

Zelluläre Veränderungen, die den Krankheitsverlauf einer Arrhythmogenen Rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC) beeinflussen können

Karin P. Hammer, Maria Giglberger, Lena Albersdoerfer, Teresa Stauber, Barbara Schober, Marcus Fischer, Andrea Baessler, Lars S. Maier, Stefan Wagner
 Universitätsklinikum Regensburg, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II

Einleitung / Hintergrund

- Seltene Erkrankung (ca. 1:5000, variiert je nach Geographie)
- Verantwortlich für etwa 11 bis 22 % aller Fälle von plötzlichen Herztod bei jungen Sportlern
- Die zugrundeliegenden erblichen Veränderungen betreffen vor allem, aber nicht ausschließlich, desmosomale Proteine.
- Strukturelle und funktionale Veränderungen vorwiegend im rechten Ventrikel, können aber auch den linken Ventrikel betreffen.
- Diagnose ist schwierig, da statt einem einzelnen Test eine Reihe an Kriterien erfüllt sein müssen (ESC Task-Force Kriterien).

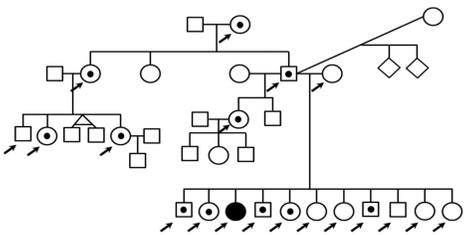
Zielsetzung

Die Arrhythmogenese bei ARVC ist weitgehend unklar, sodass sowohl Diagnostik und Therapie schwierig bleiben. Hier sollen mit Hilfe von patientenspezifischen Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche zellulären Veränderungen finden sich in den Herzmuskelzellen von ARVC Patienten mit einer PKP2 Mutation?
2. Welche zellulären Faktoren bestimmen den Krankheitsverlauf?
3. Warum entwickelt eine Mutationsträgerin schwere Arrhythmien, während die Schwester trotz Mutation asymptomatisch bleibt?

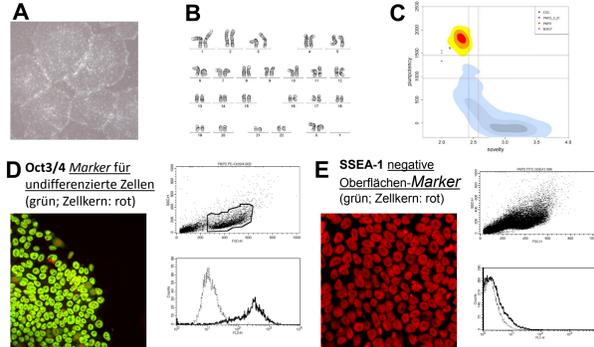
Material und Methoden

ARVC Familie mit PKP2 Mutation



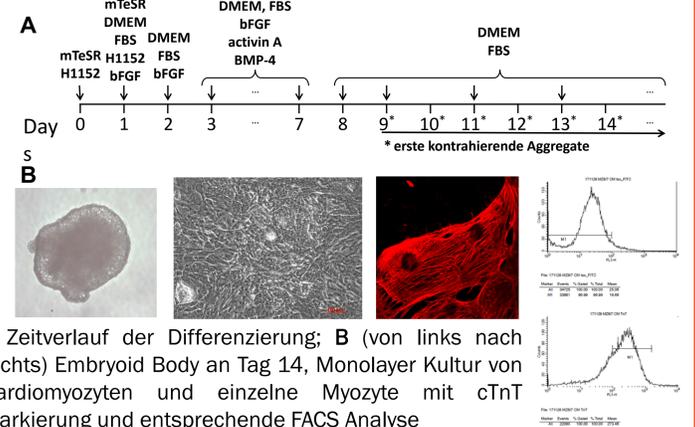
- 20-jährige Patientin mit überlebtem, plötzlichen Herztod
- ICD Implantation
- Mutation im plakophilin2 (PKP2) Gen (c.1664delT; p.Phe555SerfsX8, Exon 7)
- Schwester ist trotz Mutation asymptomatisch

Generierung von iPSCs aus Blut



A iPSC Kultur; B Karyogramm; C NGS basierte Pluripotenzanalyse; D Immunofluoreszenz und FACS Analyse des Pluripotenzmarkers (Oct3/4) und E des Differenzierungsmarkers (SSEA-1)

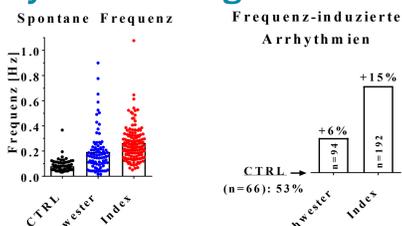
Differenzierung der hiPSCs zu Kardiomyozyten



A Zeitverlauf der Differenzierung; B (von links nach rechts) Embryoid Body an Tag 14, Monolayer Kultur von Kardiomyozyten und einzelne Myozyte mit cTnT Markierung und entsprechende FACS Analyse

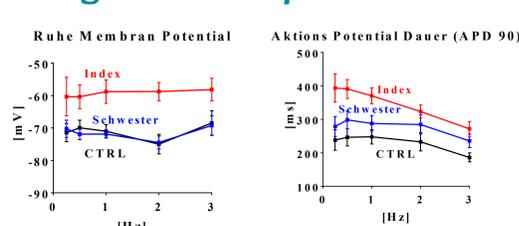
Ergebnisse

Erhöhte Schlagfrequenz und Arrhythmieanfälligkeit



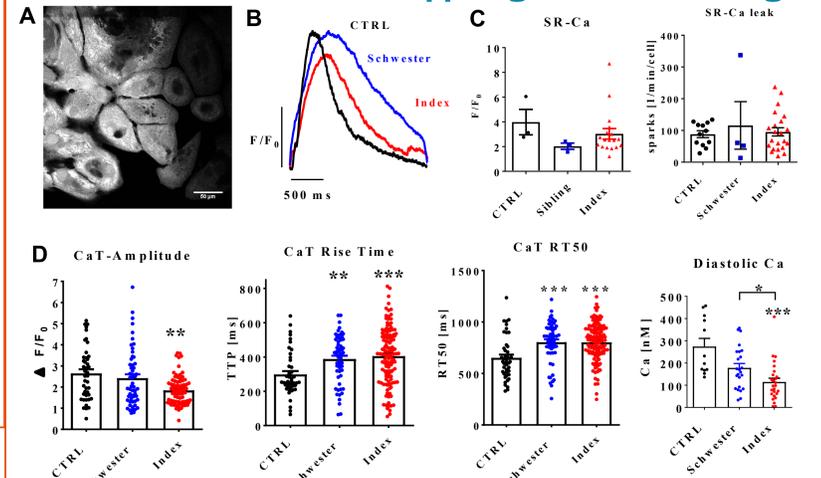
Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigen die Zellen der Indexpatientin deutlich erhöhte Frequenzen. Die Arrhythmieanfälligkeit der Indexpatientin ist mit 15% deutlich erhöht.

Erhöhtes Ruhemembranpotential und verlängerte Aktionspotentialdauer



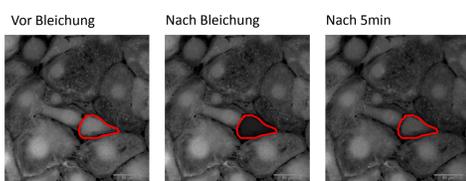
Das Ruhemembranpotential der Indexpatientin ist in den positiven Bereich verschoben, während die Schwester unveränderte Werte aufweist. Auch die APD der Indexpatientin ist deutlich verlängert, beides begünstigt das Auftreten von Arrhythmien.

Die elektromechanische Kopplung ist beeinträchtigt



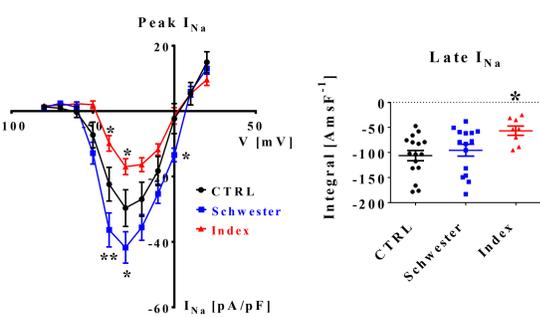
Die Zellen wurden mit 0,5 Hz stimuliert und die Kalzium-Transienten aufgezeichnet und ausgewertet (A + B). Der Kalziumgehalt im SR (Speicher) ist leicht reduziert während das Leck aus dem Speicher nicht verändert ist (C). Die Kalziumtransienten der Indexpatientin sind kleiner, d.h. es wird weniger Kalzium freigesetzt. Die Kinetik (Aufstichphase / TTP und Abfallrate / RT50) sind sowohl bei der Indexpatientin als auch der Schwester gleichermaßen verlängert. Der Kalziumgehalt im Cytosol während der Diastole ist in der Indexpatientin signifikant reduziert (D).

Zell-Zell-Kommunikation



Fluorescence recovery after photobleach (FRAP) wurde zur Ermittlung der Qualität der Zell-Zell-Verbindungen eingesetzt. Die Zellen der Kontrollperson zeigten eine höhere Recovery Rate als die der Indexpatientin und der Schwester. Die vollständige Inhibition der Connexine mit Carbenoxolone (CBX) bestätigte, dass der Stoffaustausch ausschließlich über Gap Junctions vermittelt wird.

Reduzierter Spitzen- und Später Natriumstrom bei der Indexpatientin, aber nicht der Schwester!

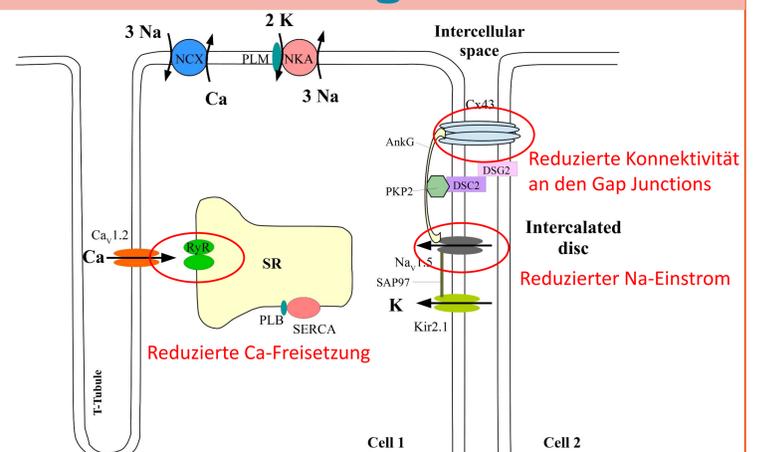


Der Spitzennatriumstrom (Peak I_{Na}) ist bei der Indexpatientin signifikant reduziert, während er bei der Schwester größer ist. Die späte Komponente des Natriumstroms (Late I_{Na}), welche bei Herzinsuffizienz meist vergrößert ist, ist bei der Schwester unverändert und bei der Indexpatientin verringert.

Zusammenfassung I

- In unserem Modell ist eine PKP2 Mutation pro-arrhythmogen indem **Na-Ströme reduziert**, die **Aktionspotentialdauer verlängert** und der **Kalziumhaushalt gestört** ist
- Im Gegensatz dazu scheinen **größere Na-Ströme** und **normal große Kalziumtransienten** den pro-arrhythmogenen Effekt der PKP2 Mutation deutlich **abzuschwächen**

Zelluläre Veränderungen bei ARVC



Danksagung

Wir danken Prof. Dr. U. Hehr für die Erstellung der Karyogramme und Prof. Dr. M. Riemenschneider für die NGS basierten Pluripotenzanalysen. Die Arbeit wurde gefördert durch die Deutsche Stiftung für Herzforschung (F/35/15 und K.P.H., S.W. and M.F), die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG: HA6017/3-1 an K.P.H. und WA 2539/4-1, 5-1 and 7-1 an S.W.), ReForM C der Medizinische Fakultät der Universität Regensburg (an S.W., K.P.H. und L.S.M.) und durch die EU HORIZON 2020 (SILICOFCM ID 777204 an L.S.M.)