Schlussbericht zum Verwendungsnachweis – Teil I: Kurzbericht

Zuwendungsempfänger:	**Georg-August-Universität Göttingen Universitätsmedizin Göttingen**
Projektleiter*in:	**Dr. Daniela Hübscher, Prof. Dr. Katrin Streckfuß-Bömeke**
Projekttitel:	**Functional assessment of atrial cardiomyocytes of Takotsubo Syndrome patients**
Förderkennzeichen:	**FKZ 81X4300114**
Laufzeit des Projektes:	**01.04.2022 – 30.09.2023**

Kurzbericht zu:

1. **Aufgabenstellung**
   Das Ziel dieser Studie ist es zu analysieren, inwieweit atriale Kardiomyozyten zur Entwicklung des Takotsubo Syndroms (TTS) beitragen. Dafür sollen humane induzierte pluripotente Stammzell (iPSC)- abgeleitete atriale Kardiomyozyten (KM) (a-iPSC-KM) von TTS-Patienten verwendet werden sowie humane KM, die aus dem Atrium von TTS-Patienten oder gesunden Probanden isoliert worden sind.
   Die Kollaboration bringt die vorhandene Expertise der iPSC-KM-Herstellung und funktionellen Charakterisierung in Göttingen (AG Streckfuß-Bömeke: Translationale Stammzellforschung) mit der Expertise von Prof. Nikolaevs Research-Gruppe in cAMP Biosensoren, FRET Imaging Experimenten und PDE-Biochemie zusammen.

2. **dem wissenschaftlichen und technischen Stand, an den angeknüpft wurde**
   Reprogrammierte KM sind zu einem wichtigen Instrument für die Untersuchung der Mechanismen menschlicher Herzkrankheiten geworden. Unser Wissen über Ca^{2+} - Anomalien, den Beitrag von PDE und Arrhythmie von Vorhofkardiomyozyten bei TTS ist jedoch begrenzt und wurde bisher nicht untersucht.
   Die unter 3 beschriebenen Vorarbeiten zur Herstellung und Qualitätskontrolle der atrialen iPSC-KM unterschiedlicher Patienten waren Voraussetzung für die FRET-Messungen mittels in Hamburg hergestellter FRET-Biosensoren. Qualitativ und quantitativ ausreichende Mengen an atrialen iPSC-KMs konnten gewonnen werden, so dass die FRET-Messungen, Expressionsanalysen sowie funktionelle Analysen der atrialen iPSC-KM der TTS-Patienten möglich waren.
   Qualitativ hochwertige atriale iPSC-KM konnten produziert, pelletiert und nach Hamburg übergeben werden, so dass die Expressionsanalysen möglich waren.

3. **dem Ablauf des Vorhabens**
   Meilenstein I: Herstellung von atrialen iPSC-KM von TTS-Patienten und gesunden Kontrollen. KM werden hinsichtlich Markerexpression und -qualität charakterisiert. (Göttingen)

Meilenstein III: Analyse der generierten a-CMs von TTS und Kontrollen mittels FRET-Experimente unter spezifischer β-AR- und PDE-Inhibierung (Göttingen)
Meilenstein IV: Funktionelle Analysen der generierten a-iPSC-KM von TTS und Kontrollen (Göttingen und Hamburg)
Die beantragten Mittel für den MS I, III und IV wurden von der Göttinger Seite aufgebraucht. Die Ergebnisse von Meilenstein I, III und IV entsprechen den ursprünglichen Zielen.
Es gab Änderungen in der Planung und im Ablauf des Vorhabens: Es fand eine kostenneutrale Umwidmung von Personalmitteln aus Kostenkategorie 0822 in Höhe von 8.398,80€ in Personalmittel Kostenkategorie 0812 statt. Dadurch wurde ermöglicht, dass die in diesem Projekt vorgesehenen anspruchsvollen Arbeiten wie ratiometrische und kinetische Calcium-Messungen mittels Fura2 (Epifluoreszenz) oder Fluo3 (Konfokale Mikroskopie) von einer erfahrenen Postdoc übernommen werden können.

4. den wesentlichen Ergebnissen des Vorhabens

Von zwei TTS-Patienten und zwei gesunden Spender*Innen, die definiert sind als Personen ohne kardialen Phänotyp, wurden bereits generierte iPSC verwendet und mittels etablierter Protokolle kontinuierlich atriale a-iPSC-KM generiert. Zwei Monate alte a-iPSC-KM wurden mittels spezifischer Immunfluoreszenz-Färbungen und Durchflusszytometrie Messungen bezüglich der Reinheit der atrialen Kultur und charakteristischer kardiale und Zytoskelett-Marker untersucht. Die für das Projekt benötigten a-iPSC-KM konnten erfolgreich hergestellt werden.
Wir konnten zeigen, dass spezifische PDEs nach Isoprenalin-Behandlung in ihrer Aktivität in a-iPSC-KM von TTS-Patienten signifikant reguliert sind im Vergleich zu Kontrollen.
Funktionelle Analysen der atrialen TTS-iPSC-KM ergaben, dass die TTS-KM sich in elektrophysiologischen Untersuchungen signifikant anders verhielten als Kontroll-iPSC-KM.

5. der Zusammenarbeit mit anderen Stellen

In dem Projekt haben die Partner aus Göttingen und Hamburg zusammengearbeitet.
Eine Zusammenarbeit mit anderen Stellen wurde nicht initiiert.

Göttingen, den 21.01.2024

Schlussbericht zum Verwendungsnachweis – Teil II: Eingehende Darstellung

Zuwendungsempfänger:	**Georg-August-Universität Göttingen Universitätsmedizin Göttingen**
Projektleiter*in:	**Dr. Daniela Hübscher, Prof. Dr. Katrin Streckfuß-Bömeke**
Projekttitel:	**Functional assessment of atrial cardiomyocytes of Takotsubo Syndrome patients**
Förderkennzeichen:	**FKZ81X4300114**
Laufzeit des Projektes:	**01.04.2022 – 30.09.2023**

Eingehende Darstellung zu:

1. **der Verwendung der Zuwendung und den erzielten wissenschaftlich-techn. Ergebnissen im Einzelnen, mit Gegenüberstellung zu den ursprünglichen Zielen: Meilenstein I: Herstellung von atrialen iPSC-KM von TTS-Patienten und gesunden Kontrollen. KM werden hinsichtlich Markerexpression und -qualität charakterisiert. (Göttingen)**
   Von zwei TTS-Patienten und zwei gesunden Spender*Innen, die definiert sind als Personen ohne kardialen Phänotyp, wurden bereits generierte iPSC verwendet und mittels etablierter Protokolle kontinuierlich atriale a-iPSC-KM generiert. Zwei Monate alte a-iPSC-KM wurden mittels spezifischer Immunfluoreszenz-Färbungen überprüft, um die Reinheit der atrialen Kultur (MLC2a versus MLC2v) und charakteristische kardiale und Zytoskelett-Marker (alpha-Aktinin und TTN) nachzuweisen. Des Weiteren konnte mit Hilfe von Durchflusszytometrie Messungen und dem kardialen Marker cTNT die Reinheit jeder Kardiomyozytenkultur festgestellt werden. Die für das Projekt benötigten a-iPSC-KM konnten erfolgreich hergestellt werden. Die generierten a-iPSC-KM zeigten eine hohe Reinheit mit 80-90% cTNT positiven Zellen, die Expression von atrialen Markerproteinen und einer ausgeprägten Sarkomerstruktur.

   Meilenstein III: Analyse der generierten a-CMs von TTS und Kontrollen mittels FRET-Experimente unter spezifischer β-AR- und PDE-Inhibierung (Göttingen)
   Adenoviren mit integrierten FRET-Biosensoren zur Analyse der cAMP-Konzentration im Zytosol wurden von der Gruppe um Prof. Nikolaev in der angegebenen Zeit und in ausreichender Menge (>$1x10^{12}$ viraler Partikel) produziert und nach Göttingen übergeben.
   Zytosolische cAMP-Konzentrationen wurden unter spezifischer Inhibition verschiedener PDEs in atrialen Kontroll- und TTS-iPSC-KMs gemessen. Wir konnten zeigen, dass nach β-AR Stimulation im Zytosol unterschiedliche PDEs in Kontrollzellen und TTS iPSC-KM wichtig sind. Unter basalen Bedingungen (ohne β-adrenerge

Stimulation) konnten im Zytosol keine Unterschiede zwischen Kontrolle und TTS identifiziert werden.

Meilenstein IV: Funktionelle Analysen der generierten a-iPSC-KM von TTS und Kontrollen (Göttingen und Hamburg)
MEA-Messungen (Schlagfrequenz, Feldpotentialdauer) wurden in atrialen TTS- und Kontroll-a-iPSC-KM durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Ca2+-Homöostase (Ca^{2+}i, Ca^{2+} im sarkoplasmatischen Retikulum, SERCA-Aktivität, Ca^{2+}-Sparks) mittels FURA-2/Fluo3-Epifluoreszenz/konfokalen Mikroskopie untersucht. Es konnten signifikante Unterschiede zwischen atrialen Kontroll- und TTS-iPSC-KM identifiziert werden.
Die Ergebnisse von Meilenstein I, III und IV entsprechen den ursprünglichen Zielen.

2. den wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,

Die Förderung umfasste Sach- und Personalmittel. Die beantragten Mittel für den MS I, III und IV wurden von der Göttinger Seite aufgebraucht.

Die Förderung umfasste ursprünglich Personal (Non-Scientific staff, 6 M (60%): E7, Stufe 2), Sachmittel (31.500 €) und Reisekosten (1000€). Es gab Änderungen in der Planung und im Ablauf des Vorhabens: Es fand eine kostenneutrale Umwidmung von Personalmitteln aus Kostenkategorie 0822 in Höhe von 8.398,80€ in Personalmittel Kostenkategorie 0812 statt. Dadurch wurde ermöglicht, dass die in diesem Projekt vorgesehenen anspruchsvollen Arbeiten wie ratiometrische und kinetische Calcium-Messungen mittels Fura2 (Epifluoreszenz) oder Fluo3 (Konfokale Mikroskopie) von einer erfahrenen Postdoc übernommen werden konnten.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,
Mit der experimentellen Pipeline werden ausgezeichnete wissenschaftliche Fähigkeiten, Fachkenntnisse und Infrastrukturen eines DZHK-Partners an anderen Standorten zur Verfügung gestellt. Die geleistete Arbeit war sowohl notwendig als auch angemessen, um die Ziele des vorliegenden Antrages zu erreichen. Die Projektkosten sind der geleisteten Arbeit angemessen.

4. dem voraussichtlichen Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans mit Zeithorizont,
Die Ergebnisse wurden teilweise auf verschiedenen nationalen und internationalen Kongressen präsentiert, aus denen bereits ein internationaler Preis folgte (Paul Dudley White International Scholar award beim BCVS in Chicago 2022). Das Manuskript ist bereits verfasst und soll 2024 hochrangig publiziert werden. Des Weiteren dienen diese Ergebnisse als Grundlage für Follow up Studien, um Patienten-spezifische therapeutisch anti-arrhythmische Therapien im Kontext des TTS zu entwickeln.

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

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

6. den erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses.

Im Rahmen dieses Projekts sind die folgenden Veröffentlichungen entstanden:

-**BCVS Chicago, USA: July 2022:** Brand C, Hübscher D, Ajmail K, Syed Ali G, Maurer W, Hasenfuß G, Nikolaev V.O., Streckfuss-Bömeke K. Arrhythmia As Cause For The Development Of The Takotsubo Syndrome In A Patient-specific Atrial Stem Cell Model. Paul Dudley White International Scholar award.

-**DGK Bonn: September 2022:** Brand C, Hübscher D, Ajmail K, Syed Ali G, Maurer W, Hasenfuß G, Nikolaev V.O., Streckfuss-Bömeke K. Arrhythmias in Takotsubo: a study on patient-specific atrial iPSC-CMs.

-**Regenerationsmeeting Göttingen: Juni 2022:** Brand C, Hübscher D, Syed Ali G, Maurer W, Hasenfuß G, Nikolaev V.O., Streckfuss-Bömeke K. The Role of the Atrium in the Development of Tako-Tsubo: Investigation of Patient-specific Atrial iPSC-Cardiomyocytes.

-**New targets in HF: Würzburg Juli 2022:** Brand C, Hübscher D, Ajmail K, Syed Ali G, Maurer W, Hasenfuß G, Nikolaev V.O., Streckfuss-Bömeke K. Arrhythmias in Takotsubo: a study on patient-specific atrial iPSC-CMs.

-**HFA Wintermeeting Les Diablerets, Schweiz: März 2023:** Brand C, Zinke C, Hübscher D, Syed Ali G, Maurer W, Hasenfuß G, Nikolaev V.O., Streckfuss-Bömeke K. Arrhythmia-induced Takotsubo Syndrome in a patient-specific atrial stem cell model.

-**ESC Amsterdam, Niederlande**; **August 2023 late breaking basic Science; Vortrag**: Clarissa Zinke, Charlotte Brand, Gideon Syed Ali, Daniela Hübscher, Karim Ajmail, Wiebke Maurer, Arne Zibat, Gerd Hasenfuß, Bernd Wollnik, Viacheslav O. Nikolaev, Katrin Streckfuss-Bömeke. Arrhythmias in the Takotsubo Syndrome: Investigating genetic predisposition using a patient-specific atrial iPSC-cardiomyocyte model

Göttingen, den 21.01.2024