ingham, 2000) und Säugermodellen (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*) (Bruneau *et al.*, 2001; Hiroi *et al.*, 2001; Bruneau *et al.*, 1999) untersucht. Es konnten Signalwege identifiziert werden, die für die Morphogenese des Herzens relevant sind (Evans *et al.*, 2010; Vicent & Buckingham, 2010; Srivastava, 2006; Fishman & Olson, 1997). Innerhalb dieser Signalwege wurden Faktoren identifiziert, die für die Spezifikation der einzelnen kardialen Zelltypen, deren Differenzierung, das Zellwachstum und die Migration der Zellen verantwortlich sind (Boettger & Braun, 2012; Kim *et al.*, 2012; Munshi, 2012; von Gise & Pu., 2012; Singh *et al.*, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass Expressionsmuster, die eine zeitliche und räumliche Ordnung aufweisen müssen, für die korrekte Kardiogenese essentiell sind (Boettger & Braun, 2012; Kim *et al.*, 2012; Munshi, 2012; von Gise & Pu., 2012; Singh *et al.*, 2011). Für die Embryogenese/Kardiogenese sind verschiedene Transkriptionsfaktoren relevant, unter anderem *Nkx2.5* (Harvey *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 1999; Lyons *et al.*, 1995), *Gata4* (Peterkin *et al.*, 2005; Pikkarainen *et al.*, 2004; Kuo *et al.*, 1997), *Isl1* (Evans *et al.*, 2010; Vincent & Buckingham, 2010; Cai *et al.*, 2003) und die T-Box Genfamilie (Greulich *et al.*, 2016; Greulich *et al.*, 2011; Stennard & Harvey, 2005; Lindsay, 2001; Merscher *et al.*, 2001; Basson *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997b). In Tiermodellen konnte, der in dieser Arbeit relevante Transkriptionsfaktor *Tbx5*, als essentiell für die Strukturierung und Differenzierung von Gewebe identifiziert werden (Papaioannou & Silver, 1998). *Tbx5* wird während der embryonalen Entwicklung in den oberen Extremitäten und im Herzen exprimiert (Showell *et al.*, 2004). Die identifizierte Relevanz von *Tbx5* für die Ausbildung der oberen Extremitäten und für die Herzentwicklung im Tiermodell deckt sich mit dem Phänotyp des HOS, bei dem Missbildungen der oberen Extremitäten mit AHF einhergehen. Die Relevanz von *Tbx5* in der Morphogenese des Herzens und im Phänotyp des HOS, als Folge einer veränderten Gendosis von *Tbx5*, wurde durch spezifische temporäre und lokale Expressionsmuster im Verlauf der Embryogenese von *M. musculus* und *D. rerio* definiert (Tsai *et al.*, 2012; Ghosh *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2008; Ahn *et al.*, 2002; Garrity *et al.*, 2002; Begemann & Ingham, 2000; Bruneau *et al.*, 1999; Chapman *et al.*, 1996).

Bruneau und Kollegen verfolgten die *Tbx5* Expression in der murinen embryonalen Herzentwicklung (Bruneau *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass zu Beginn der Embryonalentwicklung (E8) *Tbx5* ubiquitär exprimiert ist. Während der Ausbildung des linearen Herzens (E8.25) ist die *Tbx5* Expression im posterioren Teil des Herzens, aus dem

sich später der *Sinus venosus* und die Atrien entwickeln, vorhanden. Im Verlauf der Schleifenbildung des Herzens (E8.5-9) kommt es zur Verlagerung von anterior/posterior zu einer links/rechts Symmetrie. In diesem Entwicklungsstadium wird *Tbx5* auch im anterioren Teil des Herzens, aus dem sich der linke Ventrikel (LV) bildet, exprimiert. Im rechten Ventrikel (RV) und im Ausflusstrakt werden in diesem Stadium ebenfalls geringe Mengen an *Tbx5* exprimiert. Während der Maturierung der Ventrikel und der Septenbildung ist die Expression von *Tbx5* im LV und den Trabeculae der Ventrikel nachweisbar. *Tbx5* wird in den beiden atrialen Septen, die aufeinander zuwachsen und somit zur Trennung des linken und rechten Atriums führen, exprimiert. Das ventrikuläre Septum, die atrioventrikulären Klappen, die rechte und linke *Vena superior cava* und die *Vena inferior cava* exprimieren ebenfalls *Tbx5*. Kurz vor Geburt konnte die *Tbx5* Expression im intraventrikulären Septum, im atrialen Myokardium, dem atrialen Septum und in den atrioventrikulären Klappen nachgewiesen werden. Das definierte Expressionsmuster von *Tbx5* in der murinen Embryogenese wurde in der Arbeit von Bruneau und Kollegen mit dokumentierten kardialen Defekten von 301 Patienten mit HOS verglichen (Bruneau *et al.*, 1999). Alle Fehlbildungen, die für die untersuchten HOS Patienten dokumentiert wurden (Missbildungen der Aorta, ASD, Defekte im Reizleitungssystem, DORV, Endokardkissendefekte, hypoplastisches Herz, Mitralklappendefekte, Anomalien der Pulmonalarterien, TAPVR, TA, VSD) konnten auf Herzregionen, die im Verlauf der murinen Kardiogenese *Tbx5* exprimieren zurückgeführt werden. Auch die, in der vorliegenden Arbeit eingeschlossenen HOS Indexpatienten zeigten Fehlbildungen in Herzregionen, die im Mausmodell *Tbx5* exprimieren (Indexpatientin 780: multipler, muskulärer VSD. Indexpatientin 804: perimembranöser VSD, Pulmonalstenose. Indexpatientin 950: ASD vom Secundum-Typ (ASD II), Mitralklappeninsuffizienz, Trikuspidalklappeninsuffizienz. Indexpatientin 972: multipler muskulärer VSD, valvuläre Pulmonalstenose, ASD und atrioventrikulärer Block (AV-Block) Grad I. Indexpatient 1460: „Swiss cheese“ VSD, PFO, Trikuspidalklappeninsuffizienz). Diese decken sich mit den dokumentierten kardialen Defekten die, in den HOS Patienten von Bruneau und Kollegen gefunden wurden (Bruneau *et al.*, 1999).

Im Jahre 2001 wurde in der Arbeitsgruppe von Bruneau ein Mausmodell generiert, das eine Deletion eines ( $Tbx5^{del/+}$ ) oder beider Allele ( $Tbx5^{del/del}$ ) des *Tbx5* Gens trägt (Bruneau *et al.*, 2001). Dieses Mausmodell ermöglichte es, die Auswirkungen einer verminderten/fehlenden *Tbx5* Expression in der murinen Embryonalentwicklung detailliert zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass heterozygote Mäuse ( $Tbx5^{del/+}$ ) einen Phänotyp zeigten, der dem HOS entspricht. Es kam zu Missbildungen der vorderen Extremitäten (Pfoten, Gelenke der vorderen Extremitäten und des ersten Gliedes (dem humanen Daumen entsprechend)) und kardialen Anomalien, wie einem vergrößerten Herz, dilatierten Atrien und Veränderungen des Ventrikels. Alle heterozygoten Mäuse zeigten ASD, die auf das anteriore Septum zurückzuführen waren. Da die Verteilung der neugeborenen Mäuse nicht, wie zu erwarten bei 50% Wildtyp ( $Tbx5^{+/+}$ ) und 50% heterozygoten ( $Tbx5^{del/+}$ ) Mäusen lag, sondern 72% Wildtyp und 28% heterozygote Mäuse zeigte, wurde daraus geschlossen, dass ca. 40% der heterozygoten Mäuse bereits pränatal versterben. Eine Untersuchung der Embryonen zeigte schwerwiegende Phänotypen (membranöser/muskulärer VSD, ausgeprägter ASD und

Deformationen des linken Ventrikels) und stärkt die Hypothese des vorgeburtlichen Todes von heterozygoten Mäusen mit massiver Ausprägung des Phänotyps. Die Elektrokardiogramme der lebenden heterozygoten Mäuse zeigten Veränderungen, die auf eine abweichende atriale Depolarisierung und eine Verzögerung des atrialen Impulses an den Ventrikel (AV-Block I) zurückzuführen waren. Ein Monitoring über 24 Stunden zeigte bei 50% der heterozygoten Mäuse einen AV-Block II (fehlende Impulsüberleitung des Atriums an den Ventrikel) und sinoatriale Pausen (fehlende Impulsenergie) in höherer Frequenz und länger anhaltenden Intervallen als in Wildtyp Mäusen. Dementsprechend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass heterozygote Mäuse vermehrt elektrophysiologische Störungen hatten, ein kardialer Defekt, der auch in HOS Patienten zu sehen ist.

Homozygote Mäuse ( $Tbx5^{del/del}$ ) waren nicht lebensfähig und verstarben am Tag E10.5 der Embryonalentwicklung. Am Tag E8.5 war ein deformiertes lineares Herzgefäß zu sehen. Sinoatriale Strukturen und der sich entwickelnde LV waren hypoplastisch. Das Wachstum der anterioren Strukturen aus denen sich der RV und der Ausflusstrakt entwickeln, wurde durch die hypoplastische Struktur des LVs im Wachstum eingeschränkt. Die Schleifenbildung in der embryonalen Entwicklung war nicht zu erkennen. Am Tag E9.5 zeigte sich ein Entwicklungsarrest, der sich in einem kleinen Atrium anstelle der zwei Atrien, die zu diesem Zeitpunkt bereits entwickelt sein sollten und eine große tubuläre Struktur, die den Ausflusstrakt darstellte, zeigte. Die hypoplastische posteriore Struktur wurde als Rest des LVs und der „Einflußstruktur“ identifiziert. Es gab keine Anlage der Aortenklappe. Der im Mausmodell identifizierte Entwicklungsarrest von homozygoten Mäusen ( $Tbx5^{del/del}$ ) und der pränatale Tod dieser Mäuse, erklärt die Beobachtung, dass bislang keine HOS Patienten mit homozygoter Mutation im *TBX5* Gen identifiziert wurden. Auch die in dieser Arbeit charakterisierten HOS Indexpatienten mit *TBX5* Mutation (780, 950 und 1460) tragen die Mutation heterozygot, so dass eine *TBX5* Haploinsuffizienz vorliegt.

*Danio rerio* ist ein weit verbreiteter Modellorganismus in der Genetik und Entwicklungsbiologie. Vorteile, die *D. rerio* als Modellorganismus gegenüber Säugetiermodellen auszeichnen sind die Entwicklung der Embryonen außerhalb des Muttertiers, ein kurzer Generationszyklus mit hoher Anzahl an Nachkommen und die durchsichtige Optik, die es ermöglicht Zellen bereits in einem frühen Larvenstadium sichtbar zu machen und somit Entwicklungsdefekte detailliert zu verfolgen (Brown *et al.*, 2016). Das Herz von *D. rerio* ist ein Zweikammerherz, weist aber Analogien zu den Hauptkomponenten des Säugerherzens auf (Moorman & Christoffels, 2003; Stainier *et al.*, 1993). Tsai und Kollegen konnten zeigen, dass eine verminderte Expression von *tbx5* in *D. rerio* das Expressionsmuster in der Embryogenese verändert und in ausgeprägten Entwicklungsverzögerungen resultiert (Tsai *et al.*, 2012; Garrity *et al.*, 2002; Begemann & Ingham, 2000). Ein *tbx5 knock-down* in *D. rerio* führte zu Anomalien des Herzens und der Brustflossen (Tsai *et al.*, 2012) und deckt sich mit dem humanen Phänotyp des HOS. Ahn und Kollegen zeigten, dass *tbx5* exprimierende mesodermale Zellen in die Region der Flossenknospen und in die spätere Herzregion migrieren (Ahn *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion von *tbx5* eine verminderte Expression von Genen, welche für Myosine kodieren (*amhc/mhy6*, *vmhc* und *cmhc2*) zur Folge hat und kardiale Defekte, wie



auch eine zeitlich verzögerte Ausbildung der Flossen und deren Missbildungen, verursacht werden (Gosh *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2008).

Sowohl das *Tbx5* Modell von Bruneau und Kollegen (Bruneau *et al.*, 2001), wie auch die Zebrafischmodelle (Tsai *et al.*, 2012; Ahn *et al.*, 2002) sind Modelle, die den Phänotyp des HOS erklären können. Eine homozygote Deletion von *Tbx5* führt zur Letalität in der Embryonalentwicklung und die heterozygote Deletion führt zu Missbildungen der vorderen Extremitäten, ähnlich wie beim Menschen. Auch die kardialen Anomalien des HOS Phänotyps sind in den heterozygoten Mäusen bzw. Embryonen wieder zu finden. Das Mausmodell zeigte, dass ein spezifisches temporäres und lokales Expressionsmuster von *Tbx5* in der Kardiogenese für die korrekte Entwicklung des Herzens essentiell ist. Es zeigte weiterhin, dass keine kompensatorischen Mechanismen für einen Funktionsverlust von *Tbx5* in der kardialen Entwicklung vorhanden sind und dass der Phänotyp mit der Dosis des *Tbx5* Proteins korreliert. Die Arbeiten von Tsai/Ahn und Kollegen konnten den kardialen Phänotyp, wie auch die Missbildungen der oberen Extremitäten im HOS in *D. rerio* ebenfalls rekapitulieren (Tsai *et al.*, 2012; Ahn *et al.*, 2002). Dennoch ist zu betonen, dass Mechanismen, die im Tiermodell gefunden werden, nicht ohne Einschränkung auf den Menschen übertragbar sind. In der Arbeit von Zhu und Kollegen wurde beispielsweise ein Mausmodell für *Myh11* generiert, das für *Myh11*-null Mäuse einen verzögerten Verschluss des *Ductus* zeigte, während Patienten mit *loss of function* Mutationen im *MYH11* einen persistierenden *Ductus arteriosus* (engl. *persistent ductus arteriosus*, PDA) haben (Zhu *et al.*, 2006). Untersuchungen in *D. rerio* werfen trotz grundlegender konservierter Mechanismen in der Herzentwicklung bei Vertebraten und Invertebraten die Problematik auf, dass der Zebrafisch ein Zwei- und kein Vierkammerherz besitzt, sodass die Ergebnisse nicht vollständig und ohne Bedenken direkt auf das Säugerherz übertragen werden können. Aus diesem Grund sind humane Modelle für das Verständnis der Kardiogenese und die Mechanismen, die zur Auslösung von AHF im Menschen führen essentiell.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein patienten-spezifisches HOS iPS Modell generiert, das die Mechanismen, die das HOS auslösen in einem humanen Modell untersuchen kann. Da das HOS in 75% der Fälle auf eine Mutation im *TBX5* Gen zurückgeführt werden kann (McDermott *et al.*, 2005; Basson *et al.*, 1999; Basson *et al.*, 1997), wurden die fünf HOS Indexpatienten, die die Kriterien für die Diagnose HOS nach McDermott erfüllten, auf eine vorhandene Mutation im *TBX5* Gen untersucht. Eine WES wie auch Sanger Sequenzierung konnte für drei der fünf HOS Indexpatienten eine *TBX5* Mutation nachweisen.

Für die Indexpatientin 972 lag eine Indelation im *TBX5* Gen vor, die autosomal dominant durch den Vater, der ebenfalls am HOS leidet, vererbt wurde.

Für die Indexpatientin 780 wurde eine *TBX5* Mutation identifiziert, die nach genetischer Analyse der Eltern zeigte, dass die phänotypisch gesunde Mutter Mosaikträgerin der Mutation ist. Die in der Indexpatientin identifizierte Mutation im *TBX5* Gen c.668 C>T führt zu einem Aminosäureaustausch an Position 223 von Threonin nach Methionin (Thr223Met) und ist bereits in zwei unabhängigen Familien in der Literatur beschrieben (Brassington *et al.*, 2003). Ein HOS Indexpatientin dieser Arbeit zeigte im Echokardiogramm keine Auffälligkeiten und hatte eine Supination des Unterarmes, einen triphalangealen Daumen

(links) und einen hypoplastischen Daumen (rechts). Seine Kinder zeigten kardiale Defekte (ASD, multipler muskulärer VSD) und hatten Fehlbildungen der oberen Extremitäten. Der zweite in dieser Publikation beschriebene HOS Indexpatient zeigte keine Auffälligkeiten im Echokardiogramm und keine Missbildungen an den Extremitäten. In der Arbeit von Brassington und Kollegen ist nicht beschrieben, dass Röntgenbilder der oberen Extremitäten erstellt wurden, sodass nicht auszuschließen ist, dass milde Missbildungen der präaxialen Strahlen vorhanden sind, sodass eine eindeutige Diagnose des HOS nach McDermott (McDermott *et al.*, 2005) gegeben ist (Brassington *et al.*, 2003). Unter den fünf Nachkommen, mit verschiedenen Müttern, zeigten zwei einen kardialen Defekt und Missbildungen der Extremitäten, ein weiterer Nachkomme hatte einen VSD, sodass die Kriterien nach McDermott für die kardialen Kriterien des HOS gegeben sind (McDermott *et al.*, 2005). Die in dieser Arbeit untersuchte Indexpatientin 780 hatte einen perimembranösen VSD, eine Pulmonalstenose und zeigte eine starke Streckung des Gelenks (Hyperextension), bei der sich die Daumen beidseitig in fraglicher Fehlstellung befinden. Für die, in der Arbeit von Brassington und Kollegen beschriebenen Familien (Brassington *et al.*, 2003) und die in dieser Arbeit untersuchte Indexpatientin 780 liegt die gleiche *missense* Mutation im *TBX5* Gen (Thr223Met) vor. Dennoch zeigte sich der Phänotyp der HOS Indexpatienten variabel und war darüber hinaus intrafamiliär in der Publikation von Brassington unterschiedlich (Brassington *et al.*, 2003). In der Arbeit von Bruneau und Kollegen wurde gezeigt, dass heterozygote Mäuse (*Tbx5<sup>del/+</sup>*) mit unterschiedlichem genetischem Background Variationen im Phänotyp zeigten (Bruneau *et al.*, 2001). Dieses Ergebnis untermauert und stützt die Beobachtung, dass trotz gleicher Mutation im *TBX5* Gen bei Patienten mit HOS, der Phänotyp variieren kann.

Der dritte HOS Indexpatient (1460) dieser Arbeit mit Mutation im *TBX5* Gen c.920C>A (Pro85Thr), trägt eine *de novo* Mutation und zeigt einen deutlichen kardialen Phänotyp, wie auch massive Missbildungen der Extremitäten. Ausgehend von der Schwere des Phänotyps und der aus den Tiermodellen bekannten „Dosis-abhängigen“ Wirkung von *Tbx5*, kann von einem deutlich reduzierten physiologischen Level des mutierten *TBX5* Proteins (Pro85Thr) ausgegangen werden.

Bei zwei der HOS Indexpatientinnen (804, 950) konnte keine Mutation im *TBX5* Gen nachgewiesen werden. Die Indexpatientin 804 trug eine *de novo* Mutation im *THEMIS2* Gen. Mutationen in Patienten, deren Eltern phänotypisch gesund sind, sind zumindest teilweise als potentiell ursächlich für das Krankheitsbild mit in Betracht zu ziehen. In der Literatur wurde gezeigt, dass *Themis2* in B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert ist (Hartwegger *et al.*, 2014). Lesourne und Kollegen konnten *Themis1* und *Themis2* mit der T-Zell Entwicklung und der T-Zell rezeptorvermittelten Immunantwort in Verbindung bringen und eine redundante Funktion der beiden Proteine zeigen (Lesourne *et al.*, 2012). Im Jahre 2017 zeigte die Arbeitsgruppe von Cheng die Beteiligung von *Themis2* an der positiven und negativen Selektion von Lymphozyten und seine Rolle bei der Stimulierung der B-Zellen (Cheng *et al.*, 2017). Alle publizierten Arbeiten zu *Themis2* zeigen die Relevanz des Gens in der Immunantwort. Um die Rolle für *THEMIS2* in der kardialen Differenzierung zu prüfen, wurde die Expression von *THEMIS2* in der gerichteten kardialen Differenzierung von iPS

Zellen einer Kontrolle gemessen. Die Expression von *THEMIS2* konnte für alle Zeitpunkte der gerichteten Differenzierung detektiert werden, dennoch zeigte sich keine Induktion der *THEMIS2* Genexpression. Auch RNAseq Analysen von iPS Zellen dreier Kontrollen in der gerichteten Differenzierung (D0, D6, D8, D10, D14), die im Rahmen eines anderen Projektes innerhalb der Experimentellen Chirurgie des DHMs durchgeführt wurden, zeigten keine Regulation von *THEMIS2* im Verlauf der gerichteten Differenzierung (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der, für die kardiale Differenzierung nicht detektierten Induktion von *THEMIS2* wurde die, in der Indexpatientin 804 gefundene *de novo* Mutation im Folgenden als nicht kardial relevant eingestuft und deshalb nicht weiter untersucht.

Für die HOS Indexpatientin 950 wurde keine *TBX5* Mutation und auch keine *de novo* Mutation gefunden. Diese Patientin gehört somit zu den HOS Indexpatienten, bei denen eine Mutation im *TBX5* Gen nicht ursächlich für die Ausbildung des HOS ist. Auch *de novo* Mutationen, die als potentiell krankheitsverursachend untersucht werden können, wurden in der Indexpatientin 950 nicht identifiziert.

Weitere Mechanismen, die zu veränderten Expressionsmustern von Genen führen, sind Varianten in regulatorischen Elementen wie Promotoren und *Enhancer*. Da bekannt ist, dass *Tbx5* ein dosis-abhängiger Regulator in der Kardiogenese ist (Mori *et al.*, 2006.), können Varianten in regulatorischen Elementen die Genexpression beeinflussen und somit verantwortlich für die Entstehung von AHF sein. In der Arbeit von Smemo und Kollegen wurde ein homozygoter SNP in einem *cis*-regulatorischen Element (*Enhancer*) eines Patienten mit VSD identifiziert, welcher die Regulation von *TBX5* steuert (Smemo *et al.*, 2012). In einer weiteren Arbeit wurden Varianten im *TBX5* Promotor von zwei Patienten mit VSD gefunden, die in funktionellen Analysen ein verändertes Expressionslevel von *TBX5* zeigten (Shan *et al.*, 2012). Für zwei der fünf HOS Indexpatienten dieser Arbeit konnten keine Mutationen im *TBX5* Gen und auch keine *de novo* Mutationen identifiziert werden, die als ursächlich für die Ausbildung des HOS in Frage kommen können. Aus diesem Grund wurden die Region des *Enhancers* und die Promotorregion der HOS Indexpatientinnen 804 und 950 für die beschriebenen Varianten amplifiziert und sequenziert. Die Identifikation der beschriebenen Varianten in HOS Patienten ohne Mutation im *TBX5* Gen könnten als ursächlich für eine Veränderung der Dosis im *TBX5* Proteins in Betracht gezogen werden.

Neben einer Mutation im *TBX5* Gen, können Varianten in regulatorischen Elementen, welche die *TBX5* Expression steuern die dosis-abhängige Regulation von *TBX5* in der Kardiogenese erweiternd beeinflussen. Solche zusätzlich auftretenden Varianten könnten unterschiedliche Phänotypen des HOS bei identischer Mutation erklären. Aus diesem Grund wurden auch die drei Indexpatienten mit Mutation im *TBX5* Gen auf die beschriebenen Varianten untersucht. Keine der beschriebenen Varianten, die ein verändertes Expressionslevel von *TBX5* zur Folge hat, wurde in den zwei HOS Indexpatienten ohne Mutation im *TBX5* Gen identifiziert. Auch die drei Indexpatienten, bei denen eine Mutation im *TBX5* Gen identifiziert wurde, tragen keine der beschriebenen Varianten in den regulatorischen Elementen. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Varianten in regulatorischen Elementen, die bislang nicht beschrieben und in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, zu einer veränderten Regulation der *TBX5* Expression in den HOS Indexpatienten führen.

Die in dem HOS Indexpatienten 1460 identifizierte Mutation im *TBX5* Gen (c.920C>A) war zum Zeitpunkt der Identifikation nicht in der Literatur beschrieben. Da der Phänotyp des Indexpatienten massiv ausgeprägt war, wurde die *de novo* Mutation genau charakterisiert. Die Mutation des Indexpatienten führt zu einem Aminosäureaustausch von Prolin nach Threonin (Pro85Thr). Eine dreidimensionale Strukturanalyse der *TBX5*-DNA Interaktion zeigte eine *cis*-Peptidkonformation für die Aminosäure Phenylalanin an Position 84 und Prolin an Position 85 (Dreßen *et al.*, 2016). Diese *cis*-Peptidkonformation ist nahezu ausschließlich für die Aminosäure Prolin in Kombination mit jeder beliebigen Aminosäure beschrieben (Craveur *et al.*, 2013). Der dabei gebildete Torsionswinkel zwischen den Aminosäuren ist mit 0° vorhergesagt. Die *de novo* Mutation des HOS Indexpatienten 1460 führt zum Einbau von Threonin an Aminosäureposition 85 des *TBX5* Proteins und der Torsionswinkel von 0° kann mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht aufrechterhalten werden. Durch den Einbau von Threonin an Stelle von Prolin an Position 85 ist eine *trans*-Peptidkonformation zwischen den Aminosäuren mit einem Winkel von 180° vorhergesagt (Dreßen *et al.*, 2016). Konformationsänderungen dieser Art führen zu einer lokalen bzw. überregional veränderten Proteinfaltung und resultieren mit hoher Wahrscheinlichkeit in einer Beeinflussung der Proteinfunktion (Javitt *et al.*, 2019). Konformationsänderungen von Transkriptionsfaktoren können zu einem veränderten Aktivitätsprofil des TFs führen, wobei der zugrunde liegende Mechanismus unterschiedlicher Natur sein kann (verminderte/erhöhte Aktivität, Verlust der Interaktion mit anderen TF, Dislokation).

Ein Vergleich der Aminosäurepositionen über die T-Box Genfamilie und über die Speziesgrenzen hinweg, zeigte die Position 85 der *de novo* Mutation im *TBX5* Protein als hochkonserviert und Teil der DNA-bindenden TBOX Domäne (Dreßen *et al.*, 2016), die mit den Aminosäurepositionen 52 bis 243 angegeben ist (Hiroi *et al.*, 2001). Die *de novo* Mutation Pro85Thr liegt am N-terminalen Ende der TBOX Domäne und ist für die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA verantwortlich. Eine veränderte Bindungsdomäne kann eine verminderte oder erhöhte Aktivität des TFs zur Folge haben. Zur funktionellen Analyse der Pro85Thr Mutation wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivität des mutierten *TBX5* Proteins (*TBX5*<sup>mut</sup>) auf den *NPPA* Promotor untersucht. *NPPA* kodiert das atrial natriuretische Peptid (ANP), das ein bekanntes direktes Zielgen von *TBX5* ist (Bruneau *et al.*, 2001; Hiroi *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Luziferaseaktivität in Gegenwart von mutiertem *TBX5* (Pro85Thr) im Vergleich zu *TBX5*<sup>wt</sup> um mehr als 95% reduziert ist, sodass die Mutation c.920C>A im *TBX5* Gen als *loss of function* Mutation anzusehen ist. Die verminderte Aktivierung des *NPPA* Promotors durch mutiertes *TBX5* zeigte sich weiterhin in der verminderten Genexpression von *NPPA* in den, mit *TBX5*<sup>mut</sup> transfizierten HEK 293 Zellen. In der Literatur konnte für verschiedene *TBX5* Mutationen, die ebenfalls in der N-terminalen Region der TBOX Domäne liegen und zu einem Aminosäureaustausch führen (Gly80Arg (Ghosh *et al.*, 2001; Hiroi *et al.*, 2001), Met74Ile und Leu94Arg (Boogerd *et al.*, 2010) und Pro132Ser (Guo *et al.*, 2016)), eine verminderte Aktivität bei der Regulation der Expression von Zielgenen gezeigt werden. In der Arbeit von Stirnemann und Kollegen wurden sechs Punktmutationen im *TBX5* Gen, die zu einem Aminosäureaustausch führen (Met74Val, Gly80Arg, Try121Gly, Gly169Arg, Thr223Met,

Arg237Try) auf thermische Stabilität und ihre Affinität des Proteins für spezifische und unspezifische DNA Sequenzen untersucht (Stirnemann *et al.*, 2010). Für zwei Mutationen (Gly80Arg, Try121Gly) konnte eine Reduktion der thermischen Stabilität nachgewiesen werden. Bei der im Indexpatienten 1460 vorliegenden c.920C>A Mutation (Pro85Thr) wurde ebenfalls eine geringere Stabilität im Vergleich zum Wildtyp TBX5 Protein vorausgesagt (Dreßen *et al.*, 2016). Zur Untersuchung der Affinität für spezifische und unspezifische Bindung wurden in der Arbeit von Stirnemann und Kollegen die DNA Zielsequenz des *ANF* Promotors (spezifische Bindung), bzw. die Sequenz des *ANF* Promotors ohne Zielsequenz (unspezifische Bindung) verwendet. Alle sechs untersuchten Mutationen resultierten in einer niedrigeren Bindungsaffinität des Proteins zur *ANF* Zielsequenz (*NPPA*), deren Ausmaß variierte. Die Affinität für unspezifische Zielsequenzen war für alle mutierten Proteine beeinflusst, sodass davon ausgegangen wurde, dass sowohl spezifische wie auch unspezifische Bindung in der TBX Domäne des mutierten TBX5 Protein zur veränderten Genregulation beitragen können.

Ein weiterer Mechanismus, der zu einem veränderten Aktivitätsprofil von TF führen kann, ist der Verlust der Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren (Hiroi *et al.*, 2001). In der Arbeit von Hiroi und Kollegen konnte in einem *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) für eine *TBX5* Mutation, die zu einem Aminosäureaustausch von Glycin nach Arginin an Position 80 (Gly80Arg) führt, gezeigt werden, dass die synergistische Aktivierung mit NKX2.5 nicht mehr vorhanden ist und die N-terminale Region der TBX Domäne für die Interaktion von TBX5 mit NKX2.5 verantwortlich ist (Hiroi *et al.*, 2001). Basierend auf der Literatur lässt die N-terminale Lage der *TBX5* Mutation des Indexpatienten 1460 (Pro85Thr) in der DNA-Bindedomäne eine Beeinflussung der Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie der synergistischen Aktivierung mit NKX2.5, vermuten.

Nukleäre Exklusion von Transkriptionsfaktoren ist ein weiterer Mechanismus, der bei der Inhibierung der Transkription in der Literatur beschrieben ist (Zhang *et al.*, 2014). In der Arbeit von Zaragoza und Kollegen konnte gezeigt werden, dass eine Deletion der Aminosäuren 325-327 (KRK) zu einer Dislokation des TBX5 Proteins führt (Zaragoza *et al.*, 2004). Die Deletion der drei Aminosäuren, lokalisierte den Transkriptionsfaktor exklusiv im Zytoplasma und legte den Schluss einer fehlenden Kerngängigkeit des Proteins nahe. In der Arbeitsgruppe von Fan und Kollegen ist eine *In-Frame* Deletion beschrieben, die eine verminderte Kerngängigkeit des mutierten TBX5 Proteins zeigt (Fan *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden immunzytochemische Färbungen des Flag-markierten mutierten TBX5 Proteins (Pro85Thr), welches in HEK 293 Zellen transfiziert wurde, zur Bestimmung der Lokalisation des Transkriptionsfaktors durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das TBX5<sup>mut</sup> Protein im Zellkern lokalisiert ist, sodass eine nukleäre Exklusion als Mechanismus der verminderten TBX5 Aktivität ausgeschlossen werden konnte (Dreßen *et al.*, 2016). Aufgrund der deutlichen Distanz der *TBX5* Mutation (Pro85Thr) zur den Aminosäuren Lys-Arg-Lys (KRK) an Position 325-327 (Zaragoza *et al.*, 2004) und des immunzytologischen Nachweises von TBX5 im Nukleus, ist eine reguläre Kerngängigkeit für das mutierte TBX5 Protein (Pro85Thr) nachgewiesen.

Humane iPS Zellen sind die Grundlage zur Etablierung von humanen Modellsystemen mit denen zuverlässig regulatorische Prozesse, unter Verwendung von spezifischen Differenzierungsprotokollen während der frühen Embryonalentwicklung *in vitro* untersucht werden können. Ein Jahr nach der Etablierung der murinen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS Zellen) (Takahashi & Yamanka, 2006), war es im Jahr 2007 möglich humane iPS Zellen (Takahashi *et al.*, 2007) durch Reprogrammierung aus somatischen Zellen herzustellen. Die Entdeckung der iPS Zellen war ein bahnbrechender Erfolg in der Medizin und ermöglichte die Arbeit mit Stammzellen ohne die ethische Problematik, welche die Arbeit mit ES Zellen mit sich bringt. Die Problematik, gewonnene Erkenntnisse aus einem Tiermodell in ein humanes Modell umzusetzen, wurde durch die Verwendung von humanen iPS Zellen ebenfalls gelöst.

Der Einsatz von nicht-integrierenden Sendai-Viren (Fusaki *et al.*, 2009.; Li *et al.*, 2000; Kuroya *et al.*, 1953) für die Überexpression von *KLF4*, *OCT4*, *SOX2* und *c-MYC* zur Reprogrammierung schließt eine zufällige Integration der Gene ins Genom weitestgehend aus. Somit wird bei der Reprogrammierung von somatischen Zellen zu iPS Zellen mit nicht-integrativen Sendai Viren die Problematik umgangen, essentielle Gene in ihrer Funktion zu beeinträchtigen, wie dies bei der Verwendung von Retro- oder Lentiviren der Fall sein kann.

Für die Etablierung von zellulären Krankheitsmodellen ist die Möglichkeit gegeben, iPS Zellen von Patienten mit gesichertem *in vivo* Phänotyp zu nutzen, sodass der genetische Hintergrund des Patienten komplett erhalten bleibt. Weiterhin erlauben patientenspezifische iPS Modelle (*in vitro* Krankheitsmodelle) die vergleichende Untersuchung von regulatorischen Prozessen in „betroffenen“ („kranken“) Zellen im Vergleich zu „gesunden“ Zellen.

Im Bereich der kardiovaskulären Forschung wurden die ersten humanen patientenspezifischen iPS Modelle für monogenetische Erkrankungen, wie das LEOPARD Syndrom (Carvajal-Vergara *et al.*, 2010), das Long-QT Syndrom (Itzhaki *et al.*, 2011; Moretti *et al.*, 2010b) und die supravalvuläre Aortenstenose (engl. *supravalvular aortic stenosis*, SVAS) (Ge *et al.*, 2012) etabliert.

Das LEOPARD Syndrom (Akronym engl. *Lentiginos, Electrocardiographic abnormalities, Ocular hypertelorism, Pulmonary valve stenosis, Abnormal genitalia, Retardation of growth and Deafness*) kennzeichnet sich durch multiple angeborene Anomalien, die Haut, Herz und Gesicht betreffen. In 85% der Fälle ist das LEOPARD Syndrom auf eine heterozygote *Missense Mutation* im Gen *Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 11 (PTPN11)*, zurückzuführen. *PTPN11* kodiert für ein Protein, das in den meisten Geweben exprimiert wird und Bestandteil des MAP-Kinase Signalwegs ist (engl. *mitogen-activated protein*, MAP), welcher eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Zellwachstum reguliert. Weitere Mutationen in Genen, die im RAS/MAP-Kinase Signalweg und der Embryonalentwicklung relevant sind, sind mit dem Auftreten des LEOPARD Syndroms beschrieben (Ekvall *et al.*, 2015). 60% der Patienten mit LEOPARD Syndrom entwickeln eine hypertrophe Kardiomyopathie. Als Folgen kardialer Hypertrophie kommt es zu einer verstärkten Induktion von „unmittelbaren frühen Genen“ (engl. *immediate early genes*, IEG), wie *c-jun*, *c-fos* und *c-myc* (Buitrago *et al.*, 2005; Aoki *et al.*, 2000), einer

Zunahme der Zellgröße, verstärkter Proteinsynthese und einer Zunahme des Sarkomers (Buitrago *et al.*, 2005; Aoki *et al.*, 2000). In der Arbeitsgruppe von Carvaja-Vergara und Kollegen wurden iPS Zellen von Patienten mit LEOPARD Syndrom, die eine Mutation im *PTPN11* Gen tragen, welche zu einem Aminosäureaustausch (Thr468Met) führt, zur Generierung des patienten-spezifischen iPS Modells verwendet (Carvajal-Vergara *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Kardiomyozyten differenziert aus patienten-spezifischen iPS Zellen eine im Mittel größere Oberfläche im Vergleich zu Kardiomyozyten von Gesunden hatten und die Sarkomere der betroffenen Kardiomyozyten stärker ausgeprägt waren. In dieser Arbeit konnten Mechanismen in Signalwegen (Cacineurin-NFAT Signalweg, RAS/MAP-Kinase Signalweg), die als Regulator der kardialen Hypertrophie bekannt sind (Kontaridis *et al.*, 2006; Buitrago *et al.*, 2005), in den Kardiomyozyten der patienten-spezifischen iPS Zellen identifiziert werden, die den Phänotyp der Patienten *in vivo* bestätigten.

In der Arbeitsgruppe von Moretti und Kollegen wurde ein patienten-spezifisches iPS Modell für das Long-QT Syndrom 1 (LQTS1) entwickelt, um den Mechanismus, der zur Entwicklung des Phänotyps führt, zu untersuchen (Moretti *et al.*, 2010b). Das Long QT-Syndrom (LQTS) ist durch ein verlängertes QT-Intervall im Elektrokardiogramm (EKG) und eine veränderte elektrische Repolarisierung der Kammern definiert. Herzrhythmusstörungen wie ventrikuläre Tachykardien, eine Prädisposition für kardiale Ereignisse, Synkopen und plötzlicher Herzstillstand sind beschrieben (Goldenberg & Moss, 2008; Sanguinetti & Tristani-Firouzi, 2006; Marbán, 2002). Das Syndrom geht auf funktionelle Störungen in verschiedenen Ionenkanälen der Zellmembran zurück und kann in familiären und sporadischen Fällen auf Mutationen in verschiedenen Genen, die für Natrium- bzw. Kaliumionenkanäle kodieren und für die De- und Repolarisation relevant sind, zurückgeführt werden. Nach Genotypisierung der Patienten kann das Long-QT Syndrom in 45% der Fälle auf Mutationen im *KCNQ1* Gen zurückgeführt werden (Moss *et al.*, 2007; Marx *et al.*, 2002; Li *et al.*, 1996), welches für die  $\alpha$ -Untereinheit des Kaliumkanals  $I_{Ks}$ , der für die Repolarisation verantwortlich ist, kodiert.

Die in der Arbeitsgruppe von Moretti verwendeten iPS Zellen wurden aus zwei verwandten Patienten mit LQTS1, die beide eine *Missense* Mutation im *KCNQ1* tragen (R190Q), generiert. Patienten-spezifische iPS Zellen und iPS Zellen von gesunden Probanden wurden kardial differenziert und die Kardiomyozyten elektrophysiologisch untersucht. Atriale und ventrikuläre Aktionspotentiale der LQTS1 Kardiomyozyten dauerten länger an und zeigten eine verlangsamte Repolarisationsgeschwindigkeit im Vergleich zu Kardiomyozyten der Kontrollen. Stimulierungen mit höherer Frequenz zeigten keine Adaptation der Aktionspotentiale bei Kardiomyozyten der LQTS1 Patienten. Eine funktionelle Auswirkung der *KCNQ1* Mutation wurde in der Lokalisation des mutierten Proteins gefunden. Mutiertes *KCNQ1* der LQTS1 Patienten zeigte eine vermehrte intrazelluläre Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum, wohingegen *KCNQ1* der Kontrollen, wie zu erwarten an der Zelloberfläche lokalisiert war. Das von Moretti und Kollegen generierte patienten-spezifische iPS Modell ist in der Lage alle elektrophysiologischen Merkmale des LQTS1 Syndroms in den Kardiomyozyten der Patienten vollständig *in vitro* zu reproduzieren. Für das Long-QT Syndrom existieren inzwischen diverse iPS Modelle, welche die elektrophysiologischen

Veränderungen patienten-spezifisch klären konnten (Wuriyanghai *et al.*, 2018; Yamamoto *et al.*, 2017; Itzhaki *et al.*, 2011; Malan *et al.*, 2011).

Ge und Kollegen generierten ein patienten-spezifisches iPS Modell zur Untersuchung der supraaortalen Aortenstenose (engl. *supraaortic aortic stenosis*, SVAS) (Ge *et al.*, 2012). Die SVAS ist durch eine Einengung der Aorta nahe am Ansatz, direkt oberhalb der Aortenklappe, gekennzeichnet. Durch die Verengung der *Aorta ascendens*, die durch eine Verdickung der Aortenwand entsteht, wird der Blutfluss in der Aorta beeinträchtigt. Der Verlust der Kontraktion von glatten Muskelzellen in den Bündeln der Aktinfilamente ist als ursächlich für die Verengung der Aorta und der daraus resultierenden Stenose bekannt.

Die genetische Ursache für die SVAS ist in den meisten Fällen eine heterozygote *loss of function* Mutation im Gen *Elastin* (*ELN*, 7q11.23) die autosomal dominant vererbt wird und eine atypische Proliferation der glatten Muskelzellen (engl. *smooth muscle cells*, SMCs) zur Folge hat. Patienten mit Williams-Beuren Syndrom (WBS) haben eine Mikrodeletion auf Chromosom 7q11.23, die ebenfalls den *ELN* Locus betrifft. Der komplexe Phänotyp des Williams-Beuren Syndroms beinhaltet unter anderem die pathophysiologischen Charakteristika der kardiovaskulären Läsionen der SVAS Patienten und wird als *ELN* Arteriopathie bezeichnet (Pober *et al.*, 2008; Morris & Mervis, 2000).

In dem von Ge und Kollegen etablierten iPS Modell für die SVAS wurden iPS Zellen eines Patienten generiert, der eine Insertion (GTAG) im Exon 9 des *ELN* Gens trägt, die in einer *Frameshift* Mutation resultiert und zur vorzeitigen Terminierung der Proteinsynthese führt.

Die patienten-spezifischen iPS Zellen wurden zu SMC differenziert. Es wurden keine Unterschiede in der Differenzierungseffizienz zwischen patienten-spezifischen iPS Zellen und iPS Zellen der gesunden Kontrolle gesehen. Immunzytochemische Färbungen für  $\alpha$ -Aktin zeigten für die SMC der SVAS Patienten weniger Aktinfilament Bündel, sodass ein Defekt in der Ausbildung des Kontraktionsapparats postuliert wurde. Molekularbiologische Untersuchungen bestätigten geringere Mengen an *ELN*, die mit der Ausbildung des Kontraktionsapparats korrelierten. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von exogenem *ELN* (Tropoelastin) die Organisation der Aktinfilamente in den SMC der SVAS deutlich verbesserte. SMC der SVAS hatten eine, im Vergleich zu SMC der Kontrollen, höhere Proliferationsrate und zeigten eine verstärkte Migration, ausgelöst durch Wachstumsfaktoren. Zur Verifizierung der durch die Mutation im *ELN* verursachten Veränderungen in den SMC des SVAS Patienten, wurden SMC eines Patienten mit WBS, der haploinsuffizient für *ELN* war, untersucht. Es konnte eine erhöhte Proliferationsrate der SMC, eine verminderte Organisation der Aktinfilament Bündel und eine niedrigere Expression des *ELN* Proteins im Vergleich zu SMC gesunder Kontrollen gezeigt werden. Die Zugabe von Tropoelastin führte zu einer Verbesserung der Aktinfilament Organisation.

In dem von Ge und Kollegen generierten patienten-spezifischen iPS Modell der SVAS konnten die pathologischen Merkmale der Erkrankung rekapituliert werden. Für beide *ELN* defizienten SMC (SVAS, WBS) wurde ein identischer *in vitro* Phänotyp gezeigt, der die Defizienz des *ELN* als ursächlich für den kardiovaskulären Phänotyp der SVAS bestätigte und eine Abschwächung des *in vitro* Phänotyps durch Tropoelastin als „rescue“ Strategie zeigte. Da speziesspezifische Unterschiede in der Funktion von SMC bekannt sind (Ruiz-Torres *et al.*,



1999), die Verfügbarkeit dieser Zellen limitiert ist und sich das Profil isolierter SMC in Kultur verändert, erlaubte das generierte humane patienten-spezifische iPS Modell gezielte Untersuchungen der Mechanismen, die zur Ausbildung einer SVAS führen.

Die bereits diskutierten humanen iPS Modelle für monogenetisch verursachte AHF zeigen die Eignung dieser zellulären Systeme die Mechanismen, die zur Ausbildung des AHFs führen und deren pathophysiologische Eigenschaften zu untersuchen. Die patienten-spezifischen iPS Modelle sind in der Lage, den Phänotyp des Patienten *in vitro* zu rekapitulieren und grundlegende Mechanismen, die an der Ausbildung beteiligt sind, zu identifizieren.

Im humanen Bereich existieren bislang keine patienten-spezifischen iPS Modelle für das HOS, die es ermöglichen regulatorische Prozesse in der humanen kardialen Entwicklung zu untersuchen und Mechanismen zu identifizieren, die die Entstehung des HOS erklären könnten. Humane iPS Modelle sind in der Lage spezifische temporäre Expressionsmuster von *TBX5* in der kardialen Differenzierung zu identifizieren. Die Untersuchung der *TBX5* Expression auf Transkriptions- und Translationsebene ist für das Verständnis des TFs in der humanen Kardiogenese und seinen Einfluss auf die Ausbildung des HOS von großer Relevanz. Da das HOS nur in ungefähr 75% der Fälle auf eine Mutation im *TBX5* Gen zurückgeführt werden kann (McDermott *et al.*, 2005; Basson *et al.*, 1999; Basson *et al.*, 1997) und der klinische Phänotyp variabel ist, wurden für die Etablierung des patienten-spezifischen iPS Modells in dieser Arbeit zwei Patienten ausgewählt, die sowohl das Spektrum des HOS Phänotyps widerspiegeln, wie auch repräsentativ für die HOS Patienten mit bzw. ohne vorliegende *TBX5* Mutation waren. Der ausgewählte Indexpatient 1460 trägt eine *de novo* *TBX5* Mutation, die nicht beschrieben war und im Rahmen dieser Arbeit eingehend untersucht wurde (Dreßen *et al.*, 2016). Der klinische Phänotyp des Indexpatienten 1460 war massiv ausgeprägt. Die zweite, für diese Arbeit ausgewählte HOS Indexpatientin 804 trägt keine Mutation im *TBX5* Gen und zeigt einen milden Phänotyp. Als Kontrollen wurden iPS Zellen von zwei unabhängigen gesunden Probanden verwendet, die der Abteilung der Experimentellen Chirurgie des DHMs zur Verfügung stehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zudem iPS Zellen der gesunden Eltern der HOS Indexpatientin 804 generiert, die als abhängige Kontrollen betrachtet wurden. Aufgrund ihrer genetischen Verwandtschaft stellen diese Zellen die optimalen Kontrollen bei der Einschätzung einer möglichen molekularen oder physiologischen Dysregulation dar. Die Generierung von iPS Zellen der gesunden Eltern des Indexpatienten 1460 war aufgrund der räumlichen Entfernung des Wohnsitzes der Familie nicht möglich.

In der Literatur existiert ein humanes iPS Modell für das HOS (Karakikes *et al.*, 2017), das jedoch keinen patienten-spezifischen Hintergrund hat. In dieser Arbeit wurde unter Verwendung von TALEN ein iPS Klon generiert, der homozygot Deletionen auf beiden Allelen des *TBX5* Gens trägt, die in einer *Frameshift* Mutation resultieren und eine vorzeitige Terminierung der Proteinsynthese hervorrufen. In dieser Arbeit konnten elektrophysiologische Veränderungen in den Kardiomyozyten mit *TBX5* Mutation gezeigt werden. Da das von Karakikes und Kollegen generierte iPS Modell kein patienten-spezifisches Modell für das HOS darstellt, ist eine Korrelation der gewonnenen Daten zu einem definierten *in vivo* Phänotyp nicht möglich. Weiterhin ist anzumerken, dass die

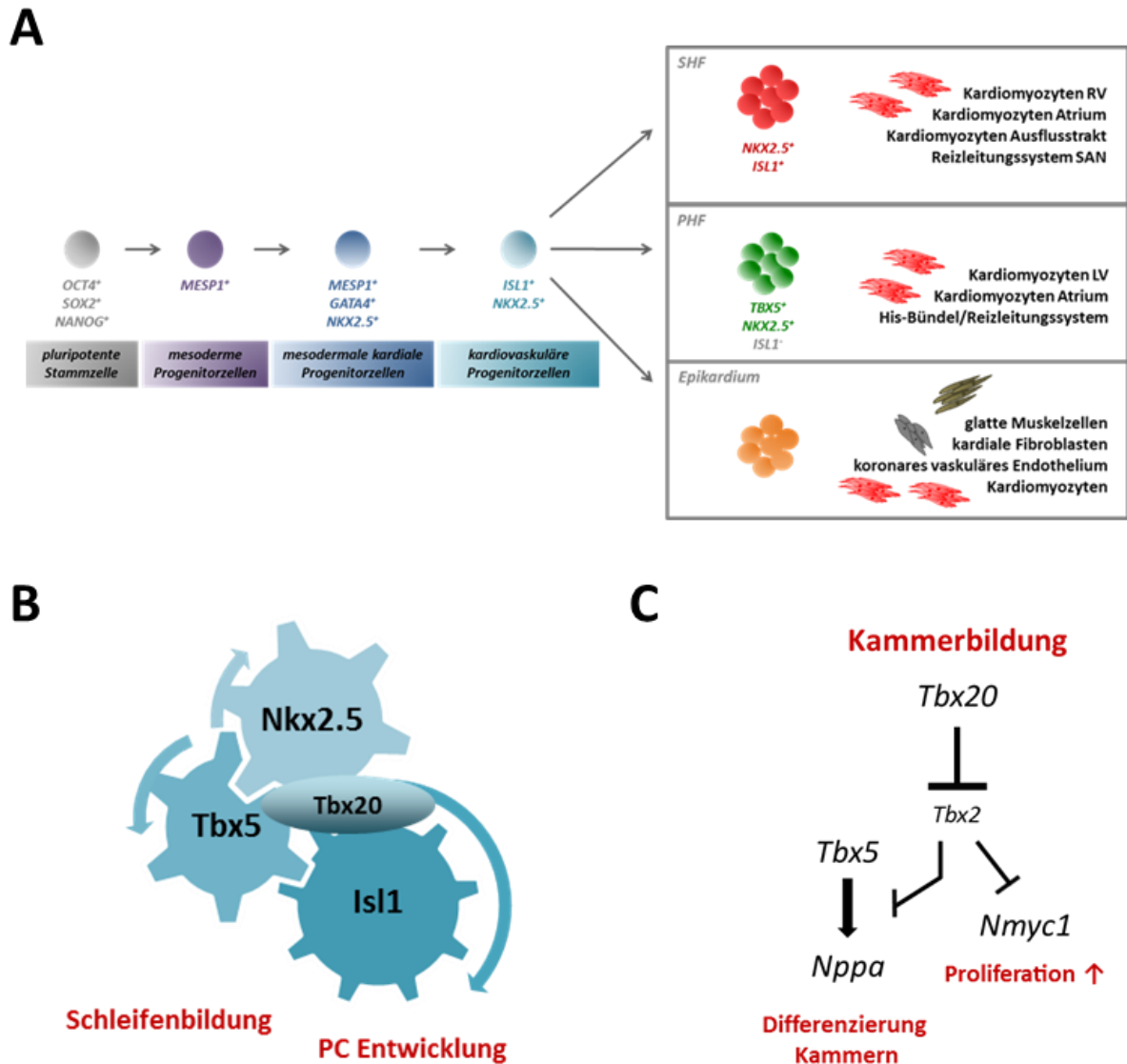
Genom-Editierung der iPS Zellen zu einer homozygoten Deletion im *TBX5* Gen führte. Bislang ist kein HOS Patient in der Literatur beschrieben, der eine homozygote Deletion im *TBX5* Gen trägt. Bruneau und Kollegen generierten ein Mausmodell, das eine Deletion eines (*Tbx5<sup>del/+</sup>*) oder beider Allele (*Tbx5<sup>del/del</sup>*) des *Tbx5* Gens trägt (Bruneau *et al.*, 2001). Dieses Mausmodell zeigte, dass homozygote Mäuse (*Tbx5<sup>del/del</sup>*) nicht lebensfähig waren und am Tag E10.5 der Embryonalentwicklung verstarben. Somit ist hervorzuheben, dass das einzige bislang in der Literatur beschriebene iPS Modell für das HOS ein zelluläres System widerspiegelt, das *in vivo* so allerdings nicht existiert und basierend auf bekannter Literatur nicht „lebensfähig“ ist.

Alle in dieser Arbeit generierten iPS Zellen (Indexpatienten 1460 und 804-K, Probanden 804-MU und 804-VA) wurden vollständig charakterisiert. Die iPS Zellen zeigten flaches, nicht differenzierendes koloniales Wachstum, welches den Kolonien humaner ES Zellen ähnelt und den morphologischen Kriterien von humanen iPS Zellen entspricht (Takahashi *et al.*, 2007). Alle iPS Zellen wurden mit nicht-integrativen Sendai Viren generiert, welche die Sequenzen der Reprogrammierungsfaktoren *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* und *c-MYC* in Expressionsvektoren tragen. Die Transkriptionsfaktoren *OCT3/4* und *SOX2* halten den pluripotenten Charakter einer Zelle aufrecht, indem sie synergistisch die Expression von Genen, die zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz essentiell sind, aktivieren und Gene, die zur Differenzierung in humanen und murinen ES Zellen beschrieben sind reprimieren (Loh *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Boyer *et al.*, 2005). Es ist bekannt, dass in ausdifferenzierten Zellen die Bindung von *OCT3/4* und *SOX2* an Zielgene durch inhibitorische Mechanismen, wie DNA-Methylierung und Histonmodifikation nicht mehr möglich ist. Verschiedene Arbeitsgruppen postulierten eine Modulation der Chromatinstruktur durch *c-MYC* und *KLF4* (Evans *et al.*, 2007; Yamanaka, 2007), welche die Bindung von *OCT3/4* und *SOX2* an ihre Zielgene ermöglicht. Für alle iPS Zellen konnte nach Ausschleusung des Sendai Virus die Reaktivierung der endogenen Pluripotenzmarker *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* und *c-MYC* gezeigt werden. *NANOG* und *REX1*, die nicht zur Reprogrammierung verwendet wurden und als ES Zellmarkergene beschrieben sind (International Stem Cell Initiative, Adewumi *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007) wurden ebenfalls für den Nachweis der Pluripotenz verwendet (Ge *et al.*, 2012; Moretti *et al.*, 2012; Carvajal-Vergara *et al.*, 2010). Beide Pluripotenzmarker konnten in allen in dieser Arbeit generierten iPS Zellen detektiert werden. Zur Überprüfung karyotypischer Anomalien in iPS Zellen wurde der *hPSC Genetic Analysis Kit* verwendet, der auf der Publikation von Baker und Kollegen basiert (Baker *et al.*, 2016) und Anomalien mittels quantitativer PCR detektiert. Die karyotypischen Anomalien, die am häufigsten für humane pluripotente Stammzellen beschrieben sind, sind Trisomien der Chromosomen 1, 12, 17 und 20 (International Stem Cell Initiative, Amps *et al.*, 2011; Taapken *et al.*, 2011). Baker und Kollegen verglichen die Sensitivität verschiedener Methoden (Chromosomen-Bandings, Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), qPCR) zur Detektion von genetischen Varianten in humanen pluripotenten Stammzellen (Baker *et al.*, 2016). Es konnte gezeigt werden, dass genetische Mosaik über qPCR detektiert werden können und die entwickelte Methode für die Detektion von Mosaiken mit geringem Anteil, im Vergleich der Methoden, die höchste Sensitivität hatte. Für die in dieser Arbeit generierten iPS Zellen konnten keine

karyotypischen Anomalien in den getesteten chromosomalen Regionen (1q, 8q, 10p, 12p, 17q, 18q, 20q, Xp) detektiert werden. Ein weiteres Merkmal von pluripotenten Stammzellen ist die Fähigkeit, sich in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren zu können (Takahashi *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression endodermaler, mesodermaler und ektodermaler Marker, die in verschiedenen Publikationen zum Nachweis der Keimblätter beschrieben sind (Lahm *et al.*, 2015a; Itzhaki *et al.*, 2011; Carvajal-Vergara *et al.*, 2010; Moretti *et al.*, 2010b; Takahashi *et al.*, 2007), in einem spontanen Differenzierungsprotokoll erfolgreich gezeigt werden. TRA1-81 ist als humanes ES-spezifisches Oberflächenantigen beschrieben (International Stem Cell Initiative, Adewumi *et al.*, 2007). Der Nachweis für TRA1-81, wie auch für SOX2 und NANOG konnte immunzytologisch, für alle in dieser Arbeit generierten iPS Zellen, erbracht werden. Die Expression von NANOG in den generierten iPS Zellen wurde zusätzlich unter Verwendung von *Smartflares* erbracht. *Smartflares* sind Nanopartikel, die es erlauben, die Genexpression in lebenden Zellen zu detektieren. Diese Technologie konnte zur Detektion von NANOG und GDF3 in murinen ES Zellen und murinen/humanen iPS Zellen bereits erfolgreich in der Experimentellen Chirurgie des Deutschen Herzzentrum Münchens angewendet werden (Lahm *et al.*, 2015a; Lahm *et al.*, 2015b).

Für alle in dieser Arbeit generierten iPS Zellen (Indexpatienten 1460 und 804-K, Probanden 804-MU und 804-VA) wurde damit eine vollständige Charakterisierung durchgeführt und die Pluripotenz der generierten iPS Zellen konnte in allen Fällen nachgewiesen werden.

In der Arbeit von Burridge und Kollegen ist die Entwicklung der Kardiomyozyten des primären Herzfeldes (PHF), des sekundären Herzfeldes (SHF) und des Epikardiums zusammengefasst (Burridge *et al.*, 2015b). Pluripotente Stammzellen exprimieren NANOG, SOX2 und OCT4. Durch die Aktivierung verschiedener Signalwege (WNT, BMP, FGF, NODAL) entwickeln sich Zellen des Mesoderms, die durch die Expression von MESP1 charakterisiert sind (Bondué & Blanpain, 2010; Kitajima *et al.*, 2000; Saga *et al.*, 1999). Während der weiterführenden Spezifikation entwickeln sich Zellen des kardialen Mesoderms, die MESP1 und NKX2.5 exprimieren. Im weiteren Verlauf der Kardiogenese differenzieren die Zellen des kardialen Mesoderms zu kardialen Progenitorzellen, welche ISL1 und NKX2.5 exprimieren und final die Kardiomyozyten des FHF, SHF und des Epikardiums bilden. Kardiomyozyten des FHF sind durch NKX2.5 und TBX5 charakterisiert, während Kardiomyozyten des SHF durch die Expression von ISL1 und NKX2.5 definiert sind. In Abbildung 42A ist die Charakterisierung der Progenitorzellen im Verlauf der kardialen Differenzierung in Anlehnung an die Publikation von Burridge und Kollegen schematisch dargestellt (Burridge *et al.*, 2015b).



**Abbildung 42: Schematische Darstellung kardial relevanter Marker und ihre Bedeutung in der Kardiogenese.** (A) Schematische Darstellung der Differenzierung von Kardiomyozyten und ihres spezifischen temporären Expressionsprofils. Adaptiert aus Burridge *et al.*, 2015b. (B) Schematische Darstellung der Rolle von TBX20 in der Kardiogenese. Adaptiert Brown *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2005; Stennard *et al.*, 2005a; Stennard *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2005; Takeuchi *et al.*, 2005; Stennard *et al.*, 2003. (C) Schematische Darstellung der Rolle von TBX20 und NPPA in der Ausbildung der Kammern. Adaptiert Stennard & Harvey, 2005. **PHF**: Primäres Herzfeld. **SHF**: Sekundäres Herzfeld. **RV**: rechter Ventrikel. **SAN**: Sinusknoten (engl. *sinoatrial node*). **LV**: linker Ventrikel. **PC**: Progenitorzellen (engl. *progenitor cell*).

Die Arbeitsgruppe von Moretti und Kollegen konnte die Induktion der kardialen Transkriptionsfaktoren *Nkx2.5*, *Isl1*, *Tbx20* und *Tbx5* in Progenitorzellen des kardialen Mesoderms zeigen (Moretti *et al.*, 2010a). Die Bedeutung dieser kardialen TF wird durch die Tatsache untermauert, dass Mutationen in diesen Genen AHF verursachen können. Mutationen im *NKX2.5* sind in Verbindung mit ASD, VSD und AV Block beschrieben (Abou *et al.*, 2015; Granados-Riveron *et al.*, 2012; McCulley & Black, 2012; Bartlett *et al.*, 2010; Bruneau, 2008; Targoff *et al.*, 2008; Akazawa & Komuro, 2005; Sarkozy *et al.*, 2005; Kasahara & Benson, 2004; Harvey *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 1999; Schott *et al.*, 1998; Lyons *et al.*, 1995). Auch die Transkriptionsfaktoren *TBX5* und *GATA4* sind mit den beschriebenen

kardialen Phänotypen ASD und VSD assoziiert (Granados-Riveron *et al.*, 2012; Greulich *et al.*, 2011; Albalat *et al.*, 2010; Reamon-Buettner *et al.*, 2007; Peterkin *et al.*, 2005; Garg *et al.*, 2003; Bruneau *et al.*, 2001; Crispino & Lodish, 2001; Basson *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997b; Kuo *et al.*, 1997). Verschiedene Publikationen belegen die physikalische Interaktion von Nkx2.5 und Tbx5 und suggerieren eine Koaktivierung von Zielgenen für diese Transkriptionsfaktoren (Bruneau *et al.*, 2001; Hiroi *et al.*, 2001). Gata4 ist als weiterer Interaktionspartner von Nkx2.5 und Tbx5 beschrieben (Garg *et al.*, 2003; Durocher *et al.*, 1997). Ein humanes patienten-spezifisches iPS Modell basierend auf einer Mutation im *GATA4* Gen zeigte eine Koaktivierung kardialer *Enhancer* durch GATA4 und TBX5 (Ang *et al.*, 2016). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die patienten-spezifische Mutation im *GATA4* Gen die Interaktion des TFs mit TBX5 beeinflusst. Eine Dysregulation von Genen, die die Entstehung von Septumdefekten erklären können wurde beschrieben (Ang *et al.*, 2016).

Tbx20 und seine Bedeutung in der Kardiogenese wurden in diversen Publikationen untersucht. Tbx20 besitzt Domänen für Repression und Aktivierung der Genexpression und interagiert physikalisch mit den TF Tbx5, Nkx2.5, Gata4/5 und Isl1 (Brown *et al.*, 2005; Takeuchi *et al.*, 2005; Stennard *et al.*, 2003). In verschiedenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Tbx20 in einem kleinen Herzgefäß ohne Schleifenbildung und einer Beeinträchtigung der Progenitorzellen resultiert (Cai *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2005; Stennard *et al.*, 2005; Takeuchi *et al.*, 2005). Die Expression der TF *Nkx2.5* und *Gata4* war verringert, die Differenzierung der Kammern fehlte und die Expression von *Nppa*, als lokaler, kammerspezifischer Marker in der Kardiogenese war nicht nachweisbar (Cai *et al.*, 2005; Stennard *et al.*, 2003; Bruneau *et al.*, 2001). Des Weiteren konnten verschiedene Publikationen zeigen, dass ein *knockout* von *Tbx20* zur erhöhten Expression von *Tbx2* in Progenitorzellen führte (Cai *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2005; Stennard *et al.*, 2005). *Tbx2* ist ein Repressor der Transkription und inhibiert die Proliferation von Zellen (Vance *et al.*, 2005). Eine erhöhte Expression von *Tbx2*, ausgelöst durch eine verringerte *Tbx20* Expression, kann daraus resultierend eine fehlende Kammerspezifizierung in der Kardiogenese und die Inhibierung der Proliferation von Progenitorzellen erklären (Stennard & Harvey, 2005). Aufgrund der diskutierten Bedeutung der Transkriptionsfaktoren *Nkx2.5*, *Tbx5*, *Tbx20* und *Isl1* für die Kardiogenese wurde die Induktion dieser Faktoren zur Definition eines *in vitro* Phänotyps in dem generierten patienten-spezifischen HOS iPS Modell im Verlauf der Differenzierung der iPS Zellen bestimmt.

Die Induktion von *NPPA* wurde aufgrund seiner Funktion als direktes Zielgen von TBX5 bestimmt. *Nppa* ist darüber hinaus ein wichtiger und sensitiver Marker in der embryonalen Kardiogenese, der regional spezifisch exprimiert wird und ein dynamisches Expressionsmuster ausweist (Bruneau *et al.*, 2011; Zeller *et al.*, 1987). Die Expression von *Nppa* korreliert mit den lokalen Differenzierungsprozessen des sich entwickelnden Myokards (Houweling *et al.*, 2005a; Houweling *et al.*, 2005b; Christoffels *et al.*, 2000), ist während der Kardiogenese auf die Ventrikel und Atrien beschränkt und speziesübergreifend konserviert (Moormann & Christoffels, 2003; Christoffels *et al.*, 2000; Small & Krieg, 2000; Zeller *et al.*, 1987). In der fetalen Entwicklung von Maus, Ratte und Mensch ist die ventrikuläre Expression von *Nppa* auf trabekuläre Komponenten beschränkt und im Verlauf der

Kardiogenese kommt es zur abnehmenden Expression von *Nppa* im rechten und bei fortschreitender Kardiogenese auch im linken Ventrikel. Zum Zeitpunkt der Geburt ist die *Nppa* Expression, falls zeitlich noch vorhanden, auf die Atrien beschränkt (Seidmann *et al.*, 1991; Bloch *et al.*, 1986). Obwohl die *Nppa* Expression speziesspezifisch konserviert ist, zeigt die Terminierung der Expression dennoch speziesspezifische Unterschiede. In Mäusen ist die ventrikuläre Expression von *Nppa* bereits pränatal beendet, während in Ratten erst nach der Geburt (Tag D1-10) eine Terminierung der *Nppa* Expression erfolgt (Houweling *et al.*, 2005a, Houweling *et al.*, 2005b). Das dynamische Expressionsmuster von *Nppa* für die Ausbildung der Kammern in der Kardiogenese ist essentiell (Christoffels *et al.*, 2000). In der Arbeit von Bruneau konnte gezeigt werden, dass die verringerte bzw. fehlende Expression von *Nppa* in der murinen Kardiogenese mit der veränderten Expression von *Tbx5* bei heterozygotem bzw. homozygotem *knockout* von *TBX5* korreliert (Bruneau *et al.*, 2001). Die Expression von *Tbx5* und *Nppa* zeigte eine regionale Überlappung in dem sich entwickelnden Myokard (Bruneau *et al.*, 2001). Aufgrund der diskutierten Relevanz von *Nppa*, wurde die Induktion von *NPPA* in der Differenzierung der patienten-spezifischen iPS Zellen der HOS Indexpatienten im Vergleich zu iPS Zellen von gesunden Kontrollen bestimmt.

*TNNT2* als Tropomyosin-bindende Untereinheit des Troponinkomplexes, der in Kardiomyozyten vorkommt, wurde als kardialer Strukturmarker verwendet.

Für die Definition eines *in vitro* Phänotyps in den iPS Zellen der HOS Indexpatienten, wurde ein spontanes Differenzierungsprotokoll verwendet (Moretti *et al.*, 2010b). Die Verwendung eines ungerichteten Differenzierungsprotokolls, ohne Stimulation der Kardiogenese schließt eine Beeinflussung der Kardiogenese, die den *in vitro* Phänotyp verändert bzw. korrigiert aus. Für die iPS Zellen der HOS Indexpatienten konnte in der spontanen Differenzierung eine geringere Induktion von *TBX5* im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden. Für die iPS Zellen des Indexpatienten 1460 zeigte sich die verminderte Induktion von *TBX5* deutlich ausgeprägter im Vergleich zu den iPS Zellen der Indexpatientin 804-K. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass eine verminderte Expression des TFs zu Anomalien des Herzens und der vorderen Extremitäten führt (Tsai *et al.*, 2012; Gosh *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2008; Ahn *et al.*, 2002; Bruneau *et al.*, 2001). In der Arbeit von Bruneau und Kollegen konnte gezeigt werden, dass *Tbx5* im ventrikulären Septum und den atrioventrikulären Klappen exprimiert wird (Bruneau *et al.*, 1999). Alle Herzregionen, die während der murinen Kardiogenese *Tbx5* exprimierten, konnten mit Regionen des Herzens, die in Patienten mit HOS durch Defekte betroffen waren korreliert werden. Die HOS Indexpatienten, die für das patienten-spezifische iPS Modell ausgewählt wurden, zeigten kardiale Defekte (1460: „Swiss cheese“ VSD, PFO, Trikuspidalklappeninsuffizienz. 804-K: perimembranöser VSD, Pulmonalstenose) in Herzregionen, die in der Arbeit von Bruneau als *Tbx5* exprimierende Regionen in der Kardiogenese identifiziert wurden (Bruneau *et al.*, 1999). Die verminderte Induktion von *TBX5* in der Differenzierung der iPS Zellen der HOS Indexpatienten kann als initiales Ereignis für einen Mechanismus in Erwägung gezogen werden, der den kardialen Phänotyp der Indexpatienten verursacht und wird durch die diskutierten Tiermodelle gestützt.

Für die Transkriptionsfaktoren *NKX2.5*, *ISL1* und *TBX20* konnte eine Dysregulation der Genexpression über Tag D0 in beiden HOS Indexpatienten gezeigt werden. Die Dysregulation

zeigte sich für den Indexpatienten 1460 für alle drei Faktoren in einer im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigten Induktion, während die Indexpatientin 804-K eine deutlich erhöhte Induktion der Transkription im Vergleich zu den Kontrollen zeigte. In diversen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Expression von TF einer zeitlichen und räumlichen Ordnung folgt, um eine korrekte Kardiogenese zu sichern (Boettger & Braun, 2012; Kim *et al.*, 2012; Munshi, 2012; von Gise & Pu, 2012; Singh *et al.*, 2011). Weiterhin zeigen verschiedene Arbeiten, dass *Tbx5* als kardial relevanter TF mit anderen TF interagiert und die Genexpression von Zielgenen steuert (Ang *et al.*, 2016; Brown *et al.*, 2005; Takeuchi *et al.*, 2005; Stennard *et al.*, 2003; Bruneau *et al.*, 2001; Hiroi *et al.*, 2001). Eine Dysregulation, die neben dem *TBX5* Gen auch die Transkriptionsfaktoren *NKX2.5*, *ISL1* und *TBX20* in den iPS Zellen der HOS Indexpatienten betrifft, lässt auf eine weitgreifende temporäre Verschiebung der Expressionsmuster in der Kardiogenese der HOS Indexpatienten schließen, wobei aufgrund der Expressionsdaten keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die Dysregulation im *TBX5* ursächlich für die Dysregulation der anderen TF ist.

Für das *TBX5* Zielgen *NPPA* wurde eine verzögerte Induktion bei den iPS Zellen des Indexpatienten 1460, die sich im Verlauf der Differenzierung erhöht zeigte, gemessen. Bei der Indexpatientin 804-K war die *NPPA* Induktion erniedrigt. *Nppa* ist ein direktes Zielgen von *TBX5* (Bruneau *et al.*, 2001; Hiroi *et al.*, 2001) und ein wichtiger und sensitiver Marker in der embryonalen Kardiogenese (Bruneau *et al.*, 2011; Zeller *et al.*, 1987). Die Expression von *Nppa* korreliert mit den lokalen Differenzierungsprozessen im Myokard (Houweling *et al.*, 2005b; Christoffels *et al.*, 2000), sodass eine Dysregulation der *NPPA* Induktion in der spontanen Differenzierung der iPS Zellen der HOS Indexpatienten als weitere Ursache, die zur Ausbildung der kardialen Defekte beiträgt, in Betracht gezogen werden kann.

*TNNT2*, als kardialer Strukturmarker, zeigte für die iPS Zellen der HOS Indexpatienten eine gegensätzliche Regulation. Der Indexpatient 1460 wies eine im Vergleich zu den Kontrollen niedrigere *TNNT2* Induktion auf, während die HOS Indexpatientin 804-K eine erhöhte Induktion, die bis Tag D10 anhielt, zeigte. Wie in Abbildung 42A gezeigt, ist ein spezifisches Expressionsmuster der TF für die Kardiogenese essentiell. Für beide HOS Indexpatienten zeigten sich Dysregulationen in kardial relevanten Genen, die essentiell für die Ausbildung kardialer Zellen des PHF, SHF und des Epikards sind (Burrige *et al.*, 2015b; Moretti *et al.*, 2010a) und somit eine daraus resultierende veränderte Induktion des *TNNT2* erklären können.

Differenzierungsprotokolle einer spontanen Differenzierung resultieren in einer Ausbeute an Kardiomyozyten, die lediglich bei 1-3% liegt. Gerichtete Differenzierungsprotokolle von iPS Zellen führen dagegen zu einem Anteil an Kardiomyozyten, der bei 80-90% liegt (Burrige *et al.*, 2015a; Bhattacharya *et al.*, 2014; Burrige *et al.*, 2014) und erlauben Genexpressionsprofile von hochreinen Kardiomyozytenpopulationen zu erstellen. In den publizierten Differenzierungsprotokollen konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung des gesamten Mesoderms und im Speziellen des kardialen Mesoderms durch Induktion von *Brachyury* (*B*) und *MESP1* gekennzeichnet ist. Ab Tag D5 exprimieren die sich differenzierenden kardialen Progenitorzellen *NKX2.5*, *ISL1*, *NPPA* und *TNNT2*, deren Expression auch in unreifen Kardiomyozyten ab Tag D7 erhalten bleibt. Eine spontane

Kontraktion der Kardiomyozyten ist in den publizierten Protokollen ab Tag D8 beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde die Induktion der in der spontanen Differenzierung gemessenen Marker ebenfalls in einem Protokoll der gerichteten Differenzierung gemessen (Burrige *et al.*, 2015a). Unter Verwendung von gerichteten Differenzierungsprotokollen wurde geprüft ob der in der spontanen Differenzierung definierte *in vitro* Phänotyp für die HOS Indexpatienten unter Verwendung eines gerichteten Differenzierungsprotokolls erhalten bleibt.

Für den HOS Indexpatienten 1460 konnte der *in vitro* Phänotyp der spontanen Differenzierung für die Transkriptionsfaktoren *TBX5*, *NKX2.5* *ISL1* vollständig bestätigt werden. Alle drei TF, die als Marker für kardiale Progenitorzellen und im weiteren Verlauf der Kardiogenese zur Charakterisierung von kardialen Progenitorzellen des PHFs und des SHFs verwendet werden (siehe Abbildung 42A), zeigten eine im Vergleich zu den Kontrollen geringere Induktion. Eine Dysregulation von TF, die sowohl im PHF wie auch im SHF relevant sind, lässt auf Beeinflussung beider Herzfelder durch ein verändertes temporäres und lokales Genexpressionsprofil schließen. Der *in vivo* Phänotyp des HOS Indexpatienten 1460 zeigte sich mit VSD, einem PFO, einer Trikuspidalklappeninsuffizienz und einer vorliegenden Kardiomegalie als massiv ausgeprägt und nicht nur auf ein Herzfeld beschränkt. Die Induktion von *NPPA* war für den Indexpatienten 1460 erniedrigt, während die Expression in der spontanen Differenzierung zu Beginn verzögert und dann erhöht vorlag. Da im Vergleich zur spontanen Differenzierung ein deutlich höherer Anteil an Kardiomyozyten in der gerichteten Differenzierung generiert wird, zeigte sich die Dysregulation von *TBX5* in dem Protokoll der gerichteten Differenzierung deutlich ausgeprägter. Da für den Indexpatienten 1460 von einer Haploinsuffizienz für *TBX5* (Pro85Thr) auszugehen ist und *NPPA* ein direktes Zielgen von *TBX5* ist, ist eine deutlich ausgeprägtere Dysregulation von *NPPA* in der gerichteten Differenzierung, im Vergleich zur spontanen Differenzierung zu erwarten. Für *TNNT2* wurde in der gerichteten Differenzierung des Indexpatienten 1460 eine erhöhte Induktion im Vergleich zu den Kontrollen gemessen. In der Arbeit von Luna-Zurita und Kollegen konnte gezeigt werden, dass eine geringere/fehlende Induktion von *Nkx2.5* in der Kardiogenese zu einer vorzeitigen Maturierung von Kardiomyozyten führt, die vermehrt *Tnnt2* exprimieren (Luna-Zurita *et al.*, 2016). In dieser Publikation wurde der Expression von *Nkx2.5* in der Kardiogenese eine Schlüsselrolle zur Repression einer vorzeitigen Maturierung von Kardiomyozyten zugeschrieben. Die hohe Induktion von *TNNT2* in der gerichteten Differenzierung der iPS Zellen des Indexpatienten 1460 geht mit einer verminderten Induktion an *NKX2.5* einher und könnte dem in der Publikation von Luna-Zurita beschriebenen Mechanismus einer vorzeitigen Maturierung von Kardiomyozyten zuzuschreiben sein.

Der Phänotyp für die Indexpatientin 804-K zeigte sich in der spontanen Differenzierung, mit Ausnahme von *TBX5*, eher konträr zum Indexpatienten 1460, aber dennoch dysreguliert. Die Induktion der gemessenen Marker in der gerichteten Differenzierung, die auf Grund der hohen Ausbeute an Kardiomyozyten spezifisch für eine kardiomyozytäre Genexpression steht, zeigte sich für die Indexpatientin 804-K für *NKX2.5*, *NPPA* und *ISL1* gleichgerichtet zum Indexpatienten 1460 und vermindert induziert im Vergleich zu Kontrollen. Die Induktion für



*TNNT2* und *TBX20* in der gerichteten Differenzierung der iPS Zellen der Indexpatientin 804-K wies, im Gegensatz zum Indexpatienten 1460, keine Unterschiede zu den Kontrollen auf.

Für die kardial gerichtete Differenzierung konnte eine Dysregulation der Transkriptionsfaktoren *TBX5*, *NKX2.5*, *ISL1* und des *TBX5* Zielgens *NPPA* in beiden HOS Indexpatienten gezeigt werden. Im Verlauf der kardialen Differenzierung zeigten Progenitorzellen und unreife Kardiomyozyten beider Patienten eine geringere Induktion für diese Marker. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Expressionsmuster von TF einer zeitlichen und räumlichen Ordnung für eine korrekte Embryogenese und Kardiogenese folgen müssen (Boettger & Braun, 2012; Kim *et al.*, 2012; Munshi, 2012; von Gise & Pu, 2012; Singh *et al.*, 2011) und diverse Publikationen suggerieren für die Aktivierung von Zielgenen eine physikalische Interaktion von TF (Ang *et al.*, 2016; Brown *et al.*, 2005; Takeuchi *et al.*, 2005; Garg *et al.*, 2003; Stennard *et al.*, 2003; Bruneau *et al.*, 2001; Hiroi *et al.*, 2001; Durocher *et al.*, 1997). Die erniedrigte Induktion von *TBX5*, *NKX2.5*, *ISL1* und *NPPA* in der kardialen Differenzierung der beiden Indexpatienten und das daraus resultierende veränderte temporäre Expressionsmuster könnten ursächlich für die Ausbildung des kardialen Phänotyps sein.

Die in dieser Arbeit generierten patienten-spezifischen iPS Zellen der HOS Indexpatienten, zeigten deutliche Dysregulationen des Expressionsprofils in der Differenzierung im Vergleich zu Kontrollen, die einen Einfluss auf die Kardiogenese erwarten lassen und durch den *in vivo* Phänotyp bestätigt werden. Aufgrund des prognostizierten Funktionsverlustes des *TBX5* Proteins (Pro85Thr) des HOS Indexpatienten 1460 ist eine Auswirkung auf die Interaktion mit anderen TF zu erwarten, welche zu einer Veränderung des Expressionsmusters in der Kardiogenese führen und wiederum als ursächlich für die kardialen Defekte im Patienten sein können. Weiterhin konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass der Verlust eines Transkriptionsfaktors zur veränderten Expression anderer TF führt (Cai *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2005; Stennard *et al.*, 2005; Stennard & Harvey, 2005; Bruneau *et al.*, 2001; Stennard *et al.*, 2003) und somit eine Vielzahl an temporär und lokal veränderten Expressionsmustern zur Folge hat. Da die Mutation des HOS Indexpatienten 1460 mit hoher Wahrscheinlichkeit die Bindung an die DNA und die Interaktion mit anderen TF beeinflusst und ein kompletter Funktionsverlust prognostiziert ist, kann man von einer deutlich verminderten *TBX5*-Dosis in der Kardiogenese des Indexpatienten ausgehen. Die Aktivitätsbestimmung des mutierten *TBX5* Proteins (Pro85Thr) dieser Arbeit lassen eine Haploinsuffizienz vermuten. Die Indexpatientin 804-K zeigt den Phänotyp des HOS, trägt aber keine *TBX5* Mutation. Die Induktion von *TBX5* in den Differenzierungen der Indexpatientin 804 ist, wie auch in den Differenzierungen des Indexpatienten 1460 im Vergleich zu den Kontrollen vermindert, aber weniger ausgeprägt als in den Differenzierungen des Indexpatienten 1460. Die *in vitro* Phänotypen der Indexpatienten korrelieren mit dem bekannten *in vivo* Phänotyp der Patienten und stärkt die Funktionalität des etablierten patienten-spezifischen iPS Modells zur Untersuchung der Mechanismen, die zur Ausbildung des HOS führen.

Die Aufklärung von Mechanismen, die zur Ausbildung des HOS Phänotyps führen, setzt die Definition des temporären und lokalen Expressionsprofil des *TBX5* Gens in gesunden

Probanden und die Identifikation von Dysregulationen in Patienten im Vergleich zu den Kontrollen voraus. Untersuchungen auf Transkriptions- und Translationsebene für TBX5 sind dabei unabdingbar. Die Unzulänglichkeit von Antikörpern für TBX5 ist eine Problematik, die eine detaillierte Untersuchung von TBX5 in der Kardiogenese erschwert. In verschiedenen Arbeiten wurde diese Problematik durch Genom-Editierung umgangen (Karakikes *et al.*, 2017; Waldron *et al.*, 2016). Mit Hilfe von Endonukleasen, die an definierter Stelle schneiden, wird dabei ein „Tag“ in den Locus von *TBX5* eingebracht. Kommt es zur Expression des Gens, wird das Tag zeitgleich exprimiert und ein Tag-spezifischer Antikörper ermöglicht die Detektion von TBX5 indirekt.

In der Arbeit von Karakikes und Kollegen wurde zur Umgehung der Unzulänglichkeit von TBX5 Antikörpern ein Flag-Tag lentiviral in den iPS Klon mit homozygoter Deletion im *TBX5* Locus eingebracht (Karakikes *et al.*, 2017). Lentiviren können in das Genom integrieren, sodass für das, in der Arbeit von Karakikes generierte iPS Modell nicht ausgeschlossen werden kann, dass das Flag-Tag auch unspezifisch im Genom integriert ist. Ein Ausschluss zufälliger Integrationen ist in dieser Publikation nicht gegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die CRISPR/Cas9 Technologie verwendet, die bereits zum „Taggen“ von Zellen beschrieben ist (Spanjaard *et al.*, 2018). Die Methodik ist hochspezifisch, da die Position zur Genom-Editierung durch eine sgRNA, die spezifisch für den zu editierenden Locus entwickelt wird, vorgegeben ist. Ein Schneiden des Locus durch das Cas9 ist nur gegeben, wenn die sgRNA bindet und das CRISPR Protein an die sgRNA anlagert. In dieser Arbeit wurde das Flag-Tag über homologe Rekombination in den *TBX5* Locus von iPS Zellen eines gesunden Probanden E5 (E5 *TBX5*<sup>Flag</sup>) eingebracht.

Aufgrund der Vorteile der CRISPR/Cas9 Technik und der Vorteile der verwendeten homologen Rekombination ist eine unspezifische Integration des Flag-Tags und ein unpräziser Reparaturmechanismus weitestgehend ausgeschlossen.

Erfolgreich editierte Klone wurden über eine, ebenfalls in den Locus eingebrachte Puromycinresistenz selektioniert. Die in der vorliegenden Arbeit angewendete Genom Editierung zeigte eine hohe Effizienz, bei der 10% homozygot editierte iPS Klone (E5 *TBX5Flag*<sup>hom</sup>) und 80% heterozygot (E5 *TBX5Flag*<sup>het</sup>) editierte Klone selektioniert wurden. Die Selektion positiver Klone über eine Antibiotikaresistenz zeigte sich als geeignete Methodik und resultierte in einer hohen Ausbeute an erfolgreich editierten iPS Zellen. Die Charakterisierung des ausgewählten Klons E5 *TBX5Flag*<sup>hom</sup> Klon 331 zeigte keine Beeinflussung der Pluripotenz nach Editierung.

Um die editierte Linie zur Etablierung eines temporären Expressionsprofils in der kardialen Differenzierung verwenden zu können, muss eine stabile und reproduzierbare Differenzierung des iPS Klons sichergestellt werden. Die iPS Zellen des E5 *TBX5Flag*<sup>hom</sup> Klon 331 wurden auf ihre Fähigkeit, gerichtet zu differenzieren geprüft und die Induktion von *NKX2.5*, *TBX5*, *ISL1*, *TBX20*, *NPPA* und *TNNT2* über Tag D0 bestimmt. Für alle Marker konnte die Induktion spezifisch und temporär gemessen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Differenzierungen stabil ablaufen. Da das generierte patienten-spezifische HOS iPS Modell zur Untersuchung von TBX5 in der Kardiogenese verwendet werden soll, ist es essentiell zu zeigen, dass der gewählte Klon in der Lage ist zu maturieren. Das in der

Publikation von Burrige und Kollegen (Burrige *et al.*, 2014) beschriebene Markerprofil von Kardiomyozyten (TNNT2, MLCA, MLC2V) in dem gerichteten Differenzierungsprotokoll konnte bestätigt werden. Kardiomyozyten an Tag D60 der Differenzierung zeigten in der Durchflusszytometrie signifikant mehr MLC2V als an Tag D30. Auch immunzytologisch war die Reifung der Kardiomyozyten zu verfolgen.

Die Editierung der iPS Zellen mit einem Flag-Tag wurde durchgeführt, um TBX5 im Verlauf der kardialen Differenzierung gezielt detektieren zu können. Eine Korrelation der *TBX5* Expression und der Flag Expression auf Transkriptionsebene ist dafür grundlegend und konnte bestätigt werden. Die Funktionalität des Flag-Tags wurde durchflusszytometrisch, immunzytochemisch und im Western Blot erbracht und eine unspezifische Detektion von Flag für diese Methoden ausgeschlossen. Weiterhin konnte für die editierte Linie gezeigt werden, dass eine Flag Detektion spezifisch nur bei Expression von TBX5 vorhanden ist (Durchflusszytometrie, Immunzytometrie, Western Blot).

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Mutationen im Transkriptionsfaktor *TBX5* sind in mehr als 70% der HOS Patienten ursächlich für die Ausbildung des Syndroms. In den verbleibenden 30% der Patienten ist die Ursache für das HOS unbekannt. Es ist allgemein anerkannt, dass *TBX5* ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der Kardiogenese ist und die Rolle von *Tbx5* in der kardialen Entwicklung ist in verschiedene Tiermodelle untersucht worden. Da eine Übertragbarkeit der gewonnenen Daten auf das humane System nicht ohne Einschränkung möglich ist, stellt die Etablierung eines humanen patienten-spezifischen iPS Modells für das HOS eine geeignete Möglichkeit dar, die Rolle von *TBX5* im Humanen zu untersuchen und mit dem *in vivo* Phänotyp der Patienten zu korrelieren. Verschiedene humane patienten-spezifische iPS Modelle für AHF zeigen, dass diese zellulären Systeme geeignet sind, um Mechanismen, die zur Ausbildung monogenetisch verursachter AHF führen, zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurden HOS Indexpatienten genetisch untersucht (WES, Sanger Sequenzierung). Für drei von fünf Patienten konnte eine Mutation im *TBX5* Gen identifiziert werden. Die HOS Indexpatienten wurden weiterhin auf Varianten in regulatorischen Elementen untersucht, welche in der Literatur als expressionsbeeinflussend für *TBX5* beschrieben sind. Für keinen der fünf Indexpatienten konnte eine der beschriebenen Varianten identifiziert werden.

Für einen HOS Indexpatienten wurde eine *de novo* Mutation im *TBX5* Gen (Pro85Thr), die bislang nicht in der Literatur beschrieben ist, identifiziert. Da der Phänotyp des Patienten massiv ausgeprägt ist, und die Mutation bisher unbekannt war, wurde diese eingehend untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die *de novo* Mutation zu einem Aminosäureaustausch führt, welcher mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Konformationsveränderung des Proteins führt. Da Konformationsänderungen von TF zu einem erhöhten bzw. vermindertem Aktivitätsprofil führen können, wurde der Einfluss der Konformationsänderung genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von mutiertem *TBX5* (Pro85Thr) sehr stark reduziert war (< 5%) und direkte Zielgene von *TBX5* nicht mehr aktiviert wurden. Aufgrund der Lokalisation der Mutation ist davon auszugehen, dass sowohl die Bindungsdomäne wie auch die Interaktion mit anderen TF beeinflusst sind. Eine Dislokation des mutierten *TBX5* Proteins, welche ebenfalls zu einer verminderten Aktivität des Proteins führen kann, konnte ausgeschlossen werden.

Basierend auf den genetischen Ergebnissen, dem *in vivo* Phänotyp des Indexpatienten und der ausführlichen Charakterisierung des mutierten *TBX5* Proteins (Pro85Thr) wurde dieser HOS Patient für die Etablierung eines patienten-spezifischen iPS Modells ausgewählt. Weiterhin wurde eine HOS Indexpatientin ausgewählt, die keine *TBX5* Mutation trägt und einen milden Phänotyp zeigt. Neben iPS Zellen von zwei gesunden Kontrollen, die bereits zur Verfügung standen, wurden iPS Zellen der gesunden Eltern der Indexpatientin ohne *TBX5* Mutation als weitere Kontrollen generiert.

Alle generierten iPS Zellen wurden detailliert charakterisiert. Zur Definition eines *in vitro* Phänotyps, der ursächlich für die Entstehung des HOS sein könnte, wurden die iPS Zellen der beiden Indexpatienten und der vier Kontrollen spontan differenziert. Da spontane Differenzierungen nur in geringer Menge Kardiomyozyten generieren, wurde darüber hinaus

ein gerichtetes Differenzierungsprotokoll verwendet, welches aufgrund der hohen Ausbeute und Reinheit der Kardiomyozyten für die spezifische Untersuchung von Kardiomyozyten besser geeignet ist.

Das gerichtete Differenzierungsprotokoll bestätigte den in der spontanen Differenzierung identifizierten Phänotyp. In beiden Differenzierungsprotokolle konnte eine deutlich verminderte Induktion des *TBX5* Gens identifiziert werden. Weitere TF, die für ihre Rolle in der Kardiogenese bekannt sind zeigten sich in beiden Differenzierungsprotokollen dysreguliert. Die identifizierte verminderte Induktion von *TBX5* und die Dysregulationen weiterer kardial relevanter TF geben erste Hinweise auf ein temporär verändertes Expressionsprofil, welches die Ausbildung der kardialen Defekte in den Indexpatienten erklären kann. Der in den Differenzierungen identifizierte molekulare Phänotyp zeigte sich für den HOS Indexpatienten mit massivem Phänotyp und *TBX5* Mutation deutlich ausgeprägter als für die Indexpatientin ohne *TBX5* Mutation und milderem Phänotyp.

Das in dieser Arbeit etablierte humane patienten-spezifische iPS Modell für das HOS ist in der Lage Mechanismen, die zur Ausbildung des HOS führen und auf einer *TBX5* Mutation basieren zu untersuchen. Darüber hinaus können Mechanismen, die zur Ausbildung des HOS führen, aber nicht auf einer Mutation im *TBX5* Gen beruhen in dem etablierten patienten-spezifischen iPS Modell für das HOS untersucht werden.

Weiterhin konnten mit *TBX5*-Flag markierte iPS Zellen unter Verwendung von CRISPR/Cas9 generiert werden, die die Unzulänglichkeiten vorhandener *TBX5* Antikörper geschickt umgehen und eine indirekte Detektion des *TBX5* Proteins über das Flag-Tag ermöglichen. Die Spezifikation, Funktionalität und Korrelation der Flag-Tag Expression mit *TBX5* konnte erfolgreich gezeigt werden.

Das in dieser Arbeit etablierte humane iPS Modell für das HOS ist geeignet ein temporäres Expressionsmuster von *TBX5* in der Kardiogenese zu identifizieren und die Dysregulation in HOS Patienten, die zur Ausbildung des HOS beitragen zu klären. Der identifizierte *in vitro* Phänotyp des HOS zeigte sich in der gerichteten Differenzierung erhalten, sodass dieses Differenzierungsprotokoll zur Generation einer hohen Anzahl an reinen Kardiomyozyten, ohne Beeinflussung des Phänotyps, verwendet werden kann. Die hohe Anzahl und Reinheit an Kardiomyozyten ist notwendig, um die Regulation von *TBX5*-Zielgenen mittels *Next-Generation Sequencing* (NGS) von RNA und *Chromatin ImmunoPrecipitation* gefolgt von DNA-next-generation sequencing (ChIPseq) verlässlich detektieren zu können.

*Chromatin ImmunoPrecipitation* und *ChIPseq* Analysen setzen eine sichere Detektion von *TBX5* voraus. Da Antikörper für *TBX5* deutliche Unzulänglichkeiten zeigen, stellt das, in dieser Arbeit etablierte Flag-Tag zur indirekten Detektion von *TBX5* in iPS Zellen eine weitere Grundvoraussetzung für Folgeexperimente dar.

Das etablierte Modell ist geeignet *TBX5* assoziierte regulatorische Prozesse, Gennetzwerke und Zielgene von *TBX5* während der humanen kardialen Embryonalentwicklung zu identifizieren. Detaillierte, mechanistische Regulationen von *TBX5* in der humanen Herzentwicklung können identifiziert werden und sind die Basis für die Entwicklung bzw. den Transfer von potentiellen regenerativen Strategien. Basierend auf der vorliegenden Arbeit wurde ein DFG-Antrag mit dem Titel: „Untersuchung von *TBX5* assoziierten regulatorischen

Prozessen in der humanen kardialen Embryonalentwicklung unter Verwendung eines patienten-spezifischen Holt-Oram Syndrom iPS Modells“ genehmigt.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abou Hassan, O. K., Fahed, A. C., Batrawi, M., Arabi, M., Refaat, M. M., DePalma, S. R., . . . Nemer, G. M. (2015). NKX2-5 mutations in an inbred consanguineous population: genetic and phenotypic diversity. *Sci Rep*, *5*, 8848. doi:10.1038/srep08848
- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., . . . Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, *7*(4), 248-249. doi:10.1038/nmeth0410-248
- Ahn, D. G., Kourakis, M. J., Rohde, L. A., Silver, L. M., & Ho, R. K. (2002). T-box gene *tbx5* is essential for formation of the pectoral limb bud. *Nature*, *417*(6890), 754-758. doi:10.1038/nature00814
- Akazawa, H., & Komuro, I. (2005). Cardiac transcription factor *Csx/Nkx2-5*: Its role in cardiac development and diseases. *Pharmacol Ther*, *107*(2), 252-268. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.03.005
- Albalat, R., Baquero, M., & Minguillon, C. (2010). Identification and characterisation of the developmental expression pattern of *tbx5b*, a novel *tbx5* gene in zebrafish. *Gene Expr Patterns*, *10*(1), 24-30. doi:10.1016/j.gep.2009.11.003
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, *215*(3), 403-410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Ang, Y. S., Rivas, R. N., Ribeiro, A. J. S., Srivas, R., Rivera, J., Stone, N. R., . . . Srivastava, D. (2016). Disease Model of GATA4 Mutation Reveals Transcription Factor Cooperativity in Human Cardiogenesis. *Cell*, *167*(7), 1734-1749 e1722. doi:10.1016/j.cell.2016.11.033
- Aoki, H., & Horie, M. (2018). Electrical disorders in atrial septal defect: genetics and heritability. *J Thorac Dis*, *10*(Suppl 24), S2848-S2853. doi:10.21037/jtd.2018.02.53
- Aoki, H., Sadoshima, J., & Izumo, S. (2000). Myosin light chain kinase mediates sarcomere organization during cardiac hypertrophy in vitro. *Nat Med*, *6*(2), 183-188. doi:10.1038/72287
- Asoglu, M. R., Gabbay-Benziv, R., Turan, O. M., & Turan, S. (2018). Exposure of the developing heart to diabetic environment and early cardiac assessment: A review. *Echocardiography*, *35*(2), 244-257. doi:10.1111/echo.13811
- Avior, Y., Sagi, I., & Benvenisty, N. (2016). Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *17*(3), 170-182. doi:10.1038/nrm.2015.27
- Baban, A., Postma, A. V., Marini, M., Trocchio, G., Santilli, A., Pelegrini, M., . . . Pongiglione, G. (2014). Identification of TBX5 mutations in a series of 94 patients with Tetralogy of Fallot. *Am J Med Genet A*, *164A*(12), 3100-3107. doi:10.1002/ajmg.a.36783
- Baker, D., Hirst, A. J., Gokhale, P. J., Juarez, M. A., Williams, S., Wheeler, M., . . . Barbaric, I. (2016). Detecting Genetic Mosaicism in Cultures of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, *7*(5), 998-1012. doi:10.1016/j.stemcr.2016.10.003
- Bartlett, H., Veenstra, G. J., & Weeks, D. L. (2010). Examining the cardiac NK-2 genes in early heart development. *Pediatr Cardiol*, *31*(3), 335-341. doi:10.1007/s00246-009-9605-0

- Basson, C. T., Bachinsky, D. R., Lin, R. C., Levi, T., Elkins, J. A., Soultz, J., . . . Seidman, C. E. (1997). Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet*, *15*(1), 30-35. doi:10.1038/ng0197-30
- Basson, C. T., Cowley, G. S., Solomon, S. D., Weissman, B., Poznanski, A. K., Traill, T. A., . . . Seidman, C. E. (1994). The clinical and genetic spectrum of the Holt-Oram syndrome (heart-hand syndrome). *N Engl J Med*, *330*(13), 885-891. doi:10.1056/NEJM199403313301302
- Basson, C. T., Huang, T., Lin, R. C., Bachinsky, D. R., Weremowicz, S., Vaglio, A., . . . Seidman, C. E. (1999). Different TBX5 interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(6), 2919-2924. doi:10.1073/pnas.96.6.2919
- Basson, C. T., Solomon, S. D., Weissman, B., MacRae, C. A., Poznanski, A. K., Prieto, F., . . . et al. (1995). Genetic heterogeneity of heart-hand syndromes. *Circulation*, *91*(5), 1326-1329. doi:10.1161/01.cir.91.5.1326
- Beers, J., Gulbranson, D. R., George, N., Siniscalchi, L. I., Jones, J., Thomson, J. A., & Chen, G. (2012). Passaging and colony expansion of human pluripotent stem cells by enzyme-free dissociation in chemically defined culture conditions. *Nat Protoc*, *7*(11), 2029-2040. doi:10.1038/nprot.2012.130
- Begemann, G., & Ingham, P. W. (2000). Developmental regulation of Tbx5 in zebrafish embryogenesis. *Mech Dev*, *90*(2), 299-304.
- Ben Jehuda, R., Eisen, B., Shemer, Y., Mekies, L. N., Szantai, A., Reiter, I., . . . Binah, O. (2018). CRISPR correction of the PRKAG2 gene mutation in the patient's induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes eliminates electrophysiological and structural abnormalities. *Heart Rhythm*, *15*(2), 267-276. doi:10.1016/j.hrthm.2017.09.024
- Bengtsson, N. E., Hall, J. K., Odom, G. L., Phelps, M. P., Andrus, C. R., Hawkins, R. D., . . . Chamberlain, J. S. (2017). Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun*, *8*, 14454. doi:10.1038/ncomms14454
- Bennett, C. N., Ross, S. E., Longo, K. A., Bajnok, L., Hemati, N., Johnson, K. W., . . . MacDougald, O. A. (2002). Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem*, *277*(34), 30998-31004. doi:10.1074/jbc.M204527200
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., . . . Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, *28*(1), 235-242. doi:10.1093/nar/28.1.235
- Bernier, P. L., Stefanescu, A., Samoukovic, G., & Tchervenkov, C. I. (2010). The challenge of congenital heart disease worldwide: epidemiologic and demographic facts. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*, *13*(1), 26-34. doi:10.1053/j.pcsu.2010.02.005
- Bhattacharya, S., Burrridge, P. W., Kropp, E. M., Chuppa, S. L., Kwok, W. M., Wu, J. C., . . . Gundry, R. L. (2014). High efficiency differentiation of human pluripotent stem cells to cardiomyocytes and characterization by flow cytometry. *J Vis Exp*(91), 52010. doi:10.3791/52010
- Bissell, D. M., Arenson, D. M., Maher, J. J., & Roll, F. J. (1987). Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *J Clin Invest*, *79*(3), 801-812. doi:10.1172/JCI112887



- Bloch, K. D., Seidman, J. G., Naftilan, J. D., Fallon, J. T., & Seidman, C. E. (1986). Neonatal atria and ventricles secrete atrial natriuretic factor via tissue-specific secretory pathways. *Cell*, *47*(5), 695-702. doi:10.1016/0092-8674(86)90512-x
- Blue, G. M., Kirk, E. P., Sholler, G. F., Harvey, R. P., & Winlaw, D. S. (2012). Congenital heart disease: current knowledge about causes and inheritance. *Med J Aust*, *197*(3), 155-159.
- Bodmer, R., & Venkatesh, T. V. (1998). Heart development in Drosophila and vertebrates: conservation of molecular mechanisms. *Dev Genet*, *22*(3), 181-186. doi:10.1002/(SICI)1520-6408(1998)22:3<181::AID-DVG1>3.0.CO;2-2
- Boettger, T., & Braun, T. (2012). A new level of complexity: the role of microRNAs in cardiovascular development. *Circ Res*, *110*(7), 1000-1013. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.247742
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, *151*(Pt 8), 2551-2561. doi:10.1099/mic.0.28048-0
- Bondue, A., & Blanpain, C. (2010). Mesp1: a key regulator of cardiovascular lineage commitment. *Circ Res*, *107*(12), 1414-1427. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227058
- Boogerd, C. J., Dooijes, D., Ilgun, A., Mathijssen, I. B., Hordijk, R., van de Laar, I. M., . . . Postma, A. V. (2010). Functional analysis of novel TBX5 T-box mutations associated with Holt-Oram syndrome. *Cardiovasc Res*, *88*(1), 130-139. doi:10.1093/cvr/cvq178
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., . . . Young, R. A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, *122*(6), 947-956. doi:10.1016/j.cell.2005.08.020
- Brade, T., Pane, L. S., Moretti, A., Chien, K. R., & Laugwitz, K. L. (2013). Embryonic Heart Progenitors and Cardiogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *3*(10). doi:ARTN a013847/10.1101/cshperspect.a013847
- Brassington, A. M., Sung, S. S., Toydemir, R. M., Le, T., Roeder, A. D., Rutherford, A. E., . . . Bamshad, M. J. (2003). Expressivity of Holt-Oram syndrome is not predicted by TBX5 genotype. *Am J Hum Genet*, *73*(1), 74-85. doi:10.1086/376436
- Brown, D. D., Martz, S. N., Binder, O., Goetz, S. C., Price, B. M., Smith, J. C., & Conlon, F. L. (2005). Tbx5 and Tbx20 act synergistically to control vertebrate heart morphogenesis. *Development*, *132*(3), 553-563. doi:10.1242/dev.01596
- Brown, D. R., Samsa, L. A., Qian, L., & Liu, J. (2016). Advances in the Study of Heart Development and Disease Using Zebrafish. *J Cardiovasc Dev Dis*, *3*(2). doi:10.3390/jcdd3020013
- Bruneau, B. G. (2008). The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature*, *451*(7181), 943-948. doi:10.1038/nature06801
- Bruneau, B. G. (2011). Atrial natriuretic factor in the developing heart: a signpost for cardiac morphogenesis. *Can J Physiol Pharmacol*, *89*(8), 533-537. doi:10.1139/y11-051
- Bruneau, B. G., Logan, M., Davis, N., Levi, T., Tabin, C. J., Seidman, J. G., & Seidman, C. E. (1999). Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev Biol*, *211*(1), 100-108. doi:10.1006/dbio.1999.9298

- Bruneau, B. G., Nemer, G., Schmitt, J. P., Charron, F., Robitaille, L., Caron, S., . . . Seidman, J. G. (2001). A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell*, *106*(6), 709-721.
- Budde, B. S., Binner, P., Waldmuller, S., Hohne, W., Blankenfeldt, W., Hassfeld, S., . . . Scheffold, T. (2007). Noncompaction of the ventricular myocardium is associated with a de novo mutation in the beta-myosin heavy chain gene. *PLoS One*, *2*(12), e1362. doi:10.1371/journal.pone.0001362
- Buitrago, M., Lorenz, K., Maass, A. H., Oberdorf-Maass, S., Keller, U., Schmitteckert, E. M., . . . Engelhardt, S. (2005). The transcriptional repressor Nab1 is a specific regulator of pathological cardiac hypertrophy. *Nat Med*, *11*(8), 837-844. doi:10.1038/nm1272
- Burn, J., Brennan, P., Little, J., Holloway, S., Coffey, R., Somerville, J., . . . Hunter, A. S. (1998). Recurrence risks in offspring of adults with major heart defects: results from first cohort of British collaborative study. *Lancet*, *351*(9099), 311-316. doi:10.1016/s0140-6736(97)06486-6
- Burridge, P. W., Holmstrom, A., & Wu, J. C. (2015). Chemically Defined Culture and Cardiomyocyte Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. *Curr Protoc Hum Genet*, *87*, 21 23 21-15. doi:10.1002/0471142905.hg2103s87
- Burridge, P. W., Matsa, E., Shukla, P., Lin, Z. C., Churko, J. M., Ebert, A. D., . . . Wu, J. C. (2014). Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods*, *11*(8), 855-860. doi:10.1038/nmeth.2999
- Burridge, P. W., Sharma, A., & Wu, J. C. (2015). Genetic and Epigenetic Regulation of Human Cardiac Reprogramming and Differentiation in Regenerative Medicine. *Annu Rev Genet*, *49*, 461-484. doi:10.1146/annurev-genet-112414-054911
- Butler, T. L., Esposito, G., Blue, G. M., Cole, A. D., Costa, M. W., Waddell, L. B., . . . Winlaw, D. S. (2010). GATA4 mutations in 357 unrelated patients with congenital heart malformation. *Genet Test Mol Biomarkers*, *14*(6), 797-802. doi:10.1089/gtmb.2010.0028
- Buzzard, J. J., Gough, N. M., Crook, J. M., & Colman, A. (2004). Karyotype of human ES cells during extended culture. *Nat Biotechnol*, *22*(4), 381-382; author reply 382. doi:10.1038/nbt0404-381
- Cai, C. L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P. H., Pfaff, S. L., Chen, J., & Evans, S. (2003). Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell*, *5*(6), 877-889.
- Cai, C. L., Zhou, W., Yang, L., Bu, L., Qyang, Y., Zhang, X., . . . Evans, S. (2005). T-box genes coordinate regional rates of proliferation and regional specification during cardiogenesis. *Development*, *132*(10), 2475-2487. doi:10.1242/dev.01832
- Calcagni, G., Digilio, M. C., Sarkozy, A., Dallapiccola, B., & Marino, B. (2007). Familial recurrence of congenital heart disease: an overview and review of the literature. *Eur J Pediatr*, *166*(2), 111-116. doi:10.1007/s00431-006-0295-9
- Carvajal-Vergara, X., Sevilla, A., D'Souza, S. L., Ang, Y. S., Schaniel, C., Lee, D. F., . . . Lemischka, I. R. (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature*, *465*(7299), 808-812. doi:10.1038/nature09005

- Catli, G., Abaci, A., Flanagan, S. E., De Franco, E., Ellard, S., Hattersley, A., . . . Bober, E. (2013). A novel GATA6 mutation leading to congenital heart defects and permanent neonatal diabetes: a case report. *Diabetes Metab*, *39*(4), 370-374. doi:10.1016/j.diabet.2013.01.005
- Chapman, D. L., Garvey, N., Hancock, S., Alexiou, M., Agulnik, S. I., Gibson-Brown, J. J., . . . Papaioannou, V. E. (1996). Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn*, *206*(4), 379-390. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199608)206:4<379::AID-AJA4>3.0.CO;2-F
- Chen, C. H., Poucher, S. M., Lu, J., & Henry, P. D. (2004). Fibroblast growth factor 2: from laboratory evidence to clinical application. *Curr Vasc Pharmacol*, *2*(1), 33-43.
- Chen, C. W., Lin, J., & Chu, Y. W. (2013). iStable: off-the-shelf predictor integration for predicting protein stability changes. *BMC Bioinformatics*, *14 Suppl 2*, S5. doi:10.1186/1471-2105-14-S2-S5
- Chen, G., Gulbranson, D. R., Hou, Z., Bolin, J. M., Ruotti, V., Probasco, M. D., . . . Thomson, J. A. (2011). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods*, *8*(5), 424-429. doi:10.1038/nmeth.1593
- Chen, H. X., Zhang, X., Hou, H. T., Wang, J., Yang, Q., Wang, X. L., & He, G. W. (2017). Identification of a novel and functional mutation in the TBX5 gene in a patient by screening from 354 patients with isolated ventricular septal defect. *Eur J Med Genet*, *60*(7), 385-390. doi:10.1016/j.ejmg.2017.04.011
- Chen, K. G., Hamilton, R. S., Robey, P. G., & Mallon, B. S. (2014). Alternative cultures for human pluripotent stem cell production, maintenance, and genetic analysis. *J Vis Exp*(89). doi:10.3791/51519
- Cheng, D., Deobagkar-Lele, M., Zvezdova, E., Choi, S., Uehara, S., Baup, D., . . . Cornall, R. J. (2017). Themis2 lowers the threshold for B cell activation during positive selection. *Nat Immunol*, *18*(2), 205-213. doi:10.1038/ni.3642
- Ching, Y. H., Ghosh, T. K., Cross, S. J., Packham, E. A., Honeyman, L., Loughna, S., . . . Brook, J. D. (2005). Mutation in myosin heavy chain 6 causes atrial septal defect. *Nat Genet*, *37*(4), 423-428. doi:10.1038/ng1526
- Chowdhury, S., Erickson, S. W., MacLeod, S. L., Cleves, M. A., Hu, P., Karim, M. A., & Hobbs, C. A. (2011). Maternal genome-wide DNA methylation patterns and congenital heart defects. *PLoS One*, *6*(1), e16506. doi:10.1371/journal.pone.0016506
- Christoffels, V. M., Habets, P. E., Franco, D., Campione, M., de Jong, F., Lamers, W. H., . . . Moorman, A. F. (2000). Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol*, *223*(2), 266-278. doi:10.1006/dbio.2000.9753
- Chung, C. Y., Khurana, V., Auluck, P. K., Tardiff, D. F., Mazzulli, J. R., Soldner, F., . . . Lindquist, S. (2013). Identification and rescue of alpha-synuclein toxicity in Parkinson patient-derived neurons. *Science*, *342*(6161), 983-987. doi:10.1126/science.1245296
- Clark, K. L., Yutzey, K. E., & Benson, D. W. (2006). Transcription factors and congenital heart defects. *Annu Rev Physiol*, *68*, 97-121. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040104.113828

- Coulier, F., Pontarotti, P., Roubin, R., Hartung, H., Goldfarb, M., & Birnbaum, D. (1997). Of worms and men: an evolutionary perspective on the fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor families. *J Mol Evol*, *44*(1), 43-56.
- Crane, A. M., Kramer, P., Bui, J. H., Chung, W. J., Li, X. S., Gonzalez-Garay, M. L., . . . Davis, B. R. (2015). Targeted correction and restored function of the CFTR gene in cystic fibrosis induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, *4*(4), 569-577. doi:10.1016/j.stemcr.2015.02.005
- Craveur, P., Joseph, A. P., Poulain, P., de Brevern, A. G., & Rebehmed, J. (2013). Cis-trans isomerization of omega dihedrals in proteins. *Amino Acids*, *45*(2), 279-289. doi:10.1007/s00726-013-1511-3
- Crispino, J. D., Lodish, M. B., Thurberg, B. L., Litovsky, S. H., Collins, T., Molkentin, J. D., & Orkin, S. H. (2001). Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. *Genes Dev*, *15*(7), 839-844. doi:10.1101/gad.875201
- Daley, G. Q. (2015). Stem cells and the evolving notion of cellular identity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *370*(1680), 20140376. doi:10.1098/rstb.2014.0376
- Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., & Cohen, P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*, *351*(Pt 1), 95-105. doi:10.1042/0264-6021:3510095
- Dewan, P., & Gupta, P. (2012). Burden of Congenital Rubella Syndrome (CRS) in India: a systematic review. *Indian Pediatr*, *49*(5), 377-399.
- Dolk, H., Loane, M., Garne, E., & European Surveillance of Congenital Anomalies Working, G. (2011). Congenital heart defects in Europe: prevalence and perinatal mortality, 2000 to 2005. *Circulation*, *123*(8), 841-849. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.958405
- Dragan, A. I., Pavlovic, R., McGivney, J. B., Casas-Finet, J. R., Bishop, E. S., Strouse, R. J., . . . Geddes, C. D. (2012). SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. *J Fluoresc*, *22*(4), 1189-1199. doi:10.1007/s10895-012-1059-8
- Draper, J. S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H. D., Maltby, E., Johnson, J., . . . Andrews, P. W. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, *22*(1), 53-54. doi:10.1038/nbt922
- Dressen, M., Lahm, H., Lahm, A., Wolf, K., Doppler, S., Deutsch, M. A., . . . Krane, M. (2016). A novel de novo TBX5 mutation in a patient with Holt-Oram syndrome leading to a dramatically reduced biological function. *Mol Genet Genomic Med*, *4*(5), 557-567. doi:10.1002/mgg3.234
- Durocher, D., Charron, F., Warren, R., Schwartz, R. J., & Nemer, M. (1997). The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J*, *16*(18), 5687-5696. doi:10.1093/emboj/16.18.5687
- Egbe, A., Uppu, S., Lee, S., Stroustrup, A., Ho, D., & Srivastava, S. (2015). Temporal variation of birth prevalence of congenital heart disease in the United States. *Congenit Heart Dis*, *10*(1), 43-50. doi:10.1111/chd.12176

- Ekvall, S., Wilbe, M., Dahlgren, J., Legius, E., van Haeringen, A., Westphal, O., . . . Bondeson, M. L. (2015). Mutation in NRAS in familial Noonan syndrome--case report and review of the literature. *BMC Med Genet*, *16*, 95. doi:10.1186/s12881-015-0239-1
- Elek, C., Vitez, M., & Czeizel, E. (1991). [Holt-Oram syndrome]. *Orv Hetil*, *132*(2), 73-74, 77-78.
- Elliott, D. A., Kirk, E. P., Yeoh, T., Chandar, S., McKenzie, F., Taylor, P., . . . Harvey, R. P. (2003). Cardiac homeobox gene NKX2-5 mutations and congenital heart disease: associations with atrial septal defect and hypoplastic left heart syndrome. *J Am Coll Cardiol*, *41*(11), 2072-2076.
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, *292*(5819), 154-156. doi:10.1038/292154a0
- Evans, P. M., Zhang, W., Chen, X., Yang, J., Bhakat, K. K., & Liu, C. (2007). Kruppel-like factor 4 is acetylated by p300 and regulates gene transcription via modulation of histone acetylation. *J Biol Chem*, *282*(47), 33994-34002. doi:10.1074/jbc.M701847200
- Evans, S. M., Yelon, D., Conlon, F. L., & Kirby, M. L. (2010). Myocardial lineage development. *Circ Res*, *107*(12), 1428-1444. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227405
- Fahed, A. C., Gelb, B. D., Seidman, J. G., & Seidman, C. E. (2013). Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res*, *112*(4), 707-720. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.300853
- Fan, C., Liu, M., & Wang, Q. (2003). Functional analysis of TBX5 missense mutations associated with Holt-Oram syndrome. *J Biol Chem*, *278*(10), 8780-8785. doi:10.1074/jbc.M208120200
- Fernig, D. G., & Gallagher, J. T. (1994). Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. *Prog Growth Factor Res*, *5*(4), 353-377.
- Fishman, M. C., & Olson, E. N. (1997). Parsing the heart: genetic modules for organ assembly. *Cell*, *91*(2), 153-156. doi:10.1016/s0092-8674(00)80397-9
- Flynn, R., Grundmann, A., Renz, P., Hanseler, W., James, W. S., Cowley, S. A., & Moore, M. D. (2015). CRISPR-mediated genotypic and phenotypic correction of a chronic granulomatous disease mutation in human iPS cells. *Exp Hematol*, *43*(10), 838-848 e833. doi:10.1016/j.exphem.2015.06.002
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, *85*(8), 348-362. doi:10.2183/pjab.85.348
- Garg, V., Kathiriya, I. S., Barnes, R., Schluterman, M. K., King, I. N., Butler, C. A., . . . Srivastava, D. (2003). GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature*, *424*(6947), 443-447. doi:10.1038/nature01827
- Garrity, D. M., Childs, S., & Fishman, M. C. (2002). The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin Tbx5 deficiency syndrome. *Development*, *129*(19), 4635-4645.

- Ge, X., Ren, Y., Bartulos, O., Lee, M. Y., Yue, Z., Kim, K. Y., . . . Qyang, Y. (2012). Modeling supravalvular aortic stenosis syndrome with human induced pluripotent stem cells. *Circulation*, *126*(14), 1695-1704. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.116996
- Ghosh, T. K., Packham, E. A., Bonser, A. J., Robinson, T. E., Cross, S. J., & Brook, J. D. (2001). Characterization of the TBX5 binding site and analysis of mutations that cause Holt-Oram syndrome. *Hum Mol Genet*, *10*(18), 1983-1994. doi:10.1093/hmg/10.18.1983
- Ghosh, T. K., Song, F. F., Packham, E. A., Buxton, S., Robinson, T. E., Ronksley, J., . . . Brook, J. D. (2009). Physical interaction between TBX5 and MEF2C is required for early heart development. *Mol Cell Biol*, *29*(8), 2205-2218. doi:10.1128/MCB.01923-08
- Gill, H. K., Splitt, M., Sharland, G. K., & Simpson, J. M. (2003). Patterns of recurrence of congenital heart disease: an analysis of 6,640 consecutive pregnancies evaluated by detailed fetal echocardiography. *J Am Coll Cardiol*, *42*(5), 923-929.
- Gilsbach, R., Schwaderer, M., Preissl, S., Gruning, B. A., Kranzhofer, D., Schneider, P., . . . Hein, L. (2018). Distinct epigenetic programs regulate cardiac myocyte development and disease in the human heart in vivo. *Nat Commun*, *9*(1), 391. doi:10.1038/s41467-017-02762-z
- Goetz, S. C., Brown, D. D., & Conlon, F. L. (2006). TBX5 is required for embryonic cardiac cell cycle progression. *Development*, *133*(13), 2575-2584. doi:10.1242/dev.02420
- Goldenberg, I., & Moss, A. J. (2008). Long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*, *51*(24), 2291-2300. doi:10.1016/j.jacc.2008.02.068
- Goldmuntz, E. (2004). The genetic contribution to congenital heart disease. *Pediatr Clin North Am*, *51*(6), 1721-1737, x. doi:10.1016/j.pcl.2004.08.006
- Gonzalez, R., Lee, J. W., & Schultz, P. G. (2011). Stepwise chemically induced cardiomyocyte specification of human embryonic stem cells. *Angew Chem Int Ed Engl*, *50*(47), 11181-11185.
- Granados-Riveron, J. T., Ghosh, T. K., Pope, M., Bu'Lock, F., Thornborough, C., Eason, J., . . . David Brook, J. (2010). Alpha-cardiac myosin heavy chain (MYH6) mutations affecting myofibril formation are associated with congenital heart defects. *Hum Mol Genet*, *19*(20), 4007-4016. doi:10.1093/hmg/ddq315
- Granados-Riveron, J. T., Pope, M., Bu'lock, F. A., Thornborough, C., Eason, J., Setchfield, K., . . . Brook, J. D. (2012). Combined mutation screening of NKX2-5, GATA4, and TBX5 in congenital heart disease: multiple heterozygosity and novel mutations. *Congenit Heart Dis*, *7*(2), 151-159. doi:10.1111/j.1747-0803.2011.00573.x
- Greenway, S. C., McLeod, R., Hume, S., Roslin, N. M., Alvarez, N., Giuffre, M., . . . Gerull, B. (2014). Exome sequencing identifies a novel variant in ACTC1 associated with familial atrial septal defect. *Can J Cardiol*, *30*(2), 181-187. doi:10.1016/j.cjca.2013.12.003
- Greenway, S. C., Pereira, A. C., Lin, J. C., DePalma, S. R., Israel, S. J., Mesquita, S. M., . . . Seidman, C. E. (2009). De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot. *Nat Genet*, *41*(8), 931-935. doi:10.1038/ng.415

- Greulich, F., Rudat, C., Farin, H. F., Christoffels, V. M., & Kispert, A. (2016). Lack of Genetic Interaction between *Tbx18* and *Tbx2/Tbx20* in Mouse Epicardial Development. *PLoS One*, *11*(6), e0156787. doi:10.1371/journal.pone.0156787
- Greulich, F., Rudat, C., & Kispert, A. (2011). Mechanisms of T-box gene function in the developing heart. *Cardiovasc Res*, *91*(2), 212-222. doi:10.1093/cvr/cvr112
- Gruenauer-Kloevekorn, C., & Froster, U. G. (2003). Holt-Oram syndrome: a new mutation in the *TBX5* gene in two unrelated families. *Ann Genet*, *46*(1), 19-23.
- Guo, D. F., Li, R. G., Yuan, F., Shi, H. Y., Hou, X. M., Qu, X. K., . . . Qiu, X. B. (2016). *TBX5* loss-of-function mutation contributes to atrial fibrillation and atypical Holt-Oram syndrome. *Mol Med Rep*, *13*(5), 4349-4356. doi:10.3892/mmr.2016.5043
- Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F., & Nelson, K. E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*, *1*(6), e60. doi:10.1371/journal.pcbi.0010060
- Han, J., Wu, Q., Xia, Y., Wagner, M. B., & Xu, C. (2016). Cell alignment induced by anisotropic electrospun fibrous scaffolds alone has limited effect on cardiomyocyte maturation. *Stem Cell Res*, *16*(3), 740-750. doi:10.1016/j.scr.2016.04.014
- Hartweger, H., Schweighoffer, E., Davidson, S., Peirce, M. J., Wack, A., & Tybulewicz, V. L. (2014). *Themis2* is not required for B cell development, activation, and antibody responses. *J Immunol*, *193*(2), 700-707. doi:10.4049/jimmunol.1400943
- Harvey, R. P. (1996). NK-2 homeobox genes and heart development. *Dev Biol*, *178*(2), 203-216. doi:10.1006/dbio.1996.0212
- Harvey, R. P., Lai, D., Elliott, D., Biben, C., Solloway, M., Prall, O., . . . Kirk, E. (2002). Homeodomain factor *Nkx2-5* in heart development and disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *67*, 107-114.
- Herold, G. Innere Medizin 2019, Köln 2018, ISBN 978-3-9814660-8-9. 188
- Hill, J. T., Demarest, B., Gorski, B., Smith, M., & Yost, H. J. (2017). Heart morphogenesis gene regulatory networks revealed by temporal expression analysis. *Development*, *144*(19), 3487-3498. doi:10.1242/dev.154146
- Hiroi, Y., Kudoh, S., Monzen, K., Ikeda, Y., Yazaki, Y., Nagai, R., & Komuro, I. (2001). *Tbx5* associates with *Nkx2-5* and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet*, *28*(3), 276-280. doi:10.1038/90123
- Hoffman, J. I., & Kaplan, S. (2002). The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol*, *39*(12), 1890-1900.
- Holt, M., & Oram, S. (1960). Familial heart disease with skeletal malformations. *Br Heart J*, *22*, 236-242. doi:10.1136/hrt.22.2.236
- Houweling, A. C., Somi, S., Massink, M. P., Groenen, M. A., Moorman, A. F., & Christoffels, V. M. (2005). Comparative analysis of the natriuretic peptide precursor gene cluster in vertebrates reveals loss of ANF and retention of CNP-3 in chicken. *Dev Dyn*, *233*(3), 1076-1082. doi:10.1002/dvdy.20423

- Houweling, A. C., van Borren, M. M., Moorman, A. F., & Christoffels, V. M. (2005). Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene *Nppa* during development and disease. *Cardiovasc Res*, *67*(4), 583-593. doi:10.1016/j.cardiores.2005.06.013
- Huang, T. (2002). Current advances in Holt-Oram syndrome. *Curr Opin Pediatr*, *14*(6), 691-695.
- International Stem Cell, I., Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P. W., . . . Zhang, W. (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol*, *25*(7), 803-816. doi:10.1038/nbt1318
- International Stem Cell, I., Amps, K., Andrews, P. W., Anyfantis, G., Armstrong, L., Avery, S., . . . Zhou, Q. (2011). Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat Biotechnol*, *29*(12), 1132-1144. doi:10.1038/nbt.2051
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, *169*(12), 5429-5433. doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
- Ishizaki, T., Uehata, M., Tamechika, I., Keel, J., Nonomura, K., Maekawa, M., & Narumiya, S. (2000). Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol*, *57*(5), 976-983.
- Itzhaki, I., Maizels, L., Huber, I., Zwi-Dantsis, L., Caspi, O., Winterstern, A., . . . Gepstein, L. (2011). Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature*, *471*(7337), 225-229. doi:10.1038/nature09747
- Jacobs, J. P., Jacobs, M. L., Lacour-Gayet, F. G., Jenkins, K. J., Gauvreau, K., Bacha, E., . . . Mavroudis, C. (2009). Stratification of complexity improves the utility and accuracy of outcomes analysis in a Multi-Institutional Congenital Heart Surgery Database: Application of the Risk Adjustment in Congenital Heart Surgery (RACHS-1) and Aristotle Systems in the Society of Thoracic Surgeons (STS) Congenital Heart Surgery Database. *Pediatr Cardiol*, *30*(8), 1117-1130. doi:10.1007/s00246-009-9496-0
- Jacobs, J. P., Pasquali, S. K., Austin, E., Gaynor, J. W., Backer, C., Hirsch-Romano, J. C., . . . Jacobs, M. L. (2014). Linking the congenital heart surgery databases of the Society of Thoracic Surgeons and the Congenital Heart Surgeons' Society: part 1--rationale and methodology. *World J Pediatr Congenit Heart Surg*, *5*(2), 256-271. doi:10.1177/2150135113519454
- Jansen, R., Embden, J. D., Gastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, *43*(6), 1565-1575.
- Javitt, G., Grossman-Haham, I., Alon, A., Resnick, E., Mutsafi, Y., Ilani, T., & Fass, D. (2019). cis-Proline mutants of quiescin sulfhydryl oxidase 1 with altered redox properties undermine extracellular matrix integrity and cell adhesion in fibroblast cultures. *Protein Sci*, *28*(1), 228-238. doi:10.1002/pro.3537
- Jiang, H. K., Qiu, G. R., Li-Ling, J., Xin, N., & Sun, K. L. (2010). Reduced ACTC1 expression might play a role in the onset of congenital heart disease by inducing cardiomyocyte apoptosis. *Circ J*, *74*(11), 2410-2418.



- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. doi:10.1126/science.1225829
- Karakikes, I., Termglinchan, V., Cepeda, D. A., Lee, J., Diecke, S., Hendel, A., . . . Wu, J. C. (2017). A Comprehensive TALEN-Based Knockout Library for Generating Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Based Models for Cardiovascular Diseases. *Circ Res*, 120(10), 1561-1571. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309948
- Kasahara, H., & Benson, D. W. (2004). Biochemical analyses of eight NKX2.5 homeodomain missense mutations causing atrioventricular block and cardiac anomalies. *Cardiovasc Res*, 64(1), 40-51. doi:10.1016/j.cardiores.2004.06.004
- Kemaladewi, D. U., Maino, E., Hyatt, E., Hou, H., Ding, M., Place, K. M., . . . Cohn, R. D. (2017). Correction of a splicing defect in a mouse model of congenital muscular dystrophy type 1A using a homology-directed-repair-independent mechanism. *Nat Med*, 23(8), 984-989. doi:10.1038/nm.4367
- Khairy, P., Ionescu-Iltu, R., Mackie, A. S., Abrahamowicz, M., Pilote, L., & Marelli, A. J. (2010). Changing mortality in congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol*, 56(14), 1149-1157. doi:10.1016/j.jacc.2010.03.085
- Kim, K. H., Rosen, A., Bruneau, B. G., Hui, C. C., & Backx, P. H. (2012). Iroquois homeodomain transcription factors in heart development and function. *Circ Res*, 110(11), 1513-1524. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.265041
- Kimura, M., Kikuchi, A., Ichinoi, N., & Kure, S. (2015). Novel TBX5 duplication in a Japanese family with Holt-Oram syndrome. *Pediatr Cardiol*, 36(1), 244-247. doi:10.1007/s00246-014-1028-x
- Kirk, E. P., Sunde, M., Costa, M. W., Rankin, S. A., Wolstein, O., Castro, M. L., . . . Harvey, R. P. (2007). Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*, 81(2), 280-291. doi:10.1086/519530
- Kitajima, S., Takagi, A., Inoue, T., & Saga, Y. (2000). MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development*, 127(15), 3215-3226.
- Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Liotta, L. A., Robey, P. G., Tryggvason, K., & Martin, G. R. (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry*, 21(24), 6188-6193.
- Kodo, K., & Yamagishi, H. (2010). GATA transcription factors in congenital heart defects: a commentary on a novel GATA6 mutation in patients with tetralogy of Fallot or atrial septal defect. *J Hum Genet*, 55(10), 637-638. doi:10.1038/jhg.2010.105
- Kontaridis, M. I., Swanson, K. D., David, F. S., Barford, D., & Neel, B. G. (2006). PTPN11 (Shp2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects. *J Biol Chem*, 281(10), 6785-6792. doi:10.1074/jbc.M513068200
- Kopf, P. G., & Walker, M. K. (2009). Overview of developmental heart defects by dioxins, PCBs, and pesticides. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 27(4), 276-285. doi:10.1080/10590500903310195

- Koyanagi, M., Takahashi, J., Arakawa, Y., Doi, D., Fukuda, H., Hayashi, H., . . . Hashimoto, N. (2008). Inhibition of the Rho/ROCK pathway reduces apoptosis during transplantation of embryonic stem cell-derived neural precursors. *J Neurosci Res*, *86*(2), 270-280. doi:10.1002/jnr.21502
- Kuo, C. T., Morrisey, E. E., Anandappa, R., Sigrist, K., Lu, M. M., Parmacek, M. S., . . . Leiden, J. M. (1997). GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev*, *11*(8), 1048-1060. doi:10.1101/gad.11.8.104
- Kuroya, M., Ishida, N., & Shiratori, T. (1953). Newborn virus pneumonitis (type Sendai). II. The isolation of a new virus. *Tohoku J Exp Med*, *58*(1), 62.
- Lahm, H., Doppler, S., Dressen, M., Werner, A., Adamczyk, K., Schrambke, D., . . . Krane, M. (2015). Live fluorescent RNA-based detection of pluripotency gene expression in embryonic and induced pluripotent stem cells of different species. *Stem Cells*, *33*(2), 392-402. doi:10.1002/stem.1872
- Lahm, H., Doppler, S. A., Dressen, M., Adamczyk, K., Deutsch, M. A., Ulrich, H., . . . Krane, M. (2015). Detection of Intracellular Gene Expression in Live Cells of Murine, Human and Porcine Origin Using Fluorescence-labeled Nanoparticles. *J Vis Exp*(105). doi:10.3791/53268
- Lahm, H., Schon, P., Doppler, S., Dressen, M., Cleuziou, J., Deutsch, M. A., . . . Krane, M. (2015). Tetralogy of Fallot and Hypoplastic Left Heart Syndrome - Complex Clinical Phenotypes Meet Complex Genetic Networks. *Curr Genomics*, *16*(3), 141-158. doi:10.2174/1389202916666150303232520
- Lang, G. (2013). Histotechnik. Springer Verlag, 271
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., . . . Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, *23*(21), 2947-2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404
- Lesourne, R., Zvezdova, E., Song, K. D., El-Khoury, D., Uehara, S., Barr, V. A., . . . Love, P. E. (2012). Interchangeability of Themis1 and Themis2 in thymocyte development reveals two related proteins with conserved molecular function. *J Immunol*, *189*(3), 1154-1161. doi:10.4049/jimmunol.1200123
- Levenstein, M. E., Ludwig, T. E., Xu, R. H., Llanas, R. A., VanDenHeuvel-Kramer, K., Manning, D., & Thomson, J. A. (2006). Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells*, *24*(3), 568-574. doi:10.1634/stemcells.2005-0247
- Li, G. R., Feng, J., Yue, L., Carrier, M., & Nattel, S. (1996). Evidence for two components of delayed rectifier K<sup>+</sup> current in human ventricular myocytes. *Circ Res*, *78*(4), 689-696. doi:10.1161/01.res.78.4.689
- Li, H. O., Zhu, Y. F., Asakawa, M., Kuma, H., Hirata, T., Ueda, Y., . . . Hasegawa, M. (2000). A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *J Virol*, *74*(14), 6564-6569. doi:10.1128/jvi.74.14.6564-6569.2000
- Li, L., Krantz, I. D., Deng, Y., Genin, A., Banta, A. B., Collins, C. C., . . . Spinner, N. B. (1997). Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet*, *16*(3), 243-251. doi:10.1038/ng0797-243

- Li, Q. Y., Newbury-Ecob, R. A., Terrett, J. A., Wilson, D. I., Curtis, A. R., Yi, C. H., . . . Brook, J. D. (1997). Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet*, *15*(1), 21-29. doi:10.1038/ng0197-21
- Li, X., Krawetz, R., Liu, S., Meng, G., & Rancourt, D. E. (2009). ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells. *Hum Reprod*, *24*(3), 580-589. doi:10.1093/humrep/den404
- Li, Y., Wang, H., Muffat, J., Cheng, A. W., Orlando, D. A., Loven, J., . . . Jaenisch, R. (2013). Global transcriptional and translational repression in human-embryonic-stem-cell-derived Rett syndrome neurons. *Cell Stem Cell*, *13*(4), 446-458. doi:10.1016/j.stem.2013.09.001
- Lian, X., Hsiao, C., Wilson, G., Zhu, K., Hazeltine, L. B., Azarin, S. M., . . . Palecek, S. P. (2012). Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(27), E1848-1857. doi:10.1073/pnas.1200250109
- Lian, X., Zhang, J., Azarin, S. M., Zhu, K., Hazeltine, L. B., Bao, X., . . . Palecek, S. P. (2013). Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*, *8*(1), 162-175. doi:10.1038/nprot.2012.150
- Liang, Q., Gong, W., Zheng, D., Zhong, R., Wen, Y., & Wang, X. (2017). The influence of maternal exposure history to virus and medicine during pregnancy on congenital heart defects of fetus. *Environ Sci Pollut Res Int*, *24*(6), 5628-5632. doi:10.1007/s11356-016-8198-4
- Liberatore CM, Searcy-Schrick RD, Yutzey KE. 2000. Ventricular expression of tbx5 inhibits normal heart chamber development. *Dev Biol* *223*(1):169-80.
- Lichiardopol, C., Militaru, C., Popescu, B., Hila, G., & Mixich, F. (2007). Holt-Oram syndrome. *Rom J Morphol Embryol*, *48*(1), 67-70.
- Lindinger, A., Schwedler, G., & Hense, H. W. (2010). Prevalence of congenital heart defects in newborns in Germany: Results of the first registration year of the PAN Study (July 2006 to June 2007). *Klin Padiatr*, *222*(5), 321-326. doi:10.1055/s-0030-1254155
- Lindsay, E. A. (2001). Chromosomal microdeletions: dissecting del22q11 syndrome. *Nat Rev Genet*, *2*(11), 858-868. doi:10.1038/35098574
- Liu, R. M., Sun, R. G., Zhang, L. T., Zhang, Q. F., Chen, D. X., Zhong, J. J., & Xiao, J. H. (2016). Hyaluronic acid enhances proliferation of human amniotic mesenchymal stem cells through activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Exp Cell Res*, *345*(2), 218-229. doi:10.1016/j.yexcr.2016.05.019
- Loh, Y. H., Wu, Q., Chew, J. L., Vega, V. B., Zhang, W., Chen, X., . . . Ng, H. H. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*, *38*(4), 431-440. doi:10.1038/ng1760
- Lu, J. H., Lu, J. K., Choo, S. L., Li, Y. C., Yeh, H. W., Shiue, J. F., & Yeh, V. C. (2008). Cascade effect of cardiac myogenesis gene expression during cardiac looping in tbx5 knockdown zebrafish embryos. *J Biomed Sci*, *15*(6), 779-787. doi:10.1007/s11373-008-9268-5

- Ludwig, T. E., Bergendahl, V., Levenstein, M. E., Yu, J., Probasco, M. D., & Thomson, J. A. (2006). Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nat Methods*, 3(8), 637-646. doi:10.1038/nmeth902
- Ludwig, T. E., Levenstein, M. E., Jones, J. M., Berggren, W. T., Mitchen, E. R., Frane, J. L., . . . Thomson, J. A. (2006). Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol*, 24(2), 185-187. doi:10.1038/nbt1177
- Luna-Zurita, L., Stirnimann, C. U., Glatt, S., Kaynak, B. L., Thomas, S., Baudin, F., . . . Bruneau, B. G. (2016). Complex Interdependence Regulates Heterotypic Transcription Factor Distribution and Coordinates Cardiogenesis. *Cell*, 164(5), 999-1014. doi:10.1016/j.cell.2016.01.004
- Lyons, I., Parsons, L. M., Hartley, L., Li, R., Andrews, J. E., Robb, L., & Harvey, R. P. (1995). Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev*, 9(13), 1654-1666. doi:10.1101/gad.9.13.1654
- Ma, J. F., Yang, F., Mahida, S. N., Zhao, L., Chen, X., Zhang, M. L., . . . Tian, X. L. (2016). TBX5 mutations contribute to early-onset atrial fibrillation in Chinese and Caucasians. *Cardiovasc Res*, 109(3), 442-450. doi:10.1093/cvr/cvw003
- Madsen, N. L., Schwartz, S. M., Lewin, M. B., & Mueller, B. A. (2013). Prepregnancy body mass index and congenital heart defects among offspring: a population-based study. *Congenit Heart Dis*, 8(2), 131-141. doi:10.1111/j.1747-0803.2012.00714.x
- Makarova, K. S., Aravind, L., Grishin, N. V., Rogozin, I. B., & Koonin, E. V. (2002). A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res*, 30(2), 482-496. doi:10.1093/nar/30.2.482
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*, 1, 7. doi:10.1186/1745-6150-1-7
- Malan, D., Friedrichs, S., Fleischmann, B. K., & Sasse, P. (2011). Cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells with long-QT syndrome 3 recapitulate typical disease-specific features in vitro. *Circ Res*, 109(8), 841-847. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243139
- Marban, E. (2002). Cardiac channelopathies. *Nature*, 415(6868), 213-218. doi:10.1038/415213a
- Marx, S. O., Kurokawa, J., Reiken, S., Motoike, H., D'Armiento, J., Marks, A. R., & Kass, R. S. (2002). Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science*, 295(5554), 496-499. doi:10.1126/science.1066843
- Matsson, H., Eason, J., Bookwalter, C. S., Klar, J., Gustavsson, P., Sunnegardh, J., . . . Dahl, N. (2008). Alpha-cardiac actin mutations produce atrial septal defects. *Hum Mol Genet*, 17(2), 256-265. doi:10.1093/hmg/ddm302
- McBride, K. L., Riley, M. F., Zender, G. A., Fitzgerald-Butt, S. M., Towbin, J. A., Belmont, J. W., & Cole, S. E. (2008). NOTCH1 mutations in individuals with left ventricular outflow tract malformations reduce ligand-induced signaling. *Hum Mol Genet*, 17(18), 2886-2893. doi:10.1093/hmg/ddn187

- McCulley, D. J., & Black, B. L. (2012). Transcription factor pathways and congenital heart disease. *Curr Top Dev Biol*, *100*, 253-277. doi:10.1016/B978-0-12-387786-4.00008-7
- McDermott, D. A., Bressan, M. C., He, J., Lee, J. S., Aftimos, S., Brueckner, M., . . . Basson, C. T. (2005). TBX5 genetic testing validates strict clinical criteria for Holt-Oram syndrome. *Pediatric Research*, *58*(5), 981-986. doi:10.1203/01.Pdr.0000182593.95441.64
- McGuire, P. G., & Seeds, N. W. (1989). The interaction of plasminogen activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells. *J Cell Biochem*, *40*(2), 215-227. doi:10.1002/jcb.240400210
- Mehta, A., Ramachandra, C. J., Sequiera, G. L., Sudibyo, Y., Nandihalli, M., Yong, P. J., . . . Shim, W. (2014). Phasic modulation of Wnt signaling enhances cardiac differentiation in human pluripotent stem cells by recapitulating developmental ontogeny. *Biochim Biophys Acta*, *1843*(11), 2394-2402. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.06.011
- Merscher, S., Funke, B., Epstein, J. A., Heyer, J., Puech, A., Lu, M. M., . . . Kucherlapati, R. (2001). TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell*, *104*(4), 619-629. doi:10.1016/S0092-8674(01)00247-1
- Mitchell, S. C., Korones, S. B., & Berendes, H. W. (1971). Congenital heart disease in 56,109 births. Incidence and natural history. *Circulation*, *43*(3), 323-332.
- Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J., & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, *155*(Pt 3), 733-740. doi:10.1099/mic.0.023960-0
- Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, *60*(2), 174-182. doi:10.1007/s00239-004-0046-3
- Molkentin, J. D. (2004). Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res*, *63*(3), 467-475. doi:10.1016/j.cardiores.2004.01.021
- Monserat, L., Hermida-Prieto, M., Fernandez, X., Rodriguez, I., Dumont, C., Cazon, L., . . . Castro-Beiras, A. (2007). Mutation in the alpha-cardiac actin gene associated with apical hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction, and septal defects. *Eur Heart J*, *28*(16), 1953-1961. doi:10.1093/eurheartj/ehm239
- Moorman, A. F., & Christoffels, V. M. (2003). Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol Rev*, *83*(4), 1223-1267. doi:10.1152/physrev.00006.2003
- Moretti, A., Bellin, M., Jung, C. B., Thies, T. M., Takashima, Y., Bernshausen, A., . . . Laugwitz, K. L. (2010). Mouse and human induced pluripotent stem cells as a source for multipotent Isl1+ cardiovascular progenitors. *FASEB J*, *24*(3), 700-711. doi:10.1096/fj.09-139477
- Moretti, A., Bellin, M., Welling, A., Jung, C. B., Lam, J. T., Bott-Flugel, L., . . . Laugwitz, K. L. (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med*, *363*(15), 1397-1409. doi:10.1056/NEJMoa0908679

- Mori, A. D., Zhu, Y., Vahora, I., Nieman, B., Koshiba-Takeuchi, K., Davidson, L., . . . Bruneau, B. G. (2006). Tbx5-dependent rheostatic control of cardiac gene expression and morphogenesis. *Dev Biol*, 297(2), 566-586. doi:10.1016/j.ydbio.2006.05.023
- Morris, C. A., & Mervis, C. B. (2000). Williams syndrome and related disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 1, 461-484. doi:10.1146/annurev.genom.1.1.461
- Moss, A. J., Shimizu, W., Wilde, A. A., Towbin, J. A., Zareba, W., Robinson, J. L., . . . McNitt, S. (2007). Clinical aspects of type-1 long-QT syndrome by location, coding type, and biophysical function of mutations involving the KCNQ1 gene. *Circulation*, 115(19), 2481-2489. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.665406
- Munshi, N. V. (2012). Gene regulatory networks in cardiac conduction system development. *Circ Res*, 110(11), 1525-1537. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.260026
- Natunen, S., Satomaa, T., Pitkanen, V., Salo, H., Mikkola, M., Natunen, J., . . . Valmu, L. (2011). The binding specificity of the marker antibodies Tra-1-60 and Tra-1-81 reveals a novel pluripotency-associated type 1 lactosamine epitope. *Glycobiology*, 21(9), 1125-1130. doi:10.1093/glycob/cwq209
- Newbury-Ecob, R. A., Leanage, R., Raeburn, J. A., & Young, I. D. (1996). Holt-Oram syndrome: a clinical genetic study. *J Med Genet*, 33(4), 300-307. doi:10.1136/jmg.33.4.300
- Nora, J. J. (1968). Multifactorial inheritance hypothesis for the etiology of congenital heart diseases. The genetic-environmental interaction. *Circulation*, 38(3), 604-617.
- Nora, J. J., & Nora, A. H. (1988). Update on counseling the family with a first-degree relative with a congenital heart defect. *Am J Med Genet*, 29(1), 137-142. doi:10.1002/ajmg.1320290117
- Oda, T., Elkahloun, A. G., Pike, B. L., Okajima, K., Krantz, I. D., Genin, A., . . . Chandrasekharappa, S. C. (1997). Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet*, 16(3), 235-242. doi:10.1038/ng0797-235
- Olson, E. N., & Srivastava, D. (1996). Molecular pathways controlling heart development. *Science*, 272(5262), 671-676. doi:10.1126/science.272.5262.671
- Packham, E. A., & Brook, J. D. (2003). T-box genes in human disorders. *Hum Mol Genet*, 12 Spec No 1, R37-44. doi:10.1093/hmg/ddg077
- Padang, R., Bagnall, R. D., Richmond, D. R., Bannon, P. G., & Semsarian, C. (2012). Rare non-synonymous variations in the transcriptional activation domains of GATA5 in bicuspid aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol*, 53(2), 277-281. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.05.009
- Papadopoulos, V. E., & Silver, L. M. (1998). The T-box gene family. *Bioessays*, 20(1), 9-19. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199801)20:1<9::AID-BIES4>3.0.CO;2-Q
- Peterkin, T., Gibson, A., Loose, M., & Patient, R. (2005). The roles of GATA-4, -5 and -6 in vertebrate heart development. *Semin Cell Dev Biol*, 16(1), 83-94. doi:10.1016/j.semcdb.2004.10.003
- Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkela, R., & Ruskoaho, H. (2004). GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res*, 63(2), 196-207. doi:10.1016/j.cardiores.2004.03.025

- Pittermann, E., Lachmann, N., MacLean, G., Emrich, S., Ackermann, M., Gohring, G., . . . Klusmann, J. H. (2017). Gene correction of HAX1 reversed Kostmann disease phenotype in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Blood Adv*, *1*(14), 903-914. doi:10.1182/bloodadvances.2016003798
- Pober, B. R., Johnson, M., & Urban, Z. (2008). Mechanisms and treatment of cardiovascular disease in Williams-Beuren syndrome. *J Clin Invest*, *118*(5), 1606-1615. doi:10.1172/JCI35309
- Posch, M. G., Gramlich, M., Sunde, M., Schmitt, K. R., Lee, S. H., Richter, S., . . . Ozelik, C. (2010). A gain-of-function TBX20 mutation causes congenital atrial septal defects, patent foramen ovale and cardiac valve defects. *J Med Genet*, *47*(4), 230-235. doi:10.1136/jmg.2009.069997
- Postma, A. V., van de Meerakker, J. B., Mathijssen, I. B., Barnett, P., Christoffels, V. M., Ilgun, A., . . . Moorman, A. F. (2008). A gain-of-function TBX5 mutation is associated with atypical Holt-Oram syndrome and paroxysmal atrial fibrillation. *Circ Res*, *102*(11), 1433-1442. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.168294
- Postma, A. V., van Engelen, K., van de Meerakker, J., Rahman, T., Probst, S., Baars, M. J., . . . Klaassen, S. (2011). Mutations in the sarcomere gene MYH7 in Ebstein anomaly. *Circ Cardiovasc Genet*, *4*(1), 43-50. doi:10.1161/CIRCGENETICS.110.957985
- Pourcel, C., Salvignol, G., & Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, *151*(Pt 3), 653-663. doi:10.1099/mic.0.27437-0
- Priest, J. R., Osoegawa, K., Mohammed, N., Nanda, V., Kundu, R., Schultz, K., . . . Ashley, E. A. (2016). De Novo and Rare Variants at Multiple Loci Support the Oligogenic Origins of Atrioventricular Septal Heart Defects. *PLoS Genet*, *12*(4), e1005963. doi:10.1371/journal.pgen.1005963
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, *117*, 119-128. doi:10.1016/j.biochi.2015.03.025
- Razmara, E., & Garshasbi, M. (2018). Whole-exome sequencing identifies R1279X of MYH6 gene to be associated with congenital heart disease. *BMC Cardiovasc Disord*, *18*(1), 137. doi:10.1186/s12872-018-0867-4
- Reamon-Buettner, S. M., Cho, S. H., & Borlak, J. (2007). Mutations in the 3'-untranslated region of GATA4 as molecular hotspots for congenital heart disease (CHD). *BMC Med Genet*, *8*, 38. doi:10.1186/1471-2350-8-38
- Reller, M. D., Strickland, M. J., Riehle-Colarusso, T., Mahle, W. T., & Correa, A. (2008). Prevalence of congenital heart defects in metropolitan Atlanta, 1998-2005. *J Pediatr*, *153*(6), 807-813. doi:10.1016/j.jpeds.2008.05.059
- Roger, V. L., Go, A. S., Lloyd-Jones, D. M., Adams, R. J., Berry, J. D., Brown, T. M., . . . Stroke Statistics, S. (2011). Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, *123*(4), e18-e209. doi:10.1161/CIR.0b013e3182009701
- Ruiz-Torres, A., Gimeno, A., Melon, J., Mendez, L., Munoz, F. J., & Macia, M. (1999). Age-related loss of proliferative activity of human vascular smooth muscle cells in culture. *Mech Ageing Dev*, *110*(1-2), 49-55.

- Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyazaki, J., & Inoue, T. (1999). MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development*, *126*(15), 3437-3447.
- Sanguinetti, M. C., & Tristani-Firouzi, M. (2006). hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*, *440*(7083), 463-469. doi:10.1038/nature04710
- Sarkozy, A., Conti, E., Neri, C., D'Agostino, R., Digilio, M. C., Esposito, G., . . . Dallapiccola, B. (2005). Spectrum of atrial septal defects associated with mutations of NKX2.5 and GATA4 transcription factors. *J Med Genet*, *42*(2), e16. doi:10.1136/jmg.2004.026740
- Schott, J. J., Benson, D. W., Basson, C. T., Pease, W., Silberbach, G. M., Moak, J. P., . . . Seidman, J. G. (1998). Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science*, *281*(5373), 108-111. doi:10.1126/science.281.5373.108
- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D. (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*, *11*(4), 361-362. doi:10.1038/nmeth.2890
- Schwedler, G., Lindinger, A., Lange, P. E., Sax, U., Olchvary, J., Peters, B., . . . Hense, H. W. (2011). Frequency and spectrum of congenital heart defects among live births in Germany : a study of the Competence Network for Congenital Heart Defects. *Clin Res Cardiol*, *100*(12), 1111-1117. doi:10.1007/s00392-011-0355-7
- Seidman, C. E., Schmidt, E. V., & Seidman, J. G. (1991). cis-dominance of rat atrial natriuretic factor gene regulatory sequences in transgenic mice. *Can J Physiol Pharmacol*, *69*(10), 1486-1492. doi:10.1139/y91-223
- Seki, T., Yuasa, S., Oda, M., Egashira, T., Yae, K., Kusumoto, D., . . . Fukuda, K. (2010). Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*, *7*(1), 11-14. doi:10.1016/j.stem.2010.06.003
- Shan, J., Pang, S., Qiao, Y., Ma, L., Wang, H., Xing, Q., . . . Yan, B. (2012). Functional analysis of the novel sequence variants within TBX5 gene promoter in patients with ventricular septal defects. *Transl Res*, *160*(3), 237-238. doi:10.1016/j.trsl.2012.04.003
- Shenoy, A. R., & Visweswariah, S. S. (2003). Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA. *Anal Biochem*, *319*(2), 335-336.
- Showell, C., Binder, O., & Conlon, F. L. (2004). T-box genes in early embryogenesis. *Dev Dyn*, *229*(1), 201-218. doi:10.1002/dvdy.10480
- Singh, M. K., Christoffels, V. M., Dias, J. M., Trowe, M. O., Petry, M., Schuster-Gossler, K., . . . Kispert, A. (2005). Tbx20 is essential for cardiac chamber differentiation and repression of Tbx2. *Development*, *132*(12), 2697-2707. doi:10.1242/dev.01854
- Singh, N., Trivedi, C. M., Lu, M., Mullican, S. E., Lazar, M. A., & Epstein, J. A. (2011). Histone deacetylase 3 regulates smooth muscle differentiation in neural crest cells and development of the cardiac outflow tract. *Circ Res*, *109*(11), 1240-1249. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.255067



- Small, E. M., & Krieg, P. A. (2000). Expression of atrial natriuretic factor (ANF) during *Xenopus* cardiac development. *Dev Genes Evol*, *210*(12), 638-640.
- Smemo, S., Campos, L. C., Moskowitz, I. P., Krieger, J. E., Pereira, A. C., & Nobrega, M. A. (2012). Regulatory variation in a TBX5 enhancer leads to isolated congenital heart disease. *Hum Mol Genet*, *21*(14), 3255-3263. doi:10.1093/hmg/dds165
- Smith, K. A., Joziase, I. C., Chocron, S., van Dinther, M., Guryev, V., Verhoeven, M. C., . . . Bakkers, J. (2009). Dominant-negative ALK2 allele associates with congenital heart defects. *Circulation*, *119*(24), 3062-3069. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.843714
- Soemedi, R., Wilson, I. J., Bentham, J., Darlay, R., Topf, A., Zelenika, D., . . . Keavney, B. D. (2012). Contribution of global rare copy-number variants to the risk of sporadic congenital heart disease. *Am J Hum Genet*, *91*(3), 489-501. doi:10.1016/j.ajhg.2012.08.003
- Soldner, F., & Jaenisch, R. (2012). Medicine. iPSC disease modeling. *Science*, *338*(6111), 1155-1156. doi:10.1126/science.1227682
- Soldner, F., Laganier, J., Cheng, A. W., Hockemeyer, D., Gao, Q., Alagappan, R., . . . Jaenisch, R. (2011). Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell*, *146*(2), 318-331. doi:10.1016/j.cell.2011.06.019
- Sorek, R., Kunin, V., & Hugenholtz, P. (2008). CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol*, *6*(3), 181-186. doi:10.1038/nrmicro1793
- Spanjaard, B., Hu, B., Mitic, N., Olivares-Chauvet, P., Janjuha, S., Ninov, N., & Junker, J. P. (2018). Simultaneous lineage tracing and cell-type identification using CRISPR-Cas9-induced genetic scars. *Nat Biotechnol*, *36*(5), 469-473. doi:10.1038/nbt.4124
- Srivastava, D. (2006). Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell*, *126*(6), 1037-1048. doi:10.1016/j.cell.2006.09.003
- Stainier, D. Y., Lee, R. K., & Fishman, M. C. (1993). Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation. *Development*, *119*(1), 31-40.
- Stennard, F. A., Costa, M. W., Elliott, D. A., Rankin, S., Haast, S. J., Lai, D., . . . Harvey, R. P. (2003). Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart. *Dev Biol*, *262*(2), 206-224. doi:10.1016/s0012-1606(03)00385-3
- Stennard, F. A., Costa, M. W., Lai, D., Biben, C., Furtado, M. B., Solloway, M. J., . . . Harvey, R. P. (2005). Murine T-box transcription factor Tbx20 acts as a repressor during heart development, and is essential for adult heart integrity, function and adaptation. *Development*, *132*(10), 2451-2462. doi:10.1242/dev.01799
- Stennard, F. A., & Harvey, R. P. (2005). T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart. *Development*, *132*(22), 4897-4910. doi:10.1242/dev.02099
- Sterneckert, J. L., Reinhardt, P., & Scholer, H. R. (2014). Investigating human disease using stem cell models. *Nat Rev Genet*, *15*(9), 625-639. doi:10.1038/nrg3764

- Stirnemann, C. U., Ptchelkine, D., Grimm, C., & Muller, C. W. (2010). Structural basis of TBX5-DNA recognition: the T-box domain in its DNA-bound and -unbound form. *J Mol Biol*, *400*(1), 71-81. doi:10.1016/j.jmb.2010.04.052
- Su, M. T., Fujioka, M., Goto, T., & Bodmer, R. (1999). The Drosophila homeobox genes *zfh-1* and *even-skipped* are required for cardiac-specific differentiation of a *numb*-dependent lineage decision. *Development*, *126*(14), 3241-3251.
- Su, W., Zhu, P., Wang, R., Wu, Q., Wang, M., Zhang, X., . . . Dong, N. (2017). Congenital heart diseases and their association with the variant distribution features on susceptibility genes. *Clin Genet*, *91*(3), 349-354. doi:10.1111/cge.12835
- Sun, N., Yazawa, M., Liu, J., Han, L., Sanchez-Freire, V., Abilez, O. J., . . . Wu, J. C. (2012). Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med*, *4*(130), 130ra147. doi:10.1126/scitranslmed.3003552
- Taapken, S. M., Nisler, B. S., Newton, M. A., Sampsel-Barron, T. L., Leonhard, K. A., McIntire, E. M., & Montgomery, K. D. (2011). Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, *29*(4), 313-314. doi:10.1038/nbt.1835
- 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. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- Takeuchi, J. K., Mileikowska, M., Koshiba-Takeuchi, K., Heidt, A. B., Mori, A. D., Arruda, E. P., . . . Bruneau, B. G. (2005). *Tbx20* dose-dependently regulates transcription factor networks required for mouse heart and motoneuron development. *Development*, *132*(10), 2463-2474. doi:10.1242/dev.01827
- Takeuchi JK, Ohgi M, Koshiba-Takeuchi K, Shiratori H, Sakaki I, Ogura K, Saijoh Y, Ogura T. 2003. *Tbx5* specifies the left/right ventricles and ventricular septum position during cardiogenesis. *Development* *130*(24):5953-64.
- Tanaka, M., Chen, Z., Bartunkova, S., Yamasaki, N., & Izumo, S. (1999). The cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2.5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development*, *126*(6), 1269-1280.
- Targoff, K. L., Schell, T., & Yelon, D. (2008). *Nkx* genes regulate heart tube extension and exert differential effects on ventricular and atrial cell number. *Dev Biol*, *322*(2), 314-321. doi:10.1016/j.ydbio.2008.07.037
- 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. *Science*, *282*(5391), 1145-1147.
- Tomita-Mitchell, A., Stamm, K. D., Mahnke, D. K., Kim, M. S., Hidestrand, P. M., Liang, H. L., . . . Mitchell, M. E. (2016). Impact of MYH6 variants in hypoplastic left heart syndrome. *Physiol Genomics*, *48*(12), 912-921. doi:10.1152/physiolgenomics.00091.2016

- Towe, E. C., Bos, J. M., Ommen, S. R., Gersh, B. J., & Ackerman, M. J. (2015). Genotype-Phenotype Correlations in Apical Variant Hypertrophic Cardiomyopathy. *Congenit Heart Dis*, *10*(3), E139-145. doi:10.1111/chd.12242
- Tsai, T. C., Lu, J. K., Choo, S. L., Yeh, S. Y., Tang, R. B., Lee, H. Y., & Lu, J. H. (2012). The paracrine effect of exogenous growth hormone alleviates dysmorphogenesis caused by *tbx5* deficiency in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J Biomed Sci*, *19*, 63. doi:10.1186/1423-0127-19-63
- Ungrin, M. D., Joshi, C., Nica, A., Bauwens, C., & Zandstra, P. W. (2008). Reproducible, ultra high-throughput formation of multicellular organization from single cell suspension-derived human embryonic stem cell aggregates. *PLoS One*, *3*(2), e1565. doi:10.1371/journal.pone.0001565
- Valet, G. (2003). Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective. *J Biol Regul Homeost Agents*, *17*(3), 213-222.
- van der Bom, T., Bouma, B. J., Meijboom, F. J., Zwinderman, A. H., & Mulder, B. J. (2012). The prevalence of adult congenital heart disease, results from a systematic review and evidence based calculation. *Am Heart J*, *164*(4), 568-575. doi:10.1016/j.ahj.2012.07.023
- van der Bom, T., Zomer, A. C., Zwinderman, A. H., Meijboom, F. J., Bouma, B. J., & Mulder, B. J. (2011). The changing epidemiology of congenital heart disease. *Nat Rev Cardiol*, *8*(1), 50-60. doi:10.1038/nrcardio.2010.166
- van der Linde, D., Konings, E. E., Slager, M. A., Witsenburg, M., Helbing, W. A., Takkenberg, J. J., & Roos-Hesselink, J. W. (2011). Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*, *58*(21), 2241-2247. doi:10.1016/j.jacc.2011.08.025
- van der Linde, I. H. M., Hiemstra, Y. L., Bokenkamp, R., van Mil, A. M., Breuning, M. H., Ruivenkamp, C., . . . Barge-Schaapveld, D. (2017). A Dutch MYH7 founder mutation, p.(Asn1918Lys), is associated with early onset cardiomyopathy and congenital heart defects. *Neth Heart J*, *25*(12), 675-681. doi:10.1007/s12471-017-1037-5
- Vance, K. W., Carreira, S., Brosch, G., & Goding, C. R. (2005). *Tbx2* is overexpressed and plays an important role in maintaining proliferation and suppression of senescence in melanomas. *Cancer Res*, *65*(6), 2260-2268. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3045
- Vaughan, C. J., & Basson, C. T. (2000). Molecular determinants of atrial and ventricular septal defects and patent ductus arteriosus. *Am J Med Genet*, *97*(4), 304-309.
- Vermeer, A. M., van Engelen, K., Postma, A. V., Baars, M. J., Christiaans, I., De Haij, S., . . . Keavney, B. (2013). Ebstein anomaly associated with left ventricular noncompaction: an autosomal dominant condition that can be caused by mutations in MYH7. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, *163C*(3), 178-184. doi:10.1002/ajmg.c.31365
- Vincent, S. D., & Buckingham, M. E. (2010). How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Curr Top Dev Biol*, *90*, 1-41. doi:10.1016/S0070-2153(10)90001-X
- von Gise, A., & Pu, W. T. (2012). Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease. *Circ Res*, *110*(12), 1628-1645. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.259960

- Vukicevic, S., Kleinman, H. K., Luyten, F. P., Roberts, A. B., Roche, N. S., & Reddi, A. H. (1992). Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res*, *202*(1), 1-8.
- Waldron, L., Steimle, J. D., Greco, T. M., Gomez, N. C., Dorr, K. M., Kweon, J., . . . Conlon, F. L. (2016). The Cardiac TBX5 Interactome Reveals a Chromatin Remodeling Network Essential for Cardiac Septation. *Dev Cell*, *36*(3), 262-275. doi:10.1016/j.devcel.2016.01.009
- Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, X., Levasseur, D. N., Theunissen, T. W., & Orkin, S. H. (2006). A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*, *444*(7117), 364-368. doi:10.1038/nature05284
- Wang, Y., Du, X., Zhou, Z., Jiang, J., Zhang, Z., Ye, L., & Hong, H. (2016). A gain-of-function ACTC1 3'UTR mutation that introduces a miR-139-5p target site may be associated with a dominant familial atrial septal defect. *Sci Rep*, *6*, 25404. doi:10.1038/srep25404
- Watanabe, G., Saito, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Fujisawa, K., Morii, N., . . . Narumiya, S. (1996). Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein raphilin as targets of small GTPase Rho. *Science*, *271*(5249), 645-648.
- Wattanapanitch, M., Damkham, N., Potirat, P., Trakarnsanga, K., Janan, M., Y, U. P., . . . Issaragrisil, S. (2018). One-step genetic correction of hemoglobin E/beta-thalassemia patient-derived iPSCs by the CRISPR/Cas9 system. *Stem Cell Res Ther*, *9*(1), 46. doi:10.1186/s13287-018-0779-3
- Watts, D. H., Huang, S., Culnane, M., Kaiser, K. A., Scheuerle, A., Mofenson, L., . . . Cunningham, C. K. (2011). Birth defects among a cohort of infants born to HIV-infected women on antiretroviral medication. *J Perinat Med*, *39*(2), 163-170. doi:10.1515/JPM.2010.139
- Wei, D., Bao, H., Zhou, N., Zheng, G. F., Liu, X. Y., & Yang, Y. Q. (2013). GATA5 loss-of-function mutation responsible for the congenital ventriculoseptal defect. *Pediatr Cardiol*, *34*(3), 504-511. doi:10.1007/s00246-012-0482-6
- Weininger, U., Jakob, R. P., Eckert, B., Schweimer, K., Schmid, F. X., & Balbach, J. (2009). A remote prolyl isomerization controls domain assembly via a hydrogen bonding network. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(30), 12335-12340. doi:10.1073/pnas.0902102106
- Wessels, M. W., & Willems, P. J. (2010). Genetic factors in non-syndromic congenital heart malformations. *Clin Genet*, *78*(2), 103-123. doi:10.1111/j.1399-0004.2010.01435.x
- Wolf, M., & Basson, C. T. (2010). The molecular genetics of congenital heart disease: a review of recent developments. *Curr Opin Cardiol*, *25*(3), 192-197. doi:10.1097/HCO.0b013e328337b4ce
- Wren, C., Birrell, G., & Hawthorne, G. (2003). Cardiovascular malformations in infants of diabetic mothers. *Heart*, *89*(10), 1217-1220. doi:10.1136/heart.89.10.1217
- Wren, C., Richmond, S., & Donaldson, L. (2000). Temporal variability in birth prevalence of cardiovascular malformations. *Heart*, *83*(4), 414-419. doi:10.1136/heart.83.4.414

- Wuriyanghai, Y., Makiyama, T., Sasaki, K., Kamakura, T., Yamamoto, Y., Hayano, M., . . . Horie, M. (2018). Complex aberrant splicing in the induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with long QT syndrome carrying KCNQ1-A344Aspl mutation. *Heart Rhythm*, *15*(10), 1566-1574. doi:10.1016/j.hrthm.2018.05.028
- Xu, Y. J., Di, R. M., Qiao, Q., Li, X. M., Huang, R. T., Xue, S., . . . Yang, Y. Q. (2018). GATA6 loss-of-function mutation contributes to congenital bicuspid aortic valve. *Gene*, *663*, 115-120. doi:10.1016/j.gene.2018.04.018
- Yamamoto, Y., Makiyama, T., Harita, T., Sasaki, K., Wuriyanghai, Y., Hayano, M., . . . Kimura, T. (2017). Allele-specific ablation rescues electrophysiological abnormalities in a human iPS cell model of long-QT syndrome with a CALM2 mutation. *Hum Mol Genet*, *26*(9), 1670-1677. doi:10.1093/hmg/ddx073
- Yamanaka, S. (2007). Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, *1*(1), 39-49. doi:10.1016/j.stem.2007.05.012
- Yang, J., Qiu, H., Qu, P., Zhang, R., Zeng, L., & Yan, H. (2015). Prenatal Alcohol Exposure and Congenital Heart Defects: A Meta-Analysis. *PLoS One*, *10*(6), e0130681. doi:10.1371/journal.pone.0130681
- Ye, L., Wang, J., Beyer, A. I., Teque, F., Cradick, T. J., Qi, Z., . . . Kan, Y. W. (2014). Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Delta32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(26), 9591-9596. doi:10.1073/pnas.1407473111
- Zaragoza, M. V., Lewis, L. E., Sun, G., Wang, E., Li, L., Said-Salman, I., . . . Huang, T. (2004). Identification of the TBX5 transactivating domain and the nuclear localization signal. *Gene*, *330*, 9-18. doi:10.1016/j.gene.2004.01.017
- Zeller, R., Bloch, K. D., Williams, B. S., Arceci, R. J., & Seidman, C. E. (1987). Localized expression of the atrial natriuretic factor gene during cardiac embryogenesis. *Genes Dev*, *1*(7), 693-698. doi:10.1101/gad.1.7.693
- Zhang, P., Tu, B., Wang, H., Cao, Z., Tang, M., Zhang, C., . . . Zhu, W. G. (2014). Tumor suppressor p53 cooperates with SIRT6 to regulate gluconeogenesis by promoting FoxO1 nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(29), 10684-10689. doi:10.1073/pnas.1411026111
- Zhang, X. L., Qiu, X. B., Yuan, F., Wang, J., Zhao, C. M., Li, R. G., . . . Yang, Y. Q. (2015). TBX5 loss-of-function mutation contributes to familial dilated cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *459*(1), 166-171. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.094
- Zhu, H., Kartiko, S., & Finnell, R. H. (2009). Importance of gene-environment interactions in the etiology of selected birth defects. *Clin Genet*, *75*(5), 409-423. doi:10.1111/j.1399-0004.2009.01174.x
- Zhu, L., Vranckx, R., Khau Van Kien, P., Lalande, A., Boisset, N., Mathieu, F., . . . Jeunemaitre, X. (2006). Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nat Genet*, *38*(3), 343-349. doi:10.1038/ng1721

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., & Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*, 32(12), e103. doi:10.1093/nar/gnh101

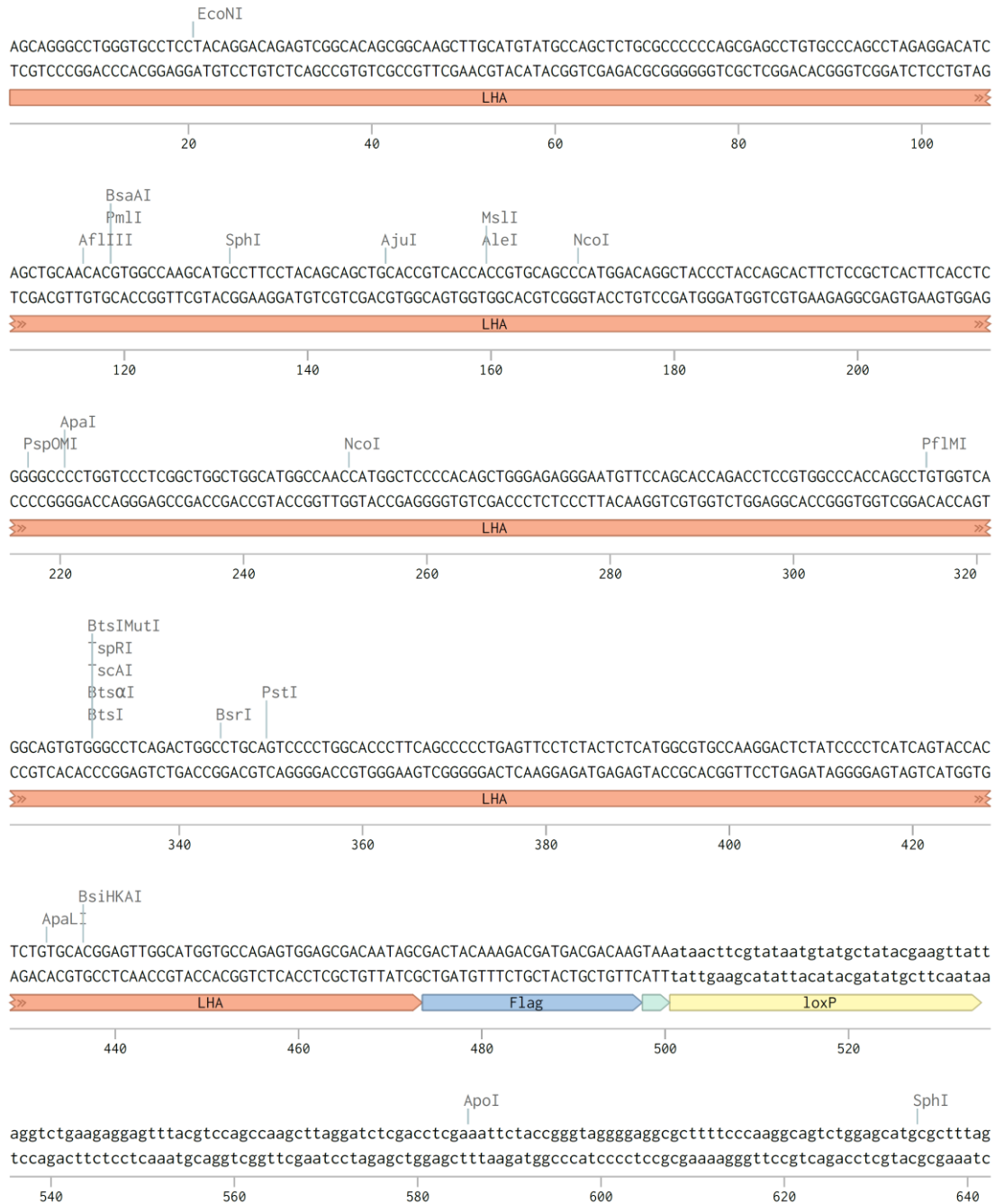
# Supplement

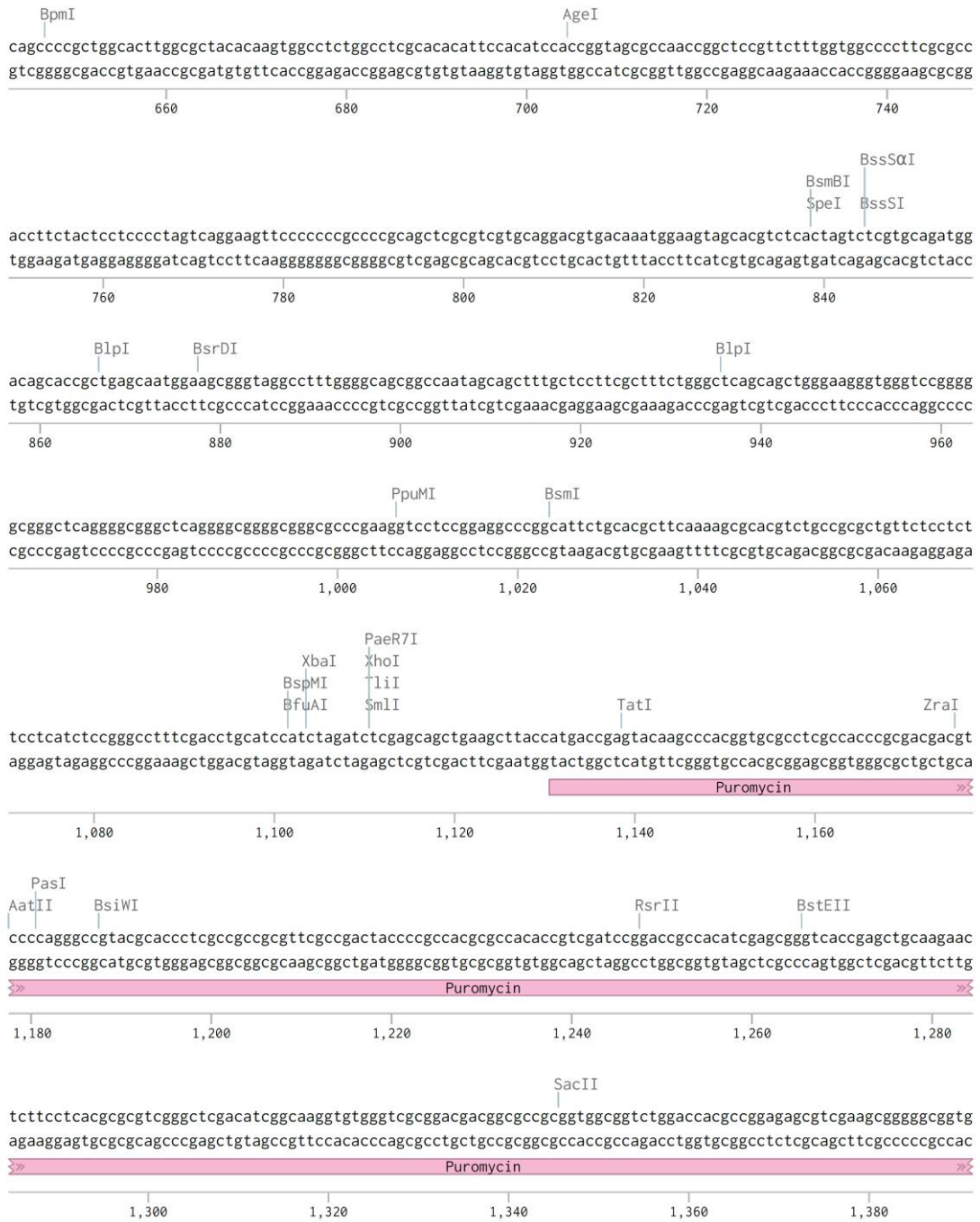
## A Supplement Abbildungen

(from 1-642 bp)

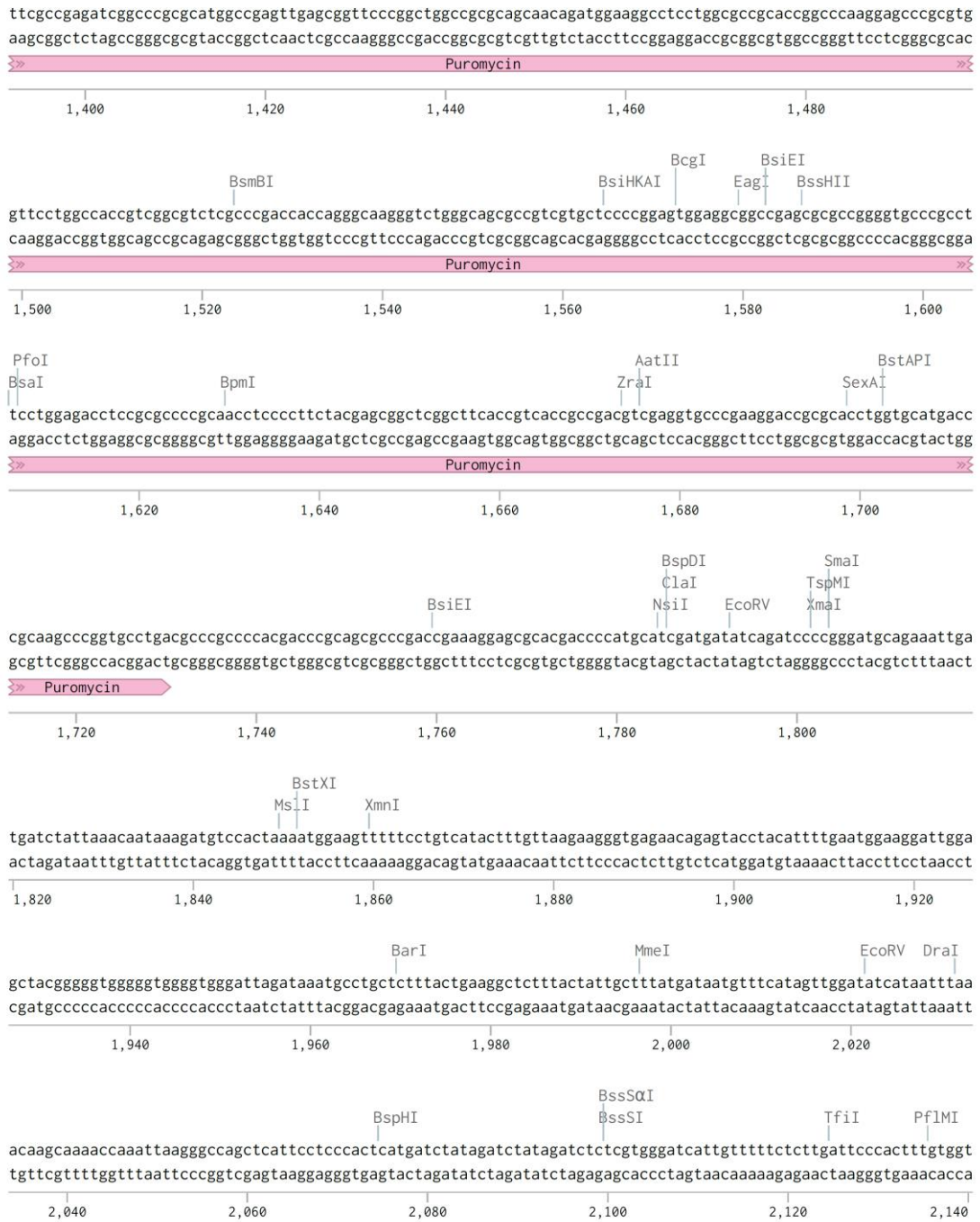
7.3.2018 18:53:05

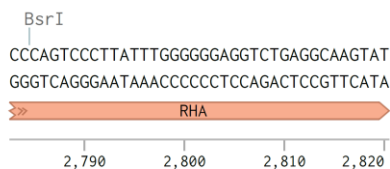
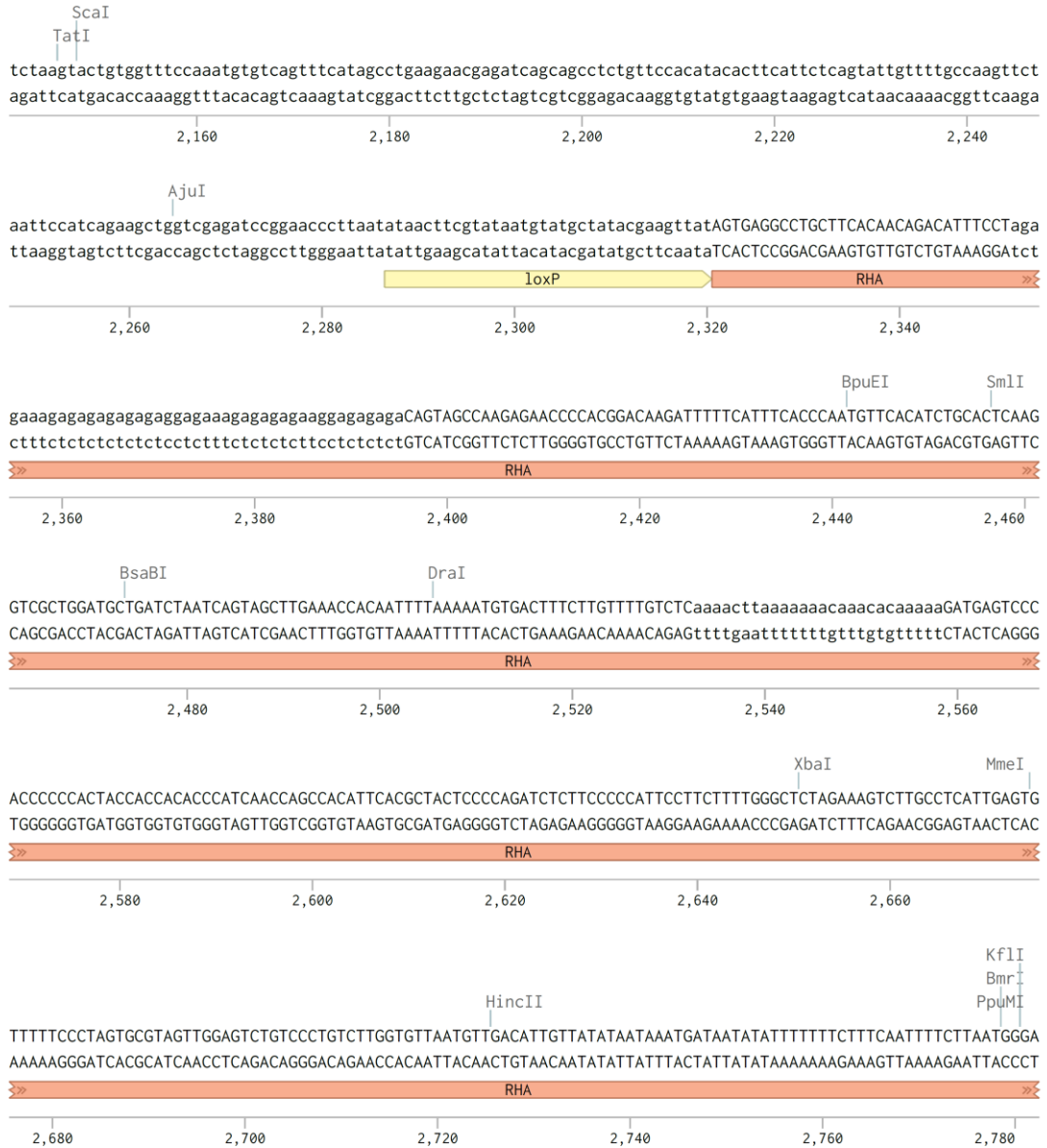
### TBX5 Flag Donorkonstrukt (2820 bp)



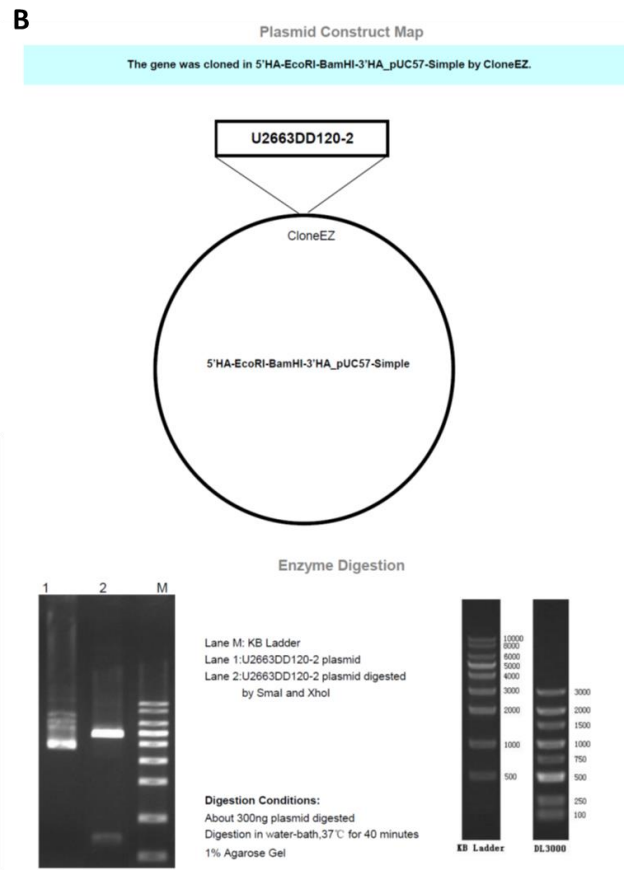
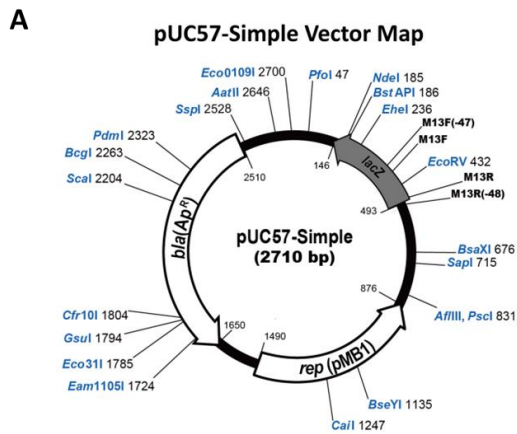








**Abbildung S1: Sequenz des Donorkonstruktes 5'HA-TBX5 Exon 9 Flag-3'HA.** Die Sequenz wurde unter Verwendung des Programms Benchling (<https://benchling.com/>) generiert.



**Abbildung S2: Vektordesign des Donorkonstruktes pUC57-5'HA-TBX5 Exon 9 Flag-3'HA. (A)** pUC57-Simple Vektor Map (Backbone). **(B)** Klonierungsvektor pUC57 Vektor mit Lage der Insertionsstelle des Donorkonstrukts 5'HA-TBX5 Exon 9 Flag-3'HA. **(C)** Kontrollrestriktionsverdau zur Qualitätskontrolle des klonierten Donorkonstruktes.

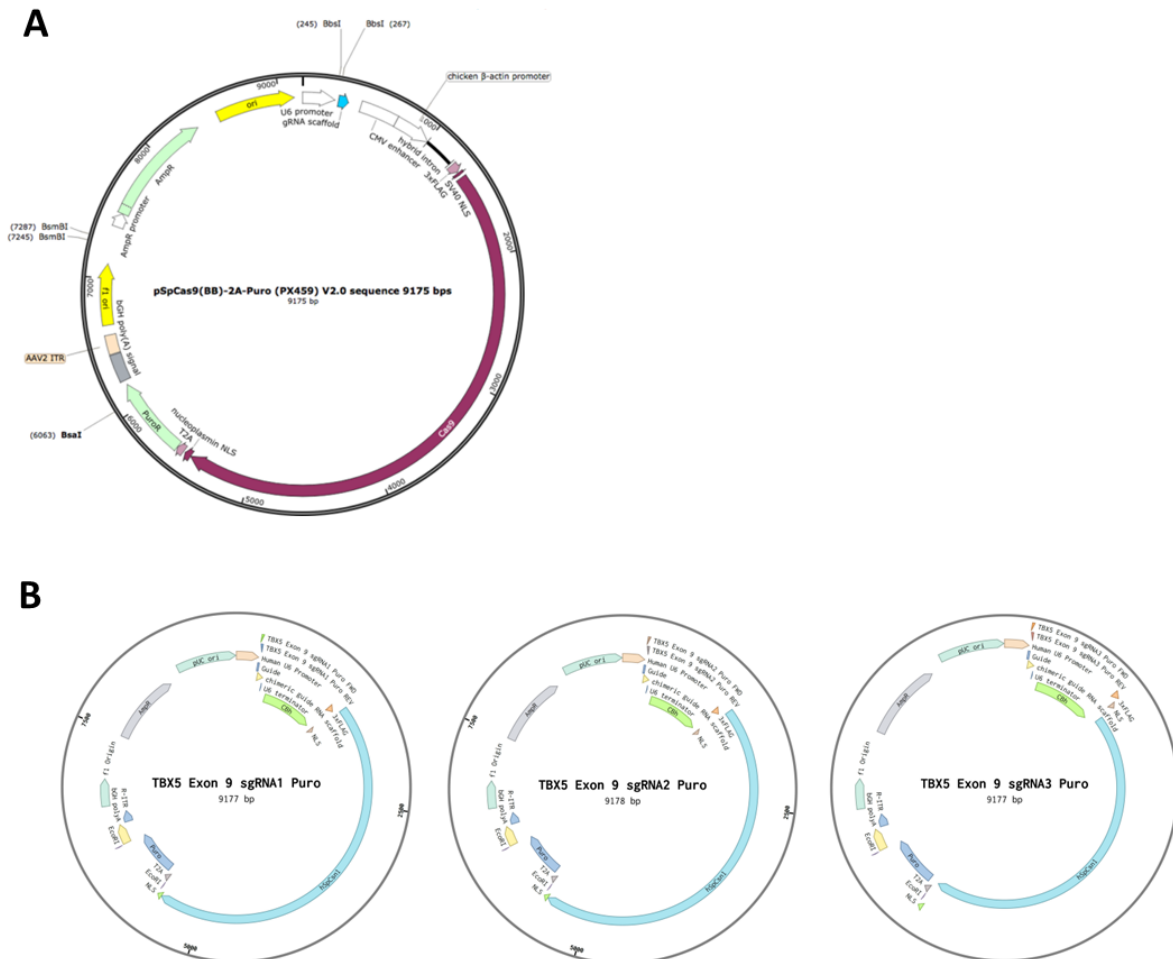
**Sequenz pUC57-5'HA-TBX5 Exon 9 Flag-3'HA (GenScript)**

t c g c g c g t t t c g g t g a t g a c g g t g a a a c c t c t g a c a c a t g c a g c t c c c g g a g a c g g t c a c a g c t t g t c t g t a a g c g g a t  
g c c g g g a g c a g a c a a g c c c g t c a g g g c g c t c a g c g g t g t t g g c g g t g t c g g g g t g g c t t a a c t a t g c g g c a t c a g a  
g c a g a t t g t a c t g a g a g t g c a c c a t a t g c g g t g t g a a a t a c c g c a c a g a t g c g t a a g g a g a a a t a c c g c a t c a g g c g c c  
a t t c g c a t t c a g g t g c g c a a c t g t t g g a a g g g c g a t c g g t g c g g c c t c t t c g c t a t t a c g c c a g c t g g c g a a a g g g  
g g a t g t g c t g c a a g g c g a t t a a g t t g g g t a a c g c c a g g g t t t t c c a g t c a c g a c g t t g t a a a c g a c g c c a g t g a a t t  
g g a g a t c g g t a c t t c g c g a a t g c g t c g a g a t a g c a g g g c c t g g g t g c c t c c t a c a g g a c a g a g t c g g c a c a g c g g c a a g c  
t t g c a t g t a t g c c a g c t c t g c g c c c c c a g c g a g c c t g t g c c c a g c c t a g a g g a c a t c a g c t g c a a c a c g t g g c c a a g c a  
t g c c t t c c t a c a g c a g c t g c a c c g t c a c c a c c g t g c a g c c a t g g a c a g g t a c c c t a c c a g c a c t t c t c c g t c a c t t c  
a c c t c g g g g c c c c t g g t c c c t c g g t g g c t g g c a t g g c c a a c c a t g g c t c c c c a c a g c t g g g a g a g g a a t g t t c c a g c a  
c c a g a c c t c c g t g g c c c a c c a g c c t g t g g t c a g g c a g t g t g g g c c t c a g a c t g g c c t g c a g t c c c c t g g c a c c c t t c a g c  
c c c t g a g t t c c t a c t c t c a t g g c g t g c c a a g g a c t c t a t c c c c t c a t c a g t a c c a c t c t g t g c a c g g a g t t g g c a t g  
g t g c c a g a g t g g a g c g a c a a t a g c g a c t a c a a g g a c g a c g a t g a c a a a t a a a t a a c t t c g t a t a a t g t a t g c t a t a c g a a  
g t t a t t a g g t c t g a a g a g g a g t t t a c g t c c a g c c a a g c t t a g g a t c t c g a c c t c g a a a t t c t a c c g g g t a g g g g a g g c g c  
t t t t c c c a a g g c a g t c t g g a g c a t g c g c t t t a g c a g c c c g c t g g c a c t t g g c g t a c a c a a g t g g c c t c t g g c c t c g c a  
c a c a t t c c a c a t c c a c c g g t a g c g c c a a c c g g t c c g t t c t t t g g t g g c c c c t t c g c g c c a c c t t c t a c t c c c c t a g  
t c a g g a a g t t c c c c c c g c c c c g c a g c t c g c g t c g t g c a g g a c g t g a c a a t g g a a g t a g a c g t c t c a c t a g t c t c g t g  
c a g a t g g a c a g c a c c g c t g a g c a a t g g a a g c g g t a g g c c t t t g g g g c a g c g g c c a a t a g c a g c t t t g c t c c t t c g c t t t  
c t g g g c t c a g c a g c t g g g a a g g t g g g t c c g g g g c g g g c t c a g g g g c g g g c t c a g g g g c g g g g c g c c c g a a g g t c  
c t c c g g a g g c c c g g a t t c t g c a c g c t t c a a a a g c g a c g t c t g c c g c g t g t t c t c t c t c t c a t c t c c g g g c c t t t  
c g a c c t g c a t c c a t c t a g a t c t c g a g c a g c t g a a g c t t a c c a t g a c c g a g t a c a a g c c a c g g t g c g c c t c g c c a c c g c  
g a c g a c g t c c c c a g g g c c g t a c g c a c c c t c g c c g c c g t t c g c c g a c t a c c c c g c c a c g c c a c a c c g t c g a t c c g g a  
c g c c a c a t c g a g c g g t c a c c g a g c t g c a a g a a c t c t t c c t c a c g c g c t c g g g c t c g a c a t c g g c a a g g t g t g g g t c g  
c g g a c g a c g g c g c c g g t g g c g g t c t g g a c c a g c c g g a g a g c t c g a a g c g g g g c g g t g t t c g c c g a g a t c g g c c c g  
c g c a t g g c c g a g t t g a g c g g t t c c c g g t g g c c g c g a g c a a c a g a t g g a a g g c c t c t g g c g c c a c c g g c c c a a g g a  
g c c c g c g t g g t t c t g g c a c c g t c g g c g t c t c g c c c g a c c a c c a g g g c a a g g g t c t g g g c a g c c c g t c g t g c t c c c g  
g a g t g g a g g c g g c c g a g c g c c g g g t g c c c g c t t c t g g a g a c c t c c g c g c c c g c a a c c t c c c t t c t a c g a g c g g  
c t c g g c t t c a c c g t c a c c g c g a c g t c g a g g t g c c c g a a g g a c c g c g a c c t g g t g c a t g a c c g c a a g c c c g g t g c c t g  
a c g c c c g c c c a c g a c c c g c a g c g c c c g a c c g a a a g g a g c g c a c g a c c c a t g c a t c g a t g a t a t c a g a t c c c c g g g a t g  
c a g a a a t t g a t g a t c t a t t a a c a a t a a a g a t g t c c a c t a a a a t g g a a g t t t t t c c t g t c a t a c t t t g t t a a g a a g g t g  
a g a a c a g a g t a c c t a c a t t t t g a a t g g a a g g a t t g g a g c t a c g g g g t g g g g t g g g g t g g g a t t a g a t a a a t g c c t g c t  
c t t t a c t g a a g g c t c t t t a c t a t t g c t t t a t g a t a a t g t t t c a t a g t t g g a t a t c a t a a t t t a a c a a g c a a a c c a a a t  
t a a g g g c c a g c t c a t t c c t c c c a c t c a t g a t c t a t a g a t c t a t a g a t c t c t c g t g g g a t c a t t g t t t t t c t c t t g a t t c c

cactttgtggttctaagtactgtggtttccaaatgtgtcagtttcatagcctgaagaacgagatcagcagcctctgttcc  
acatacacttcattctcagttattgttttgccaagttctaattccatcagaagctggctcgagatccggaacccttaatata  
acttcgtataatgtatgctatacgaagttatagtgaggcctgcttcacaacagacatttcttagagaaagagagagagag  
aggagaaagagagagaaggagagagacagtagccaagagaacccacgacaagatttttcatttcaccaatgttcaca  
tctgcactcaaggtcgctggatgctgatctaatacagtagcttgaaaccacaatttttaaaaatgtgactttctgttttgt  
ctcaaaacttaaaaaacaaacacaaaagatgagtcacccccactaccaccacaccatcaaccagccacattcac  
gctactccccagatctcttccccattccttcttttgggctctagaaagtcttgccctcattgagtgttttccctagtgc  
gtagttggagtctgtccctgtcttgggtgtaatgttgacattggtatataataaatgataatatattttttctttcaat  
tttcttaatgggaccagtccttatttggggggaggtctgaggcaagtatatcggatgccgggaccgacgagtgagag  
gctgcaagcgagcttgccgtaatcatggcatagctgtttcctgtgtgaaattggtatccgctcacaattccacacaac  
atcagagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtcctaataagtgagtgactcaactcacattaattgogttgcgctcact  
gcccgtttccagtcgggaaacctgctgctgacagctgcattaatgaatcggccaacgcgaggggagagggcgtttgcgta  
ttgggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgcgctcggctcgttcggctgcggcgagcgggtatcagctcactca  
aaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccag  
gaaccgtaaaaaggccggttgctggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaataatcgacgctcaa  
gtcagaggtggcgaaacccgacaggaactataaagataaccagggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgtt  
ccgacctgcccgttacoggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtag  
gtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagccgctgcgct  
tatccggtaactatcgtcttgagtcacaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggatt  
agcagagcgaggtatgtaggcgggtgctacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagatt  
tggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccaccgctg  
gtagcgggtggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttct  
acggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggtttttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcaccta  
gatccttttaataaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtataatgagtaaaacttggctgacagttaccaatgct  
taatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgctcgtgtagataact  
acgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataaccgagacccacgctcaccggctccagatttatc  
agcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgctccatccagctctattaatt  
gttgcgggaagctagagtaagtagttcggcagttaatagtttgcgcaacggttggccattgctacaggcatcgtgggtg  
tcacgctcgtcgtttggatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggttg  
caaaaaagcggtagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgagtggtatcactcatggttatgg  
cagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattc  
tgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttggccggcgtcaatacgggataataaccgcccacatagcagaacttt  
aaaagtgctcatcattggaacgcttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctggtgagatccagttcagatg

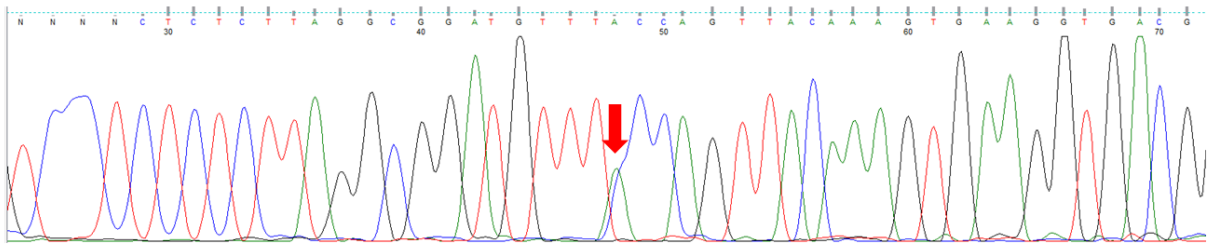
aaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaa  
aatgccgcaaaaaaggggaataagggcgacacggaaatggtgaatactcatactcttcttttcaatattattgaagcat  
ttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaaatgatttagaaaaataaacaatatagggggtccgcgcacat  
ttccccgaaaagtgccacctgacgtctaagaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgagg  
ccctttcgtc

**Abbildung S3: Qualitätskontrolle.** Sequenzierung und Verifizierung der Sequenz des Donorkonstrukts 5'HA-TBX5 Exon 9 Flag-3'HA im pUC67-Simple Vektor (GenScript).

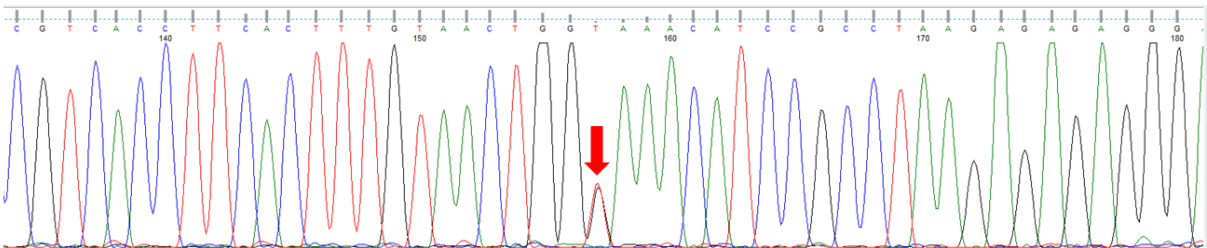


**Abbildung S4: Karte des Vektors für die Klonierung der sgRNAs.** (A) Vektor pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0 Vektor (Addgene). (B) Lage der sgRNA1, 2 und 3 im pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0 Vektor.

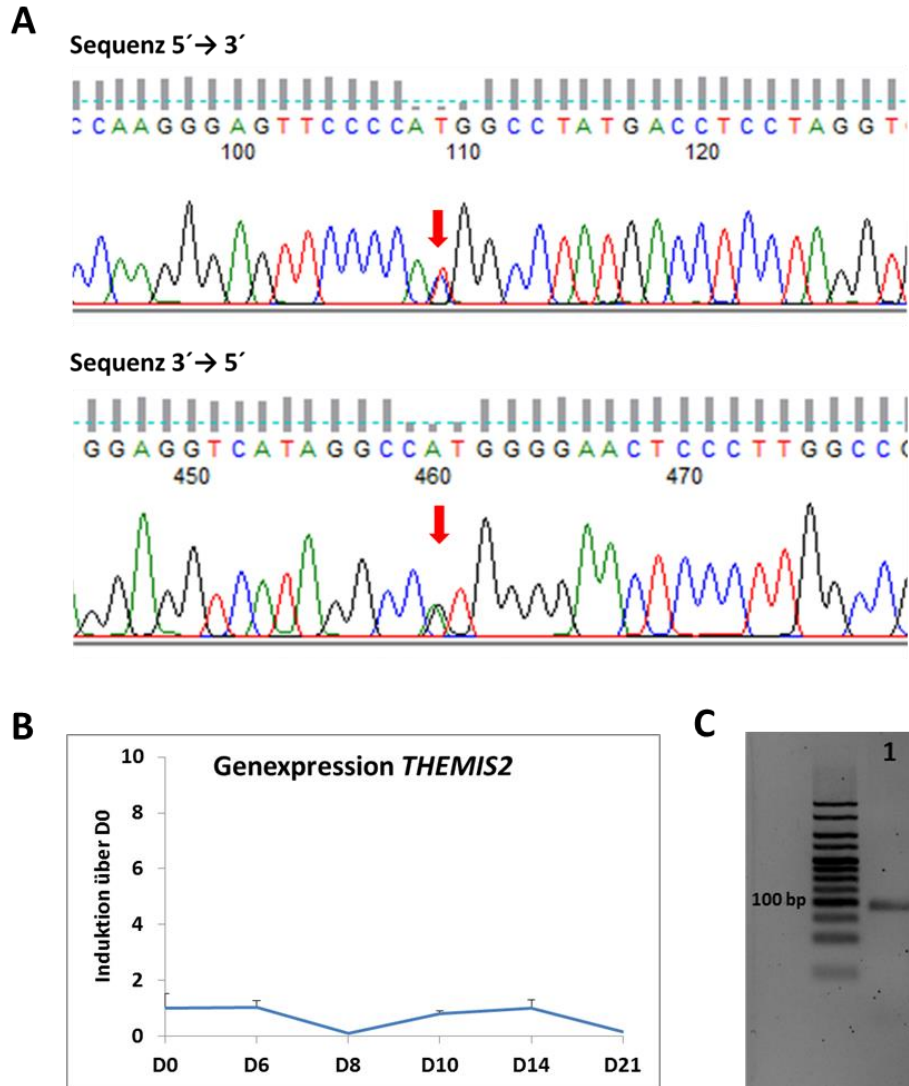
Sequenz 5' → 3'



Sequenz 3' → 5'

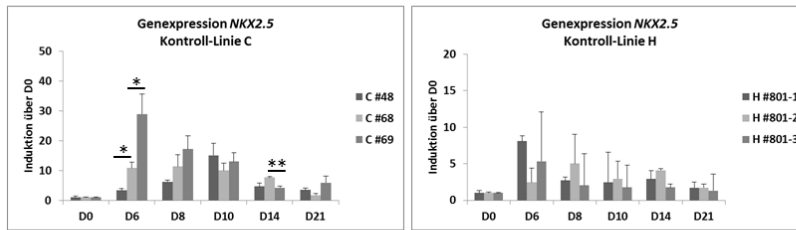
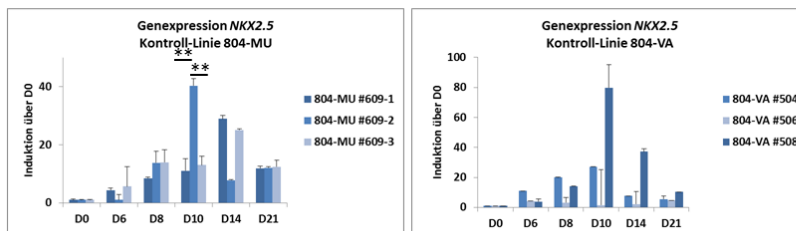
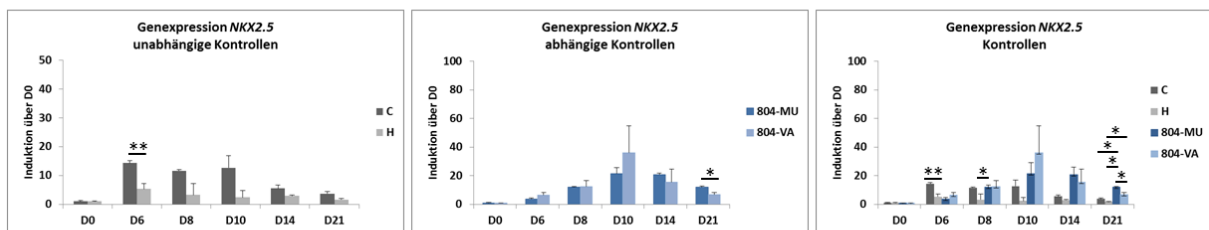
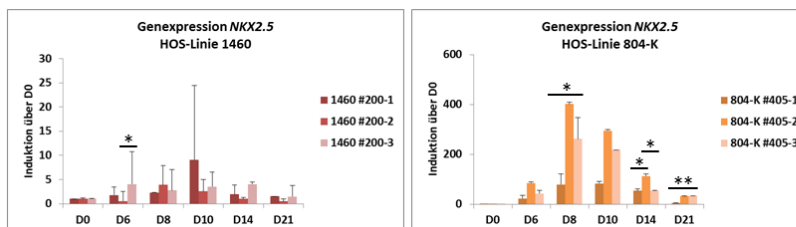


**Abbildung S5: Identifikation der *TBX5* Mutation in den iPS Zellen des HOS Indexpatienten 1460.** Chromatogramm des Exons 4 der iPS Zellen des Indexpatienten 1460. Identifikation der *de novo* *TBX5* Mutation c.920\_C>A des Indexpatienten 1460 in den generierten iPS Zellen. Die gefundene *de novo* Mutation führt zum Aminosäureaustausch Pro85Thr. Dargestellt sind die Chromatogramme der Sequenzierungen in 5' → 3' und in 3' → 5' Richtung gezeigt. Rote Pfeile markieren die gefundene Mutation.

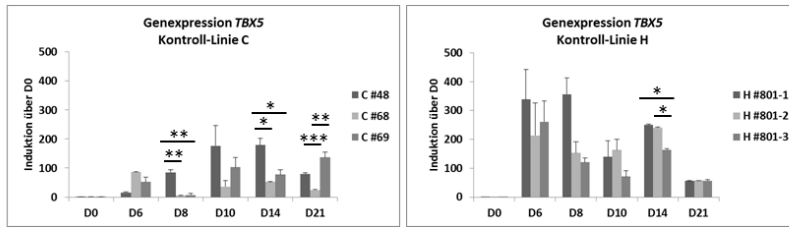
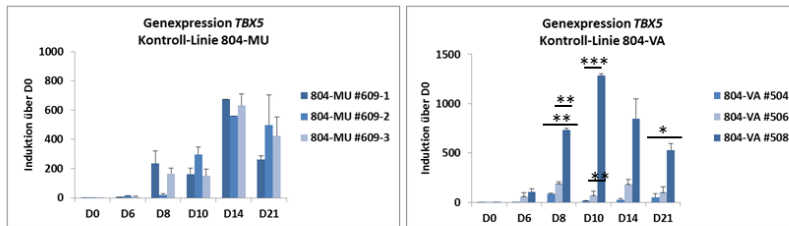
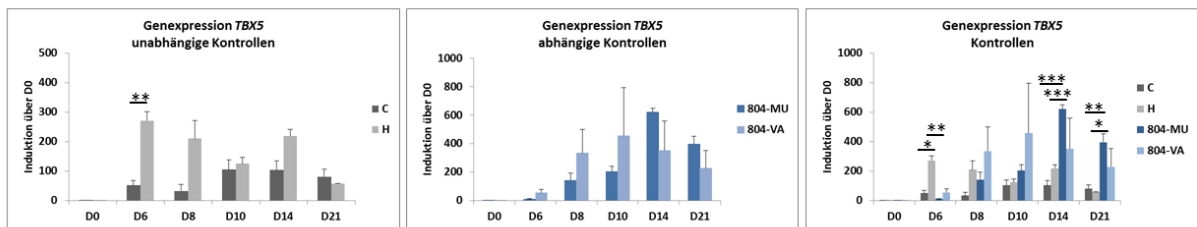
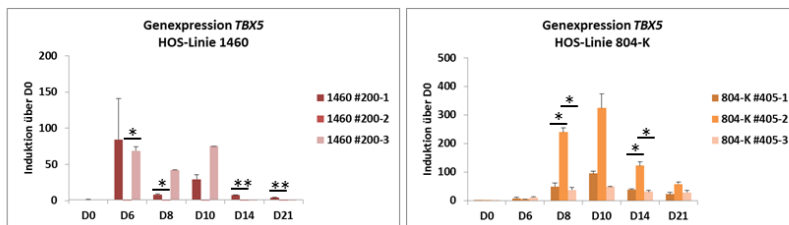


**Abbildung S6: Verifikation der *de novo* Mutation im *THEMIS2* und Genexpression von *THEMIS2*.** (A) Chromatogramm des Exons 4 der iPS Zellen der HOS Indexpatientin 804. Identifikation der *de novo* Mutation c.998\_C>T der Indexpatientin 804 in den generierten iPS Zellen. Die gefundene *de novo* Mutation führt zum Aminosäureaustausch Thr333Met. (B) Genexpressionsanalyse der gerichteten Differenzierung von iPS Zellen einer Kontrolle für humanes *THEMIS2* (NM\_001286115). Dargestellt ist die Induktion von *THEMIS2* über Tag D0 nach Normalisierung mit *ACTB*. (C) Geldokumentation des amplifizierten Produkts *THEMIS2* (Spur1) und die Negativkontrolle (Spur 2). Als Marker zur Bestimmung der Größe der Amplifikationsprodukte wurde der Quantitas DNA Marker 25 - 500bp verwendet.

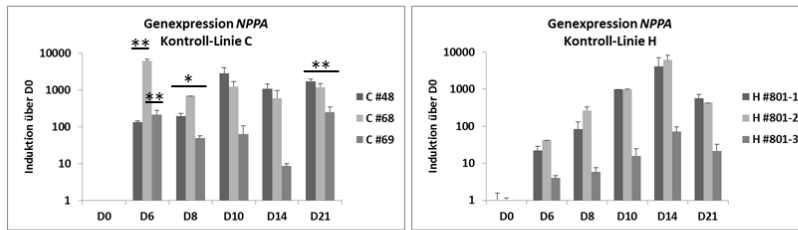
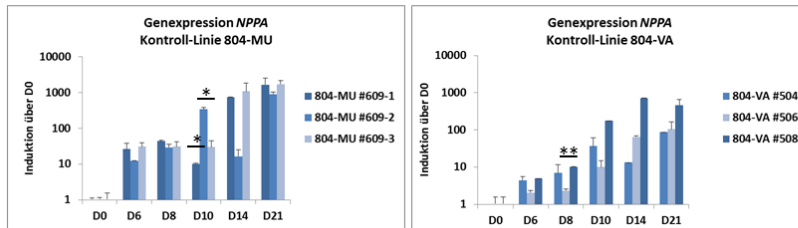
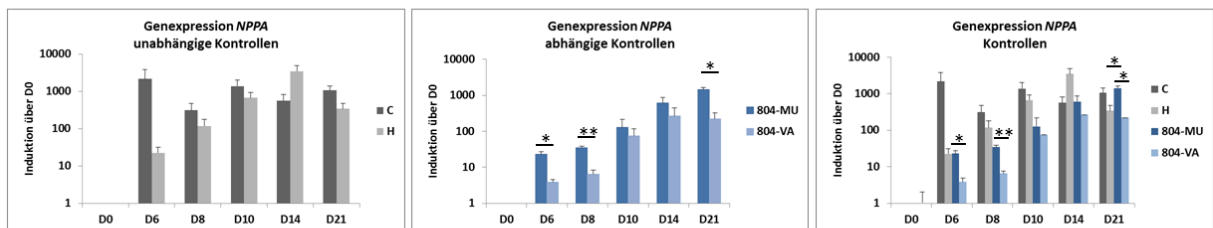
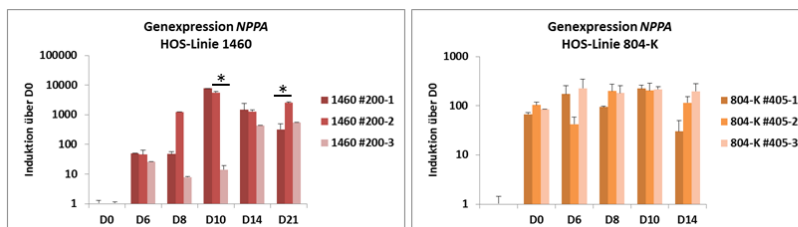


**A****B****C****D**

**Abbildung S7: Induktion von *NKX2.5* in der spontanen Differenzierung. (A)** Vergleich der Differenzierungen der unabhängigen Kontrollen C und H. **(B)** Vergleich der Differenzierungen der abhängigen Kontrollen 804-MU und 804-VA. **(C)** Vergleich der unabhängigen, abhängigen Kontrollen und aller vier verwendeten Kontrollen als Mittelwert der einzelnen Differenzierung. **(D)** Vergleich der drei Differenzierungen der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K. Die Genexpression ist als n-fache Genexpression über Tag D0 nach Normalisierung durch *ACTB* gezeigt. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Signifikanzen: \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ .

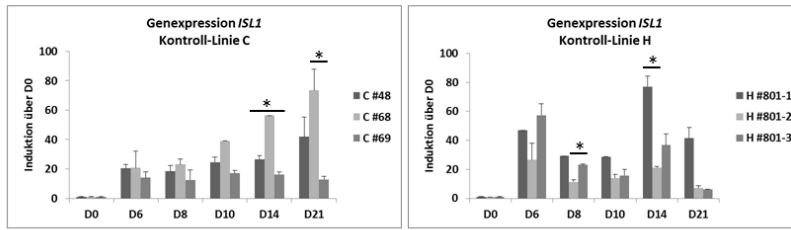
**A****B****C****D**

**Abbildung S8: Induktion von *TBX5* in der spontanen Differenzierung. (A)** Vergleich der Differenzierungen der unabhängigen Kontrollen C und H. **(B)** Vergleich der Differenzierungen der abhängigen Kontrollen 804-MU und 804-VA. **(C)** Vergleich der unabhängigen, abhängigen Kontrollen und aller vier verwendeten Kontrollen als Mittelwert der einzelnen Differenzierung. **(D)** Vergleich der drei Differenzierungen der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K. Die Genexpression ist als n-fache Genexpression über Tag D0 nach Normalisierung durch *ACTB* gezeigt. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Signifikanzen: \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ .

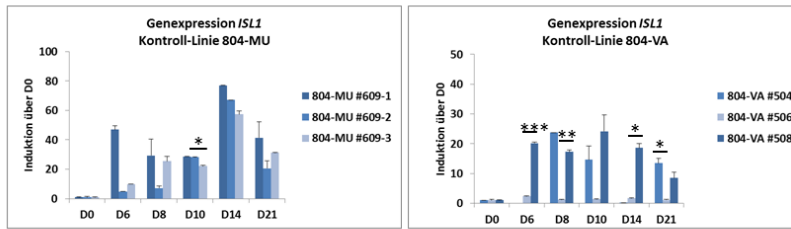
**A****B****C****D**

**Abbildung S9: Induktion von *NPPA* in der spontanen Differenzierung. (A)** Vergleich der Differenzierungen der unabhängigen Kontrollen C und H. **(B)** Vergleich der Differenzierungen der abhängigen Kontrollen 804-MU und 804-VA. **(C)** Vergleich der unabhängigen, abhängigen Kontrollen und aller vier verwendeten Kontrollen als Mittelwert der einzelnen Differenzierung. **(D)** Vergleich der drei Differenzierungen der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K. Die Genexpression ist als n-fache Genexpression über Tag D0 nach Normalisierung durch *ACTB* gezeigt. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Signifikanzen: \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ .

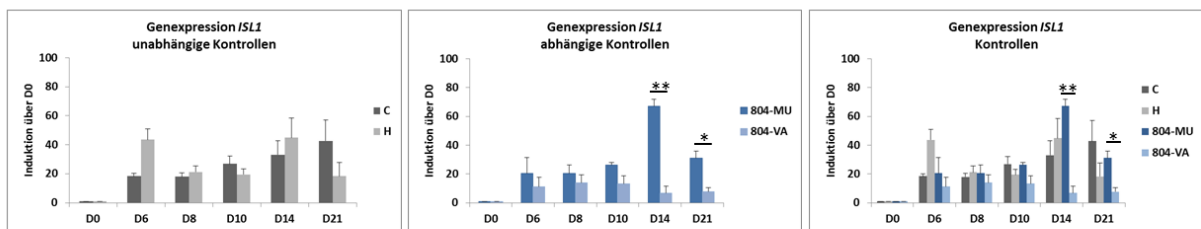
**A**



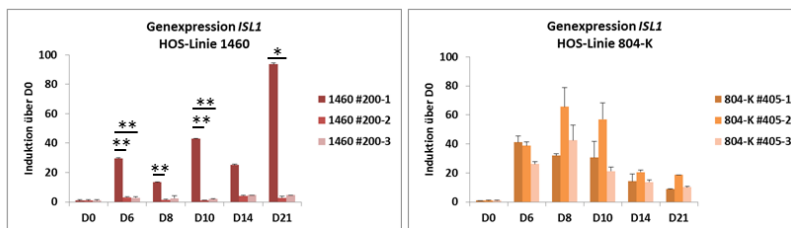
**B**



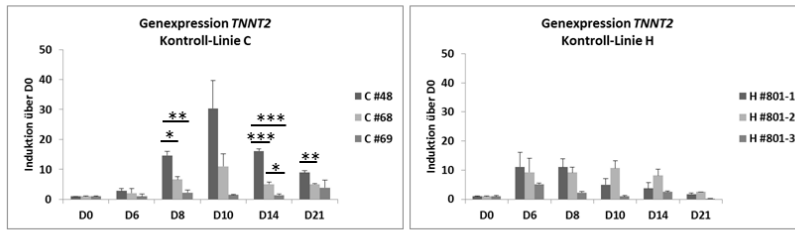
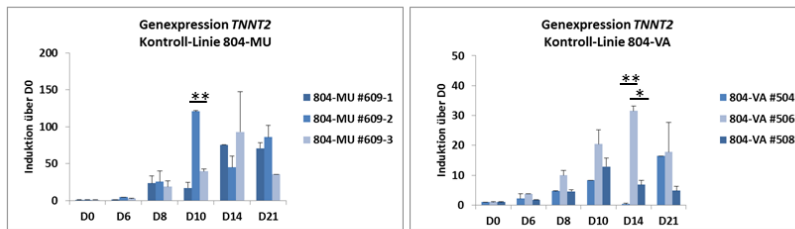
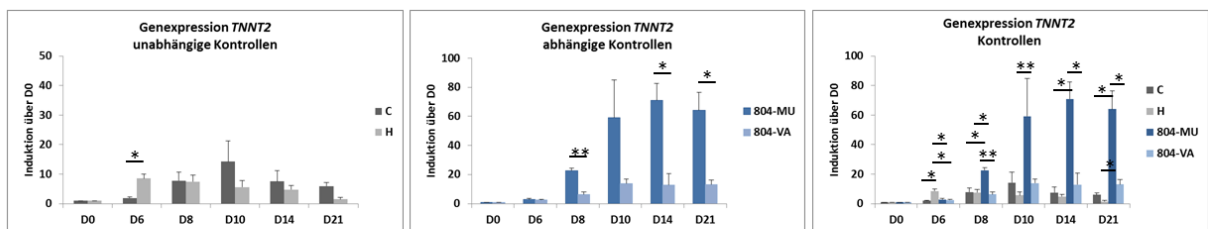
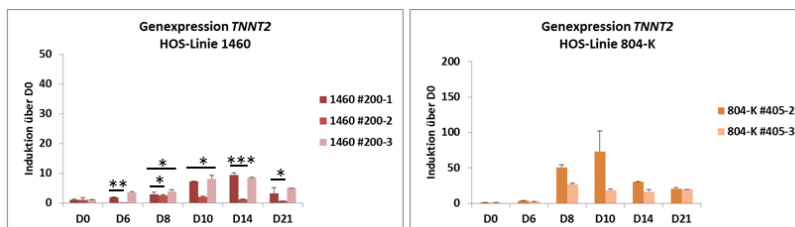
**C**



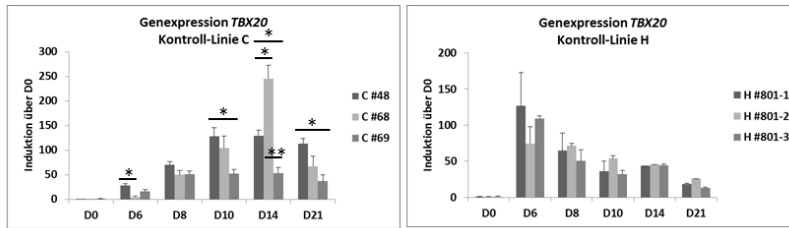
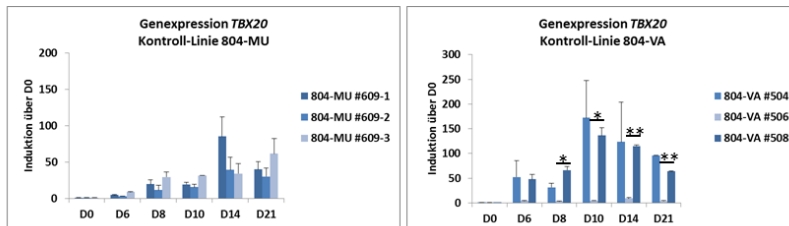
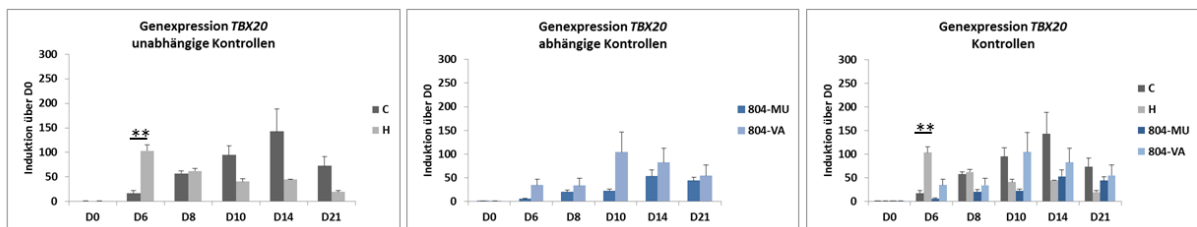
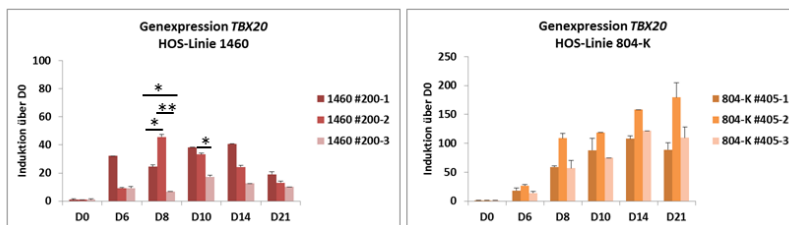
**D**



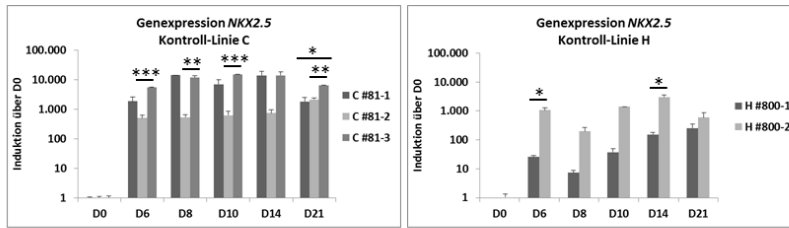
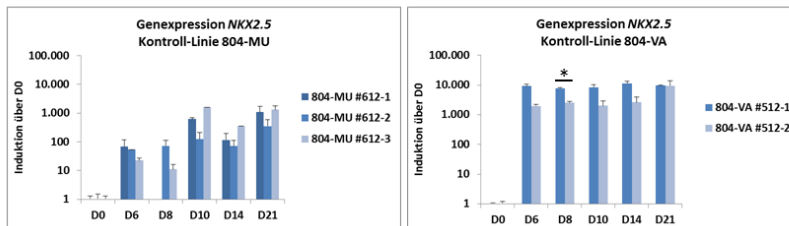
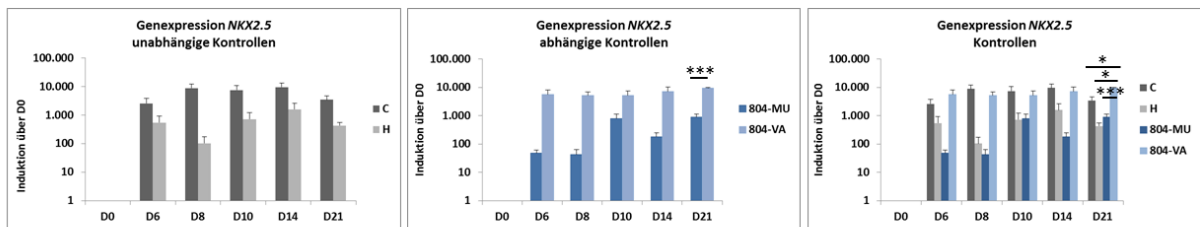
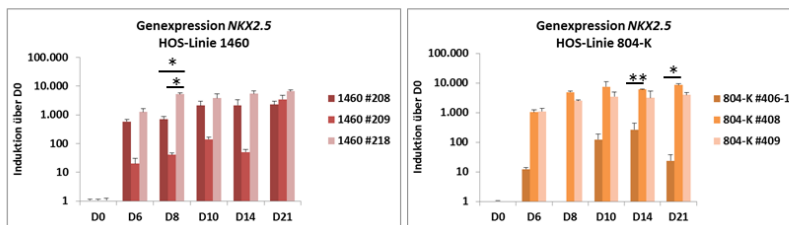
**Abbildung S10: Induktion von *ISL1* in der spontanen Differenzierung**(A) Vergleich der Differenzierungen der unabhängigen Kontrollen C und H. (B) Vergleich der Differenzierungen der abhängigen Kontrollen 804-MU und 804-VA. (C) Vergleich der unabhängigen, abhängigen Kontrollen und aller vier verwendeten Kontrollen als Mittelwert der einzelnen Differenzierung. (D) Vergleich der drei Differenzierungen der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K. Die Genexpression ist als n-fache Genexpression über Tag D0 nach Normalisierung durch *ACTB* gezeigt. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Signifikanzen: \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ .

**A****B****C****D**

**Abbildung S11: Induktion von *TNNT2* in der spontanen Differenzierung. (A)** Vergleich der Differenzierungen der unabhängigen Kontrollen C und H. **(B)** Vergleich der Differenzierungen der abhängigen Kontrollen 804-MU und 804-VA. **(C)** Vergleich der unabhängigen, abhängigen Kontrollen und aller vier verwendeten Kontrollen als Mittelwert der einzelnen Differenzierung. **(D)** Vergleich der drei Differenzierungen der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K. Die Genexpression ist als n-fache Genexpression über Tag D0 nach Normalisierung durch *ACTB* gezeigt. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Signifikanzen: \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ .

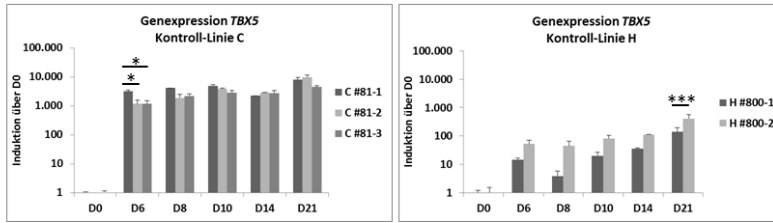
**A****B****C****D**

**Abbildung S12: Induktion von *TBX20* in der spontanen Differenzierung. (A)** Vergleich der Differenzierungen der unabhängigen Kontrollen C und H. **(B)** Vergleich der Differenzierungen der abhängigen Kontrollen 804-MU und 804-VA. **(C)** Vergleich der unabhängigen, abhängigen Kontrollen und aller vier verwendeten Kontrollen als Mittelwert der einzelnen Differenzierung. **(D)** Vergleich der drei Differenzierungen der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K. Die Genexpression ist als n-fache Genexpression über Tag D0 nach Normalisierung durch *ACTB* gezeigt. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Signifikanzen: \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ .

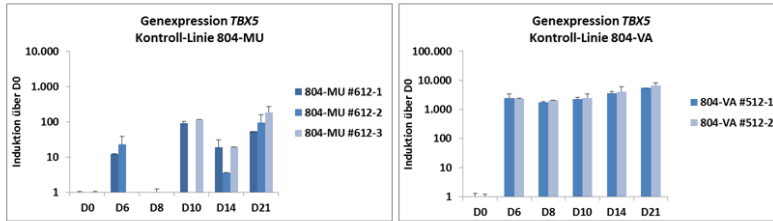
**A****B****C****D**

**Abbildung S13: Induktion von *NKX2.5* in der gerichteten Differenzierung. (A)** Vergleich der Differenzierungen der unabhängigen Kontrollen C und H. **(B)** Vergleich der Differenzierungen der abhängigen Kontrollen 804-MU und 804-VA. **(C)** Vergleich der unabhängigen, abhängigen Kontrollen und aller vier verwendeten Kontrollen als Mittelwert der einzelnen Differenzierung. **(D)** Vergleich der drei Differenzierungen der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K. Die Genexpression ist als n-fache Genexpression über Tag D0 nach Normalisierung durch *ACTB* gezeigt. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Signifikanzen: \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ .

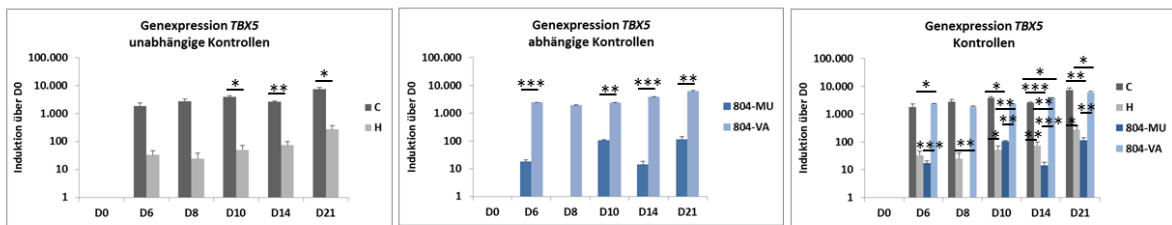
**A**



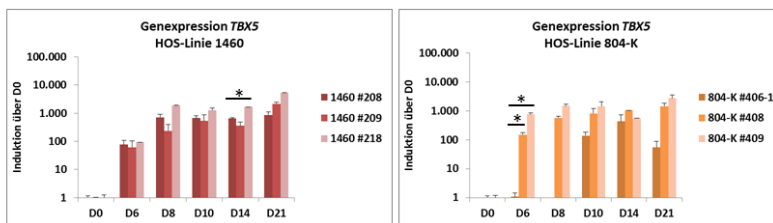
**B**



**C**

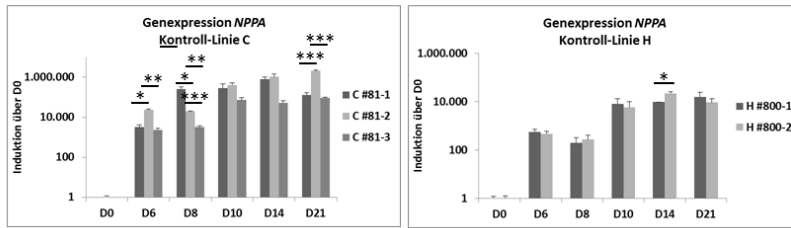
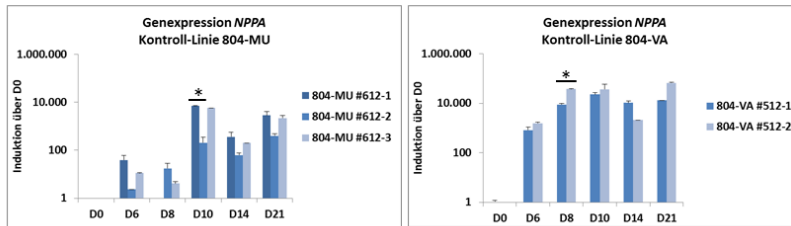
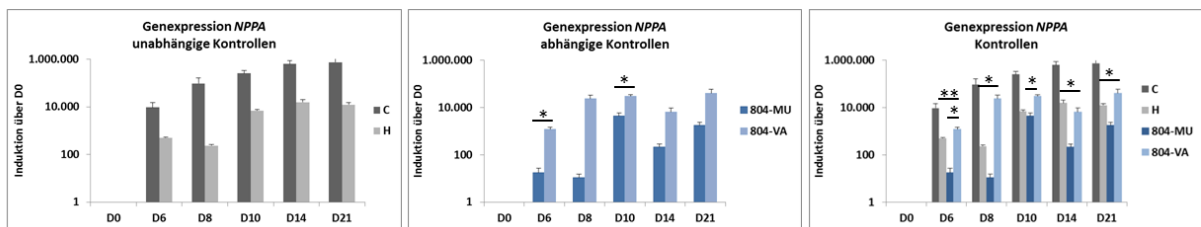
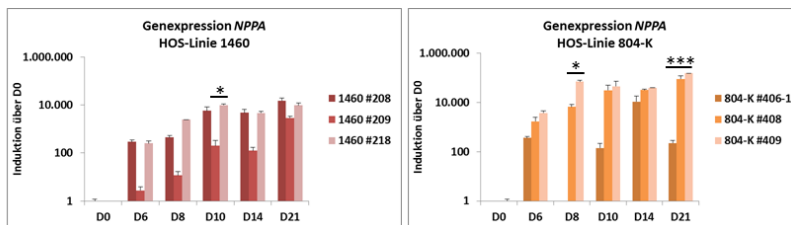


**D**



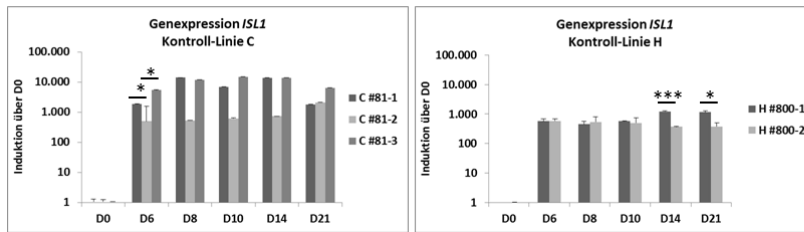
**Abbildung S14: Induktion von *TBX5* in der gerichteten Differenzierung. (A)** Vergleich der Differenzierungen der unabhängigen Kontrollen C und H. **(B)** Vergleich der Differenzierungen der abhängigen Kontrollen 804-MU und 804-VA. **(C)** Vergleich der unabhängigen, abhängigen Kontrollen und aller vier verwendeten Kontrollen als Mittelwert der einzelnen Differenzierung. **(D)** Vergleich der drei Differenzierungen der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K. Die Genexpression ist als n-fache Genexpression über Tag D0 nach Normalisierung durch *ACTB* gezeigt. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Signifikanzen: \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ .



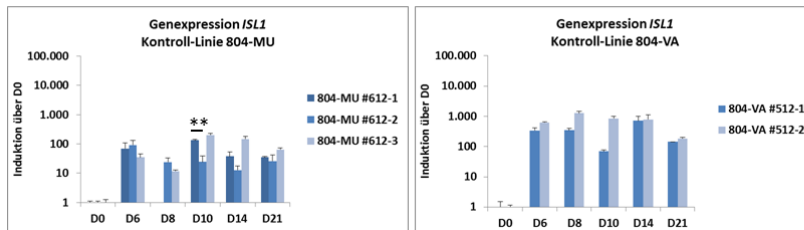
**A****B****C****D**

**Abbildung S15: Induktion von *NPPA* in der gerichteten Differenzierung. (A)** Vergleich der Differenzierungen der unabhängigen Kontrollen C und H. **(B)** Vergleich der Differenzierungen der abhängigen Kontrollen 804-MU und 804-VA. **(C)** Vergleich der unabhängigen, abhängigen Kontrollen und aller vier verwendeten Kontrollen als Mittelwert der einzelnen Differenzierung. **(D)** Vergleich der drei Differenzierungen der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K. Die Genexpression ist als n-fache Genexpression über Tag D0 nach Normalisierung durch *ACTB* gezeigt. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Signifikanzen: \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ .

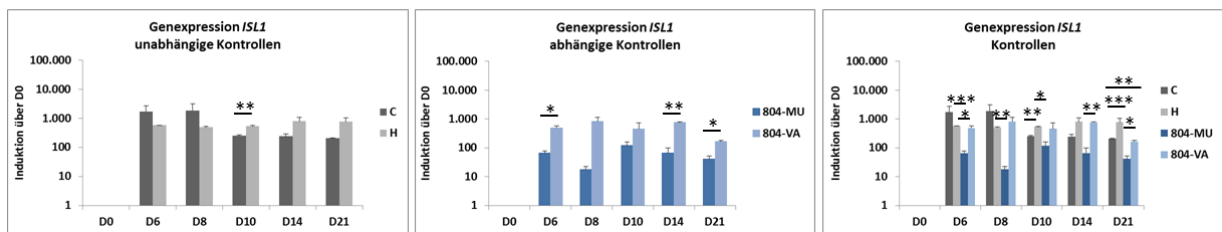
**A**



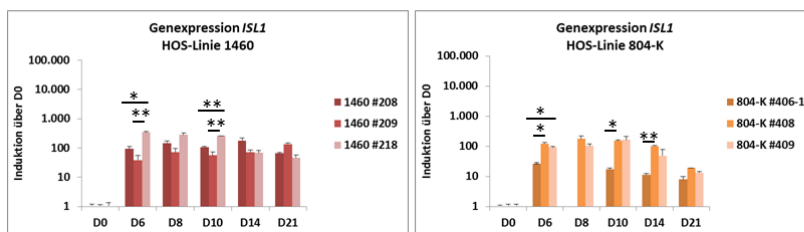
**B**



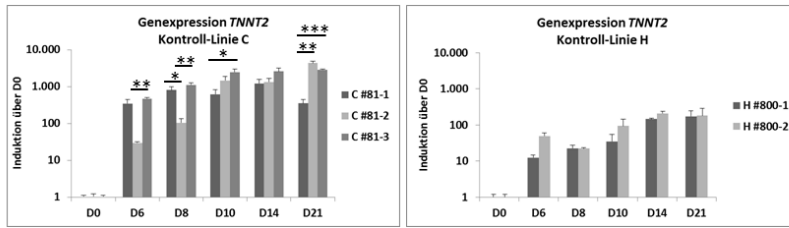
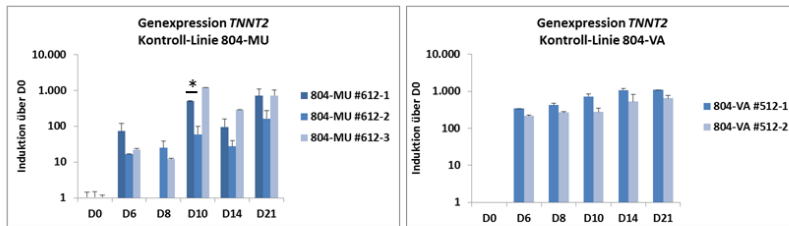
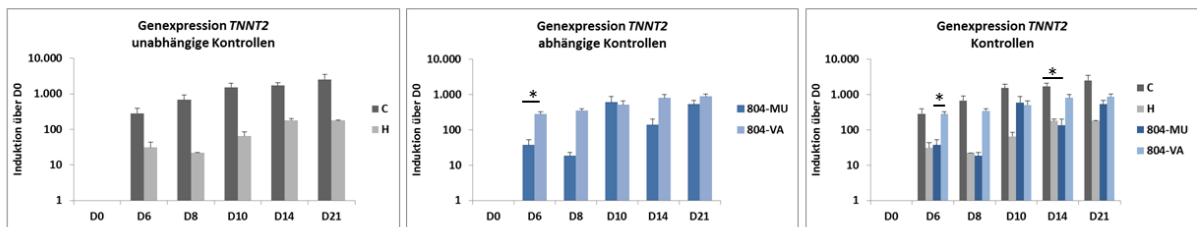
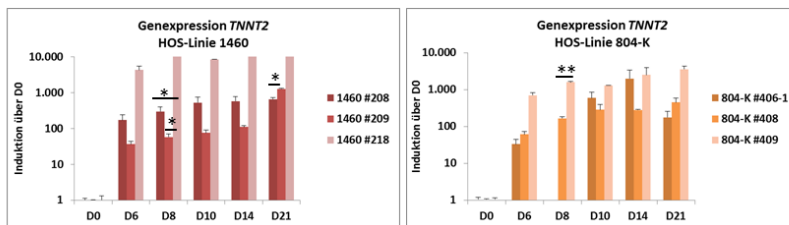
**C**



**D**

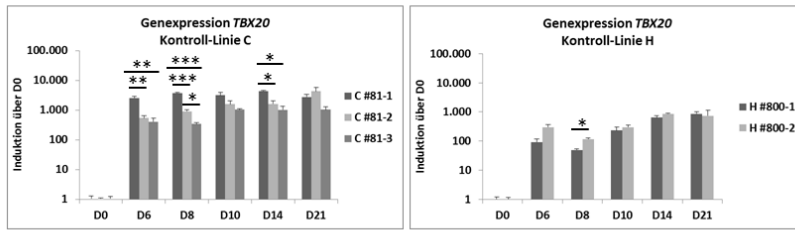


**Abbildung S16: Induktion von *ISL1* in der gerichteten Differenzierung. (A)** Vergleich der Differenzierungen der unabhängigen Kontrollen C und H. **(B)** Vergleich der Differenzierungen der abhängigen Kontrollen 804-MU und 804-VA. **(C)** Vergleich der unabhängigen, abhängigen Kontrollen und aller vier verwendeten Kontrollen als Mittelwert der einzelnen Differenzierung. **(D)** Vergleich der drei Differenzierungen der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K. Die Genexpression ist als n-fache Genexpression über Tag D0 nach Normalisierung durch *ACTB* gezeigt. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Signifikanzen: \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ .

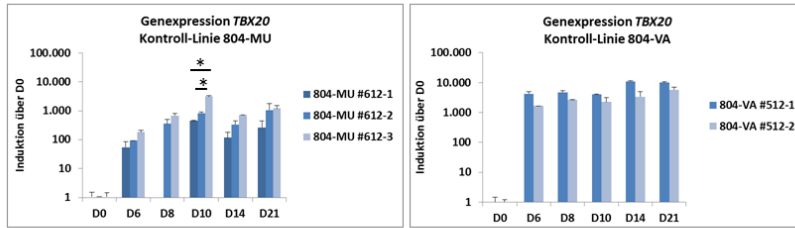
**A****B****C****D**

**Abbildung S17: Induktion von *TNNT2* in der gerichteten Differenzierung. (A)** Vergleich der Differenzierungen der unabhängigen Kontrollen C und H. **(B)** Vergleich der Differenzierungen der abhängigen Kontrollen 804-MU und 804-VA. **(C)** Vergleich der unabhängigen, abhängigen Kontrollen und aller vier verwendeten Kontrollen als Mittelwert der einzelnen Differenzierung. **(D)** Vergleich der drei Differenzierungen der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K. Die Genexpression ist als n-fache Genexpression über Tag D0 nach Normalisierung durch *ACTB* gezeigt. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Signifikanzen: \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$ .

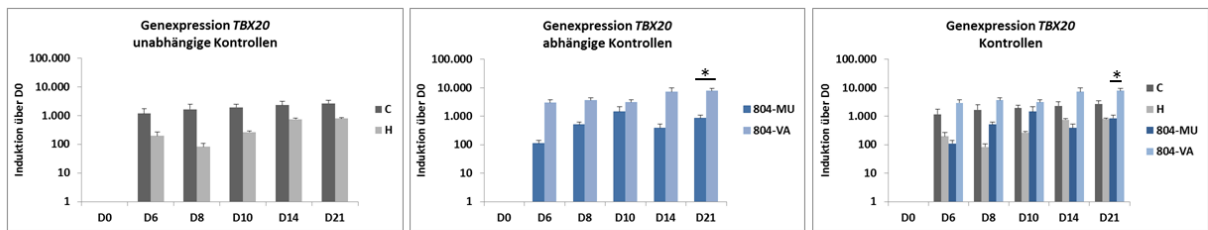
**A**



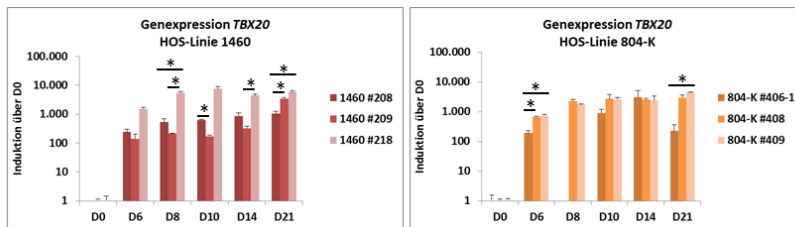
**B**



**C**



**D**



**Abbildung S18: Induktion von *TBX20* in der gerichteten Differenzierung. (A)** Vergleich der Differenzierungen der unabhängigen Kontrollen C und H. **(B)** Vergleich der Differenzierungen der abhängigen Kontrollen 804-MU und 804-VA. **(C)** Vergleich der unabhängigen, abhängigen Kontrollen und aller vier verwendeten Kontrollen als Mittelwert der einzelnen Differenzierung. **(D)** Vergleich der drei Differenzierungen der HOS Indexpatienten 1460 und 804-K. Die Genexpression ist als n-fache Genexpression über Tag D0 nach Normalisierung durch *ACTB* gezeigt. Abweichungen in der Genexpression sind als Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Signifikanzen: \*:  $p < 0,05$ .

Gen	1460, spontane Differenzierung	1460, gerichtete Differenzierung	804-K, spontane Differenzierung	804-K, gerichtete Differenzierung
<i>NKX2.5</i>	↓	↓	↑	↗ verzögert
<i>TBX5</i>	↓	↓	↓	↓
<i>NPPA</i>	↗ , verzögert	↓	↑ bis D10, dann ↓	↑
<i>ISL1</i>	↓	↓	↑ bis D10, dann ↓	↓
<i>TNNT2</i>	↓	↑	↑ bis D8, dann ↓	↑
<i>TBX20</i>	↓	↑	↑	↓

Abbildung S19: Zusammenfassung der Induktion von *NKX2.5*, *TBX5*, *NPPA*, *ISL1*, *TNNT2* und *TBX20* für die spontanen und gerichteten Differenzierungen des HOS Indexpatienten 1460 im Vergleich zu den unabhängigen Kontrollen (C und H) und der HOS Indexpatientin 804-K im Vergleich zu den abhängigen Kontrollen (Eltern, 804-MU und 804-VA). Grüne Pfeile zeigen eine höhere Induktion des HOS Indexpatienten über Tag D0 im Vergleich zu den Kontrollen nach Normalisierung mit *ACTB* in der jeweiligen Differenzierung an. Rote Pfeile zeigen eine niedrigere Induktion des HOS Indexpatienten über Tag D0 im Vergleich zu den Kontrollen an. Graue Pfeile signalisieren eine ähnliche Induktion des HOS Indexpatienten im Vergleich zu den Kontrollen.

Gen	804 Eltern vs C_H spontane Differenzierung	804 Eltern vs C_H gerichtete Differenzierung
<i>NKX2.5</i>	↗ , verzögert	↑ bis D6, dann ↓
<i>TBX5</i>	↗ , verzögert	→
<i>NPPA</i>	↓	↓
<i>ISL1</i>	→	↓
<i>TNNT2</i>	↑	→
<i>TBX20</i>	↘	↑

Abbildung S20: Zusammenfassung der Induktion von *NKX2.5*, *TBX5*, *NPPA*, *ISL1*, *TNNT2* und *TBX20* für die spontanen und gerichteten Differenzierungen der abhängigen Kontrollen (804-MU, 804-VA) im Vergleich zu den unabhängigen Kontrollen (C, H). Grüne Pfeile zeigen eine höhere Induktion der abhängigen Kontrollen über Tag D0 im Vergleich zu den unabhängigen Kontrollen nach Normalisierung mit *ACTB* in der jeweiligen Differenzierung an. Rote Pfeile zeigen eine niedrigere Induktion der abhängigen Kontrollen über Tag D0 im Vergleich zu den unabhängigen Kontrollen an. Graue Pfeile signalisieren eine ähnliche Induktion der beiden Kontrollgruppen.

(A)

**TBX5\_Ex9\_sg1\_PX459\_Klon 1**

NNNNNNNNNCNNANNNNNNGGCTGTTAGAGAGANAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATAT  
TAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTT  
AAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTAAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTG  
GAAAGGACGAAACACC**GAGTTGGCATGGTGCCAGAG**GTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAAATAA  
GGCTAGTCCGTTATCAACTTAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATA  
GCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTTTTAGCGCGTGCCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGG  
TACCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACG  
TCAATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCA  
CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC  
CCGCTGGCATTGTGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTA  
GTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTC  
CCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTTTGTNANNAGANGNGNNGNA

(B)

**TBX5\_Ex9\_sg2\_PX459\_Klon 1**

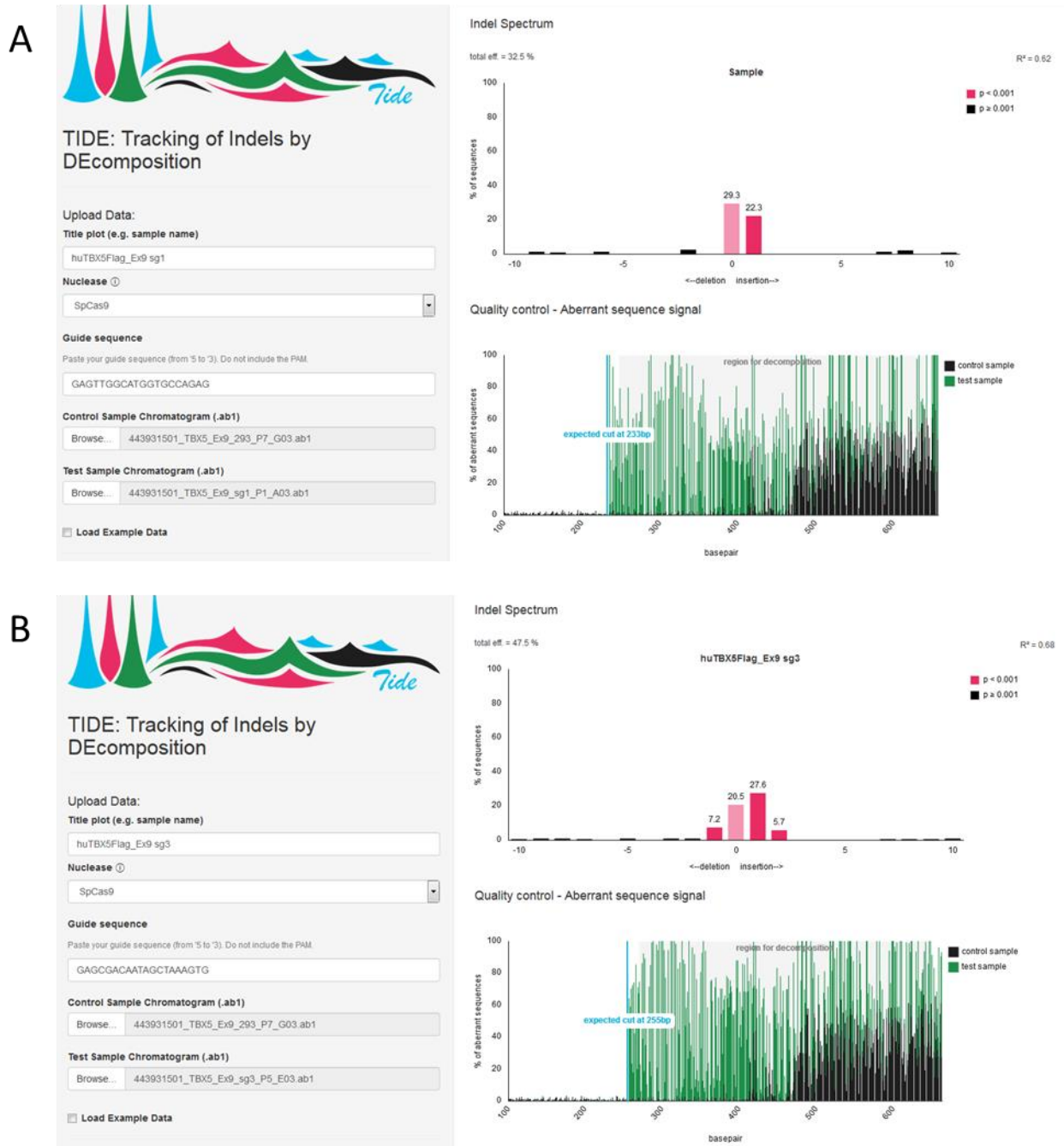
NNNNNNNNNNANNNNGCTGTTAGAGAGANAATTGGANTTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTA  
GTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAA  
AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTAAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGA  
AAGGACGAAACACC**GTAGCTATTGTCGCTCCACTC**GTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAAATAAG  
GCTAGTCCGTTATCAACTTAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAG  
CAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTTTTAGCGCGTGCCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGT  
ACCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGT  
CAATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCAC  
TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC  
CGCTGGCATTGTGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAG  
TCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCC  
CCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGG  
NNNNNNNNNNANNGNNNNNNNNANNNNNNNAANNNNNNGNNNNNNNNNNNNA

(C)

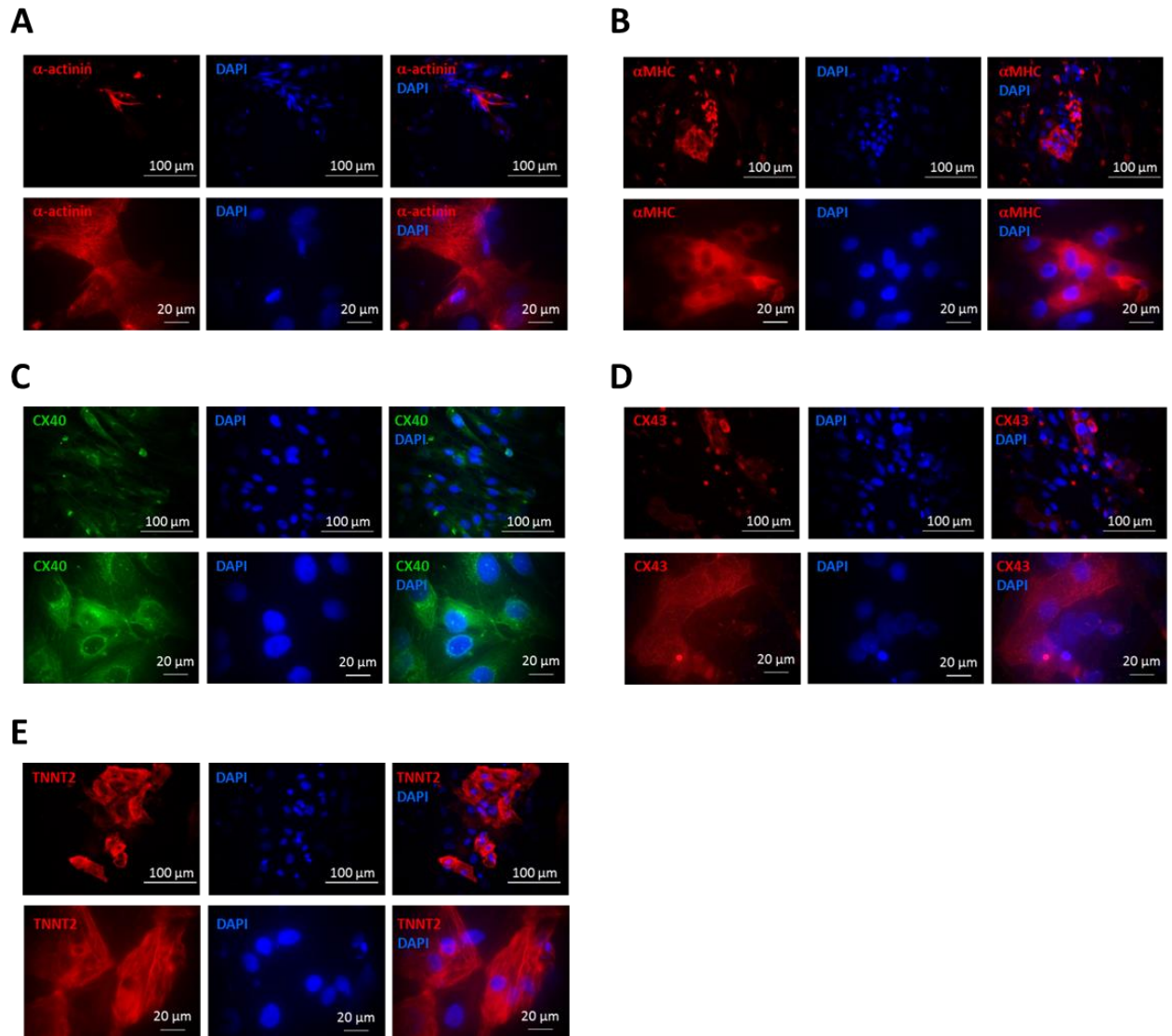
**TBX5\_Ex9\_sg3\_PX459\_Klon 1**

NNNNNNNNNNNACNNGCTGTTAGAGAGANAATTGGANTTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTA  
GTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAA  
AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTAAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGA  
AAGGACGAAACACC**GAGCGACAATAGCTAAAGTG**GTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAAATAAGG  
CTAGTCCGTTATCAACTTAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC  
AAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTTTTAGCGCGTGCCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTA  
CCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGT  
AATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACT  
TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC  
GCCTGGCATTGTGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT  
CATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCC  
CACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGG

**Abbildung S21:** Sequenzen der klonierten sgRNAs im pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0 Vektor. **(A)** pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0\_sgRNA1 Klon 1 **(B)** pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0\_sgRNA2 Klon 1 **(C)** pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0\_sgRNA3 Klon 1.



**Abbildung S22: Kalkulierte Schneideeffizienz der sgRNAs in transfizierten HEK 293 Zellen. (A) pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0-sgRNA1; Klon 1. (B) pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0-sgRNA3; Klon 1. Als Kontrolle dienten HEK 293 Zellen, die nicht transfiziert waren.**



**Abbildung S32: Immunzytochemische Färbungen der gerichteten Differenzierung der iPS Zellen des E5 TBX5Flag<sup>hom</sup> Klon 331 an Tag D60 der Differenzierung. (A) Färbung für  $\alpha$ -Actinin (rot). (B) Färbung für  $\alpha$ -MHC (rot). (C) Färbung für Connexin 40 (grün). (D) Färbung für Connexin 43 (rot). (E) Färbung für Troponin T (rot). Dargestellt sind jeweils die Einzelfärbungen und DAPI zur Visualisierung des Zellkerns, wie auch das aus diesen beiden Bildern übereinander gelagerte Bild. Für jede Färbung sind Aufnahmen in 100-facher und 1000-facher Vergrößerung gezeigt.**



## B Supplement Tabelle

**Tabelle S1: STS Nomenklatur zur Klassifizierung von angeborenen Herzfehlern. IPCCC basierend auf dem STS-CHSD Register.**

ID	Hauptdiagnose	STS Code
1	PFO	1
2	ASD, Secundum	2
3	ASD, Sinus venosus	3
4	ASD, Coronary sinus	4
5	ASD, Common atrium (single atrium)	5
6	VSD, Multiple	8
7	AVC (AVSD), Complete CAVSD	10
8	AVC (AVSD), Intermediate (transitional)	11
9	AVC (AVSD), Partial (incomplete) (PAVSD) (ASD, primum)	12
10	AP window (aortopulmonary window)	14
11	Pulmonary artery origin from ascending aorta (hemitruncus)	15
12	Truncus arteriosus	16
13	Partial anomalous pulmonary venous connection (PAPVC)	17
14	Partial anomalous pulmonary venous connection (PAPVC), scimitar	18
15	Total anomalous pulmonary venous connection (TAPVC), Type 1 (supracardiac)	19
16	Total anomalous pulmonary venous connection (TAPVC), Type 2 (cardiac)	20
17	Total anomalous pulmonary venous connection (TAPVC), Type 3 (infracardiac)	21
18	Total anomalous pulmonary venous connection (TAPVC), Type 4 (mixed)	22
19	Cor triatriatum	24
20	Pulmonary venous stenosis	25
21	Systemic venous anomaly	26
22	Systemic venous obstruction	27
23	TOF	28
24	TOF, AVC (AVSD)	29
25	TOF, Absent pulmonary valve	30
26	Pulmonary atresia	31
27	Pulmonary atresia, IVS	32
28	Pulmonary atresia, VSD (Including TOF, PA)	33
29	Pulmonary atresia, VSD-MAPCA (pseudotruncus)	34
30	MAPCA(s) (major aortopulmonary collateral[s]) (without PA-VSD)	35
31	Ebstein's anomaly	36
32	Tricuspid regurgitation, non-Ebstein's related	37
33	Tricuspid stenosis	38
34	Tricuspid regurgitation and tricuspid stenosis	39
35	Tricuspid valve, Other	40
36	Pulmonary stenosis, Valvar	41
37	Pulmonary artery stenosis (hypoplasia), Main (trunk)	42
38	Pulmonary artery stenosis, Branch, Central (within the hilar bifurcation)	43
39	Pulmonary artery stenosis, Branch, Peripheral (at or beyond the hilar bifurcation)	44
40	DCRV	46
41	Pulmonary valve, Other	47
42	Conduit failure	48
43	Pulmonary insufficiency	49
44	Pulmonary insufficiency and pulmonary stenosis	50
45	Aortic stenosis, Subvalvar	51
46	Aortic stenosis, Valvar	52
47	Aortic stenosis, Supravalvar	53
48	Aortic valve atresia	55
49	Aortic insufficiency	56
50	Aortic insufficiency and aortic stenosis	57
51	Aortic valve, Other	58
52	Sinus of Valsalva aneurysm	59
53	LV to aorta tunnel	60
54	Mitral stenosis, Supravalvar mitral ring	61
55	Mitral stenosis, Valvar	62
56	Mitral stenosis, Subvalvar	63
57	Mitral stenosis, Subvalvar, Parachute	64
58	Mitral regurgitation and mitral stenosis	66
59	Mitral regurgitation	67
60	Mitral valve, Other	68
61	Hypoplastic left heart syndrome (HLHS)	69
62	Cardiomyopathy	70
63	Pericardial effusion	71
64	Pericarditis	72
65	Pericardial disease, Other	73

66	Single ventricle, DILV	74
67	Single ventricle, DIRV	75
68	Single ventricle, Mitral atresia	76
69	Single ventricle, Tricuspid atresia	77
70	Single ventricle, Unbalanced AV canal	78
71	Single ventricle, Heterotaxia syndrome	79
72	Single ventricle, Other	80
73	Congenitally corrected TGA	82
74	TGA, IVS	83
75	TGA, IVS-LVOTO	84
76	TGA, VSD	85
77	TGA, VSD-LVOTO	86
78	DORV, VSD type	88
79	DORV, TOF type	89
80	DORV, TGA type	90
81	DORV, Remote VSD (uncommitted VSD)	91
82	DOLV	93
83	Coarctation of aorta	95
84	Aortic arch hypoplasia	96
85	Interrupted aortic arch	98
86	Patent ductus arteriosus	99
87	Vascular ring	100
88	Aortic aneurysm (including pseudoaneurysm)	102
89	Aortic dissection	103
90	Lung disease, Benign	104
91	Lung disease, Malignant	105
92	Pectus	106
93	Tracheal stenosis	107
94	Tracheal disease, Other	108
95	Arrhythmia	109
96	Arrhythmia, Heart block, Acquired	110
97	Arrhythmia, Heart block, Congenital	111
98	Arrhythmia, Pacemaker, Indication for replacement	113
99	Atrial Isomerism, Left	114
100	Atrial Isomerism, Right	115
101	Aneurysm, Ventricular, Right	116
102	Aneurysm, Ventricular, Left	117
103	Aneurysm, Pulmonary artery	118
104	Aneurysm, Other	119
105	Hypoplastic RV	120
106	Hypoplastic LV	121
107	Mediastinitis	122
108	Endocarditis	123
109	Prosthetic valve failure	124
110	Myocardial infarction	125
111	Cardiac tumor	126
112	Pulmonary AV fistula	127
113	Pulmonary embolism	128
114	Pulmonary vascular obstructive disease (Eisenmenger's)	130
115	Primary pulmonary hypertension	131
116	Persistent fetal circulation	132
117	Meconium aspiration	133
118	Pleural disease, Benign	134
119	Pleural disease, Malignant	135
120	Pneumothorax	136
121	Pleural effusion	137
122	Chylothorax	138
123	Empyema	139
124	Esophageal disease, Benign	140
125	Esophageal disease, Malignant	141
126	Mediastinal disease, Benign	142
127	Mediastinal disease, Malignant	143
128	Diaphragm paralysis	144
129	Diaphragm disease, Other	145
130	Cardiac, Other	146
131	Thoracic and/or mediastinal, Other	147
132	Peripheral vascular, Other	148
133	Miscellaneous, Other	149
134	Normal heart	150
135	Arrhythmia, Heart block	151
136	Cardiomyopathy, End-stage congenital heart disease	152
137	Congenitally corrected TGA, IVS	153

138	Congenitally corrected TGA, IVS-LVOTO	154
139	Congenitally corrected TGA, VSD	155
140	Congenitally corrected TGA, VSD-LVOTO	156
141	Coronary artery anomaly, Aneurysm	157
142	Coronary artery anomaly, Anomalous aortic origin	158
143	Coronary artery anomaly, Anomalous pulmonary origin (includes ALCAPA)	159
144	Coronary artery anomaly, Fistula	160
145	Coronary artery anomaly, Other	161
146	DORV, IVS	162
147	Mediastinal disease	163
148	Mitral stenosis	164
149	Pulmonary artery, Discontinuous	165
150	Pulmonary stenosis, Subvalvar	166
151	Pulmonary vascular obstructive disease	167
152	VSD + Aortic arch hypoplasia	168
153	VSD + Coarctation of aorta	169
154	VSD, Type 1 (Subarterial) (Supracristal) (Conal septal defect) (Infundibular)	170
155	VSD, Type 2 (Perimembranous) (Paramembranous) (Conoventricular)	171
156	VSD, Type 3 (Inlet) (AV canal type)	172
157	VSD, Type 4 (Muscular)	173
158	VSD, Type: Gerbode type (LV-RA communication)	174
159	Status post transplant, Heart	175
160	Status post transplant, Heart and lung	176
161	Status post transplant, Lung	177

## C Publikationen

Puluca N, Lee S, Doppler S, Münsterer A, **Dreßen M**, Krane M, Wu SM. Bioprinting Approaches to Engineering Vascularized 3D Cardiac Tissues. Curr Cardiol Rep. 2019 Jul 27;21(9):80. doi: 10.1007/s11886-019-1179-8. Review. PMID: 31352612

\*H. Lahm, \***M. Dreßen**, N. Beck, S. Doppler, M.-A. Deutsch, M. Shunsuke, I. Neb, K. C. König, K. Sideris, S. Voss, L. Eschenbach, N. Puluca, I. Deisenhofer, S. Doll, S. Holdenrieder, M. Mann, R. Lange, M. Krane. Myosin binding protein H-like (MYBPHL): a promising biomarker to predict atrial damage. Scientific Reports. 2019, Jul 10;9(1): 9986. doi: 10.1038/s41598-019-46123-w.\*equal contribution. PMID: 31292467

Deutsch MA, Doppler SA, Li X, Lahm H, Santamaria G, Cuda G, Eichhorn S, Ratschiller T, Dzilic E, **Dreßen M**, Eckart A, Stark K, Massberg S, Bartels A, Rischpler C, Gilsbach R, Hein L, Fleischmann BK, Wu SM, Lange R, Krane M. Reactivation of the Nkx2.5 cardiac enhancer after myocardial infarction does not persage myogenesis. Cardiovasc Res. 2018 Jul 1;114(8):1098-1114. doi: 10.1093/cvy069. PMID: 29579159

Dzilic E, Lahm H, **Dreßen M**, Deutsch MA, Lange R, Wu SM, Krane M, Doppler SA. Genome Editing Redefines Precision Medicine in the Cardiovascular Field. Stem Cells Int. 2018 Mar 14;2018:4136473. doi: 10.1155/2018/4136473. eCollection 2018. Review. PMID: 29731778

Gilsbach R, Schwaderer M, Preissl S, Grüning BA, Kranzhöfer D, Schneider P, Nührenberg TG, Mulero-Navarro S, Weichenhan D, Braun C, **Dreßen M**, Jacobs AR, Lahm H, Doerst T, Backofen R, Krane M, Gelb BD, Hein. Distinct epigenetic programs regulate cardiac myocyte development and disease in the human heart *in vivo*. Nat. Commun. 2018 Jan 26;9(1):391. doi: 10.1038/s41467-017-02762-z. PMID: 29374152

Doll S, **Dreßen M**, Geyer PE, Itzhak DN, Braun C, Doppler SA, Meier F, Deutsch MA, Lahm H, Lange R, Krane M, Mann M. Region and cell-type resolved quantitative proteomic map of the human heart. Nat. Commun. 2017 Nov 13;8(1):1469. doi: 10.1038/s41467-017-01747-2. PMID: 29133944

Hoelscher SC, Doppler SA, **Dreßen M**, Lahm H, Lange R, Krane M. MicroRNAs: pleiotropic players in congenital heart disease and regeneration. J Thorac Dis. 2017 Mar;9(Suppl 1): S64-S81. doi: 10.21037/jtd.2017.03.149. Review. PMID: 28446969

Doppler SA, Carvalho C, Deutsch MA, **Dreßen M**, Puluca N, Lange R, Krane M. Cardiac fibroblasts: more than mechanical support. J Thorac Dis. 2017 Mar; 9(Suppl 1): S36-S51. doi: 10.21037/jtd.2017.03.122. Review. PMID: 28446967

**Dreßen M**, Lahm H, Lahm A, Wolf K, Doppler S, Deutsch MA, Cleuziou J, Papst von Ohain J, Schön P, Ewert P, Malcic I, Lange R, Krane M. A novel *de novo* TBX5 Mutation in a patient with Holt-Oram syndrome leading to a dramatically reduced biological function. Mol Genet Genomic Med. 2016 Jul 14,4(5): 557-67. doi: 10.1002/mgg3.234. eCollection 2016 Sep. PMID: 27652283

Lahm H, Doppler SA, **Dreßen M**, Adamczyk K, Deutsch MA, Ulrich H, Schiemann M, Lange R, Krane M. Detection of Intracellular Gene Expression in Live Cells of Murine, Human and Porcine Origin Using Fluorescence-labeled Nanoparticles. J Vis Exp. 2015 Nov 13;(105). doi: 10.3791/53268. PMID: 26650934

Lahm H, Schön P, Doppler S, **Dreßen M**, Cleuziou J, Deutsch MA, Ewert P, Lange R, Krane M. Tetralogy of Fallot and Hypoplastic Left Heart Syndrome - Complex Clinical Phenotypes Meet Complex Genetic Networks. Curr Genomics. 2015 Jun; 16(3): 141-58. doi: 10.2174/1389202916666150303232520. PMID: 26069455

Lahm H, Doppler S, **Dreßen M**, Werner A, Adamczyk K, Schramke D, Brade T, Laugwitz KL, Deutsch MA, Schiemann M, Lange R, Moretti A, Krane M. Live fluorescent RNA-based detection of pluripotency gene expression in embryonic and induced pluripotent stem cells of different species. Stem Cells. 2015 Feb. 33(2): 392-402. doi: 10.1002/stem.1872. PMID: 25335772

M.-A. Deutsch, S. Doppler, H. Lahm, **M. Dressen**, R. Lange, M. Krane. Endogene myokardiale Regeneration. Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie. Springer Medizin. 2015

Doppler SA, Werner A, Barz M, Lahm H, Deutsch MA, **Dreßen M**, Schiemann M, Voss B, Gregoire S, Kuppasamy R, Wu SM, Lange R, Krane M. Myeloid zinc finger 1 (Mzf1) differentially modulates murine cardiogenesis by interacting with an Nkx2.5 cardiac enhancer. PLoS One. 2014 Dec 1;9(12): e113775. doi: 10.1371/journal.pone.0113775.eCollection 2014. PMID: 25436607

Lahm H, Deutsch MA, **Dreßen M**, Doppler S, Werner A, Hörere J, Cleuziou J, Schreiber C, Böhm J, Laugwitz KL, Lange R, Krane M. Mutational analysis of the human MESP1 gene in patients with congenital heart disease reveals a highly variable sequence in exon 1. Eur J Med Genet. 2013 Nov;56(11):591-8. doi: 10.1016/j.ejmg.2013.09.001. Epub 2013 Sep 19. PMID: 24056064

Krane M, Dummler S, **Dreßen M**, Hauner H, Hoffmann M, Haller D, Heller K, Wildhirt S, Voss B, Grammer J, Lahm H, Lange R, Baurernschmitt R. Identification of an up-regulated anti-apoptotic network in the internal thoracic artery. Int J Cardiol. 2011 Jun 2; 149(2): 221-226. doi: 10.1016/j.ijcard.2010.02.003. Epub 2010 Mar 6. PMID: 20207035

Markus Krane, Sara Dummler, **Martina Dressen**, Robert Bauernschmitt, Rüdiger Lange. Bioengineering von Herzklappen. Kardiologie up2date4 (2008); 276-280

Vogl K, Wenter R, **Dressen M**, Schlickerrieder M, Plöscher M, Eichacker L, Overmann J. Identification and analysis of four candidate symbiosis genes from 'Chlorochromatium aggregatum', a highly developed bacterial symbiosis. Environ Microbiol. 2008 Oct;10(10):2842-56. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01709.x. Epub 2008 Aug 14. PMID: 18707609

## D Vorträge

**M. Dreßen**, B.H. Northoff, S. Laue, I. Neb, Z. Zhang, A. Gödel, S Doppler, M.-A. Deutsch, H. Lahm, D. Teupser, A. Moretti, L.M. Holdt, R. Lange, K.-L. Laugwitz, M. Krane. Identification of differentially regulated pathways in cardiac development and cardiac gene expression during in vitro cardiac differentiation of HLHS-derived human induced pluripotent stem cells using transcriptome analysis. DGTHG 2018, Leipzig

H. Lahm, M. Jia, **M. Dreßen**, N. Puluca, N. Beck, J. Cleuziou, S. Doppler, M.-A. Deutsch, P. Lichtner, G. Eckstein, R. Lange, T. Meitinger, B. Müller-Myhsok, M. Krane. GWAS analysis reveals previously unknown genomic variants associated with different subgroups of congenital heart disease. DGTHG 2018, Leipzig

**M. Dreßen**, H. Lahm, K. Adamczyk-Wolf, J. Cleuziou, J. Kansar-Samprec, P. Schön, S. Doppler, MA Deutsch, R. Lange, M. Krane. Genetic variants of TBX5 in Holt-Oram Syndrome patients. DGTHG 2016, Freiburg

**M. Dreßen**, H. Lahm. iPS lines from congenital heart disease patients: potential and possibilities of in vitro cellular systems. DHM Forschungsretreat 2016, München

**Dreßen M.**, Crotti L., Lahm H., Moretti A., Wolf K., Cleuziou J., Schön P., Hörer J., Schreiber C., Doppler S., Werner A., Deutsch M.-A., Schiemann M., Brade T., Laue S., Oexle K., Mastantuono E., Gruber P., Laugwitz K.-L., Meitinger T., Lange R., Krane M. Differential expression of candidate genes with *de novo* mutations in patients with hypoplastic left heart syndrome murine cardiac progenitor cells. DGTHG 2015, Freiburg

**M. Dreßen**, H. Lahm, K. Adamczyk, D. Schramke, S. Doppler, M.-A. Deutsch, R. Lange, M. Krane. Generation of porcine induced pluripotent stem cell lines from adipose tissue-derived fibroblast. DGK 2014, Mannheim

## E Posterpräsentationen

**M. Dreßen**, H. Lahm, E. Dzilic, I. Neb, Z. Zhang, B. Beyersdorf, N. Beck, S. A. Deutsch, R. Lange. Generation of a Flag-tagged CRISPR/Cas9 edited huiPS model for investigation of the TBX5 function in congenital heart disease. 2nd Cardiovascular Epigenetics Conference 2018, Freiburg/Breisgau

S. Doll, **M. Dreßen**, P.E. Geyer, D.N. Itzhak, C. Braun, S.A. Doppler, F. Meier, M.-A. Deutsch, H. Lahm, R. Lange, M. Krane, M. Mann. Regional and cell-type resolved quantitative proteomic map of the human heart. MHA Wintermeeting 2018, München

**M. Dreßen**, S. Laue, A. Goedel, H. Lahm, K. Wolf, J. Cleuziou, P. Schön, S. Doppler, M.-A. Deutsch, I. My, L.S. Pane, R. Lange, A. Moretti, K.-L. Laugwitz, M. Krane. Patient-specific HLHS model revealed a significant dysregulation of first heart field cardiac transcription factors during *in vitro* differentiation. European Society of Cardiology 2016, Rome, Italy. **“Best Poster” in Developmental Biology.**

**M. Dreßen**, H. Lahm, K. Wolf, J. Cleuziou, J. Kasnar-Samprec, P. Schön, S. Doppler, M.-A. Deutsch, R. Lange, M. Krane. A novel *de novo* occurring TBX5 mutation with severely reduced transcriptional activity in a patient with Holt-Oram Syndrome. DGK 2016, Mannheim. **nominiert: „Best Poster“.**

**M. Dreßen**, H. Lahm, K. Wolf, J. Cleuziou, J. Kasnar-Samprec, P. Schön, S. Doppler, M.-A. Deutsch, R. Lange. Genetic variants of TBX5 in Holt-Oram syndrome patients. MHA Wintermeeting 2016, München

**M. Dreßen**, K. Wolf, J. Cleuziou, P. Schön, S. Doppler, M.-A. Deutsch, P. Ewert, R. Lange, M. Krane. TBX5 dependent dysregulation in a patient-specific iPS model of the Holt-Oram Syndrome. “Cardiac Regeneration and Vascular Biology”- Conference 2016 DGK, San Servolo, Italien

**M. Dreßen**, H. Lahm, J. Cleuziou, J. Kasnar-Samprec, P. Schön, S. Doppler, M.-A. Deutsch, R. Lange, M. Krane. A novel *de novo* occurring TBX5 mutation with severely reduced transcriptional activity in a patient with Holt-Oram Syndrome. DGK 2016, Mannheim, Deutschland

**M. Dreßen**, H. Lahm, A. Moretti, T. Brade, S. Laue, L. Crotti, E. Mastantuono, S. Doppler, K. Adamczyk, A. Werner, J. Cleuziou, J. Hörer, C. Schreiber, M.-A. Deutsch, M. Kornek, M. Schiemann, K. Oexle, K.-L. Laugwitz, T. Meitinger, R. Lange, M. Krane. Expression of *de novo* mutated HLHS candidate genes in murine cardiac progenitor cells. MHA Wintermeeting 2014, Nymphenburg, Deutschland