

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
(Prof. Dr. med. W.-H. Zimmermann)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Kalziumhandling und Kalziumpufferung
bei familiärer dilatativer
Kardiomyopathie am Modell der
induzierten pluripotenten Stammzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Philipp Jung

aus

Frankfurt a. M.

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. med. N. Voigt

Ko-Betreuerin: Prof. Dr. rer. nat. K. Streckfuß-Bömeke

Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. med. N. Voigt

Ko-Referentin: Prof. Dr. rer. nat. K. Streckfuß-Bömeke

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 06.02.2024

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Kalziumhandling und Kalziumpufferung bei familiärer dilatativer Kardiomyopathie am Modell der induzierten pluripotenten Stammzellen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Jung P*, Seibertz F*, Fakuade FE, Ignatyeva N, Sampathkumar S, Ritter M, Li H, Mason FE, Ebert A, Voigt N (2022): Increased cytosolic calcium buffering contributes to a cellular arrhythmogenic substrate in iPSC-cardiomyocytes from patients with dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 117, 5

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise auf Kongressen präsentiert und die zugehörigen Kurzfassungen publiziert:

Jung P, Seibertz F, Fakuade FE, Mason F, Ebert A, Voigt N (2022): PO-705-05 Calcium Handling Abnormalities Contribute To Arrhythmogenesis In Dilated Cardiomyopathy. *Heart Rhythm* 19, S455.
Heart Rhythm 2022: 29. April – 1. Mai; San Francisco, Kalifornien (USA)

Jung P, Mason FE, Fakuade FE, Ebert A, Voigt N (2020): P144 Increased calcium buffering promotes proarrhythmogenic calcium alternans in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iPSC-CM). In: Abstracts of the 86th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT) With contribution of the Arbeitsgemeinschaft für Angewandte Humanpharmakologie e. V. (AGAH). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 393, 1-97.
86. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT): 2. März – 5. März 2020; Leipzig, Deutschland

* geteilte Erstautorenschaft

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abbildungsverzeichnis | IV |
| Tabellenverzeichnis | V |
| Abkürzungsverzeichnis..... | VI |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Elektrophysiologie der myokardialen Kontraktion..... | 1 |
| 1.1.1 Ruhe- und Aktionspotential | 2 |
| 1.1.2 Elektromechanische Kopplung..... | 3 |
| 1.1.3 Relaxation | 4 |
| 1.2 Kardiale Ca ²⁺ -Pufferung..... | 5 |
| 1.2.1 Eigenschaften intrazellulärer Ca ²⁺ -Puffer..... | 6 |
| 1.2.2 Einfluss der Ca ²⁺ -Pufferung auf den Ca ²⁺ -Transienten und die Kontraktilität | 9 |
| 1.2.3 Einfluss der Ca ²⁺ -Pufferung auf die Arrhythmogenese bei hereditären Herzerkrankungen..... | 10 |
| 1.3 Dilatative Kardiomyopathie..... | 12 |
| 1.4 Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC)..... | 14 |
| 1.4.1 Charakteristika von Stammzellen..... | 14 |
| 1.4.2 Die Geschichte der induzierten Pluripotenz - iPSC | 15 |
| 1.4.3 Kardiogene Differenzierung – iPSC-CM | 16 |
| 1.4.4 Eigenschaften von iPSC-CM..... | 17 |
| 1.4.5 iPSC-CM als Modell der familiären DCM..... | 18 |
| 1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit | 19 |
| 2 Material und Methoden | 21 |
| 2.1 Patch-Clamp-Technik..... | 21 |
| 2.1.1 Entstehung der Methode | 21 |
| 2.1.2 Die Cell-Attached-Konfiguration | 22 |
| 2.1.3 Die Whole-Cell-Konfiguration..... | 22 |
| 2.1.4 Voltage-Clamp-Modus | 23 |
| 2.1.5 Elektrophysikalische Prinzipien | 24 |
| 2.2 Hardware und Materialien..... | 28 |
| 2.3 Der Patch-Clamp-Messplatz..... | 30 |
| 2.3.1 Messtisch..... | 31 |
| 2.3.2 Messkammer | 31 |
| 2.3.3 Perfusionssystem | 32 |
| 2.3.4 Temperaturregulation | 32 |
| 2.3.5 Pipetten, Pipettenhalter und Pipettendrucksystem | 32 |
| 2.3.6 Elektroden | 33 |
| 2.4 Videotechnik und Epifluoreszenz | 34 |
| 2.4.1 Mikroskop..... | 34 |
| 2.4.2 Videotechnik | 34 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.4.3 | Ca ²⁺ -sensitiver Fluoreszenzfarbstoff - Fluo-3 | 35 |
| 2.4.4 | Epifluoreszenztechnik | 37 |
| 2.5 | Versuchsobjekt..... | 38 |
| 2.6 | Lösungen, Chemikalien und Pharmaka | 39 |
| 2.6.1 | 4-AP Lösung | 40 |
| 2.6.2 | Promotion..... | 41 |
| 2.6.3 | EMD57033..... | 41 |
| 2.6.4 | Koffein..... | 42 |
| 2.6.5 | Pipettenlösung | 42 |
| 2.7 | Durchführung der Patch-Clamp-Experimente..... | 44 |
| 2.7.1 | Vorbereitung der Patch-Clamp-Experimente..... | 44 |
| 2.7.2 | Herstellen einer Whole-Cell-Konfiguration..... | 45 |
| 2.7.3 | Messung des L-Typ-Ca ²⁺ -Stroms (I _{Ca,L})..... | 45 |
| 2.7.4 | Messung der CaT..... | 47 |
| 2.7.5 | Messung der SR-Beladung und der Ca ²⁺ -Pufferung..... | 50 |
| 2.8 | Durchführung der Feldstimulationsversuche | 54 |
| 2.8.1 | Vorbereitung der Feldstimulationsversuche | 54 |
| 2.8.2 | Messung feldstimulierter CaT..... | 55 |
| 2.9 | Computersoftware..... | 56 |
| 2.10 | Statistische Auswertung der Daten..... | 57 |
| 3 | Ergebnisse..... | 58 |
| 3.1 | Definition der Stromdichte..... | 58 |
| 3.2 | Erhöhte Anfälligkeit für CaT-Alternans in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM..... | 60 |
| 3.3 | Ca ²⁺ -Homöostase der DCM-cTnT-R173W iPSC-CM..... | 62 |
| 3.3.1 | Vergleichbare Membrankapazität als Maß vergleichbarer Zellgröße..... | 62 |
| 3.3.2 | Erhöhter L-Typ-Ca ²⁺ -Strom (I _{Ca,L}) in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM..... | 63 |
| 3.3.3 | Reduzierte Amplitude und langsamerer Decay des I _{Ca,L} -getriggerten CaT in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM | 64 |
| 3.3.4 | Reduzierte cCaT-Amplitude bei vergleichbarer SR Ca ²⁺ -Beladung in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM..... | 66 |
| 3.3.5 | Erhöhte intrazelluläre Ca ²⁺ -Pufferung in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM..... | 67 |
| 3.3.6 | Quantifizierung totaler zytosolischer Ca ²⁺ -Konzentrationen in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM | 68 |
| 3.3.7 | Decay-Analyse und Quantifizierung der funktionellen NCX- und SERCA-Aktivität in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM..... | 69 |
| 3.4 | Ca ²⁺ -Homöostase gesunder iPSC-CM unter EMD57033 | 71 |
| 3.4.1 | Vergleichbare Membrankapazität als Maß vergleichbarer Zellgröße..... | 71 |
| 3.4.2 | EMD57033 ohne Effekt auf den L-Typ-Ca ²⁺ -Strom (I _{Ca,L})..... | 71 |
| 3.4.3 | Reduzierte Amplitude und langsamerer Decay des I _{Ca,L} -getriggerten CaT unter EMD57033..... | 72 |
| 3.4.4 | Reduzierte cCaT-Amplitude bei vergleichbarer SR Ca ²⁺ -Beladung unter EMD57033 | 73 |
| 3.4.5 | Erhöhte intrazelluläre Ca ²⁺ -Pufferung unter EMD57033 | 74 |
| 3.4.6 | Quantifizierung totaler zytosolischer Ca ²⁺ -Konzentrationen unter EMD57033..... | 74 |
| 3.4.7 | Decay-Analyse und Quantifizierung der funktionellen NCX- und SERCA-Aktivität unter EMD57033 | 76 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.5 | Erhöhte Anfälligkeit gegenüber CaT-Alternans unter EMD57033 | 77 |
| 3.6 | Blebbistatin reduziert die Alternans-Anfälligkeit in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM | 78 |
| 4 | Diskussion..... | 80 |
| 4.1 | Mechanismen von Herzrhythmusstörungen bei DCM-Patienten..... | 80 |
| 4.2 | Verändertes zytosolisches Ca ²⁺ -Handling bei DCM-Patienten | 82 |
| 4.3 | Erhöhte Ca ²⁺ -Pufferung als ein möglicher Mechanismus reduzierter CaT | 83 |
| 4.4 | Erhöhte Ca ²⁺ -Pufferung als Ursache von CaT-Alternans bei DCM..... | 84 |
| 4.5 | CaT-Alternans als proarrhythmische Substrat | 86 |
| 4.6 | Blebbistatin als pharmakologische Leitstruktur antiarrhythmischer Behandlungskonzepte..... | 86 |
| 4.7 | Erhöhter L-Typ-Ca ²⁺ -Strom bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM | 87 |
| 4.8 | Limitationen | 90 |
| 4.8.1 | Temperatur als Einflussfaktor auf die Ca ²⁺ -Homöostase..... | 91 |
| 4.8.2 | pH-Wert als Einflussfaktor auf die Ca ²⁺ -Homöostase..... | 92 |
| 4.8.3 | Fluo-3 und die CaT-Kalibrierung als möglicher Fehler | 93 |
| 4.9 | Schlussfolgerung und Ausblick | 94 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 96 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 98 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ca^{2+} -Handlings eines Kardiomyozyten..... | 5 |
| Abbildung 2: Patch-Clamp-Konfigurationen dieser Arbeit..... | 23 |
| Abbildung 3: Ersatzschaltbild der Whole-Cell-Konfiguration..... | 25 |
| Abbildung 4: Testpuls mit Umladeströmen nach Einreißen der Zellmembran..... | 27 |
| Abbildung 5: Patch-Clamp-Setup..... | 30 |
| Abbildung 6: Aufbau der Messkammer..... | 31 |
| Abbildung 7: Prinzip der Beladung und Exzitationsanregung von Fluo-3..... | 36 |
| Abbildung 8: Epifluoreszenzsetup..... | 38 |
| Abbildung 9: Beispielhafter Membranstrom ($I_{\text{Ca,L}}$) stimuliert durch das Rampenpulsprotokoll | 46 |
| Abbildung 10: Beispielhafte Darstellung einer $I_{\text{Ca,L}}$ -Decay Analyse..... | 47 |
| Abbildung 11: Kalibrierung des Fluoreszenzsignals..... | 48 |
| Abbildung 12: Analyse des CaT..... | 50 |
| Abbildung 13: Koffeinprotokoll..... | 51 |
| Abbildung 14: Analyse der Ca^{2+} -Pufferung Schritt 1..... | 53 |
| Abbildung 15: Analyse der Ca^{2+} -Pufferung Schritt 2..... | 53 |
| Abbildung 16: Messkammer mit Feldstimulationsaufsatz..... | 54 |
| Abbildung 17: Messprotokoll der Feldstimulationsexperimente..... | 55 |
| Abbildung 18: Beispielhafte Darstellung von CaT-Alternans bei 4 Hz..... | 56 |
| Abbildung 19: Absolutströme in Abhängigkeit der Membrankapazität..... | 59 |
| Abbildung 20: Stromdichte in Abhängigkeit der Membrankapazität..... | 60 |
| Abbildung 21: Auftreten von CaT-Alternans in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM..... | 61 |
| Abbildung 22: Membrankapazität (C_M)..... | 62 |
| Abbildung 23: L-Typ- Ca^{2+} -Strom der DCM-cTnT-R173W iPSC-CM..... | 63 |
| Abbildung 24: NCX-vermittelte Ca^{2+} -Extrusion der DCM-cTnT-R173W iPSC-CM..... | 64 |
| Abbildung 25: CaT der DCM-cTnT-R173W iPSC-CM..... | 65 |
| Abbildung 26: cCaT und I_{NCX} der DCM-cTnT-R173W iPSC-CM..... | 66 |
| Abbildung 27: Intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM..... | 67 |
| Abbildung 28: Totale CaT in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM..... | 68 |
| Abbildung 29: Quantifizierung des Decays der freien und totalen CaT und cCaT in DCM- TnT-R173W iPSC-CM..... | 69 |
| Abbildung 30: Funktionelle NCX-Aktivität in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM..... | 70 |
| Abbildung 31: Membrankapazität (C_M)..... | 71 |
| Abbildung 32: L-Typ- Ca^{2+} -Strom der EMD57033 inkubierten iPSC-CM..... | 72 |
| Abbildung 33: CaT der EMD57033 inkubierten iPSC-CM..... | 73 |
| Abbildung 34: cCaT und I_{NCX} der EMD57033 inkubierten Zellen..... | 74 |
| Abbildung 35: Intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung in EMD57033 inkubierten Zellen..... | 75 |
| Abbildung 36: Totale CaT in EMD57033 inkubierten iPSC-CM..... | 75 |
| Abbildung 37: Quantifizierung des Decay der freien und totalen CaT und cCaT in EMD57033 inkubierten iPSC-CM..... | 76 |
| Abbildung 38: Auftreten von CaT-Alternans unter EMD57033..... | 78 |
| Abbildung 39: Auftreten von CaT-Alternans in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM unter Blebbistatin..... | 79 |
| Abbildung 40: Untersuchung des Einflussfaktors Temperatur auf den $I_{\text{Ca,L}}$ | 92 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Hardware und Materialien | 28 |
| Tabelle 2: Substanzen zur Beladung mit Fluo-3 | 37 |
| Tabelle 3: Kardiomyozytenmedium..... | 39 |
| Tabelle 4: Badlösung | 40 |
| Tabelle 5: 4-AP Lösung | 41 |
| Tabelle 6: Pharmaka | 42 |
| Tabelle 7: Pipettenlösung | 43 |
| Tabelle 8: Software | 56 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|--|
| 4-AP | 4-Aminopyridin |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AP | Aktionspotential |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| B_{\max} | Gesamtpufferkapazität |
| CaMK-II | Calcium-Calmodulin-Kinase-II |
| CaT | Ca^{2+} -Transient |
| $Ca_v1.2$ | L-Typ- α -1C-Untereinheit |
| cCaT | <i>coffein induced Ca^{2+}-Transient</i> |
| CDI | <i>calcium dependent inactivation</i> |
| CICR | <i>calcium induced calcium release</i> |
| CM | <i>cardiomyocyte</i> |
| cTnT | <i>cardiac troponin T</i> |
| Ctrl-1 | gesunde Kontrollgruppe aus der DCM-Familie |
| Ctrl-2 | unabhängige gesunde Kontrollgruppe |
| DCM | <i>dilated cardiomyopathy</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EAD | <i>early afterdepolarization</i> |
| EF | Ejektionsfraktion |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| ESC | <i>embryonic stem cells</i> |
| F_{BL} | minimales (<i>baseline</i>) Fluoreszenzsignal |
| FDA | <i>U.S. Food and Drug Administration</i> |
| Fluo-3-AM | Fluo-3-Acetomethylester |
| F_{Max} | maximales Fluoreszenzsignal |
| HCM | <i>hypertrophic cardiomyopathy</i> |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| $I_{Ca,L}$ | Strom des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals |
| ICD | <i>implantable cardioverter-defibrillator</i> |
| I_f | <i>funny current</i> |
| I_{Kr} | <i>rapid outward potassium current</i> |
| I_{Ks} | <i>slow outward potassium current</i> |
| I_{Kur} | <i>ultrarapid outward potassium current</i> |
| I_{Na} | Natriumstrom |

| | |
|------------|--|
| I_{NCX} | Strom des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers |
| iPSC | <i>induced pluripotent stem cell</i> |
| iPSC-CM | <i>induced pluripotent stem cell derived cardiomyocyte</i> |
| K_d | Dissoziationskonstante |
| K_{ir} | <i>inward-rectifier potassium channel</i> |
| LTCC | <i>l-type calcium channel</i> |
| MCU | mitochondrialer Ca^{2+} -Uniporter |
| $Na_v1.5$ | <i>voltage-gated sodium channel subunit 1.5</i> |
| NCX | Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher |
| NP-EGTA | Nitrophenyl-EGTA |
| OAT | Organo-Anion-Transporter |
| PKA | Proteinkinase A |
| PMT | Photomultiplier |
| PSC | <i>pluripotent stem cell</i> |
| R173W | Arginin (R) ersetzt durch Tryptophan (W) an Aminosäurestelle 173 |
| RyR2 | kardialer Ryanodinrezeptor |
| SCD | <i>sudden cardiac death</i> |
| SEM | <i>standard error of the mean</i> |
| SERCA | <i>sarcolemmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i> |
| SR | sarkoplasmatisches Retikulum |
| TnC | Troponin C |
| TnI | Troponin I |
| U_{soll} | Sollspannung (Testimpuls) |
| U-Test | Mann-Whitney-U-Test |
| VDI | <i>voltage dependent inactivation</i> |

1 Einleitung

Das menschliche Herz ist das erste Organ, welches sich bereits drei Wochen nach der Befruchtung während der Gastrulation entwickelt. Nach einigen Tagen beginnt das rudimentäre Organ zu kontrahieren (Moorman et al. 2003). Die Grundlage einer kontrollierten Herzaktion ist die elektrische Erregung, welche in eine mechanische Kontraktion übersetzt wird. Dies nennt man elektromechanische Kopplung, oder auch Erregungs-Kontraktions-Kopplung. Weiterhin bedarf es eines koordinierten Kontraktions-Relaxations-Rhythmus.

Krankheiten wie die dilatative Kardiomyopathie (DCM), die zu den häufigsten Kardiomyopathien zählt, können diese elektromechanische Kopplung bzw. die Koordination aus Kontraktion und Relaxation stören und somit einerseits zu einem progredienten Pumpversagen und andererseits zu potenziell lebensgefährlichen Arrhythmien führen. Kalzium spielt dabei die wesentliche Rolle in der elektromechanischen Kopplung, weshalb eine gestörte intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase bei der Entstehung von Arrhythmien als ein entscheidender pathogener Mechanismus angenommen wird (Ter Keurs und Boyden 2007). In diesem Kontext wird auch bei der DCM davon ausgegangen, dass eine gestörte intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase zur Entstehung von gefährlichen Arrhythmien beiträgt (Liu et al. 2015; Landstrom et al. 2017). Die genauen zu Grunde liegenden Mechanismen sind jedoch bisher nur unzureichend verstanden.

Die folgenden Abschnitte sollen eine Einführung in die elektromechanische Physiologie der Herzmuskelzelle geben. Zudem soll die Rolle des Kalziums und der Ca^{2+} -Pufferung, insbesondere deren Einfluss auf Arrhythmien, erläutert und der klinische Bezug zur Dilatativen Kardiomyopathie hergestellt werden. Zuletzt wird das verwendete Forschungsmodell der aus induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleiteten Kardiomyozyten (*induced pluripotent stem cell derived cardiomyocyte*, iPSC-CM) eingeleitet, bevor die konkrete Fragestellung dieser Arbeit ausformuliert wird.

1.1 Elektrophysiologie der myokardialen Kontraktion

Bereits 1882 fand Sydney Ringer heraus, dass die Kontraktion von Muskelgewebe von bestimmten Blutbestandteilen und deren Konzentration abhängt. Damals ging er davon aus, dass Natriumchlorid (NaCl) die entscheidende Komponente sei, die für eine

Muskelkontraktion relevant sei (Ringer 1882). Nur ein Jahr später musste er sich selbst korrigieren, als er feststellte, dass die verwendete NaCl-Lösung nicht mit destilliertem Wasser, sondern mit Leitungswasser präpariert worden war. Er wiederholte seine Experimente mit vollentsalztem Wasser, untersuchte die einzelnen Komponenten des zuvor verwendeten Leitungswassers und stellte fest, dass Ca^{2+} -Ionen der entscheidende Faktor für die Muskelkontraktion gewesen waren (Ringer 1883). Noch heute wird physiologische Elektrolytlösung für Infusionen im klinischen Alltag umgangssprachlich auch Ringer-Lösung genannt.

1.1.1 Ruhe- und Aktionspotential

Die Erregung des Herzens geht physiologischerweise von erregungsbildenden Zellen des Sinusknotens aus und wird über erregungsleitende Zellen schnell auf das Myokard übertragen (Silverman et al. 2006). Die Kardiomyozyten sind elektrisch wie auch mechanisch eng miteinander gekoppelt, was eine schnelle Erregungsausbreitung im Myokard ermöglicht (Bernstein und Morley 2006). Grundlage jeder elektrischen Erregung ist das Ruhemembranpotential. Dieses ergibt sich im Wesentlichen aus der Trennung von Ionen entlang der biologischen Membran. Die Na^+/K^+ -ATPase befördert pro Molekül Adenosintriphosphat (ATP) drei Na^+ -Ionen aus der Zelle heraus, während es zwei K^+ -Ionen in die Zelle hineinpumpt. Dadurch entsteht an der Membran jeweils ein Konzentrationsgefälle. Mittels der Nernst-Gleichung lässt sich für jedes Ion das Gleichgewichtspotential berechnen, welches aussagt, bei welchem elektrischen Potential ein elektrisch-chemisches Gleichgewicht herrscht. Diese Gleichgewichtspotentiale bestimmen je nach Permeabilität der Zellmembran das Ruhemembranpotential der Zelle. Durch die deutlich höhere K^+ -Permeabilität der Membran, die aus der Expression von einwärts gerichteten K^+ -Kanälen (*inward-rectifier potassium channel*, K_{ir}) resultiert, nähert sich das Ruhemembranpotential dem Gleichgewichtspotential von K^+ an und beträgt bei menschlichen ventrikulären Kardiomyozyten etwa -90 mV (Morad und Tung 1982; Santana et al. 2010).

Das Expressionsmuster der Ionenkanäle ist je nach Zelltyp und Lage im Herzen unterschiedlich. So exprimieren erregungsbildende Zellen im Sinusknoten deutlich weniger K_{ir} und besitzen dadurch quasi kein stabiles Ruhemembranpotential. Dafür besitzen sie sogenannte *funny channels*, die bei einem Membranpotential von etwa -45 mV öffnen und einen Na^+/K^+ -Einwärtsstrom, den sogenannten *funny current* (I_f) generieren. Dieser depolarisiert die Zelle wieder zunehmend und löst ein Aktionspotential (AP) aus (DiFrancesco 2010). Dieses führt zu einer Erregung, welche sich über das

Erregungsleitungssystem entlang der elektrischen Achse des Herzens ausbreitet und so zunächst das Vorhof- und dann zeitverzögert auch das Ventrikelmyokard koordiniert erregt. Aktionspotentiale an ventrikulären Kardiomyozyten werden in Santana et al. (2010) und in Bers (2001) entsprechend der Ionen-Ströme in fünf Phasen (Phase 0-4) eingeteilt. Ein elektrischer Reiz, der das regions- und zellspezifische Schwellenpotential überschreitet, führt zu einer schlagartigen Aktivierung von spannungsabhängigen Natriumkanälen (*voltage-gated sodium channel subunit 1.5*, $\text{Na}_v1.5$). Dadurch erhöht sich die Membranpermeabilität für Natrium stark, was aufgrund der großen Differenz zwischen dem Na^+ -Gleichgewichtspotential und dem Membranpotential in einem starken Na^+ -Einstrom resultiert. Folglich ändert sich das Membranpotential in Phase 0 bis hin zu positiven Werten (*overshoot*). Diese Spannungsänderung bewirkt in Phase 1 die Öffnung spannungsabhängiger K^+ -Kanäle, die eine direkte, wenn auch geringgradige Repolarisation bewirken (*transient outward potassium current*, I_{to}). In der folgenden Phase 2, der Plateauphase, sind spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (*l-type calcium channel*, LTCC) geöffnet, die einen einwärtsgerichteten Ca^{2+} -Strom ($I_{\text{Ca,L}}$) bewirken. Diesem ist ein kontinuierlicher K^+ -Strom entgegengesetzt (*slow-, rapid- and ultrarapid outward potassium current*, I_{Ks} , I_{Kr} , I_{Kur}), weshalb das Membranpotential eine Art Plateau bildet. Schließen sich die Ca^{2+} -Kanäle, überwiegt der auswärts gerichtete K^+ -Strom, was zur Phase 3, der Repolarisation, führt. Das wiederhergestellte Ruhemembranpotential wird nach Santana et al. (2010) als Phase 4 bezeichnet.

1.1.2 Elektromechanische Kopplung

Die elektrische Erregung der Zelle allein reicht für deren Kontraktion nicht aus. Hierfür bedarf es einer Verknüpfung von elektrischer Erregung und mechanischer Kontraktion, was daher als elektromechanische Kopplung bezeichnet wird. Ca^{2+} ist dabei das Ion, welches diese Verknüpfung in direkter Weise herstellt (Bers 2002). Zu diesem Zweck besitzen humane ventrikuläre Kardiomyozyten sogenannte T-Tubuli. Dies sind senkrecht zur Kontraktionsrichtung verlaufende Membraneinstülpungen, die auf Höhe der Z-Linien etwa 150-300 nm tief in die Zelle hineinragen und so die Depolarisierung der Membran in das Innere der Zelle weiterleiten (Eisner et al. 2017). In der Membran der T-Tubuli sind viele LTCC eingebaut. Im Zellinneren liegen einseitig an den T-Tubuli Terminalzysternen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) an, in dessen Membran Ryanodinrezeptoren (RyR2) eingebaut sind. Ein T-Tubulus bildet zusammen mit einer Terminalzysterne sogenannte Diaden. An diesen Diaden befindet sich zwischen LTCC und RyR2 ein nur etwa 15 nm breiter, sogenannter diadischer Spalt (Fawcett und McNutt 1969). Durch diese Enge kommt

es in diesem Spalt durch über LTCC einströmende Ca^{2+} -Ionen, welche mengenmäßig für eine Kontraktion nicht ausreichen würden, lokal zu einem starken Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]$) von ~ 100 nM auf ~ 10 μM (Fearnley et al. 2011). Dieses Kalzium dient dort als *second-messenger*, indem es die RyR2 des SR öffnet und so eine relevant größere Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR induziert (*calcium induced calcium release*, CICR) (Fabiato 1983).

Das freigesetzte Kalzium bindet an der regulatorischen Ca^{2+} -Bindungsstelle des Troponin C und führt so zu einer Umlagerung des Tropomyosins. Dadurch wird die Bindungsstelle des Aktins frei und es kommt zur Aktin-Myosin-Interaktion, auch bekannt als Querbrückenzyklus (Solaro R. John und Rarick Helen M. 1998). Bei dieser Interaktion spaltet die ATPase des Myosinkopfes ein gebundenes ATP-Molekül, wodurch es zu einer Bindung des Myosinköpfchens an die freigegebene Bindungsstelle des Aktins kommt. Durch Abdissoziieren von zunächst einem Phosphat (P_i) wird dann die erste Umkippbewegung des Myosinköpfchens und damit eine erste Kraftentwicklung in Gang gesetzt, durch Freigeben von Adenosindiphosphat (ADP) dann die zweite Umkippbewegung, wobei die Myosin-Aktin-Bindung weiter zunimmt (Sweeney und Houdusse 2010). Erst durch die Bindung eines neuen ATP-Moleküls löst sich der Myosinkopf wieder vom Aktin und klappt zurück in die Ausgangsstellung. Nun kann sich der Querbrückenzyklus wiederholen. Während dieses Vorgangs verschieben sich Myosin und Aktin relativ zueinander, wodurch sich das Sarkomer und damit die Muskelzelle verkürzt (Sweeney und Houdusse 2010). Dies wurde bereits 1954 als sogenannte Gleitfilamenttheorie beschrieben (Huxley und Hanson 1954). Solange Kalzium in ausreichender Konzentration vorhanden ist, wiederholt sich dieser Vorgang stetig. Erst durch das Entfernen des Kalziums aus dem Zytosol dissoziieren die Ca^{2+} -Ionen vom Troponin C ab, die Bindungsstelle am Aktin wird wieder von Tropomyosin besetzt und es kommt zur Relaxation.

1.1.3 Relaxation

Die schnelle Relaxation ist genauso relevant wie die Kontraktion, da die Ventrikel in der diastolischen Phase gefüllt und die Koronararterien mit perfundiert werden. Somit korreliert die Dauer der Diastole direkt mit der Ventrikelfüllung und der Myokardperfusion (Eisner et al. 2017). Um das Kalzium wieder aus dem Zytoplasma zu entfernen, existieren grundlegend vier Mechanismen. Die zwei wichtigsten, welche zusammen den meisten Teil des Kalziums entfernen, sind zum einen die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA), die das Kalzium direkt zurück in das SR transportiert und zum anderen der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) im Sarkolemm, welcher mengenmäßig ein Ca^{2+} -Ion in die Zelle im Austausch mit drei Na^+ -Ionen aus der

Zelle transportiert. Neben diesen zwei Mechanismen existieren noch eine Ca^{2+} -ATPase des Sarkolemm und ein Ca^{2+} -Uniporter der Mitochondrien (MCU) (Bers 2002).

Der schnelle Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) während der Erregung, gefolgt von einem exponentiellen Abfall, wird auch Ca^{2+} -Transient (CaT) genannt und moduliert maßgeblich die kontraktile Eigenschaften sowie die Kontraktionsfrequenz der Kardiomyozyten (Li et al. 2013). Die Vorgänge der Ca^{2+} -Freisetzung, -Bindung und des -Rücktransportes sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

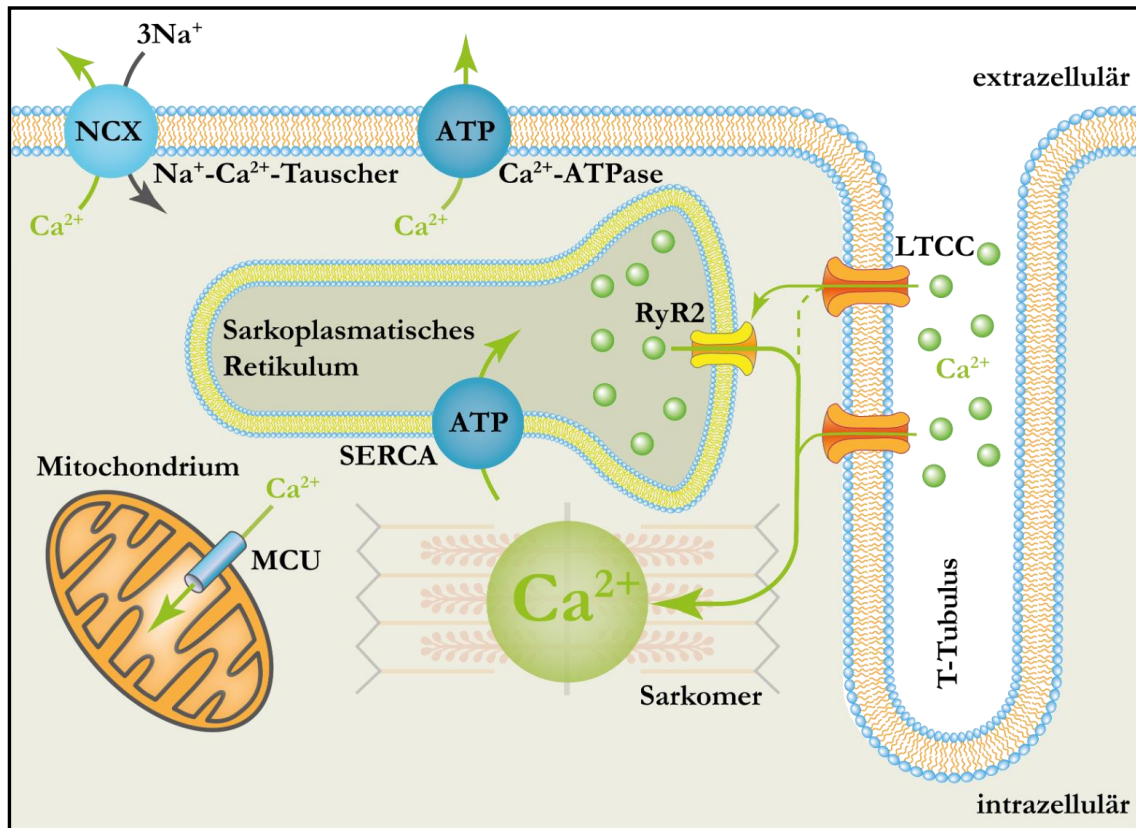


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ca^{2+} -Handlings eines Kardiomyozyten

ATP: ATPase; LTCC: L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle; MCU: Ca^{2+} -Uniporter der Mitochondrien; NCX: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher; RyR2: Ryanodinrezeptoren; SERCA: SR- Ca^{2+} -ATPase.

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an Bers (2002), Seite 198

1.2 Kardiale Ca^{2+} -Pufferung

Intrazelluläres Kalzium ist neben der elektromechanischen Kopplung an vielen weiteren zellulären Prozessen beteiligt und agiert als universeller *second-messenger*, indem es viele elektrophysiologische Prozesse durch die Regulierung von sarkolemmalen Ionenkanälen und -austauschern moduliert (Bers 2008). Jedoch sind über 99 % des intrazellulären Kalziums an intrazelluläre Proteine gebunden, was bedeutet, dass nur weniger als 1 % frei in der Zelle

vorliegt (Smith und Eisner 2019). Kleine Änderungen der Ca^{2+} -Puffereigenschaften haben einen wesentlichen Einfluss auf die intrazellulären Prozesse und im Fall von Kardiomyozyten vor allem auf deren kontraktile Eigenschaften. Fluoreszierende Ca^{2+} -Indikatoren werden genutzt, um intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) während einer Kontraktion von Kardiomyozyten zu untersuchen. Dies hat in der Vergangenheit dazu beigetragen, viele physiologische, aber auch pathologische Mechanismen besser zu verstehen. Wenn man nun bedenkt, dass nur etwa 1 % des Kalziums ungebunden ist und ausschließlich dieses an Ca^{2+} -Indikatoren binden kann (Fabiato 1983), wird somit stets nur etwas weniger als ein Hundertstel des gesamten Kalziums mit fluoreszierenden Ca^{2+} -Indikatoren sichtbar gemacht. Es ist davon auszugehen, dass die Größe und Kinetik von Ca^{2+} -Konzentrationschwankungen direkt von den Ca^{2+} -Puffereigenschaften der Kardiomyozyten abhängen und sich folglich direkt auf deren Kontraktionsverhalten auswirkt (Smith und Eisner 2019).

1.2.1 Eigenschaften intrazellulärer Ca^{2+} -Puffer

Kalzium ist als zweifach positiv geladenes Kation in wässriger Lösung von einer Hydrathülle umgeben. Wird es von Proteinen gebunden, geschieht dies in der Regel über Sauerstoff- oder Stickstoffatome ihrer Aminosäuren. Kalzium wird dabei typischerweise von sechs Liganden eines Proteins gebunden. Man spricht dann von einem sogenannten Chelation oder auch Chelatkomplex (Smith und Eisner 2019). Die typische Ca^{2+} -Bindungsstruktur von Proteinen stellt die sogenannte EF-Hand dar, dessen Begriff sich aus der Untersuchung von Parvalbumin ableitet. Es handelt sich dabei um ein spezifisches Muster aus geladenen Aminosäuren, welche sich als klassisches Helix-Loop-Helix-Motiv formieren (Kretsinger und Nockolds 1973; Pauls et al. 1996). Die Ca^{2+} -Puffereigenschaften einer Bindungsstelle sind abhängig von den Aminosäuren und deren räumlicher Anordnung, die über die spezifische Ca^{2+} -Affinität und Ca^{2+} -Selektivität einer Bindungsstelle entscheiden (Asp et al. 2016). Die Ca^{2+} -Affinität wird durch die sogenannte Dissoziationskonstante (K_d) ausgedrückt und sagt umgekehrt proportional aus, wie stark Kalzium gebunden wird bzw. direkt proportional, wie leicht es sich wieder löst. Die Bindungsselektivität drückt demgegenüber aus, ob Kalzium mit anderen Kationen um die Bindungsstelle konkurriert (Pauls et al. 1996; Asp et al. 2016). Physiologisch handelt es sich dabei um Magnesiumionen (Mg^{2+}) und Protonen (H^+). Man unterteilt die Puffer demnach weiter in reine Ca^{2+} -Puffer und $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Puffer (Milos et al. 1986; Asp et al. 2016). Kalzium bevorzugt eine pentagonale bipyramidale Bindung mit sieben Sauerstoffatomen (Koordinationszahl 7), während Mg^{2+} eher eine Oktaeder-Konfiguration mit sechs Sauerstoffatomen eingeht (Koordinationszahl 6). Häufig taucht an Position 12 einer EF-Hand ein Glutamat auf, welches entweder mit

Kalzium eine zweizählige oder mit Mg^{2+} eine einzählige Bindung eingehen kann und somit für beide eine Bindungsstelle darstellt (Kumar et al. 1990; Asp et al. 2016). Alle Ca^{2+} -Bindungsstellen eines Proteins bestimmen gemeinsam dessen Ca^{2+} -Puffereigenschaften und alle Pufferproteine einer Zelle bestimmen unter Berücksichtigung ihrer Konzentration gemeinsam die Ca^{2+} -Puffereigenschaften einer gesamten Zelle (Smith und Eisner 2019). Proteine, die die intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung in Kardiomyozyten bestimmen, sind im Wesentlichen Troponin C und SERCA mit einem K_d -Wert von jeweils ca. $0,6 \mu\text{mol/l}$ (Shannon et al. 2004). Zudem existieren weitere intrazelluläre Ca^{2+} -Puffer wie etwa Calmodulin ($K_d = 7 \mu\text{mol/l}$), daneben aber auch lösliche Moleküle wie ATP ($K_d = 1200 \mu\text{mol/l}$) oder Histidin-Dipeptid ($K_d = 1000 \mu\text{mol/l}$), die aufgrund ihrer hohen Konzentrationen und ihrer Membranungebundenheit nicht zu vernachlässigen sind (Smith und Eisner 2019).

1.2.1.1 Troponin C als Ca^{2+} -Puffer

Troponin C ist das Ca^{2+} -bindende Molekül der elektromechanischen Kopplung und damit auch ein zentrales Glied zur Regulation des Querbrückenzyklus. Troponin C besitzt drei Ca^{2+} -Bindungsstellen. Davon sind zwei hochaffin gegenüber Ca^{2+} -Ionen, jedoch binden sie auch Mg^{2+} -Ionen und sind an der Auslösung und Regulation der Kontraktion nicht direkt beteiligt. Sie sind durch ihre hohe Affinität auch während der Diastole fast vollständig mit Ca^{2+} und Mg^{2+} besetzt. Die dritte Bindungsstelle ist niederaffin und Ca^{2+} -selektiv. Sie stellt die regulatorische Seite des Troponin C dar und bindet erst bei systolischen Konzentrationen Ca^{2+} -Ionen; dies bewirkt eine krafterzeugende Myosin-Aktin-Interaktion (Bers 2002; Smith und Eisner 2019). Sie ist somit auch ein bedeutender Baustein der Adaptivität des Herzens, da an ihr die Ca^{2+} -Affinität streng reguliert wird, welche sich auf die Ca^{2+} -Sensitivität des Herzens auswirkt. Verschiedene Pharmaka bedienen sich in ihrer Wirkweise dieser Regulationsfähigkeit (Bers 2008; Li und Hwang 2015). Doch auch bestimmte Mutationen kontraktiler Filamente, insbesondere von Troponin C und Tropomyosin, können die Ca^{2+} -Affinität beeinflussen und damit zu Pathologien wie der dilatativen oder hypertrophen Kardiomyopathie führen (Robinson et al. 2007). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass diese Mutationen einen direkten Einfluss auf die Ca^{2+} -Pufferung ausüben (Huke und Knollmann 2010; Schober et al. 2012; Robinson et al. 2018). Dennoch ist zu erwarten, dass die regulatorischen Mechanismen am Troponin-Tropomyosin-Komplex von weitaus mehr Bedingungen abhängig sind als bisher angenommen. Reine Kraft- Ca^{2+} -Kurven, welche in vielen Studien als einzige Daten zur Bestimmung der Ca^{2+} -Sensitivität dienen, spiegeln häufig nur ungenügend die molekularen Mechanismen wider. Sie lassen zwar Rückschlüsse auf die

kraftbezogene Ca^{2+} -Sensitivität zu, können aber nicht sicher erklären, ob Veränderungen derselben direkt aus einer veränderten Ca^{2+} -Bindung resultieren (Smith und Eisner 2019). Wenn man die vielen krankheitsbezogenen Proteinveränderungen betrachtet, welche Einfluss auf die Ca^{2+} -Sensitivität von TnC nehmen, erscheint es eher unwahrscheinlich, dass die Ca^{2+} -Sensitivität ausschließlich durch die intrinsische Ca^{2+} -Bindungsaffinität von TnC, ähnlich einem zweistufigen Schalter, reguliert wird (Siddiqui et al. 2016). Es wird vielmehr davon ausgegangen, dass nachgeschaltete Prozesse in der Wechselwirkung zwischen TnC und seinen regulierenden Proteinen, wie Troponin I (TnI), Troponin T (TnT) und wiederum deren regulierende Proteine, einen wesentlichen Einfluss auf die gemessene („scheinbare“) Ca^{2+} -Sensitivität haben (Siddiqui et al. 2016; Smith und Eisner 2019). Weiterhin ist in diese Überlegung mit einzubeziehen, dass es umgekehrt genauso gut sein kann, dass krankhafte Proteinveränderungen die angeborene, über Phosphorylierungsprozesse gesteuerte Regulation der Ca^{2+} -Sensitivität hemmt und somit physiologische Anpassungen der Ca^{2+} -Sensitivität unentdeckt bleiben (Biesiadecki et al. 2007; Messer und Marston 2014; Siddiqui et al. 2016). In einer Untersuchung, welche die Wichtigkeit der oben angeführten Überlegungen unterstreicht, konnte gezeigt werden, dass Koffein das Verhältnis aus $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und Kraft hin zu niedrigeren $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verschiebt, ohne die Ca^{2+} -Bindung an TnC zu verändern (Powers und Solaro 1995). Es ist somit zusammengefasst nicht sicher möglich, von einer Veränderung der Kraft- Ca^{2+} -Kurve auf eine entsprechende Veränderung der Ca^{2+} -Bindungseigenschaften oder der Ca^{2+} -Pufferungseigenschaften zu schließen. Umgekehrte Rückschlüsse sind ebenso nicht pauschal möglich. Analysen der kontraktilen Funktion in Abhängigkeit der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sind somit immer getrennt von Veränderungen der Ca^{2+} -Bindungsaffinität der Myofilamente zu betrachten.

1.2.1.2 SERCA als Ca^{2+} -Puffer

Entscheidend für eine gute Pumpfunktion des Herzens ist neben der Ca^{2+} -Freisetzung auch die Relaxation und damit die Entfernung von Kalzium aus dem Zytosol. Die SERCA ist dabei der entscheidende Transporter, welcher das Kalzium nach dessen Freisetzung wieder zurück in das SR pumpt (Bers 2002). Um dies zu gewährleisten, bindet SERCA Kalzium auf der zytosolischen Seite der Membran. Durch die Spaltung von ATP kommt es zu einer Konformationsänderung der SERCA, wodurch Kalzium auf der SR-Seite der Membran wieder freigelassen wird. Bei diesem Prozess ist Kalzium an das Transporterprotein gebunden und somit kein Teil des freien Kalziums im Zytosol. Kalzium wird also durch die SERCA gepuffert (Higgins et al. 2006). Somit reduziert die SERCA über zwei Mechanismen die $[\text{Ca}^{2+}]_i$: Durch die initiale Pufferfunktion werden Ca^{2+} -Ionen direkt an die SERCA

gebunden (1) und dann aktiv aus dem Zytosol entfernt (2) (Higgins et al. 2006). Smith und Eisner (2019) berechneten, dass dadurch nur etwa zwei Pumpzyklen der SERCA notwendig sind, um das pro Systole freigesetzte Kalzium wieder in das SR zurückzuführen. Dies zeigt, wie entscheidend die Ca^{2+} -Bindungsaffinität der SERCA für die kardiomyozytäre Kontraktilität ist und wie ihr damit eine Doppelrolle beim Abklingen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zukommt (Shannon et al. 2004).

1.2.2 Einfluss der Ca^{2+} -Pufferung auf den Ca^{2+} -Transienten und die Kontraktilität

Die intrazellulären Ca^{2+} -Puffer haben einen großen Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase und somit auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten. Um die Ca^{2+} -Puffer der Zelle mathematisch zu beschreiben, wird das Verhältnis aus totalem ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}$) und freiem Kalzium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), wie in Formel 1, dargestellt (Trafford et al. 1999). Dabei ist B_{max} die Gesamtpufferkapazität der Zelle, entsprechend einem Maß der Menge an Ca^{2+} -Puffern und K_d die Dissoziationskonstante, also die $[\text{Ca}^{2+}]_i$, bei der 50 % des Kalziums gebunden ist.

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} = \frac{B_{\text{Max}} \cdot [\text{Ca}^{2+}]_i}{K_d + [\text{Ca}^{2+}]_i}$$

Formel 1: Puffergleichung

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}$ = totale Ca^{2+} -Konzentration; B_{Max} = maximale Pufferkapazität; K_d = Dissoziationskonstante; $[\text{Ca}^{2+}]_i$ = freie Ca^{2+} -Konzentration

Um zu beschreiben, wie sich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei einer Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}$ verhält, wurde der Begriff der Puffer-Leistung ($\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}}{d[\text{Ca}^{2+}]_i}$) eingeführt, welcher sich mathematisch wie in Formel 2 darstellt:

$$\frac{d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}}{d[\text{Ca}^{2+}]_i} = \frac{B_{\text{max}} \cdot k_d}{(k_d + [\text{Ca}^{2+}]_i)^2}$$

Formel 2: Puffer-Leistung

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}$ = totale Ca^{2+} -Konzentration; B_{Max} = maximale Pufferkapazität; K_d = Dissoziationskonstante; $[\text{Ca}^{2+}]_i$ = freie Ca^{2+} -Konzentration

Eine hohe Puffer-Leistung sagt somit aus, dass bei gleicher Menge an Kalzium, die freigesetzt wird, eine geringere Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ folgt (Díaz et al. 2001). Die Puffer-Leistung wird dabei maßgeblich durch den K_d -Wert bestimmt, wobei gilt: je kleiner der K_d , desto größer die maximale Puffer-Leistung. Man erwartet demnach bei einer Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Pufferung eine Verminderung des CaT in der Systole. Wichtig zu beachten ist dabei

auch die diastolische $[Ca^{2+}]_i$, von welcher ausgehend die Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet wird. Ist diese beispielsweise erhöht, so bewirkt dies eine größere Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$, da dann die Puffer bereits gesättigter sind und die Puffer-Leistung abnimmt (Gattoni et al. 2016). Umgekehrt wird bei einem erniedrigten diastolischen Ausgangswert eine geringe Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ erwartet, was auf eine Zunahme der Puffer-Leistung zurückzuführen ist. Neben einem Einfluss auf die Amplitude des CaT wird auch eine Veränderung des Ca^{2+} -Abfalls (CaT-Decay) erwartet. Der CaT-Decay in Kardiomyozyten folgt einem exponentiellen Abfall, da insbesondere die SERCA konzentrationsabhängig arbeitet (Lytton et al. 1992). Durch die Bindungsaffinität der Puffer gegenüber Kalzium haben diese einen wesentlichen Einfluss darauf, wie schnell das Kalzium wieder aus dem Zytosol entfernt wird. Eine höhere Affinität bewirkt eine verlangsamte Abklingrate, was sich mathematisch in einer verlängerten Zeitkonstante (τ) der Exponentialfunktion des CaT-Decays zeigt (Schober et al. 2012; Robinson et al. 2018). Besonders eindrucksvoll wurde der Effekt von Ca^{2+} -Puffern auf den CaT in der Arbeit von Díaz et al. (2001) gezeigt, in welcher ventrikuläre Kardiomyozyten von Ratten mit einem exogenen Ca^{2+} -Puffer (Nitrophenyl-Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure, NP-EGTA) beladen wurden. Dieser Ca^{2+} -Chelator lässt sich durch einen Lichtblitz innerhalb der Zelle spalten, sodass CaT jeweils mit und ohne exogenen Ca^{2+} -Puffer derselben Zelle aufgezeichnet werden können. Die Daten zeigen, dass der CaT unter NP-EGTA in der Amplitude reduziert und im Decay verlangsamt war. Nach der Spaltung des Ca^{2+} -Chelators normalisierte sich der CaT vollständig (Díaz et al. 2001). Auch andere Arbeiten konnten durch die pharmakologische Modulierung von Kardiomyozyten mittels EMD57033, welches eine Ca^{2+} -Sensitivierung von Troponin C und damit eine erhöhte Ca^{2+} -Pufferung bewirkt, die beschriebenen Effekte einer verringerten CaT-Amplitude und eines verlangsamten CaT-Decay nachstellen (Kawai et al. 2000; Schober et al. 2012; Wang et al. 2017).

1.2.3 Einfluss der Ca^{2+} -Pufferung auf die Arrhythmogenese bei hereditären Herzerkrankungen

Die beschriebenen Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase zeigen eindeutig die Relevanz der Ca^{2+} -Pufferung auf die Kontraktilität und Relaxationsfähigkeit von Kardiomyozyten. Es ist bekannt, dass einige hereditäre Erkrankungen des Herzens durch Defekte der Myofilamente zu Veränderungen der Ca^{2+} -Sensitivität und zu einer erhöhten Arrhythmogenese beitragen (Huke und Knollmann 2010). Im Vordergrund stehen hierbei Mutationen des Troponin T, welche mit der Hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) assoziiert sind. Patienten mit HCM assoziierten Mutationen besitzen ein erhöhtes Risiko für kardiale Arrhythmien, die zum

plötzlichen Herztod (*sudden cardiac death*, SCD) führen können (Seggewiss et al. 2009; Adamczak und Oko-Sarnowska 2018). Es wurde zudem bereits im HCM-Mausmodell gezeigt, dass eine direkte Korrelation zwischen der Ca^{2+} -Sensitivität und dem Auftreten von Arrhythmien besteht (Baudenbacher et al. 2008). Neben dem vermehrten Auftreten von Arrhythmien konnte zudem eine Verkürzung, Triangulierung und Instabilität der Aktionspotentiale nachgewiesen werden. In der selben Veröffentlichung von Baudenbacher et al. (2008) wurde diese Kausalität durch die pharmakologische Modulation der Ca^{2+} -Sensitivität mit dem Ca^{2+} -Sensitizer EMD57033 bestätigt, indem gezeigt wurde, dass dieser vergleichbare Veränderungen der Aktionspotentiale bewirkt und ebenfalls die Arrhythmogenese antreibt. Der Ca^{2+} -Desensitizer Blebbistatin hingegen normalisierte die Aktionspotentiale und schien vor vermehrten Arrhythmien zu schützen. Auf dieser Arbeit aufbauend konnte eine der erhöhten Ca^{2+} -Sensitivität entsprechend erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung in Zellen mit HCM-Mutation nachgewiesen werden, und es wurde die erhöhte Ca^{2+} -Pufferung als Ursache der Aktionspotentialveränderungen (und somit der erhöhten Arrhythmieeigung) diskutiert (Wang et al. 2017; Robinson et al. 2018; Wang et al. 2018).

Darüber hinaus existieren Formen der dilatativen Kardiomyopathie (DCM), welche ebenfalls mit Mutationen des Troponin T assoziiert sind. Patienten mit dieser genetischen Belastung besitzen ebenfalls ein erhöhtes Risiko für ventrikuläre Arrhythmien und damit verbundenen schwerwiegenderen klinischen Verläufen (Mogensen et al. 2004; Merlo et al. 2013). Zur Ca^{2+} -Sensitivität bei DCM existiert keine einheitliche Datenlage. Manche Arbeiten zeigen eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität (Wolff et al. 1995; Wolff et al. 1996; Nakano et al. 2019), während andere Arbeiten wiederum eine erniedrigte darlegen (Sommese et al. 2013; Reda und Chandra 2019). Wichtig zu betonen ist, dass diese Ergebnisse in der Regel aus Kraft- Ca^{2+} -Messungen entstehen, welche keine direkten Rückschlüsse auf die Ca^{2+} -Affinität zulassen (Abschnitt 1.2.1). Es ist bemerkenswert, dass über die Ca^{2+} -Affinität der Myofilamente und die Ca^{2+} -Pufferung bei DCM bisher nahezu nichts bekannt ist.

Experimentell lassen sich Arrhythmien unterschiedlich nachweisen. Am Tiermodell kann das gesamte Organ im Organismus oder im Langendorff-Modell mit Hilfe von EKG-Ableitungen auf Arrhythmien untersucht werden; dies ist in einem 2D-Zellkultur-Modell oder in einzelnen Kardiomyozyten nicht abbildbar. Es wurden jedoch auch auf Zellebene Muster identifiziert, welche nachweislich ein proarrhythmogenes Substrat für die Entstehung von klinisch relevanten Arrhythmien bilden (Edwards und Blatter 2014). Typischerweise

lassen sich bei der Messung von CaT oder AP sogenannte Alternans detektieren (CaT- und AP-Alternans). Diese beschreiben Änderungen der CaT-Amplitude oder der AP-Dauer, welche - einem regelmäßigen Muster folgend - von Schlag zu Schlag variieren (Fakuade et al. 2021). Diese können im Herzen zu der Entstehung von fokalen oder Reentry-Arrhythmien beitragen (Weiss et al. 2011). Der Zusammenhang zwischen erhöhter Ca²⁺-Pufferung und dem Auftreten von AP-Alternans konnte bereits in der Arbeit von Baudenbacher et al. (2008) gezeigt werden. Es existieren jedoch auch gegensätzliche Arbeiten, weshalb der genaue Zusammenhang zwischen Ca²⁺-Pufferung und Alternans nicht schlussendlich geklärt ist (Kornyejev et al. 2010; Nivala und Qu 2012; Smith und Eisner 2019).

1.3 Dilatative Kardiomyopathie

Hinter dem Begriff der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) verbirgt sich ein breites Spektrum heterogener Herzerkrankungen, welche alle durch eine linksventrikuläre Dilatation und eine verminderte Auswurfleistung (Ejektionsfraktion, EF) gekennzeichnet sind (Bozkurt et al. 2016). Beides sind maßgebliche Kriterien, die für die Diagnosestellung einer DCM, welche mittels zweidimensionaler Echokardiographie und radiologischer Bildgebung (Magnetresonanztomografie; MRT) erfolgen kann, erforderlich sind.

Zur Epidemiologie der DCM existiert keine konsistente Datenlage, die Prävalenz wird jedoch im Bereich zwischen 1:250 bis zu 1:2500 geschätzt. Sie ist damit die vermutlich häufigste Kardiomyopathie (Hershberger et al. 2013; Weintraub et al. 2017). Die Inzidenz wird mit 5-7 Fällen pro 100.000 Personen pro Jahr angegeben, wobei jedoch vermutlich eine reduzierte Penetranz und variable Expressivität zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Fallzahlen führt (Hershberger et al. 2013; Reichart et al. 2019).

Da es sich bei der DCM um eine ätiologisch heterogene Erkrankung handelt, kann sie auf genetische und nicht-genetische Ursachen zurückgeführt werden. Dabei kann je nach Ätiologie und Definitionskriterien in erworbene (sekundäre), syndromale und nicht-syndromale Formen unterschieden werden (Hershberger und Morales 2007). Hierbei nimmt mit ca. 60 % aller Fälle die sekundär ischämisch bedingte DCM den weitaus größten Anteil ein (Shore et al. 2015). Die Liste anderer nicht-genetischer Ursachen ist lang. Häufig genannt werden arterielle Hypertonie, Klappenvitien, entzündliche Erkrankungen, Infektionen, Toxine sowie metabolische und endokrine Erkrankungen (Hershberger et al. 2010). Auf den Pathomechanismus erworbener oder syndromaler DCM soll in dieser Arbeit kein weiterer Fokus gelegt werden, es ist jedoch davon auszugehen, dass auch bei diesen Formen eine gewisse genetische Komponente beteiligt ist und auch gemischte Ätiologien einen

signifikanten Anteil ausmachen (McNally und Mestroni 2017). Unter den nicht-syndromalen Formen der DCM wird überdies in familiäre (≥ 2 Familienmitglieder 1. Grades betroffen) und sporadische Fälle (1 Familienmitglied betroffen) unterschieden, wobei die Prävalenz der familiären DCM im Durchschnitt auf 30 - 50 % geschätzt wird und bei ca. 40 % dieser Fälle eine genetische Mutation identifiziert werden konnte (Taylor et al. 2006; Hershberger und Morales 2007; Bozkurt et al. 2016; McNally und Mestroni 2017). Es ist jedoch anzumerken, dass auch bei sporadischen Fällen genetische Ursachen gefunden werden, da die Vererbung häufig nur eine unvollständige Penetranz zeigt oder auch Spontanmutationen auftreten können (Ganesh et al. 2013). Insgesamt sind Mutationen in mehr als 30 Genen bekannt, welche definitiv mit DCM assoziiert sind und weitere über 80 Gene, die diesbezüglich im Verdacht stehen (McNally und Mestroni 2017). Unter diesen existieren Gene, die für Proteine des Sarkomers, des Zytoskelettes, der Mitochondrien oder verschiedener Ionenkanalproteine codieren. Die sieben häufigsten ursächlichen Gene (und ihre Proteine) in abnehmender Häufigkeit sind: *TTN* (Titin), *LMNA* (Laminin A/C), *MYH7* (Beta-Myosin schwere Kette), *TNNT2* (*cardiac troponin T*, cTnT), *SCN5A* (alpha-Untereinheit 5 des spannungsgesteuerten Na^+ -Kanals $\text{Nav}1.5$), *DSP* (Desmoplakin) und *RBM20* (RNA-bindendes Protein 20) (McNally und Mestroni 2017). Die meisten Mutationen werden autosomal-dominant vererbt, nur wenige autosomal-rezessiv oder X-chromosomal (Lakdawala et al. 2013).

Die schlechte klinische Prognose ist neben der progredienten Linksherzinsuffizienz mit Rückwärts- und Vorwärtsversagen vor allem auf die erhöhte Inzidenz von ventrikulären Tachykardien und anderen Herzrhythmusstörungen zurückzuführen, die mit einem hohen Risiko für SCD einhergehen (Li et al. 2020). Die Prävention und Therapie von Rhythmusstörungen bei DCM mittels Resynchronisation oder Implantation eines Kardioverter-Defibrillators (*implantable cardioverter-defibrillator*, ICD) stellt eine wichtige therapeutische Säule dar, um lebensbedrohlichen Komplikationen präventiv entgegen zu wirken (Schultheiss et al. 2019). Vor diesem Hintergrund ist es umso interessanter, dass insbesondere Patienten mit Mutationen in Genen sarkomerischer Proteine einen stärkeren Phänotyp entwickeln und ein erhöhtes Risiko für Rhythmusstörungen aufweisen (Mogensen et al. 2004; Merlo et al. 2013). Während sich bisherige Arbeiten vorrangig auf die molekularen Mechanismen der gestörten kontraktilen Funktion konzentrierten, ist über den zugrundeliegenden Pathomechanismus von Herzrhythmusstörungen bei Patienten mit DCM noch wenig bekannt. Um diesen näher zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Kardiomyozyten, abgeleitet aus induzierten pluripotenten Stammzellen (*induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes*, iPSC-CM) von DCM-Patienten mit einer R173W-

Punktmutation (Arginin zu Tryptophan) des kardialen Troponin T (cTnT) verwendet. Von dieser Mutation ist bekannt, dass sie mit einer hohen Inzidenz von ventrikulären Rhythmusstörungen einhergeht (Campbell et al. 2013).

1.4 Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC)

Die Regenerationsfähigkeit von Kardiomyozyten gilt als sehr begrenzt bis kaum vorhanden. So geht man davon aus, dass sich während eines gesamten Lebens weniger als 50 % aller Kardiomyozyten mindestens einmal regenerieren (Bergmann et al. 2009).

In der medizinischen Forschung sind humane Kardiomyozyten sehr rar, da eine Gewebespende nur im Rahmen medizinisch notwendiger Eingriffe möglich ist. Dadurch lassen sich in aller Regel keine Zellen herzgesunder Patienten gewinnen. Zudem ist deren Kultivierung in Zellkulturen aufgrund der eingeschränkten Mitosefähigkeit nur begrenzt möglich (Ebert et al. 2015). Ein einfach verfügbares Modell findet sich hingegen in Tiermodellen, insbesondere in dem der Maus. Aber auch, wenn Tiermodelle bis heute unbestreitbare Einblicke in physiologische und pathologische Prozesse liefern, so spiegeln die gewonnen Erkenntnisse oft nur unzureichend die Vorgänge im menschlichen Organismus, insbesondere im Rahmen der Erforschung humaner Pathologien, wieder (Houser et al. 2012).

Der Mangel an geeigneten Modellen stellt die Medizin in der Erforschung kardiologischer Erkrankungen vor enorme Herausforderungen. Durch die Entwicklung induzierter pluripotenter Stammzellen im Jahre 2006 eröffneten sich jedoch gänzlich neue Möglichkeiten und Ausblicke in diesem Bereich (Takahashi und Yamanaka 2006; Yoshida und Yamanaka 2011).

1.4.1 Charakteristika von Stammzellen

Die Stammzelle wird gerne als die „Mutter aller Zellen“ bezeichnet. Sie zeichnet sich durch besondere Eigenschaften wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, zur Ausdifferenzierung oder zur asymmetrischen Zellteilung aus (Morrison et al. 1997). Stammzellen werden weiter nach ihrem Differenzierungspotential eingeteilt. So bezeichnet man jene Zellen, welche die Fähigkeit zur Bildung eines gesamten Organismus besitzen, als totipotent. Während der Entwicklung eines Lebewesens differenzieren sich diese Zellen bereits ab dem 8-Zell-Stadium weiter aus (Kelly 1977). Die nächste Differenzierungsstufe ist die Pluripotenz. Die pluripotenten Stammzellen (*pluripotent stem cell*, PSC) sind per Definition im Stande, sich in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren, haben jedoch die Fähigkeit der Bildung

extraembryologischen Gewebes verloren, weshalb sie alleine kein vollständiges Lebewesen mehr ausbilden können. Im adulten Organismus finden sich sogenannte adulte Stammzellen unterschiedlicher Gewebesubtypen. Diese sind definitionsgemäß nur noch multi- oder unipotent, was bedeutet, dass sie in ihrer Gewebezelllinie bereits so weitgehend differenziert sind, dass sie nur noch gewebespezifische Zellen bilden können. Sie dienen der Gewebserneuerung (z. B. in Epithelien) oder der Entwicklung spezieller Zelltypen (z. B. im Knochenmark). Selbst im Herzen, welches als endgültig differenziertes Organ ohne Selbsterneuerungspotential gilt, wurde eine Subpopulation von sich replizierenden multipotenten Zellen gefunden (Beltrami et al. 2003; Bearzi et al. 2007). Ihre Rolle in der Erneuerung geschädigten Herzgewebes und in ihrer therapeutischen Anwendbarkeit ist jedoch umstritten (Makkar et al. 2012; Nguyen et al. 2016).

Pluripotente Stammzellen sind aufgrund ihres breiten Differenzierungsspektrums für Forschung und Therapiekonzepte besonders interessant. Natürlicherweise befinden sich PSC in der inneren Zellmasse der Blastozyste des späten Blastomers. Die Gewinnung von PSC erforderte daher in jüngster Vergangenheit die Entnahme dieser embryologischen Stammzellen (*embryonic stem cell*, ESC), da sie die einzig verfügbaren Zellen mit Pluripotenz waren (Evans und Kaufman 1981; Martin 1981; Thomson et al. 1998). Aufgrund der Herkunft von PSC sind diese ethisch jedoch äußerst umstritten. Somit war der Einsatz von PSC in Forschung und Medizin lange Zeit nur begrenzt möglich.

1.4.2 Die Geschichte der induzierten Pluripotenz - iPSC

Bereits im Jahre 1952 gelang es, Zellkerne von einer lebenden somatischen Zelle in ein kernloses Froschei zu transplantieren (Briggs und King 1952). Aufbauend auf dieser Methode wurden erste Erfolge in der Reprogrammierung von somatischen Zellkernen erzielt. Zunächst gelang dies durch den Transfer somatischer Zellkerne eines adulten Schafes in kernlose Oozyten eines anderen Schafes, welches im Jahr 1996 als Schaf „Dolly“ zur Welt kam und weltweite Berühmtheit erlangte (Wilmut et al. 1997). Darauf aufbauend glückte wenige Jahre später die Reprogrammierung von Zellkernen durch die Transplantation dieser in kernlose embryonale Stammzellen (Tada et al. 2001). Diese Versuche zeigen, dass Zellkerne von terminal ausdifferenzierten adulten somatischen Zellen vollständig reprogrammierbar sind und dass bestimmte Faktoren in Oozyten und ESC dafür zuständig sind.

Der Durchbruch wurde im Jahr 2006 erreicht, als es gelang, somatische Zellen direkt zu reprogrammieren, ohne deren Zellkerne zu transplantieren. Dazu wurde aus 24 möglichen Faktoren eine Kombination von vier Transkriptionsfaktoren (Oct-3/4, Klf-4, Sox-2, c-Myc)

ermittelt, die eine Pluripotenz in Maus-Fibroblasten induzieren konnten. Dafür wurden die entsprechenden Gene mittels retroviraler Transduktion in das Genom der Zellen eingebracht. Diese Zellen erhielten den Namen „induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC)“ (Takahashi und Yamanaka 2006). Für diesen entscheidenden Erfolg wurde Prof. Yamanaka im Jahre 2012 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet (Yamanaka 2013). Nur ein Jahr nach Veröffentlichung dieser Arbeit gelang es verschiedenen Arbeitsgruppen fast zeitgleich, iPSC aus humanen Fibroblasten zu erzeugen. So konnte gezeigt werden, dass die gleichen oben genannten vier Faktoren auch an humanen Zellen funktionieren (Takahashi et al. 2007; Park et al. 2008). Parallel dazu gelang es durch den Einsatz von Lin-28 und Nanog auf c-Myc als Transkriptionsfaktor zu verzichten. Dies erweiterte das Verständnis über die induzierte Pluripotenz und ihre Faktoren und machte das Protoonkogen c-Myc fakultativ, wenngleich es als sehr effektiv gilt (Yu et al. 2007).

Inzwischen wurde die Methode insofern weiterentwickelt, dass Alternativen entdeckt wurden, die auf den Einsatz von Retroviren verzichten. So gelang es 2008, die vier Faktoren mittels Adenoviren zu integrieren und so auf eine retrovirale Modifikation des eigentlichen Genoms zu verzichten (Stadtfield et al. 2008). Im selben Jahr wurden die ersten iPSC gänzlich ohne den Einsatz von Viren mittels nicht-integrativer cDNA-Plasmide erzeugt (Okita et al. 2008). 2009 gelang dasselbe mit modifizierten membrangängigen Proteinen, wodurch auf eine zelleigene Proteinbiosynthese integrierter Gene verzichtet werden konnte (Kim et al. 2009; Zhou et al. 2009).

Die Verwendung von humanen iPSC bietet inzwischen eine gute Alternative zu humanen ESC. Sie sind durch die deutlich geringeren ethischen Bedenken besser zugänglich und entsprechend in Klinik und Forschung breiter einsetzbar. Somit ergeben sich wesentliche Fortschritte im Bereich der personalisierten Medizin (Robinton und Daley 2012). Im Bereich der Herzforschung lassen sich patienten- und krankheitsspezifische Kardiomyozyten, abgeleitet aus iPSC, entwickeln (iPSC-CM), die in großer Menge vorhanden sind (BurrIDGE et al. 2014; Hnatiuk et al. 2021).

1.4.3 Kardiogene Differenzierung – iPSC-CM

iPSC lassen sich zu iPSC-Kardiomyozyten (iPSC-CM) differenzieren (Zhang et al. 2009) und schließen damit eine Lücke in der medizinischen Forschung zwischen der begrenzten Verfügbarkeit humaner Kardiomyozyten auf der einen Seite und der ethisch problematischen Nutzung embryonaler Stammzellen oder auch von Tiermodellen auf der anderen Seite. Darüber hinaus bieten iPSC-CM die beispiellose Möglichkeit, nicht nur krankheits-, sondern sogar patientenspezifische Krankheitsmodelle zu entwerfen (Ebert et al. 2015). Dies konnte

bereits für eine Vielzahl von kardialen Erkrankungen, wie beispielsweise beim Long-QT-Syndrom (Moretti et al. 2010), bei der arrhythmogenen rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (Kim et al. 2013), der familiären hypertrophen Kardiomyopathie (Lan et al. 2013; Liang et al. 2013) oder der familiären dilatativen Kardiomyopathie (Sun et al. 2012; Dai et al. 2020) realisiert werden. Zur Differenzierung von iPSC in iPSC-CM werden bestimmte Signalwege stufenspezifisch so moduliert, dass die Zellen beginnen, kardiale Proteine zu exprimieren. Dabei spielt insbesondere die Modulierung von TGF β -Rezeptoren über das *bone morphogenetic protein 4* (BMP4) oder Activin A eine Rolle, was zu einer Aktivierung des Wnt-Signalweges führt (Paige et al. 2010; Kattman et al. 2011; Lian et al. 2013). Neben der genauen Modulierung der internen Signalwege ist aber auch die Umgebung, in welcher sich die Zellen befinden, von entscheidender Bedeutung. So hat sich gezeigt, dass der gezielte Einsatz von Extrazellulärmatrix die kardiale Ausdifferenzierung unterstützt (Zhang et al. 2012). Durch die intensive Weiterentwicklung der Differenzierungsprotokolle ist es heute möglich, effizient Kardiomyozyten aus iPSC mit einer Reinheit von über 98 % zu differenzieren (Ma et al. 2011). Dabei ist zu bedenken, dass iPSC-CM eine gewisse Differenzierungsheterogenität besitzen. Es ist durch AP-Messungen bekannt, dass neben vorwiegend ventrikulären Differenzierungslinien auch atriale sowie zu geringen Teilen schrittmacherähnliche Linien existieren (Zhang et al. 2009; Ma et al. 2011; Burridge et al. 2012; Abilez et al. 2018).

1.4.4 Eigenschaften von iPSC-CM

Zur Morphologie der iPSC-CM lässt sich sagen, dass sich diese im Vergleich zu aus Gewebeproben isolierten humanen Kardiomyozyten wesentlich heterogener präsentieren. So weisen sie neben runden auch dreieckige oder längliche Erscheinungsformen auf (Hwang et al. 2015). Neben der veränderten äußeren Struktur ist ein wesentlicher Unterschied, dass iPSC-CM ein schlechter ausgeprägtes T-Tubuli-System besitzen (Cadet und Kamp 2017). Somit befinden sich insbesondere die LTCC zwangsläufig auf der oberflächlichen Zellmembran (Li et al. 2013). Es konnten durch verschiedene Patch-Clamp- und Epifluoreszenz-Messungen sowohl die typischen kardialen Ionenströme (I_{Na} , $I_{Ca,L}$, I_{Ks} , I_{Kr} , I_f), Aktionspotentiale, als auch stimulierte und koffeininduzierte Ca^{2+} -Transienten gemessen werden (Tanaka et al. 2009; Zhang et al. 2009; Zwi et al. 2009; Lee et al. 2011; Hwang et al. 2015; Karakikes et al. 2015). Entsprechend konnte auch die Expression der relevanten Ca^{2+} -Handling-Proteine, RyR2, SERCA2a, NCX1, Inositoltrisphosphat-Rezeptor-2 (IP3R2), Calsequestrin-2 (CSQ2), Phospholamban (PLN) und die L-Typ- α -1C-Untereinheit ($Ca_v1.2$) nachgewiesen werden (Itzhaki et al. 2011; Lee et al. 2011). Hwang et al. (2015) untersuchte

das Ca^{2+} -Handling von humanen iPSC-CM verschiedener Laboratorien und verglich die Ergebnisse mit adulten Kardiomyozyten von Mäusen und Kaninchen. Es wurde nachgewiesen, dass die gemessenen CaT in ihrem diastolischen Level und ihrer Amplitude vergleichbar waren. Lediglich die Zeitspanne bis zum Peak und der Decay des CaT waren in iPSC-CM im Vergleich zu Maus- und Kaninchen-Kardiomyozyten verlangsamt, was mit der oben beschriebenen strukturellen Defizienz eines vollständigen T-Tubulus-Systems vereinbar ist. Es ist folglich davon auszugehen, dass dies in einer ineffizienten CICR resultiert (Li et al. 2013), was vor allem durch die relative Unreife der iPSC-CM zu erklären ist (Ebert et al. 2019). Es wurden auch die SR- Ca^{2+} -Beladung sowie die Ca^{2+} -Puffereigenschaften quantifiziert und verglichen. Diese waren unter allen Gruppen vergleichbar (Hwang et al. 2015). Humane iPSC-CM ähneln adulten Kardiomyozyten in vielen Aspekten der Elektrophysiologie, des Ca^{2+} -Handlings und den kontraktilen Eigenschaften und eignen sich daher als Modell zur Untersuchung der kardialen Elektrophysiologie sowohl von Gesunden als auch von Patienten mit hereditären kardialen Erkrankungen (Blazeski et al. 2012).

1.4.5 iPSC-CM als Modell der familiären DCM

In der vorliegenden Arbeit wurde ein bereits etabliertes Modell der familiären DCM verwendet, welches eine vererbte R173W-Punktmutation des kardialen Troponin T (cTnT) aufweist (DCM-cTnT-R173W). iPSC-CM mit dieser Mutation wurden erstmals im Jahr 2012 entwickelt und freundlicherweise von Joseph C. Wu (Stanford University, CA) der Arbeitsgruppe von Dr. Antje Ebert überlassen, welche diese zur elektrophysiologischen Untersuchung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Niels Voigt zur Verfügung stellte (Sun et al. 2012). Als Kontrolle wurden gesunde iPSC-CM der gleichen Familie verwendet (Ctrl-1 iPSC-CM).

Das basische Arginin (R im Einbuchstabencode) an Stelle 173 (R173) des cTnT befindet sich in einer Scharnierregion zwischen dem Schwanz von cTnT, welcher mit Tropomyosin, und dem Kopf, welcher mit dem kardialen Troponin I (cTnI) interagiert (Manning et al. 2011). Somit ist Arginin hier günstig platziert, um an den Kontrollmechanismen von cTnT teilzunehmen. Es ist daher nicht überraschend, dass der Verlust der Ladung beim Austausch des basischen Arginins mit unpolarem Tryptophan (W im Einbuchstabencode; R173W) Konsequenzen hat (Sommese et al. 2013; Broughton et al. 2016).

Seit 2012 wurden bereits einige Untersuchungen an DCM-cTnT-R173W iPSC-CM veröffentlicht, die erste Einblicke in die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Zelllinie erlauben. Ein sehr konsistenter Befund ist, dass diese Zellen ein desorganisiertes

Sarkomer und schlechtere kontraktile Eigenschaften besitzen (Sun et al. 2012; Dai et al. 2020; Malkovskiy et al. 2020). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass die Zellen gewisse Auffälligkeiten im Ca^{2+} -Handling besitzen. Dabei wurde mehrfach dargelegt, dass die Amplitude des CaT reduziert, die Zeit zum Peak verzögert und der CaT -Decay verlangsamt war (Sun et al. 2012; Wu et al. 2015; Dai et al. 2020). Zudem konnte beschrieben werden, dass die Zellen auf β -adrenerge Stimulation nur abgeschwächt und mit einer Rückbildung der Sarkomere reagierten (Sun et al. 2012; Wu et al. 2015).

Es ist jedoch hervorzuheben, dass alle bisher durchgeführten Ca^{2+} -Messungen mangels Verwendung eines ratiometrischen Farbstoffes bzw. mangels Durchführung einer Kalibrierung nur relative Ca^{2+} -Signale abbilden. Eine umfangreiche Untersuchung der Ca^{2+} -Homöostase ist bisher nicht erfolgt. Auch Aussagen zur Ca^{2+} -Sensitivität bei DCM-cTnT-R173W existieren bisher nicht (Sun et al. 2012). Viele Untersuchungen anderer mit DCM assoziierten cTnT-Mutationen deuten jedoch auf eine Abnahme der Ca^{2+} -Sensitivität hin (Morimoto et al. 2002; Lu et al. 2003; Hershberger et al. 2009). Diese Ergebnisse beruhen jedoch auf Kraft- Ca^{2+} -Messungen. Über die tatsächliche Ca^{2+} -Affinität bzw. Ca^{2+} -Pufferung existieren derzeit keine Daten, weshalb diese Erkenntnisse nicht einfach auf DCM-cTnT-R173W übertragen werden können. In einer früheren Arbeit von Dai et al. (2020) zu DCM-cTnT-R173W iPSC-CM wurde die Bindung der Proteinkinase A (PKA) an lokale Sarkomer-Mikrodomänen untersucht. Diese schien bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM abgeschwächt zu sein. Da eine Hypophosphorylierung von TnI typischerweise die Ca^{2+} -Affinität von TnC erhöht (Sommese et al. 2013; Bollen et al. 2017), folgt daraus, dass die Ca^{2+} -Pufferung in DCM TnT-R173W iPSC-CM erhöht sein würde (Smith und Eisner 2019). Der Einfluss einer erhöhten Ca^{2+} -Pufferung auf die Arrhythmogenese bei hereditären Kardiomyopathien wurde bereits in Abschnitt 1.2.3 erläutert. Und obwohl Patienten mit cTnT-R173W-Mutation nachweislich ein hohes Risiko für ventrikuläre Tachykardien besitzen (Campbell et al. 2013; Merlo et al. 2013), wurde bisher in nur geringem Umfang nach arrhythmogenen Mechanismen in diesen Zellen gesucht.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die DCM ist eine der häufigsten Kardiomyopathien des Menschen. Sie ist durch eine pathologische Dilatation des linken Ventrikels und eine progrediente Herzinsuffizienz charakterisiert. Die schlechte klinische Prognose der DCM ist zu großen Teilen auf das Auftreten gefährlicher Herzrhythmusstörungen zurückzuführen, welche nicht selten mit einem plötzlichen Herztod assoziiert sind. Dabei üben genetische Ursachen einen

bedeutenden Einfluss auf die Entstehung und den Progress der Erkrankung sowie auf die Entstehung von Arrhythmien aus. Der Pathomechanismus, der hinter dem Auftreten von Arrhythmien bei DCM steckt, ist bisher jedoch noch nicht verstanden. Ziel dieser Arbeit ist es daher, einen Beitrag zum tiefergehenden Verständnis über die Entstehung von Arrhythmien bei DCM zu leisten.

Zu diesem Zweck wurde ein iPSC-CM Modell von Patienten mit einer Punktmutation (R173W) im kardialen Troponin T gewählt (DCM-cTnT-R173W iPSC-CM), von welcher bekannt ist, dass sie beim Menschen zu einer DCM führt und in diesem Zusammenhang auch mit dem Auftreten von gefährlichen Arrhythmien assoziiert ist.

Grundlage dieser Arbeit ist es, die DCM-cTnT-R173W iPSC-CM auf das Auftreten sowie die Mechanismen von Arrhythmien zu untersuchen. Dabei liegt der Fokus auf der Detektion von proarrhythmogenen CaT-Alternans, welche mittels Ca²⁺-sensitiver Epifluoreszenz unter Feldstimulation gemessen werden sollen. Weiterführend soll ein Augenmerk dieser Arbeit auf proarrhythmogenen Änderungen der Ca²⁺-Homöostase liegen. Diese sollen durch umfangreiche Patch-Clamp-Experimente und simultane Epifluoreszenz untersucht werden. Der Schwerpunkt dieser Messungen besteht in der erstmaligen Quantifizierung der intrazellulären Ca²⁺-Pufferung bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM. Es wird vermutet, dass diese Zellen eine erhöhte zytosolische Ca²⁺-Pufferung aufweisen, was als proarrhythmogener Mechanismus diskutiert werden kann. Alle Ergebnisse sollen mit Messungen an Ctrl-1 iPSC-CM von gesunden Probanden der gleichen Familie verglichen werden.

Daneben soll mit Hilfe des Ca²⁺-Sensitizers EMD57033 ein pharmakologisches Modell einer hohen Ca²⁺-Pufferung in Kardiomyozyten konstruiert werden. Dieses wird mit gesunden iPSC-CM realisiert, welche nicht aus der DCM-Familie stammen (Ctrl-2), um die bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM gewonnenen Ergebnisse in einen umfassenderen Vergleich einbetten zu können. So soll entsprechend gezeigt werden, ob sich die Ergebnisse unabhängig von der Mutation und der Familie reproduzieren lassen, was die Kausalität der beobachteten Zusammenhänge unterstreichen würde.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen könnte ein neuer proarrhythmogener Mechanismus postuliert werden, welcher in der Folge neuartige Überlegungen pharmakologischer antiarrhythmischer Therapieansätze bei DCM hervorbringen könnte.

2 Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden L-Typ- Ca^{2+} -Ströme ($I_{\text{Ca,L}}$) von iPSC-CM mittels Einzelelektroden Patch-Clamp-Technik in der Whole-Cell-Konfiguration im Voltage-Clamp Modus untersucht. Simultan dazu wurde die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) mit Hilfe von Epifluoreszenz quantifiziert. So wurden $I_{\text{Ca,L}}$ getriggerte CaT gemessen. Zudem wurden mit Hilfe eines Koffeinprotokolls koffeininduzierte Ca^{2+} -Transienten (cCaT) und simultan dazu die NCX-abhängigen Einwärtsströme (I_{NCX}) analysiert. Diese Daten wurden zur Quantifizierung der intrazellulären Ca^{2+} -Pufferung herangezogen. Des Weiteren wurde zur Untersuchung von proarrhythmischen CaT-Alternans in iPSC-CM diese in einem Frequenzbereich zwischen 0,5 Hz und 5 Hz mittels Epifluoreszenz unter Feldstimulation untersucht.

Es liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen unter der Nummer 15/2/20 für diese Arbeit vor.

2.1 Patch-Clamp-Technik

Die Erläuterungen zur Patch-Clamp-Methodik im folgenden Abschnitt basieren weitestgehend auf den Büchern von Markus Numberger und Andreas Draguhn (1996), Areles Molleman (2002) und der Dissertationsschrift von Niels Voigt (2006). Diese Werke wurden zum grundlegenden Verständnis, zur Vorbereitung der Experimente und zur systematischen Analyse zu Hilfe genommen.

2.1.1 Entstehung der Methode

Grundlage für die Entwicklung der Patch-Clamp-Methode war die Etablierung der sogenannten Spannungsklemme mittels zweier Elektroden, die direkt in die Zelle gestochen werden. Diese wurde von H. J. Curtis und K. Cole zur Untersuchung von Membranströmen an Neuronen in den 1930er Jahren entwickelt (Cole 1979). Die Methode wurde im Laufe der Jahre wesentlich zur Patch-Clamp-Technik weiterentwickelt, wobei es nicht mehr notwendig ist zwei Elektroden direkt in die Zelle einzustechen. Vielmehr wird eine Elektrode, eingebettet in eine dünn ausgezogene, mit Pipettenlösung gefüllte Glaspipette, auf die Zelle aufgesetzt und so ein sehr hoher Abdichtwiderstand zwischen Glas und Zellmembran erzeugt. Dieser verhindert größere Leckströme, welche an der Zelle vorbeifließen würden, und macht somit das Messen sehr kleiner Ströme im Bereich weniger Picoampere

($pA \triangleq 10^{-12} A$) möglich. Die zweite Elektrode befindet sich in der Badlösung und benötigt als Referenzelektrode keinen direkten Kontakt zur Zelle. Durch einen Operationsverstärker, welcher als Strom-Spannungs-Wandler (I-U-Wandler) agiert, wird es möglich, dass die Elektrode innerhalb der Pipette sowohl die Aufgabe des Kommandos als auch der Messung übernimmt. Diese Methode wurde erstmals von E. Neher und B. Sakmann im Jahr 1976 beschrieben (Neher und Sakmann 1976), wofür die beiden im Jahre 1991 den Nobelpreis erhielten (Neher 1992). In den folgenden Jahren wurden aufbauend auf einer stetigen Verbesserung der Methodik weitere Konfigurationen entwickelt. Hierbei handelt es sich um die Outside-Out- und die Inside-Out-Konfiguration, welche jedoch in dieser Arbeit nicht weiter beschrieben werden. Die Cell-Attached- und die Whole-Cell-Konfigurationen hingegen, die in dieser Arbeit Anwendung fanden, werden daher im Folgenden erläutert (Hamill et al. 1981).

2.1.2 Die Cell-Attached-Konfiguration

Jedes Patch-Clamp-Experiment beginnt mit der Cell-Attached-Konfiguration bzw. dem Herstellen eines sogenannten *seals*. Dazu wird zunächst ein leichter Überdruck an die Pipette angelegt und die Pipettenspitze in die Nähe der Membranoberfläche gebracht. Nun wird die Membran vorsichtig mit der Pipette berührt, was durch einen leichten Anstieg des Pipettenwiderstands erkennbar wird. Nach einem Anstieg um etwa $0,3 M\Omega$ wird der Überdruck der Pipette entfernt, was zum Ansaugen der Membran an die Pipette führt. Dies kann durch einen leichten zusätzlichen Sog unterstützt werden. Das Ergebnis ist die Ausbildung eines möglichst großen Abdichtwiderstandes zwischen Pipettenlösung und Badlösung. Dieser sollte mindestens $1 G\Omega$ betragen, weshalb man in dem Fall auch von einem *gigaseal* spricht (Abbildung 2 links). In dieser Konfiguration ist die Zelle noch vollständig intakt und befindet sich, abgesehen von dem mechanischen Kontakt durch die Pipette, in einem physiologischen Zustand. Diese Konfiguration wurde in der vorliegenden Arbeit bei jeder mittels Patch-Clamp-Technik gemessenen Zelle als Voraussetzung für die Whole-Cell-Konfiguration geschaffen.

2.1.3 Die Whole-Cell-Konfiguration

Die Whole-Cell-Konfiguration, oder auch Ganzzelleableitung wird verwendet, um die gesamte Zellmembran und damit die gesamte Zelle mit all ihren Ionenkanälen zu erfassen. Das Ziel ist es dabei die gesamte Zellmembran zwischen die beiden Elektroden zu schalten. Machbar wird dies, indem nach dem Erreichen eines *gigaseals* durch nun etwas stärkeren Sog die Zellmembran an der Pipettenspitze eingerissen wird. Dadurch wird ein vollständiger

Zugang zum Zytoplasma der Zelle hergestellt und somit das Innere der Pipette mit dem Inneren der Zelle gleichgeschaltet. Um nun die Ionenverhältnisse des Zytoplasmas nicht durcheinander zu bringen ist es notwendig, dass die verwendete Pipettenlösung eine zytoplasmaähnliche Zusammensetzung besitzt. Während des Einreißens der Membran wird der hohe Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Zelle erhalten (Abbildung 2 rechts). Da sich nun jedoch die Zellmembran zwischen den Elektroden befindet, nimmt bei Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration die Größe des kapazitiven Ladestromes zu. Dieser ist abhängig von der Größe der Membrankapazität, welche zellspezifisch ist, und von dem Serienwiderstand, welcher sich aus dem Zugangswiderstand zur Zelle ergibt. Je geringer der Serienwiderstand, desto steiler und höher zeigt sich der Ladestrom als Antwort auf den Testimpuls. Ist der Serienwiderstand zu groß, ist dies häufig durch Membranreste in der Pipettenspitze bedingt, welche sich meist durch minimalen Druck auf die Pipette entfernen lassen.

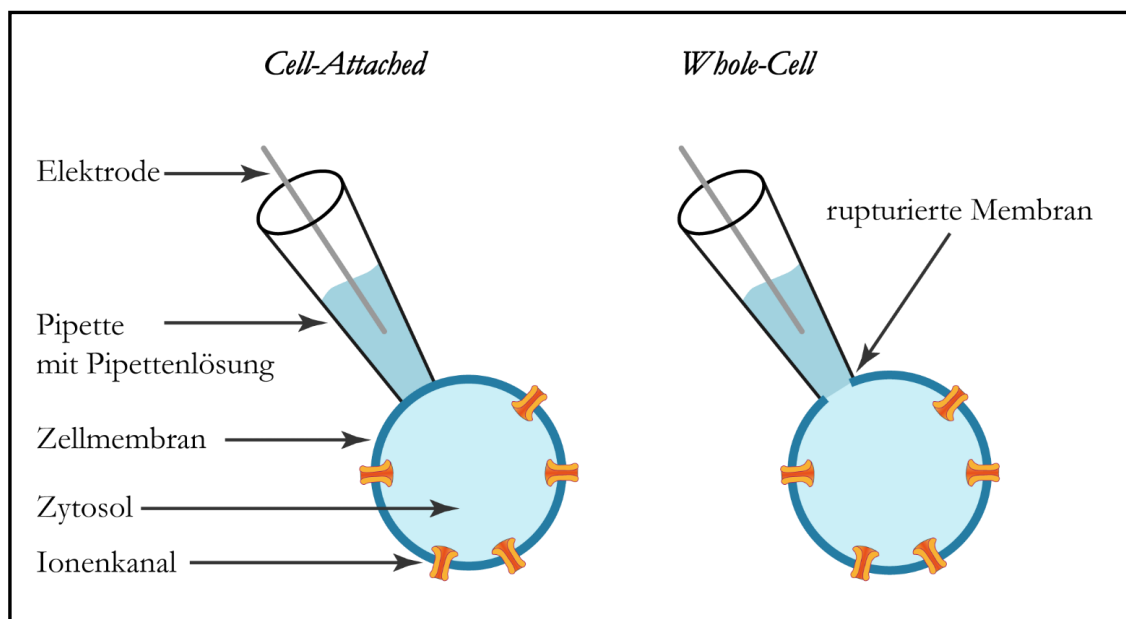


Abbildung 2: Patch-Clamp-Konfigurationen dieser Arbeit

Links: Durch Ansaugen der Glaspipette an die Zellmembran wird ein maximal hoher Abdichtwiderstand erreicht und somit ein *gigaseal* hergestellt. In dieser Arbeit diente die Konfiguration lediglich als Ausgangspunkt der Whole-Cell-Konfiguration. **Rechts:** Durch einen kontrollierten Sog wird die Zellmembran kontrolliert rupturiert und somit ein vollständiger Zugang zum Zytoplasma erreicht.

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an Voigt (2006), S. 20

2.1.4 Voltage-Clamp-Modus

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen in der Whole-Cell-Konfiguration mittels des Voltage-Clamp-Modus untersucht. Das Ziel dieser Methodik ist es physiologische

Membranströme messen zu können, ohne dass diese die Membranspannung rückkoppelnd beeinflussen. Es wird demnach durch diesen Modus die Membranspannung mittels einer Kontrollspannung kontrolliert, während die Membranströme gemessen werden können. Um dies zu erreichen, wird äquivalent zu dem Membranstrom ein betragsgleicher aber entgegengerichteter Kompensationsstrom in die Zelle appliziert. Der Patch-Clamp-Verstärker kann somit mithilfe eines Vorverstärkers und einem darin verbauten Strom-Spannungs-Wandler allein mit der Pipettenelektrode zum einen die Membranspannung kontrollieren und zum anderen durch Messen des notwendigen Kompensationsstromes den Membranstrom ermitteln.

2.1.5 Elektrophysikalische Prinzipien

Im Folgenden sollen elektrophysikalische Grundprinzipien der Methodik erläutert werden, die für ein Verständnis und zur Interpretation der Ergebnisse notwendig sind. Es wird zu einem detaillierten Verständnis jedoch auf die einleitend genannte Literatur verwiesen (Numberger und Draguhn 1996; Molleman 2002; Voigt 2006),

2.1.5.1 Die Membran als Kondensator

Die Biomembran, hauptsächlich bestehend aus Phospholipiden, bildet in wässriger Lösung eine gut isolierende Barriere. Sie trennt dadurch zwei wässrige, gut leitende Lösungen elektrisch und gibt dadurch die Möglichkeit Ladungen voneinander zu trennen bzw. Ladungen zu speichern. Die Membran wird durch diese Eigenschaft zu einem elektrischen Plattenkondensator (Formel 3). Je mehr Ladung ein Kondensator speichern kann, desto größer ist seine Kapazität (C). Die Kapazität eines Kondensators und damit einer Zellmembran ist generell von drei Faktoren abhängig. Erstens von der Dicke (d), zweitens von den Eigenschaften des Materials, ausgedrückt durch die Dielektrizitätskonstante (ϵ_r) und drittens von der Größe der Oberfläche (A). Korrigiert durch die elektrische Feldkonstante ϵ_0 stellt sich der Zusammenhang dieser drei Faktoren folgendermaßen dar:

$$C = \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \frac{A}{d}$$

Formel 3: Kapazität eines Plattenkondensators

C = Kapazität des Kondensators; ϵ_0 = elektrische Feldkonstante; ϵ_r = Dielektrizitätskonstante; A = Oberfläche des Kondensators; d = Dicke des Kondensators

Dicke und Material sind im Grunde bei allen biologischen Zellmembranen konstant, wodurch die Größe der Oberfläche als einzige Variable übrig bleibt. So ergibt sich, dass die Membrankapazität proportional zur Zelloberfläche ist.

$$C \sim A$$

Somit gibt die Messung der Membrankapazität einen guten Wert zur Abschätzung der Zelloberfläche und erlaubt eine Relativierung von Stromgrößen gegenüber der Membrankapazität.

2.1.5.2 Laden und Entladen der Zellmembran

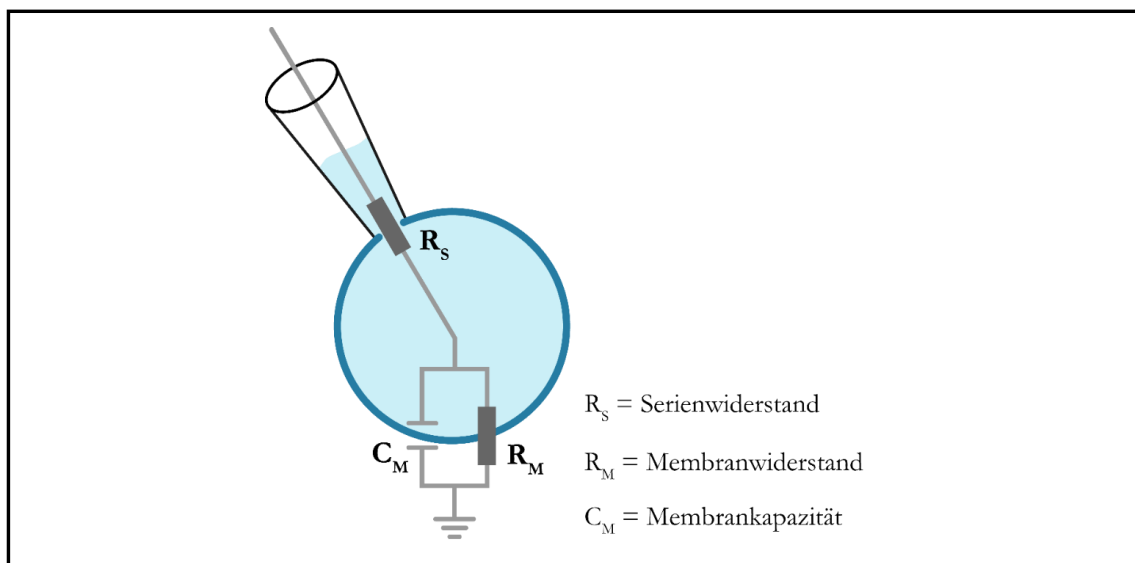


Abbildung 3: Ersatzschaltbild der Whole-Cell-Konfiguration

Nach Zerreißen der Zellmembran erhält man einen direkten Zugang zum Zytosol. Die gesamte Zellmembran wird somit zwischen die beiden Elektroden geschaltet. Das entsprechende Ersatzschaltbild ist hier dargestellt. Der Serienwiderstand R_S ergibt sich aus der Öffnung zum Zellinneren. R_S ist mit der Zellmembran in Reihe geschaltet, welche elektrisch durch die Parallelschaltung aus Membrankapazität C_M und Membranwiderstand R_M ausgedrückt wird.

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an Numberger und Draguhn 1996, Seite 88

Folglich kann die Zellmembran als vollständiges elektrisches Modell verstanden werden, welches einen elektrischen Widerstand, ein elektrisches Potential und eine Kapazität besitzt. Ändert sich das Potential in einem Kreislauf mit Widerstand und Kondensator, so folgt zunächst ohne Zeitverzug ein entsprechender Stromfluss (Abbildung 4). Dieser bewirkt ein Umladen des Kondensators, was zur Umkehr des elektrischen Feldes innerhalb des Kondensators führt. Dieses wirkt dem Stromfluss entgegen, bis der Stromfluss zum Erliegen kommt. Wird nun das Potential wieder auf den Ausgangswert gesetzt, so tritt der umgekehrte Effekt ein. Die resultierende Stromkurve zeigt sich in der folgenden Exponentialfunktion,

wobei τ_M die Zeitkonstante angibt, bei welcher der Strom auf $1/e$ (etwa 37 %) des Maximalwertes abgefallen ist.

$$I(t) = I_{max} \cdot e^{-t/\tau_M}$$

Das Potential (φ) des Kondensators verhält sich umgekehrt proportional dazu.

$$\varphi(t) = \varphi_{max} \cdot (1 - e^{-t/\tau_M})$$

Entsprechend ist der Kondensator bei $t = \tau$ zu $1 - e^{-1}$ (etwa 63 %) geladen. Die Kapazität und der Widerstand sind beide linear proportional zu τ_M . Es gilt folgende Formel:

$$\tau_M = R_S \cdot C_M$$

Diese Gleichung sagt aus, dass je größer der Kondensator und je größer der Serienwiderstand ist, desto länger der Umladeprozess der Membran dauert.

2.1.5.3 Kompensation der Membrankapazität

Das oben beschriebene Prinzip des Lade- und Entladeprozesses ist sehr nützlich, um die Eigenschaften der Zelle als elektrisches Glied im Ersatzschaltbild zu beschreiben (Abbildung 3). Simuliert wird dies an der Zelle nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration durch einen 5 mV starken Testimpuls (Sollspannung, U_{soll}), welcher mit einer Frequenz von 33,3 Hz appliziert wird.

Dies führt an der Zellmembran zu dem in Abschnitt 2.1.5.2 beschriebenen Umladeprozess, welcher durch einen initial hohen und dann exponentiell abfallenden Stromfluss erkennbar wird (Abbildung 4). Dieser lässt nun Rückschlüsse auf Membrankapazität und Serienwiderstand zu.

Allerdings ist dieses Phänomen bei der eigentlichen Messung teils sehr kleiner Ströme störend und würde zu großen Artefakten führen. Zudem könnten große Spannungsänderungen der Zellmembran und damit verbundene große Umladeströme eine Übersättigung des Systems zur Folge haben. Deshalb wird die Membrankapazität so weit über einen transienten Strom kompensiert, bis der Umladestrom nicht mehr als Antwort auf den Testpuls sichtbar wird. Dieser injizierte Strom muss entsprechend der Zelleigenschaften die gleiche Zeitkonstante haben, um den Umladestrom auszugleichen. Er wird jedoch nicht über den I-U-Wandler, sondern über einen zweiten Eingang injiziert, sodass er bei der Messung von Strömen nicht erscheint. Dies hat zur Folge, dass während der Messung keine störenden Artefakte sichtbar werden, gleichzeitig wird aber auch verhindert, dass der Verstärker bei großen Spannungssprüngen übersättigt wird. Die kompensierte

Membrankapazität wird zunächst vom Computer mathematisch geschätzt und lässt sich dann auf Grundlage dieser Schätzung per Hand mittels Regler einstellen.

Basierend auf demselben Prinzip wird nach Eintauchen der Pipette in die Badlösung die Kapazität der Glaspipette ebenfalls über einen zweiten Kompensationsmechanismus kompensiert. Beide Kompensationsmechanismen (Pipettenkompensation und Zellkompensation) sind unabhängig voneinander und lassen sich vollständig überlagern.

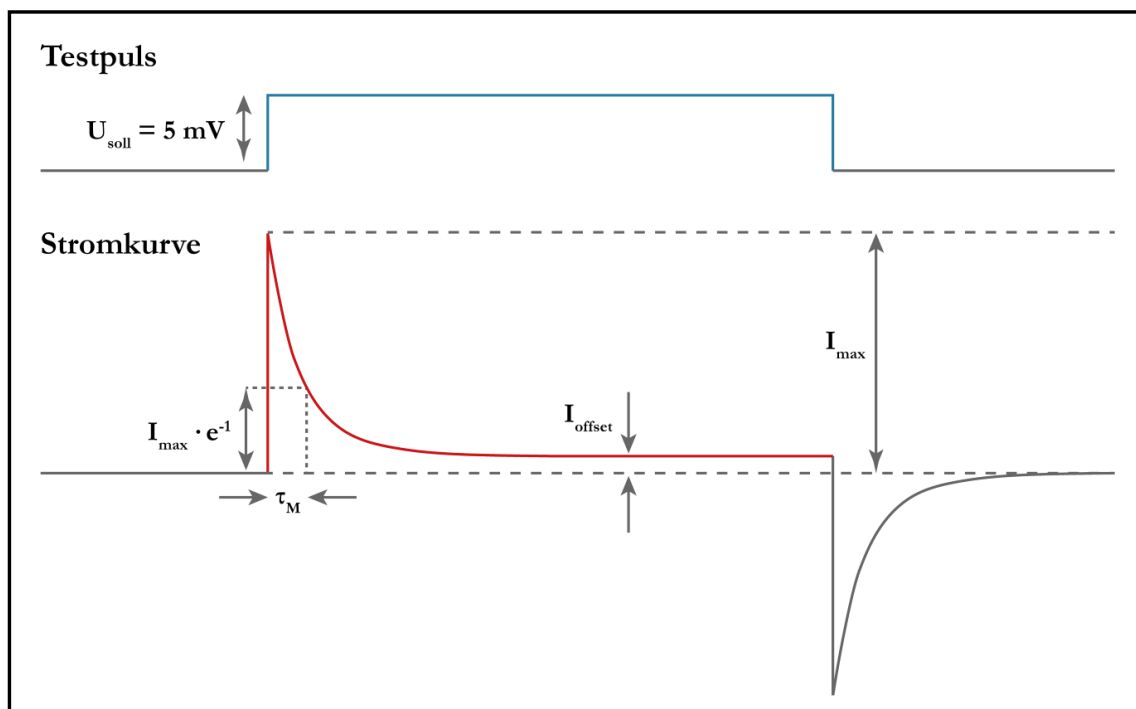


Abbildung 4: Testpuls mit Umladeströmen nach Einreißen der Zellmembran

Nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration bewirkt der Testpuls (U_{soll}) von 5 mV ein Umladen der Zellmembran. Wie in Abschnitt 2.1.5.2 erklärt führt dies zu einer Stromkurve, welche initial steil auf den Umladestrom I_{max} ansteigt und dann durch das Laden der Membran exponentiell mit der Zeitkonstante τ_M auf den Haltestrom I_{offset} abfällt. Anhand der Exponentialfunktion der Stromkurve lässt sich Membrankapazität und Serienwiderstand berechnen und so entsprechend kompensieren.

Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an Numberger und Draguhn 1996, Seite 94

2.1.5.4 Kompensation des Serienwiderstandes

Wie bereits beschrieben und in Abbildung 3 dargestellt besteht zwischen Glaspipette und Zellinnerem ein Serienwiderstand R_s . Dieser setzt sich maßgeblich aus zwei Teilen zusammen: Zum einen aus dem Öffnungsdurchmesser der Pipette und zum anderen aus Membranresten, die nach Einreißen der Membran in der Öffnung der Pipette verbleiben. Letzteres macht den größten Anteil des Serienwiderstandes aus. Der Serienwiderstand besitzt jedoch zwei Nachteile. Einerseits verlangsamt ein zu großer Serienwiderstand den

Umladeprozess der Zellmembran, wie bereits aus Abschnitt 2.1.5.2 zu entnehmen ist, andererseits fällt proportional zur Höhe des Serienwiderstandes ein Teil der Sollspannung ab, was dazu führt, dass die gewünschte Spannung im Zellinneren nicht erreicht werden kann. Deshalb wird mittels der Kompensation des Serienwiderstandes ein Anteil proportional zur Kommandospannung hinzuaddiert, um so den erwarteten Verlust über den Serienwiderstand möglichst auszugleichen. Leider lässt sich der Serienwiderstand nicht vollständig kompensieren, da der Schaltkreis zur Kompensation einem positiven Rückkopplungsmechanismus unterliegt. Würde er vollständig kompensiert werden, so würde das System zu schwingen beginnen und instabil werden. Es musste an dieser Stelle daher ein Kompromiss gefunden werden, welcher darin besteht, dass in der vorliegenden Arbeit die hinzuaddierte Kompensationsspannung mit dem Kompensationsfaktor von 0,6 multipliziert wurde.

2.2 Hardware und Materialien

Tabelle 1: Hardware und Materialien

| Gerät; Material | Modell, Hersteller |
|-------------------------|---|
| Borsilicat-Pipettenglas | TW150F-3 / 1,5 mm Durchmesser; World-Precision-Instrument, USA |
| Deckgläser, rechteckig | Menzel-Gläser 22 x 40 mm No. 1; Thermo Fischer scientific, USA |
| Deckgläser, rund | Menzel-Gläser, Durchmesser 10 mm; Thermo Fischer scientific, USA |
| Elektrodenchlorierer | ACI-01; npi electronic GmbH, Deutschland |
| Glasspritze | Fortuna Optima, Poulten & Graf, Deutschland |
| Hauptverstärker | Axopatch 200B; Molecular Devices, USA |
| Heizung | TC-20-W1; npi electronic GmbH, Deutschland |
| Kamera | MyoCAM-S w CFA300; IonOptix, USA |
| Kammerplattform | PH-1; Warner Instruments, USA |

| Gerät; Material | Modell, Hersteller |
|-------------------------|--|
| Kurzbogenlampe | OptoSource High Intensity Arc Lamp; Cairn Research, UK |
| Messkammer | RC-26; Warner Instruments, USA |
| Mikromanipulator | PatchStar + Control Cube; Scientifica, UK |
| Mikroskop | Motic AE31; Motic Europe, Spanien |
| Perfusionsspitze | MPRE8-TD5; Cell MicroControls, USA |
| Perfusionssystem | VC3-8xG Series; ALA Scientific Instruments, USA |
| Photomultiplier | PMT 400; IonOptix, USA |
| Pipettenhalter | 1-HL-U, Axon; Molecular Devices, USA |
| Pipettenziehgerät | DMZ Universal Electrode Puller; Zeitz- Instruments, Deutschland |
| Signalwandler | Axon Digidata 1440A; Molecular Devices, USA |
| Stimulator | MyoPacer EP Field Stimulator; IonOptix, USA |
| Vakuumpumpe | Vacuum Waste Kit; ALA Scientific Instruments, USA |
| Vorverstärker | CV 203 BU; Molecular Devices, USA |
| Vorwärmer | MPRE8; Cell MicroControls, USA |
| Xenon-Lichtquelle | UXL S50A; Ushio, Japan |
| Zell-Einrahmungsadapter | Cell Framing Adapter; IonOptix, USA |
| Zell-Transportbox | Cell-Trans 4016; Labotect Labor- Technik-Göttingen, Deutschland |

2.3 Der Patch-Clamp-Messplatz

Der Patch-Clamp-Messplatz, der dieser Arbeit zugrunde liegt, ist ein komplexer Aufbau von Geräten und Systemen, die es in ihrem Zusammenspiel ermöglichen die Membranströme einzelner iPSC-CM zu messen. Dabei ermöglicht dieses Setups, dass weder elektrische noch mechanische Störsignale die sehr kleinen Ströme beeinflussen. Der standardmäßige Aufbau, ist in Abbildung 5 mithilfe von beschrifteten Fotografien dargestellt.

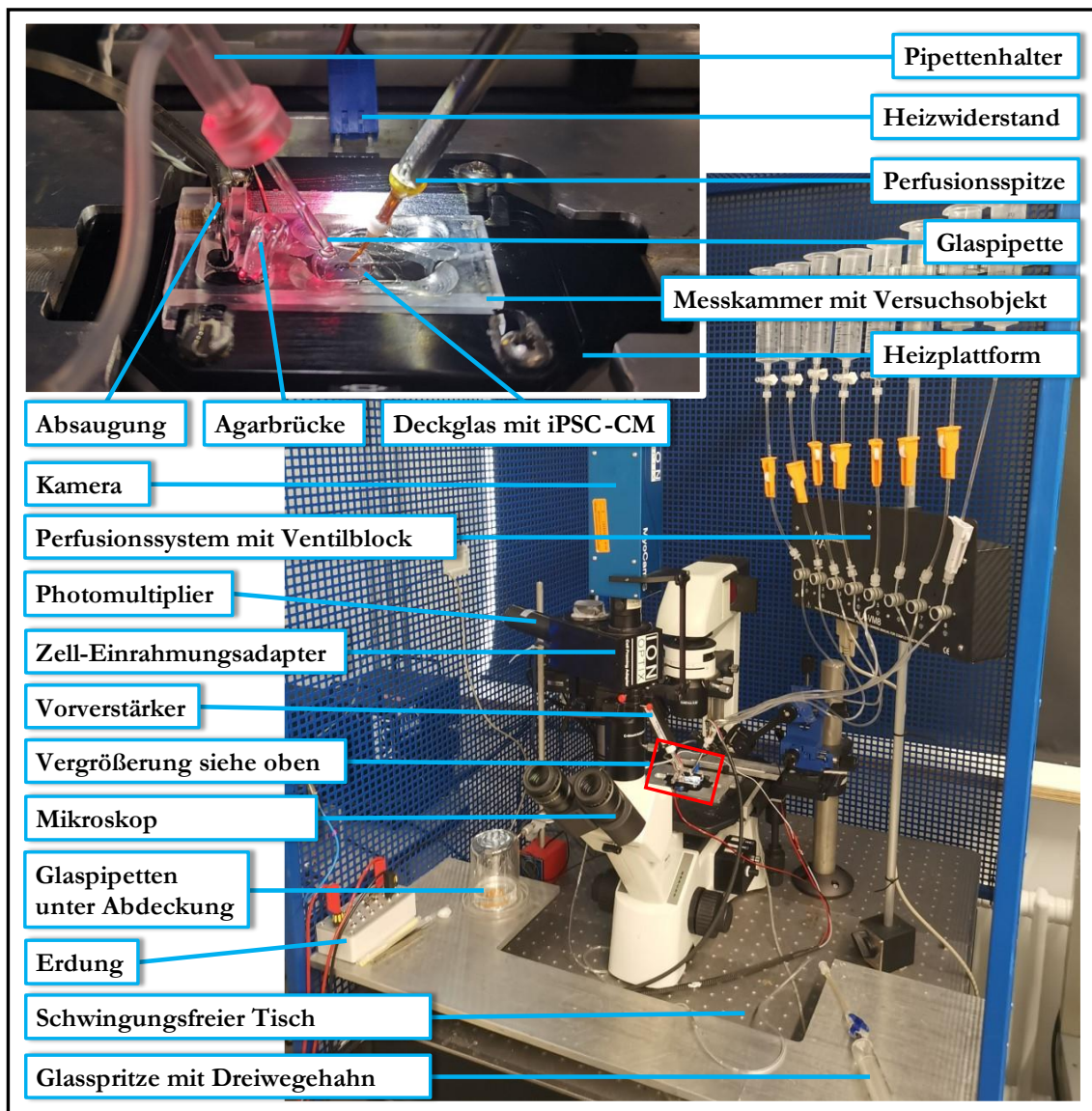


Abbildung 5: Patch-Clamp-Setup

Abgebildet sind zwei Fotos des Patch-Clamp-Setups, wie es für alle Patch-Clamp-Versuche dieser Arbeit aufgebaut wurde. Auf dem Übersichtsbild (rechts unten) ist der schwingungsgedämpfte Tisch mit Faraday'schem Käfig (blau) dargestellt. Die relevantesten Bestandteile des Messplatzes, sind in dieser Abbildung beschriftet. Der Aufbau der Messkammer mit Versuchsobjekt, Glaspipette und Lösungswechsler ist als Vergrößerung oben links abgebildet. Zur besseren Darstellung wurden die Bilder unter Raumbeleuchtung aufgenommen.

Quelle: Eigene Fotografien

2.3.1 Messtisch

Die Messungen wurden auf einem vibrationsgedämpften Tisch durchgeführt, auf welchem ein Faraday'scher Käfig aufgebaut ist (Abbildung 5). Der Tisch stellte auf diese Weise sicher, dass keine mechanischen Störungen, wie Vibrationen von innerhalb oder außerhalb des Gebäudes die Pipette relativ zur Zelle bewegten. Dies war essenziell zur Aufrechterhaltung eines guten Zugangs zur Zelle. Der Faraday'sche Käfig diente zur Abschirmung elektrischer Störsignale, welche vor allem von den elektrischen Geräten außerhalb des Käfigs und des Wechselstromnetzes ausgehen. Auf dem Tisch befand sich das Mikroskop mit IonOptix Videotechnik und Messkammer, der Mikromanipulator mit Vorverstärker und Pipettenhalter, sowie die Lösungsperfusion bestehend aus Lösungsspritzen, Ventilblock und heizbarer Applikationsspitze (Tabelle 1).

2.3.2 Messkammer

Die Messkammer wurde jeweils am Versuchstag zusammengebaut. Dazu wurde in den Randsaum auf die Unterseite der Kammer silikonfreies Laborfett (glisseal N; Borer Chemie, Schweiz) aufgetragen und ein rechteckiges Deckglas (Tabelle 1) von unten zum Abdichten aufgesetzt. Fixiert wurde die Kammer mit vier Schrauben auf der Heizplattform, welche in die Mikroskopplattform gelegt wurde. Die Messkammer selbst besaß eine Aussparung für das Versuchsobjekt, in welche die runden, mit Zellen plattierten Deckgläser gelegt wurden.

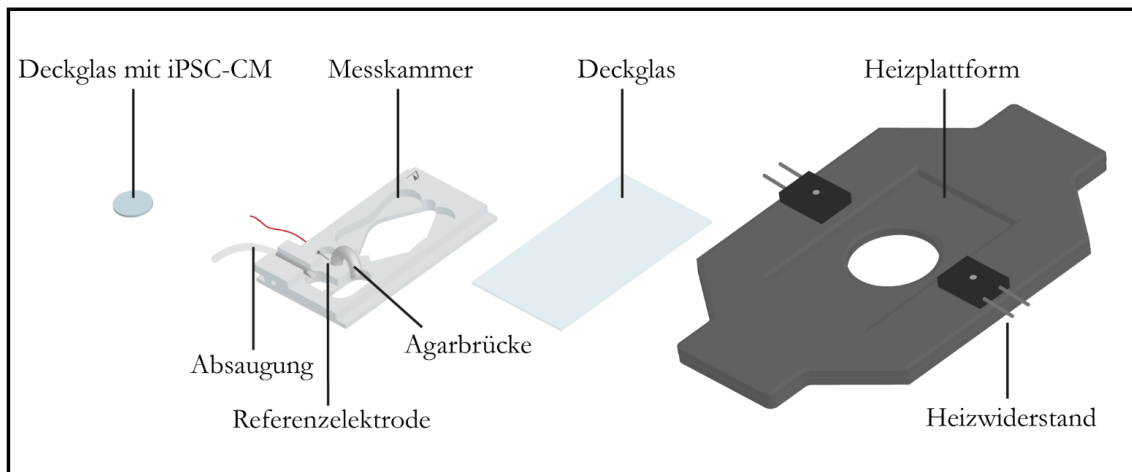


Abbildung 6: Aufbau der Messkammer

Dargestellt ist von links nach rechts ein *coverslip* mit ausplattierten iPSC-CM, welcher in eine Messkammer gelegt wird. Diese ist mit Absaugung, Referenzelektrode und Agarbrücke abgebildet und wird von unten mit einem Deckglas verschlossen. Die Messkammer wird in einer Heizplattform fest verschraubt, welche am Ende in die Mikroskopplattform (nicht dargestellt) gelegt wird.

Quelle: Eigene Darstellung

Die Messkammer war über einen Tunnel mit der Aussparung für die Absaugung verbunden. Eine davon getrennte Aussparung für die Referenzelektrode wurde über eine Agarbrücke (Salzbrücke) mit der Badlösung verbunden (Abbildung 6).

2.3.3 Perfusionssystem

Die Lösungen zur Perfusion wurden jeweils in ein 60 ml Reservoir gefüllt, welche über ein modifiziertes Infusionssystem mit der Applikationsspitze (Tabelle 1) verbunden waren. Der Schlauch des Systems führte durch den Ventilblock des Perfusionssystems (Tabelle 1). Die Ventile ließen sich über ein Steuerelement einzeln öffnen und schließen, sodass sich die gewünschte Lösung zu einem definierten Zeitpunkt innerhalb weniger Millisekunden applizieren ließ. Der Perfusionsdruck war dabei gravitationsgesteuert. Die Durchflussmenge ließ sich über den Durchflussregler des Infusionssystems im Vorhinein einstellen. An die Messkammer angeschlossen war eine Absaugvorrichtung, die mit einer Vakuumpumpe (Tabelle 1) verbunden war. Die Absaugung wurde so eingestellt, dass sie mit der Perfusionsgeschwindigkeit einen gleichmäßigen Lösungsfluss bewirkte, ohne dass sich die im Bad befindliche Gesamtlösungsmenge änderte.

2.3.4 Temperaturregulation

Im Grunde wurde mit drei Systemen gewährleistet, dass sich die temperatursensiblen iPSC-CM zu jedem Zeitpunkt in einer 37 °C warmen Lösung befanden. Vor Beginn der Experimente mussten die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 beladen werden (Abschnitt 2.4.3). Dazu wurden sie in einer beheizbaren Zell-Trasportbox inkubiert (Tabelle 1). Während der Versuche wurde diese auch verwendet, um die iPSC-CM während des gesamten Versuchstages zu lagern. Die zu messenden Zellen wurden während der Experimente mit zwei Systemen über die in Tabelle 1 genannte Heizung auf 37 °C gehalten. Dazu wurde zum einen die Plattform über zwei Heizwiderstände aufgeheizt und mit einem Temperaturfühler der Temperaturregelkreis der Plattform geschlossen. Zum anderen wurde die Perfusionsspitze direkt geheizt, sodass alle applizierten Lösungen exakt 37 °C warm waren. Dies war besonders wichtig, da die Lösungen, welche die Zelle umspülten, maßgeblich deren Temperatur während der Experimente beeinflusste (Abschnitt 4.8.1).

2.3.5 Pipetten, Pipettenhalter und Pipettendrucksystem

Für die Versuche wurden für den jeweiligen Versuchstag Pipetten hergestellt. Dazu wurden Borsilicat-Glaskapillaren (Tabelle 1) mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm verwendet. Diese wurden etwa auf eine Länge von 70 mm zugeschnitten und an den Enden mit einer

Gasflamme poliert. Die Kapillaren wurden in das Pipettenziehgerät (Tabelle 1) eingespannt und in drei Heizschritten zu je zwei Pipetten ausgezogen, welche an der Spitze poliert wurden. Die verwendeten Pipetten besaßen einen Pipettenwiderstand von 4 - 7 M Ω .

Die hergestellten Pipetten wurden für den Versuchstag abgedeckt gelagert, sodass die feinen Pipettenspitzen vor Fremdkörpern geschützt waren. Für jede Zelle wurde eine neue Pipette mit Pipettenlösung gefüllt und in das vordere Ende des Pipettenhalters eingespannt. In diesem war die Pipettenelektrode verankert, welche nun in die Pipettenlösung eintauchte. Auf der anderen Seite war der Pipettenhalter direkt am Vorverstärker verschraubt, sodass die Pipettenelektrode mit diesem nun direkt leitend verbunden war. Seitlich am Pipettenhalter befand sich eine Öffnung, auf welche ein Schlauch gesteckt wurde, der über einen Dreiwegehahn mit einer Glasspritze (Tabelle 1) verbunden war. Mit dieser ließ sich der Druck innerhalb des Pipettenhalters und damit innerhalb der Pipette jederzeit regulieren, ohne den Messplatz berühren zu müssen. Dies war zur Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration entscheidend.

2.3.6 Elektroden

Generell werden zwei Elektroden für die Patch-Clamp-Technik benötigt. Zum einen die Pipettenelektrode, zum anderen die Badelektrode. Beide stellen die Schnittstelle zwischen festen metallischen Leitern der Geräte und den flüssigen Leitern, dem Intra- und Extrazellularräum dar. In der Elektrophysiologie handelt es sich bei Strömen und Potentialen immer um Ionenverschiebungen, während die Elektronik immer auf Elektronenverschiebungen beruht. Die Elektroden sind demnach der Ort, an dem aus den Ionenverschiebungen zwischen den Lösungen Elektronenverschiebungen in den metallischen Leitern entstehen. Dies geschieht durch Redoxreaktionen am Feststoff-Lösungs-Übergang. Dazu wurden Silberdrähte verwendet, die mit einer Silberchloridschicht überzogen waren. Silberchlorid besitzt ein niedriges Redoxpotential und eignet sich daher gut für eine reversible Redoxreaktion. Dabei kann elementares Silber mit Chloridionen zu Silberchlorid reagieren, wobei ein Elektron frei wird. Umgekehrt kann aus einem Elektron und Silberchlorid wieder elementares Silber und Chloridionen entstehen. Die elektrochemischen Potentiale, die zwischen Draht und Lösung entstehen, heben sich weitestgehend zwischen den Elektroden auf, wenn die Elektroden baugleich sind, eine ähnlich große Oberfläche in der Lösung haben und wenn die Lösung eine gleiche Konzentration an Chloridionen aufweist. Dazu wurde die Referenzelektrode in eine 50 mM KCl Referenzlösung getaucht, welche über eine mit Agarosegel (50 mM KCl) gefüllte Glasbrücke (Agar- oder Salzbrücke) mit der Badlösung verbunden war. Die KCl

Konzentration in der Pipetten- und Referenzlösung war dadurch identisch. Geringe Unterschiede im elektrochemischen Potential ließen sich durch eine Korrektur des *offset* manuell vornehmen.

Eine Chlorierung der Silberdrähte erfolgte immer dann, wenn sie nicht mehr gleichmäßig schwarz gefärbt waren. Dazu wurde jeder Draht zunächst mit feinem Schmirgelpapier vollständig vom Silberchlorid befreit und dann in einem auf Elektrophorese basierenden automatischen Elektrodenchlorierer (Tabelle 1) in 3 M KCl Lösung neu chloriert.

2.4 Videotechnik und Epifluoreszenz

2.4.1 Mikroskop

Alle Versuche dieser Arbeit wurden an dem inversen Mikroskop aus Tabelle 1 durchgeführt. Der Vorteil des inversen Mikroskops ergibt sich zunächst daraus, dass das Objektiv von unten an das Objekt herangeführt wird, sodass auf dem Objektisch genügend Platz für die Pipette, den Lösungswechsler und weitere Apparaturen bleibt. Zudem wird bei einem inversen Mikroskop das Objektiv und nicht der Objektisch in der Höhe zum Scharfstellen reguliert, was essenziell während der Versuche war, um den Zugang zur Zelle nicht zu verlieren. Außerdem kann das Objektiv von unten viel näher an das Objekt herangeführt werden, was zum einen den Einsatz von Linsen großer numerischer Apparatur möglich macht, zum anderen fällt das Exzitationslicht durch das Objektiv auf das Objekt, was durch den kurzen Abstand zwischen Linse und Objektiv wesentlich fokussierter ist und somit weniger Lichtintensität bedarf. So konnte das Anregen von Zellen außerhalb des Fokus weitestgehend vermieden werden.

2.4.2 Videotechnik

Der Einsatz von Videotechnik (Tabelle 1) ermöglichte es, die Zellen während der Ausbildung eines *seals* zu beobachten und so parallel die Erhöhung des Pipettenwiderstandes und eine Eindellung der Zellmembran zu kontrollieren. Das Zusammenspiel dieser beiden Beobachtungsparameter ermöglichte es einen guten *seal* an den iPSC-CM zu erreichen. Zudem konnten die Zellen während der Versuche zu jeder Zeit beobachtet werden. Dies war essenziell, um die Vitalität der Zellen zu jedem Zeitpunkt beurteilen und am Ende der Versuche eine vollständige Kalibrierung durchführen zu können.

2.4.3 Ca^{2+} -sensitiver Fluoreszenzfarbstoff - Fluo-3

Bei chemischen Fluoreszenzfarbstoffen unterscheidet man zwischen hochaffinen und niedrigaffinen Indikatoren. Während niedrigaffine Ca^{2+} -Indikatoren sich eher für größere Ca^{2+} -Konzentrationen und damit für subzelluläre Kompartimente eignen, besitzen hochaffine Indikatoren die Eigenschaft selbst kleinste intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen zu detektieren und anzuzeigen (Paredes et al. 2008). Generell muss bedacht werden, dass jede Form von Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffen als Ca^{2+} -Puffer fungiert und damit selbst spezifische Puffereigenschaften aufweist. Des Weiteren sollte beachtet werden, dass mithilfe dieser Indikatoren nur freie Ca^{2+} -Ionen detektiert werden können. Da im Schnitt 99 % des intrazellulären Kalziums gepuffert vorliegt ist dies zur Interpretation der Daten hochrelevant (Smith und Eisner 2019).

Chemische Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich zudem in ratiometrische und nicht-ratiometrische Farbstoffe unterscheiden. Dabei liegt der generelle Unterschied darin, dass ratiometrische Farbstoffe die Ca^{2+} -Konzentration in einer Spektralverschiebung anzeigen, während nicht-ratiometrische Farbstoffe eine Änderung der Ca^{2+} -Konzentration in der Intensität des emittierten Lichts wiedergeben (Kao et al. 1989; Paredes et al. 2008).

Für die vorliegende Arbeit wurde der nicht-ratiometrische und hochsensitive Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 verwendet. Dieser zeichnet sich durch sein einzelnes Emissionsmaximum aus, welches bei 526 nm liegt. Die maximale Absorptionswellenlänge beträgt 506 nm. Die Fluo-3 spezifische Dissoziationskonstante (K_d) bei 37 °C beträgt 390 nM (Molecular Probes Handbook Thermo Fisher). In der Regel lassen sich Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen dem 0,1 bis 10-fachen des K_d detektieren, was für Fluo-3 einer Spannweite von abgerundet 50 nM bis 3 μM entspricht. Damit eignet es sich optimal für die Messung intrazellulärer Ca^{2+} in Kardiomyozyten.

Ohne Kalzium ist der Farbstoff nicht fluoreszent. Durch Binden eines Ca^{2+} -Ions in der Mitte von vier partial negativ geladenen Sauerstoffatomen kommt es zur Ausbildung eines Chelations und damit zu einer Konformationsänderung des Moleküls, wodurch es sich durch ein Exzitationslicht anregen lässt. Dabei wird ein Elektron durch die Energie eines Photons in ein energetisch höheres Orbital gebracht. Dieses befindet sich daraufhin in einem energetisch instabilen Zustand und strebt einen Rücksprung in das energieärmere Orbital an. Dabei wird die vom Photon absorbierte Energie in drei physikalischen Formen wieder frei: Jeweils ein kleiner Teil wird in Form von Wärme und Vibration frei, während der größte Teil wieder in Form eines Photons emittiert wird. Da die Energie und die Wellenlänge umgekehrt proportional zusammenhängen, besitzt das nun emittierte Licht durch den Verlust von

thermischer- und kinetischer Energie eine größere Wellenlänge (526 nm). Man nennt dieses Phänomen auch Stokes-Verschiebung.

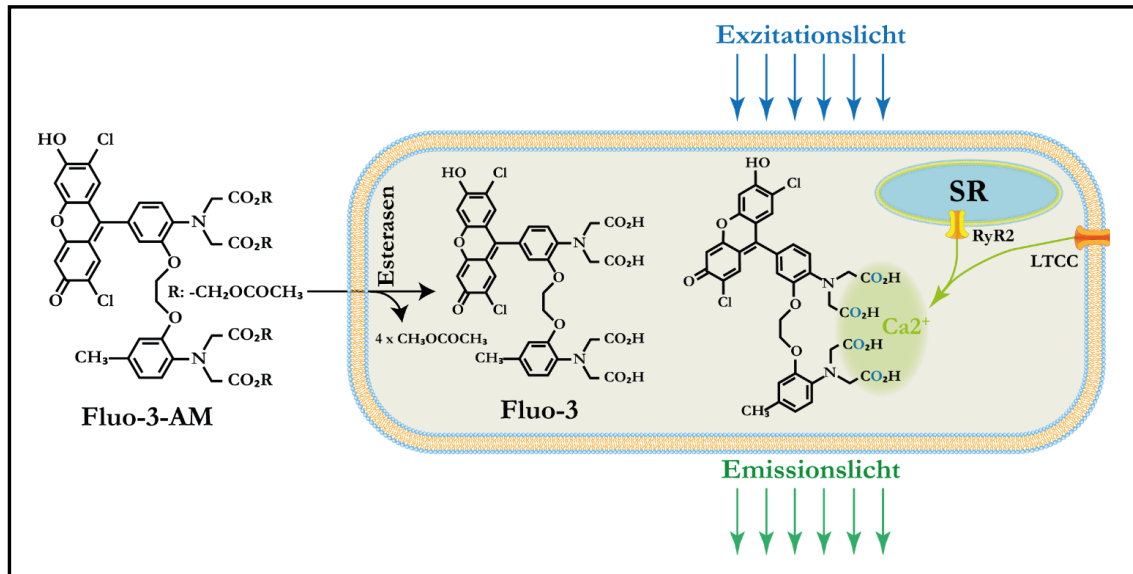


Abbildung 7: Prinzip der Beladung und Exzitationsanregung von Fluo-3

Links ist die Molekularstruktur von Fluo-3-AM dargestellt. **Mittig** ist ein Kardiomyozyt und deren Beladung mit Fluo-3 dargestellt. Intrazellulär spalten Esterasen Acetoxymethyl (AM) ab, sodass das Molekül seine lipophile Eigenschaft verliert und somit intrazellulär gefangen ist. **Rechts** in der Zelle ist schematisch die Bindung von einem Ca^{2+} -Ion an Fluo-3 abgebildet. Das Kalzium gelangt durch die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (LTCC) und durch die Ryanodinrezeptoren (RyR2) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) ins Zytosol. Blaues Exzitationslicht (blaue Pfeile) regt das Ca^{2+} -bindende Molekül an und bewirkt so, basierend auf der Stokes-Verschiebung, die Emission von grünem Licht.

Quelle: Eigene Darstellung

$$E = hc \cdot \frac{1}{\lambda}$$

$$\Delta E = E_{ex} - E_{em}$$

$$\Delta E = hc \cdot \left(\frac{1}{\lambda_{ex}} - \frac{1}{\lambda_{em}} \right)$$

$$\Delta \lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$$

Formel 4: Herleitung der Stokes Verschiebung

E = Energie; h = Plancksches Wirkungsquantum; c = Lichtgeschwindigkeit; λ = Wellenlänge; ex = Exzitation; em = Emission

Um die Zellen mit dem polaren hydrophilen Fluo-3 zu beladen wurde ein Pentaacetoxymethylester (Fluo-3-AM, Tabelle 2) verwendet, der das Molekül lipophil und damit membrangängig macht. Dazu wurde aus 50 μg Fluo-3-AM und 44 μl 20-prozentiger, in

DMSO gelöster Pluronsäure (Tabelle 2) eine Stammlösung angesetzt, welche bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in absoluter Dunkelheit gelagert wurde. Diese wurde verwendet, um mit der Badlösung (Tabelle 4) eine $10\text{ }\mu\text{M}$ Fluo-3-AM Inkubationslösung herzustellen, in welcher die Zellen für zehn Minuten inkubiert wurden. Anschließend wurde die Inkubationslösung ausgewaschen und die Zellen für weitere 50 Minuten in normaler Badlösung bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ lichtgeschützt in der Zell-Transportbox (Tabelle 1) gelagert. Intrazelluläre Esterasen hydrolysieren die Esterverbindungen und spalten so das Molekül in Acetoxymethyl und Fluo-3, welches nun nicht mehr membrangängig ist und somit in der Zelle verbleibt (Abbildung 7). Auf diese Weise erreicht man eine zytoplasmatische Fluo-3-Konzentration von etwa $100\text{ }\mu\text{M}$. Um zu verhindern, dass organische Anionentransporter das Fluo-3 aktiv aus der Zelle entfernen, wurde der Badlösung Probenecid, ein Anionentransporter-Inhibitor, beigelegt (Tabelle 4).

Tabelle 2: Substanzen zur Beladung mit Fluo-3

| Substanz | Bezeichnung; Hersteller |
|-------------------------|--|
| Fluo-3-AM | Fluo-3, AM, Calcium Indicator; Invitrogen, USA |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Hybrid-Max; Sigma-Aldrich, USA |
| Pluronsäure | Pluronic F-127, low UV absorbance; Molecular Probes, USA |

2.4.4 Epifluoreszenztechnik

Um Ca^{2+} -Transienten zu messen wurde Epifluoreszenztechnik verwendet (Abbildung 8). Dazu wurden die Zellen mit Fluo-3 beladen (Abschnitt 2.4.3) und über ein Exzitationslicht angeregt. Dieses Exzitationslicht wurde durch eine Arc-Lampe (Tabelle 1) erzeugt, welche ein sehr breites Wellenlängenspektrum mit hoher Lichtintensität erzeugt. Durch einen Exzitationslichtfilter wurden alle Wellenlängen bis auf die gewollte Anregungswellenlänge im Bereich von 480 nm herausgefiltert. Dieses monochromatische Licht wurde während der Versuche durch einen *beam splitter* (D510) und das Objektiv des inversen Mikroskops von unten auf das Objekt geworfen. Dadurch wurde der Ca^{2+} -bindende Farbstoff Fluo-3 angeregt und in einen energetisch höheren Zustand versetzt. Durch spontanen Rücksprung in den Ausgangszustand wurde Emissionslicht freigesetzt, welches aufgrund der Stokes-Verschiebung (Abschnitt 2.4.3) eine längere Wellenlänge als das Exzitationslicht besaß. Dieses Emissionslicht fiel durch das Objektiv zurück in das Mikroskop und wurde über zwei *beam splitter* (D510 und 585DCXR) und einen Exzitationsfilter in den *photomultiplier* (PMT) umgeleitet.

Der PMT besitzt hochsensitive Photozellen, in denen durch die Photonen Elektronen nach dem photoelektrischen Effekt ausgelöst werden, die je nach Lichtintensität ein elektrisches Signal induzieren. Die Lichtintensität hängt direkt proportional mit der Menge an Ca^{2+} -Ionen zusammen, welche an Fluo-3 binden. Je höher also die $[\text{Ca}^{2+}]_i$, desto höher die emittierte Lichtintensität und desto höher das elektrische Signal, das als CaT aufgezeichnet wird. Der aufgezeichnete CaT spiegelt somit in Echtzeit die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während einer Kontraktion wieder.

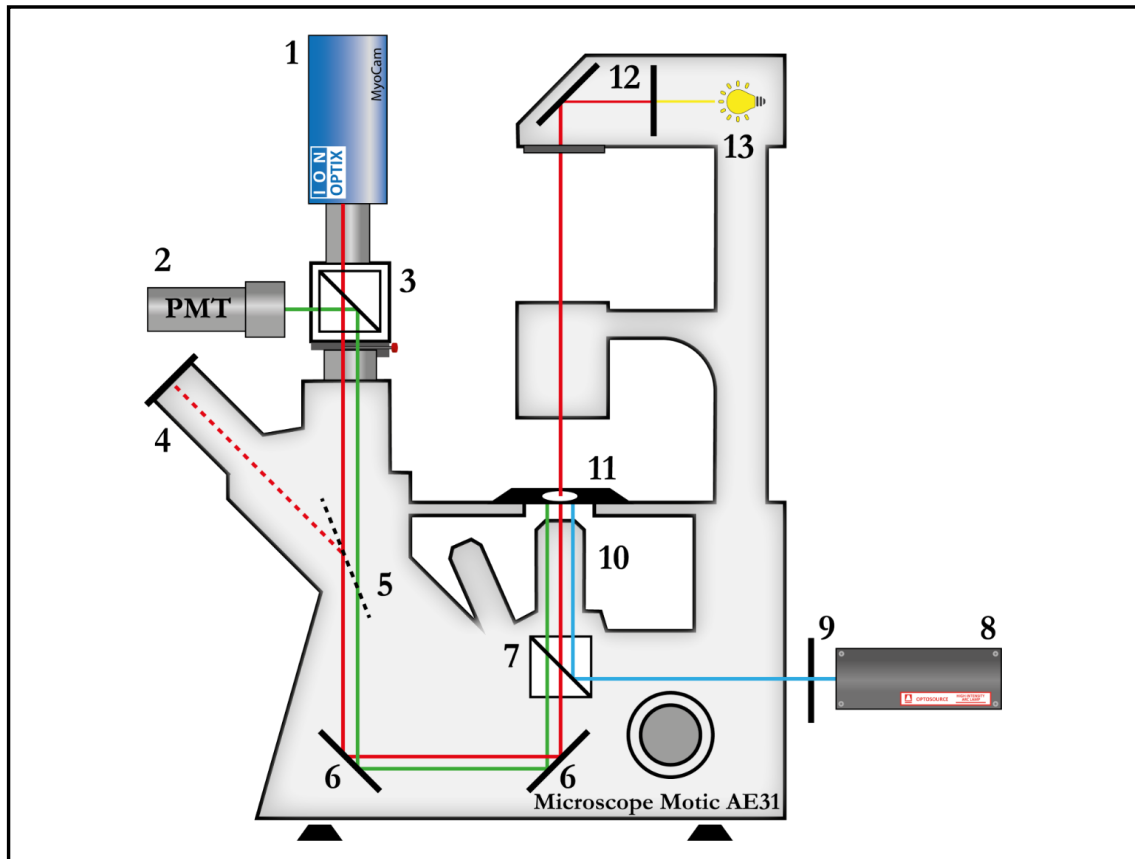


Abbildung 8: Epifluoreszenzsetup

Dargestellt ist ein 2D-Schema des Epifluoreszenzschaltbildes, welches die wichtigsten Bauteile und farbig die Lichtwege der verschiedenen Wellenlängen zeigt. **1:** IonOptix USB-Kamera; **2:** Photomultiplier mit Emissionslichtfilter (ET535/50m); **3:** Beam Splitter (585DCXR); **4:** Okular; **5:** Verstellbarer Spiegel; **6:** Spiegel; **7:** Beam Splitter (D510); **8:** Exzitatorlampe mit **9:** Exzitatorlichtfilter; **10:** Objektiv; **11:** Objektträger mit Messkammer und Versuchsobjekt; **13:** Auflicht mit **12:** Rotlichtfilter (710 nm); **rote Linie:** rotes Auflicht; **blaue Linie:** Exzitatorlicht; **grüne Linie:** Emissionslicht

Quelle: Eigene Darstellung

2.5 Versuchsobjekt

Als Versuchsobjekte wurden in dieser Arbeit funktionelle iPSC-CM mit DCM-cTnT-R173W-Mutation und gesunde iPSC-CM der gleichen Familie als Kontrolle verwendet. Diese wurden von Joseph C. Wu (Stanford University, CA) zur Verfügung gestellt und

entsprechend vorheriger Veröffentlichungen gewonnen und differenziert (Sun et al. 2012). Die gesunden Kontrollzellen der gleichen Familie werden in dieser Arbeit als Ctrl-1 bezeichnet. Zusätzlich wurden gesunde Kontrollzellen unabhängig der DCM-Familie verwendet, sie werden im Folgenden als Ctrl-2 bezeichnet. Die Differenzierungsschritte und die Ausplattierung erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe „*Cardiovascular Cell Biology and Systems Medicine*“ von Frau Dr. Antje Ebert aus dem Institut für Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen. Die ausdifferenzierten Kardiomyozyten wurden mit einer Zelldichte von 25.000 Zellen auf mit Matrigel beschichteten runden Deckgläsern von 10 mm Durchmesser (Tabelle 1) ausplattiert und in Kardiomyozytenmedium (Tabelle 3) bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zellinkubator gelagert. Die Zellen wurden in einem Zeitraum von 4 bis 14 Tagen nach Ausplattierung für die Versuche verwendet.

Tabelle 3: Kardiomyozytenmedium

| Substanz | Konzentration (%) | Hersteller |
|-----------------------------------|--------------------------|-------------------|
| RPMI Medium1640 + glutaMAX™ | 98 | Life Technologies |
| B27 Supplement (50X) + Insulin | 2 | Life Technologies |

2.6 Lösungen, Chemikalien und Pharmaka

Zur Herstellung aller Bad- und Perfusionslösungen wurde hochreines Wasser verwendet, welches aus bereits teilsalzem Wasser gewonnen wurde (Milli-Q® Direct Systeme; Merck, Deutschland).

Die Basis aller Versuchslösungen bildete eine Badlösung, welche auf Vorrat in der Menge von einem Liter zunächst ohne Glukose und ohne CaCl₂ angesetzt wurde (Tabelle 4). Die Lösung wurde in ihrer Zusammensetzung so gewählt, dass sie möglichst den physiologischen extrazellulären Ionenkonzentrationen entsprach. Dies war wichtig, um ähnliche Ionengradienten an der Zellmembran aufzubauen. Neben den physiologischen Ionen und der Glukose wurde weiterhin 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) und Probenecid verwendet (Tabelle 4). HEPES eignet sich aufgrund seines pK_s-Wertes von 7,55 bei 20 °C gut zur pH Pufferung im physiologischen Bereich. Der pH-Wert der Lösungen wurde mit NaOH und HCl auf 7,45 bei Raumtemperatur eingestellt. Probenecid ist ein Inhibitor von Organo-Anion-Transportern (OAT). Dieses Pharmakon

wurde verwendet, um zu verhindern, dass der Fluo-3 Farbstoff nach Inkubieren der Zellen von OAT aktiv aus den Zellen entfernt wird. So wurde gewährleistet, dass unabhängig von der Zeitspanne zwischen Inkubation und Messzeitpunkt eine gleichbleibende Farbstoffkonzentration in den Zellen vorliegt. Da Probenecid in reinem Wasser schlecht löslich ist, wurde es zunächst mit NaOH in Lösung gebracht und dann der Stammlösung zugeführt. Die Badlösung wurde bei 4 °C gelagert und maximal zwei Wochen verwendet. Am Versuchstag wurde dann entsprechend der Lösungsmenge Glukose und CaCl₂ zugesetzt (Tabelle 4). Anschließend wurden die Lösungen für 15 Minuten bei 40 °C im Wasserbad sonorisiert, um kleinste kristalline Partikel zu zerstören. Dieser Vorgang war essenziell, um zu verhindern, dass diese die hauchfeinen Lumen des Perfusionssystems verlegen.

Tabelle 4: Badlösung

| Substanz | Konzentration (mM) | Hersteller |
|--------------------------------|--------------------|--------------------------------|
| NaCl | 140 | Carl Roth, Deutschland |
| KCl | 4 | Carl Roth, Deutschland |
| MgCl ₂ | 1 | PanReac AppliChem, Deutschland |
| Probenecid | 2 | Sigma-Aldrich, USA |
| HEPES | 10 | Carl Roth, Deutschland |
| Glukose ¹ | 10 | PanReac AppliChem, Deutschland |
| CaCl ₂ ¹ | 2 | Carl Roth, Deutschland |

¹ wurde erst am Versuchstag zugesetzt

2.6.1 4-AP Lösung

Diese Lösung wurde erst nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration verwendet und ausschließlich während Patch-Clamp-Messungen mit dem Stimulationsprotokoll (2.7.3) appliziert. Sie basiert von der Zusammensetzung auf der Badlösung und enthält des Weiteren 4-Aminopyridin (4-AP) und BaCl₂. 4-AP ist ein Inhibitor der spannungsabhängigen Kaliumkanäle und dient der Inaktivierung dieser während des Messprotokolls. BaCl₂ ist ein Inhibitor der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle. Der pH-Wert der Lösungen wurde mit NaOH und HCl auf 7,45 bei Raumtemperatur eingestellt. Erst am Versuchstag wurde entsprechend der Lösungsmenge Glukose und CaCl₂ zugesetzt (Tabelle 5). Anschließend wurden die Lösungen für 15 Minuten bei 40 °C im Wasserbad sonorisiert. Im Folgenden wird diese Perfusionslösung auch als 4-AP Lösung bezeichnet.

Tabelle 5: 4-AP Lösung

| Substanz | Konzentration (mM) | Hersteller |
|--------------------------------|--------------------|--------------------------------|
| NaCl | 140 | Carl Roth, Deutschland |
| KCl | 4 | Carl Roth, Deutschland |
| MgCl ₂ | 1 | PanReac AppliChem, Deutschland |
| Probenecid | 2 | Sigma-Aldrich, USA |
| HEPES | 10 | Carl Roth, Deutschland |
| 4-Aminopyridin | 5 | Sigma Aldrich, USA |
| BaCl ₂ | 0,1 | Sigma Aldrich, USA |
| Glukose ¹ | 10 | PanReac AppliChem, Deutschland |
| CaCl ₂ ¹ | 2 | Carl Roth, Deutschland |

¹ wurde erst am Versuchstag zugesetzt

2.6.2 Blebbistatin

Zur pharmakologischen Reduzierung der Ca²⁺-Puffereigenschaften wurde Blebbistatin eingesetzt. Blebbistatin ist ein Inhibitor der Myosin-ATPase und reduziert so die Ca²⁺-Affinität der Myofilamente (Kovács et al. 2004). Auf diese Weise sollte sich entsprechend die zytosolische Ca²⁺-Pufferung verringern (Baudenbacher et al. 2008).

Blebbistatin wurde mit reinem Wasser zu einer 10 mM Stammlösung angesetzt und in 50 µl Portionen bei -20 °C aufbewahrt. Am Versuchstag wurde mit Badlösung eine 10 µM haltige Inkubationslösung angesetzt, in welcher die Zellen bereits vor Versuchsstart für 20 Minuten inkubiert wurden. Dies geschah bei völliger Dunkelheit, um die vielen photochemischen und phototoxischen Effekte von Blebbistatin zu minimieren (Rauscher et al. 2018). Für die Messungen wurden die Zellen dann in reine Badlösung übertragen.

2.6.3 EMD57033

Zur Modulierung der Ca²⁺-Puffereigenschaften wurde der Ca²⁺-Sensitizer EMD57033 verwendet. Dieser bewirkt als Myosin-ATPase Aktivator an den kontraktilen Filamenten eine Erhöhung der Ca²⁺-Sensitivität und damit auch der Ca²⁺-Bindungsaffinität. EMD57033 wurde mit DMSO (Tabelle 2) zu einer 10 mM Stammlösung angesetzt und in 50 µl Portionen bei -20 °C aufbewahrt. Die Gebrauchslösung von 5 µM wurde am Versuchstag mit

Badlösung und oder 4-AP-Lösung hergestellt. Dabei wurde eine Endkonzentration von 0,05 % DMSO erreicht. Die Effekte von DMSO auf iPSC-CM wurden bei einer Konzentration von 0,05 % und bei einer Applikationsdauer von unter 15 Minuten als gering eingeschätzt (Himmel 2013). Die Zellen wurden bereits vor Messstart für fünf Minuten in Badlösung mit EMD57033 inkubiert, welche mittels Lösungswechsler appliziert wurde. Bei Versuchsstart wurde die Perfusion mit EMD57033-haltiger 4-AP Perfusionslösung fortgesetzt, um die Wirkung aufrechtzuerhalten. Bei Feldstimulationsexperimenten wurden die iPSC-CM lediglich in EMD57033 haltiger Badlösung fünf Minuten inkubiert und dann während der Messungen in dieser belassen.

2.6.4 Koffein

Zur Aktivierung der RyR2 und damit zur Freisetzung von Kalzium aus dem SR wurde eine sättigende Konzentration von Koffein verwendet (10 mM). Zur Herstellung dieser Lösung wurde die in Abschnitt 2.6.1 beschriebene 4-AP-Lösung verwendet. Dazu wurde die Lösung am Versuchstag mit Koffein in Pulverform versetzt und anschließend bei 40 °C für 15 Minuten sonorisiert.

Tabelle 6: Pharmaka

| Substanz | Konzentration (mM) | Hersteller |
|-----------------|---------------------------|--------------------|
| Koffein | 10 | Sigma Aldrich, USA |
| Blebbistatin | 0,01 | Sigma Aldrich, USA |
| EMD57033 | 0,005 | Sigma Aldrich, USA |

2.6.5 Pipettenlösung

Da in der Whole-Cell-Konfiguration eine direkte Verbindung zum Zytoplasma der Zelle besteht, diffundieren Bestandteile der Pipettenlösung in das Zellinnere. Aus diesem Grund muss die Pipettenlösung eine ähnliche Zusammensetzung wie das Innere der Zelle aufweisen. Die Lösung wurde, wie in Tabelle 7 aufgeführt, unter ständiger Kühlung hergestellt. Um zu verhindern, dass beim Anvisieren der Zelle mit der Pipette kleinste Mengen Kalzium aus der Badlösung in die Pipettenlösung diffundieren, wurde eine sehr geringe Menge EGTA verwendet (0,02 mM). Somit konnte kein Kalzium der Badlösung mit dem in der Pipettenlösung enthaltenen Fluo-3 interagieren und dadurch ein Hintergrundrauschen verursachen. Außerdem wurde damit auch ausgeschlossen, dass

während der Messung geringste Mengen Kalzium aus der Pipettenlösung in die Zelle diffundieren und so die Messdaten stören. Gleichzeitig wurde die Konzentration von EGTA jedoch ausreichend gering gewählt, sodass es keinen relevanten Einfluss auf die Ca^{2+} -Puffereigenschaften ausübte. Zudem wurden alle verglichenen Zellgruppen mit der gleichen Pipettenlösung gemessen, sodass sich im direkten Vergleich eventuell entstandene systematische Messfehler dividierten. Der pH-Wert wurde mit 1 M KOH auf 7,2 eingestellt. Dazu wurden etwa 200 μl KOH pro 50 ml verwendet. Die Lösung wurde in 900 μl Portionen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, am Versuchstag langsam aufgetaut und während des Versuches ständig auf Eis gekühlt. Wenn die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3-AM inkubiert wurden, wurde auch der Pipettenlösung eine äquivalente Konzentration Fluo-3 in Form eines Pentapotassiumsalzes zugesetzt. Dies war notwendig, damit der Farbstoff während der Messung nicht durch die Pipettenlösung ausgewaschen wurde. Das Fluo-3-Pentapotassiumsalz wurde mit Pipettenlösung zu einer 1 mM Stammlösung angesetzt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert (Tabelle 7). Am Versuchstag wurden dann 100 μl der Stammlösung zu den 900 μl Pipettenlösung gegeben, um eine 0,1 mM Fluo-3 Pipettenlösung zu erhalten.

Tabelle 7: Pipettenlösung

| Substanz | Konzentration (mM) | Hersteller |
|--|--------------------|-----------------------------------|
| DL-Aspartat- K^+ -Salz | 92 | Sigma-Aldrich, USA |
| KCl | 48 | Carl Roth, Deutschland |
| Mg-ATP | 1 | Carl Roth, Deutschland |
| Na_2ATP | 4 | Sigma-Aldrich, USA |
| EGTA | 0.02 | PanReac AppliChem, Deutschland |
| GTP-Tris | 0.1 | Sigma-Aldrich, USA |
| HEPES | 10 | Carl Roth, Deutschland |
| Fluo-3-Pentapotassiumsalz ¹ | 0.1 | Invitrogen, USA |

¹ wurde nur bei mit Fluo-3-AM inkubierten Zellen verwendet

2.7 Durchführung der Patch-Clamp-Experimente

2.7.1 Vorbereitung der Patch-Clamp-Experimente

Zu Beginn eines jeden Versuchstages wurden alle Gebrauchslösungen neu aus der Stammlösung hergestellt und in die Perfusionsreservoirs gefüllt. Die Zellen wurden aus dem Zellinkubator entnommen und in eine mit 1 ml Badlösung gefüllte Zellkulturschale transferiert. In einem abgedunkelten Raum wurden nun 10 µl der Fluo-3-AM Stammlösung der Zellkulturschale hinzugefügt und vorsichtig auf und ab pipettiert, um eine 10 µM Inkubationslösung zu erhalten. Die Zellkulturschale wurde in Aluminiumfolie eingepackt, um den lichtsensitiven Farbstoff vor Licht zu schützen und in eine geheizte ZellTrans Box (Tabelle 1) gelegt. Nach zehn Minuten wurde das Fluo-3-AM mit normaler Badlösung ausgewaschen und die Zellen für mindestens weitere 50 Minuten vor der ersten Messung gelagert, damit alle Esterbindungen vollständig gespalten werden konnten.

Inzwischen wurde die Messkammer zusammengebaut und vorgeheizt, alle Geräte und Computer hochgefahren und ein ideales Perfusions-Absaugungs-Verhältnis eingestellt. Nachdem alles eingestellt war, wurde der Versuchsraum abgedunkelt und ein Deckgläschen mit iPSC-CM in die Versuchskammer gelegt. Nun wurde eine geeignete Zelle ausgesucht. Dabei spielten Kriterien, wie Zellgröße, Zellmorphologie, Membranstruktur und Kontakt zu anderen Zellen eine wichtige Rolle. Besonders letzteres war entscheidend, um sicherzustellen, dass nur einzeln vorliegende Zellen ohne direkten Kontakt zu anderen Zellen für Messungen verwendet wurden. Dies war relevant, da davon auszugehen ist, dass Zellen über *gap-junctions* leitend verbunden sein können und dadurch falsch große Ströme hätten gemessen werden können. Wurde eine passende Zelle gefunden, so wurde die Perfusionsspitze in kurzem Abstand neben der Zelle kurz über dem Glasboden platziert, sodass sich die Zelle im Perfusionsstrom befand. Nun wurde die Zelle im Kamerasichtfeld platziert und mit Hilfe von verschiebbaren Abdunklungsplatten (Tabelle 1) möglichst präzise eingerahmt. Dies war notwendig, um das Hintergrundrauschen des Lichtsignals möglichst gering zu halten und um zu verhindern, dass andere Zellen oder Zellreste vom PMT mit detektiert wurden.

Nun wurde eine Glaspipette mit Pipettenlösung befüllt und in den Pipettenhalter eingeschraubt. An die Pipette wurde ein leichter Überdruck angelegt, der zum einen verhindern sollte, dass kleinste Fremdkörper die feine Pipettenspitze verstopfen und zum anderen, dass Badlösung in die Pipette gelangt und damit die Zusammensetzung der Pipettenlösung verändert. Zudem erleichterte ein Überdruck das Bilden eines guten *seals*. Die Pipette wurde dann unter ständiger Sichtkontrolle mit Hilfe des Mikromanipulators (Tabelle

1) in die Nähe der Zelle gebracht. Zwischen beiden Elektroden wurde ein Kontrollimpuls von 5 mV in einer Frequenz von 33,33 Hz angelegt. Dies diente zur Ermittlung des Pipettenwiderstandes, welcher sich aus der Spannung des Testimpulses und der resultierenden Stromantwort ergab. Es wurden nur Pipetten verwendet, die einen Widerstand von 4–7 M Ω aufwiesen. Des Weiteren diente der Testimpuls dazu, um mittels der kapazitiven Ströme, die Pipettenkapazität zu kompensieren. Nun wurde das *offset* zwischen den beiden Elektroden adjustiert und auf den Kameramodus umgeschaltet. Mit feinsten Bewegungen am Mikromanipulator wurde die Pipette mittig über der Zelloberfläche platziert.

2.7.2 Herstellen einer Whole-Cell-Konfiguration

Nun wurde die Pipettenspitze von oben an die Zellmembran angenähert, bis eine Erhöhung des Pipettenwiderstandes angezeigt wurde. Diese ergab sich durch eine Verdeckung der Pipettenöffnung, was indirekt auf eine Berührung der Zelle hindeutete. Die Pipette wurde bis zu einer Erhöhung um 0,3 M Ω angenähert oder bis eine deutliche Eindellung der Membran sichtbar wurde. Nun wurde der Überdruck an der Pipette entfernt, was direkt zu einem leichten Sog der Membran an die Pipettenspitze führte. Oftmals reichte dies zum Erlangen eines *gigaseals* (1 G Ω) bereits aus. Spätestens durch einen leichten Sog konnte dieser jedoch meist erreicht werden (Cell-Attached-Konfiguration; Abbildung 2, links). Durch etwas größeren impulsartigen Sog wurde die Zellmembran eingerissen und so eine Whole-Cell-Konfiguration hergestellt (Abbildung 2, rechts). Dies wurde durch das erneute Erscheinen kapazitiver Ladeströme sichtbar (Abbildung 4). Mit Hilfe dieser wurden Membrankapazität und Serienwiderstand kompensiert und das Messprotokoll gestartet.

2.7.3 Messung des L-Typ-Ca²⁺-Stroms (I_{Ca,L})

2.7.3.1 Messprotokoll des I_{Ca,L}

Die Messung des I_{Ca,L} war der Ausgangspunkt jedes Patch-Clamp-Experimentes, weshalb das in Abbildung 9 dargestellte Spannungsprotokoll jeder Patch-Clamp-Messung zu Grunde lag. Dazu wurden die Zellen mit dem Protokoll aus Abbildung 9 in einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. Bei diesem Spannungsprotokoll wurde die Zelle im Ruhezustand auf -80 mV gehalten. Nach initialen 80 ms auf -80 mV wurde die Spannung mittels einer Spannungsrampe innerhalb von 100 ms auf -40 mV mit einer Steigung von 0,4 mV/ms angehoben. Dies diente dazu, die schnellen Na⁺-Kanäle zu inaktivieren. Nach weiteren 20 ms auf -40 mV wurde das Membranpotential für 100 ms per Rechtecksimpuls auf +10 mV

angehoben. Dies führte zu einer schlagartigen und unter den beschriebenen Experimentbedingungen selektiven Aktivierung aller LTCC. Der resultierende Ca^{2+} -Einstrom ($I_{\text{Ca,L}}$) in die Zelle wurde als ein negativer Membranstrom in pA aufgezeichnet. Typischerweise besitzt dieser einen eindeutigen Peak, gefolgt von einer biexponentiellen Inaktivierung der Kanäle. Das Messprotokoll wurde etwa für 90 - 120 Sekunden in Wiederholung laufen gelassen und aufgezeichnet.

2.7.3.2 Analyse des $I_{\text{Ca,L}}$ -Peak

Zur Analyse des Membranstroms wurde ein stabiler Bereich von etwa 10 Kurven ausgewählt und gemittelt. Aus der gemittelten Stromkurve wurde zunächst die maximale Amplitude berechnet. Da Leckströme immer > 0 sind, wurde die Grundlinie des Membranstroms am Ende der Inaktivierungsphase als Nulllinie festgelegt, zu welcher der Peak in Relation berechnet wurde. Dies verhinderte, dass die aus dem Rechtecksimpuls resultierenden Leckströme die Absolutwerte verfälschen. Zudem wurde das Integral der Stromkurve berechnet. Dieses bildet als Produkt aus Strom und Zeit die Ladung ab, welche über die Membran geflossen ist.

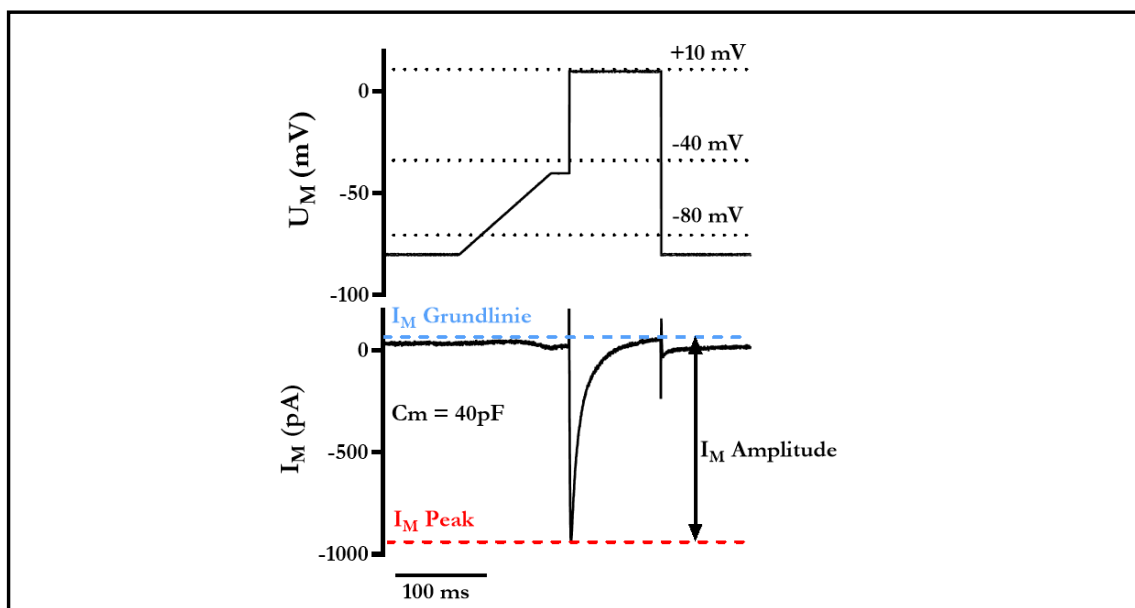


Abbildung 9: Beispielhafter Membranstrom ($I_{\text{Ca,L}}$) stimuliert durch das Rampenpulsprotokoll

Oben: Spannungsprotokoll (0,5 Hz), hier dargestellt von 0 - 400 ms. **Unten:** Typische Messung des resultierenden Membranstroms als Antwort auf das Spannungsprotokoll einer gesunden Kontrollzelle mit einer Membrankapazität von 40 pF. Eingezeichnet ist die Grundlinie in blau und der Peak in rot. Die Amplitude ergibt sich aus der Differenz der beiden.

2.7.3.3 Analyse der $I_{Ca,L}$ -Inaktivierung

Neben Peak und Integral wurde auch die Inaktivierung der LTCC quantifiziert, indem an die Stromkurve eine Standard-Biexponentialfunktion angelegt wurde. Diese Biexponentialfunktion bildet typischerweise mittels zwei Amplituden (A_{fast} und A_{slow}) und zwei dazugehörigen Zeitkonstanten (τ_{fast} und τ_{slow}) den Anteil der Ca^{2+} -abhängigen- und spannungsabhängigen Inaktivierung (CDI und VDI) an der Gesamtinaktivierung des $I_{Ca,L}$ ab (Abbildung 10). Dabei entspricht der schnelle Anteil der CDI und der langsame Anteil der VDI (Heijman et al. 2018).

$$f(t) = A_{fast} \cdot e^{(-t/\tau_{fast})} + A_{slow} \cdot e^{(-t/\tau_{slow})} + C$$

Formel 5: Standard-Exponentialfunktion mit zwei Termen ($n = 2$)

A_{fast} = Amplitude des schnellen Terms; e = Eulersche Zahl; t = Zeit; τ_{fast} = Zeitkonstante des schnellen Terms; A_{slow} = Amplitude des langsamen Terms; τ_{slow} = Zeitkonstante des langsamen Terms; C = y-Verschiebung

2.7.4 Messung der CaT

2.7.4.1 Bestimmung des CaT

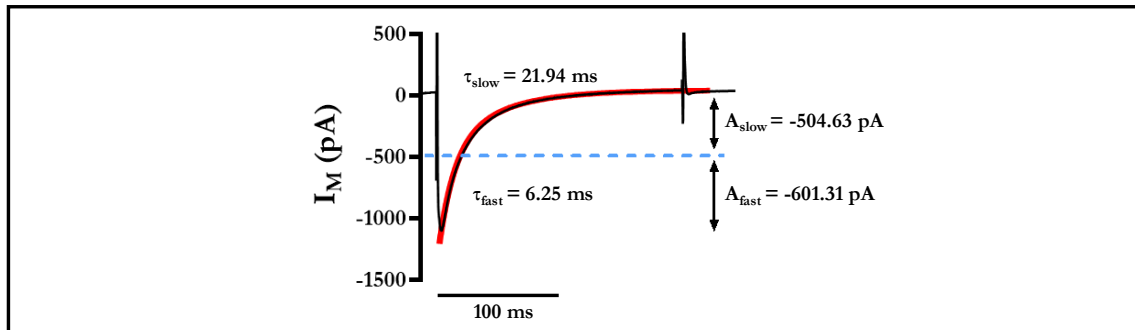


Abbildung 10: Beispielhafte Darstellung einer $I_{Ca,L}$ -Decay Analyse

Dargestellt ist ein $I_{Ca,L}$, an welchen zwischen Peak und Grundlinie eine Biexponentialfunktion angelegt wurde (rot). Zu diesem Beispiel wurden die entsprechenden Zeitkonstanten (τ_{slow} und τ_{fast}) und Amplituden (A_{slow} und A_{fast}) eingezeichnet. Durch eine blau gestrichelte Linie sind die beiden Abschnitte der Funktion visuell getrennt dargestellt.

Parallel zur Messung der Membranströme wurden CaT mittels Epifluoreszenz aufgezeichnet. Diese bildeten über den gesamten Messzeitraum ab, wie sich die Ca^{2+} -Konzentration intrazellulär verhielt und gaben so größeren Aufschluss über die Ca^{2+} -Homöostase der Zelle. Da man mit Fluo-3 Signalen an sich keine Aussage über die absolute Ca^{2+} -Konzentration treffen kann wurde jede Zelle nach erfolgreicher Messung kalibriert. Dazu wurde die Zelle auf -80 mV geklemmt und die Membran mit der Pipette vorsichtig durchstochen, was einen

Zelltod induzierte. Im Zuge dieses Zelltodes kam es zu einem massiven Ca^{2+} -Einstrom ins Zytosol, was zu einer Ca^{2+} -Sättigung des intrazellulären Fluo-3 führte und so als maximales Fluoreszenzsignal (F_{Max}) aufgezeichnet wurde (Abbildung 11, blaue Linie). Wenn das Fluoreszenzsignal nicht weiter anstieg und ein Plateau erreichte, wurde die Pipette mitsamt der Zelle langsam unter Videokontrolle aus dem Sichtfeld entfernt. Das Fluoreszenzsignal fiel auf einen minimalen Wert (F_{BL}) ab, welcher das Hintergrundrauschen abbildete (Abbildung 11, rote Linie). Die so ermittelten Werte für F_{Max} und F_{BL} konnten mithilfe von Formel 6 verwendet werden, um die relativen Fluoreszenzsignale (Abbildung 11, unten links) in absolute Ca^{2+} -Konzentrationen (Abbildung 11, unten rechts) umzurechnen. Die Bestimmung von F_{Max} , F_{BL} und die Anwendung der Formel 6 wurden im Programm Clampfit durchgeführt (Tabelle 8).

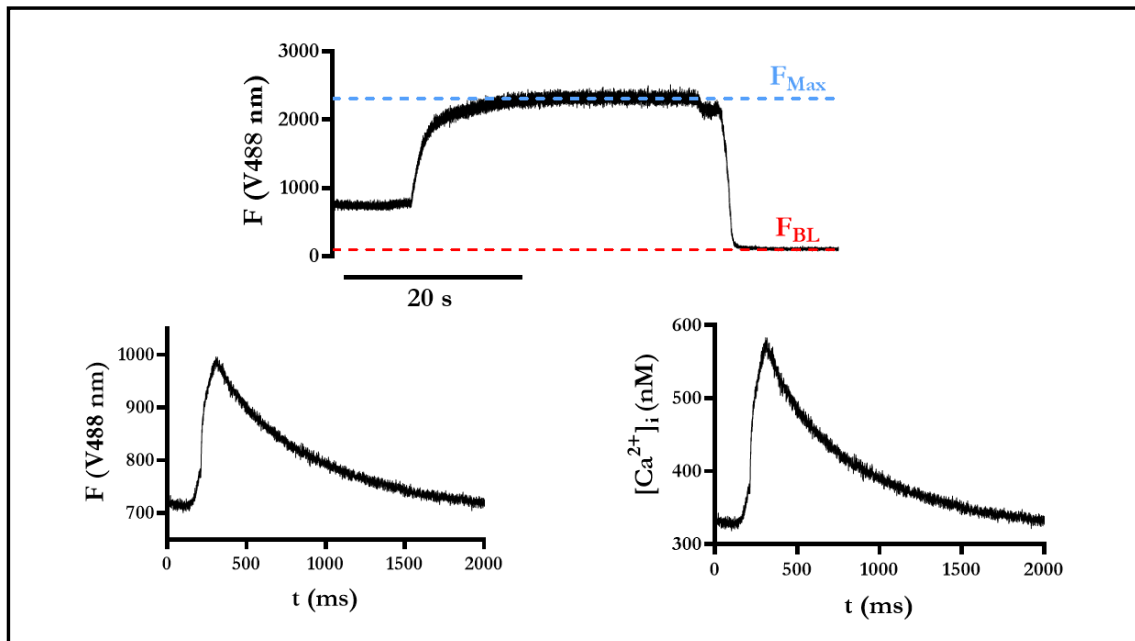


Abbildung 11: Kalibrierung des Fluoreszenzsignals

Oben: Abgebildet ist das Kalibrierungs-Fluoreszenzsignal mit einem maximalen Plateau (F_{Max}) nach Zelltod, gekennzeichnet durch eine blau gestrichelte Linie. Nach Entfernen der Zelle sank das Signal auf einen minimalen Wert ab (F_{BL}), gekennzeichnet durch eine rot gestrichelte Linie. **Unten links:** Abgebildet ist ein aus 10 CaT gemittelter Transient in relativen Fluoreszenzwerten, zugehörig zu der obigen Kalibrierung. **Unten rechts:** Abgebildet ist derselbe Transient nach Umrechnung mit Formel 6 in absolute Ca^{2+} -Konzentrationen in nM.

$$[Ca^{2+}]_i = k_d \left[\frac{(F_{(488nm)} - F_{BL})}{(F_{Max} - F_{BL}) - (F_{(488nm)} - F_{BL})} \right]$$

Formel 6: Berechnung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration

[Ca²⁺]_i = intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, k_d = Dissoziationskonstante von Fluo-3 bei 37 °C (864 nmol/L), F_(488nm) = Fluo-3 Fluoreszenz, F_{Max} = Ca²⁺-gesättigtes Fluoreszenzsignal, F_{BL} = Ca²⁺-freies Fluoreszenzsignal (Hintergrundsignal)

2.7.4.2 Analyse des CaT

Nach Umrechnung des Fluoreszenzsignals in die [Ca²⁺]_i konnte anhand des Transienten zunächst die diastolische und systolische [Ca²⁺]_i bestimmt werden. Dazu wurden die zu den analysierten Stromkurven gehörigen Transienten gemittelt, sofern sie ebenfalls einen stabilen Messzustand widerspiegeln. Der gemittelte Transient wurde als Rohdaten in eine eigens dafür vorprogrammierte Excelvorlage transferiert, welche die ersten 20 Rohdatenpunkte des Transienten mittelte, um so den diastolischen Wert zu bestimmen (Abbildung 12, blaue Linie). Mittels einer Maximalwertanalyse wurde der systolische Wert bestimmt (Abbildung 12, rote Linie). Die Differenz ergab die Amplitude. Zudem wurde die Zeit bis zum Maximalwert bestimmt (*time to peak*). Dazu wurde der Stimulationszeitpunkt, an welchem das Spannungsprotokoll auf +10 mV wechselte, als Nullpunkt gewählt. Danach wurde der Abfall der [Ca²⁺]_i (CaT-Decay) bestimmt, indem eine Standard-Monoexponentialfunktion (Formel 7) an den Transienten angelegt wurde (Abbildung 12, grüne Linie). Diese wurde im Bereich von 90 % bis 10 % der Maximalamplitude berechnet. Der Decay wird als τ (ms) angegeben. Der reziproke Wert ergibt die Decay-Konstante k (ms⁻¹).

$$f(t) = A \cdot e^{(-t/\tau)} + C$$

Formel 7: Standard-Exponentialfunktion

A = Amplitude; e = Eulersche Zahl; t = Zeit; τ = Zeitkonstante der Funktion; C = y-Verschiebung

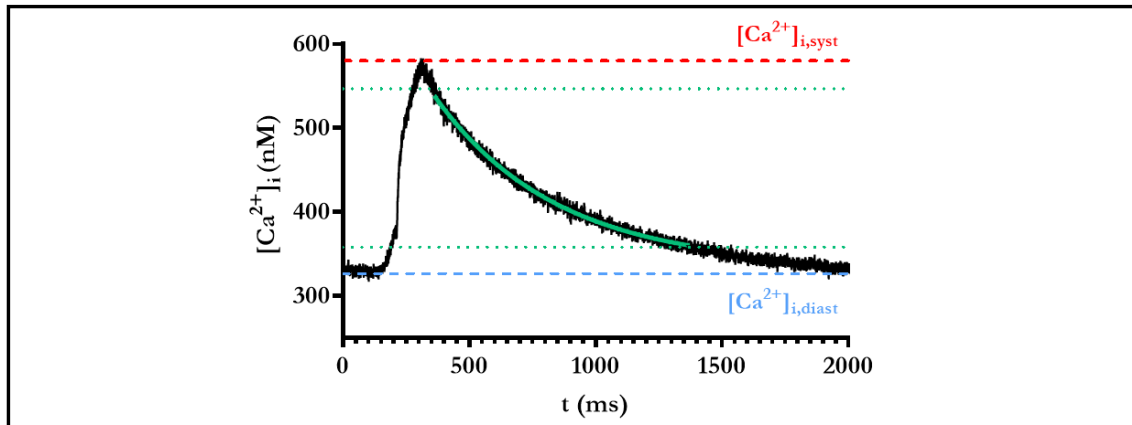


Abbildung 12: Analyse des CaT

Abgebildet ist der CaT aus Abbildung 11: Kalibrierung des Fluoreszenzsignals

Oben: Abgebildet ist das Kalibrierungs-Fluoreszenzsignal mit einem maximalen Plateau (FMax) nach Zelltod, gekennzeichnet durch eine blau gestrichelte Linie. Nach Entfernen der Zelle sank das Signal auf einen minimalen Wert ab (FBL), gekennzeichnet durch eine rot gestrichelte Linie. **Unten links:** Abgebildet ist ein aus 10 CaT gemittelter Transient in relativen Fluoreszenzwerten, zugehörig zu der obigen Kalibrierung. **Unten rechts:** Abgebildet ist derselbe Transient nach Umrechnung mit Formel 6 in absolute Ca²⁺-Konzentrationen in nM., unten rechts. Der diastolische Wert ($[Ca^{2+}]_{i,diast}$) ist als eine blaue gestrichelte Linie dargestellt. Der systolische Wert ($[Ca^{2+}]_{i,syst}$) ist als eine rote gestrichelte Linie dargestellt. Die grüne Linie symbolisiert die angelegte Exponentialfunktion nach Formel 7 im Abstand von 90 % bis 10 % des $[Ca^{2+}]_{i,syst}$ (jeweils grün gepunktete Linie).

2.7.5 Messung der SR-Beladung und der Ca²⁺-Pufferung

2.7.5.1 Koffein Messprotokoll

Nach Stimulation der Zelle (Abschnitt 2.7.3) für etwa 90 Sekunden wurde die Zelle auf -80 mV im Gap-Free-Modus gehalten und sowohl der Membranstrom als auch der CaT aufgezeichnet. Nach etwa fünf Sekunden, wenn sich der Membranstrom und der Transient nach der letzten Stimulation stabilisiert hatten, wurde eine sättigende 10 mM Koffeinlösung (Abschnitt 2.6.4) appliziert. Koffein ist ein Purinalkaloid aus der Gruppe der Xanthine. An der Herzzelle bewirkt es eine Öffnung der RyR2 und damit die Freisetzung von Kalzium aus dem SR. Die koffeininduzierte schlagartige Freisetzung des gesamten Kalziums aus dem SR führte an der gemessenen Zelle zu einem massiven koffeininduzierten Transienten, dem cCaT (Abbildung 13). Durch die andauernde Perfusion mit Koffein blieben die RyR2 geöffnet, weshalb das zeitgleich durch die SERCA zurückgepumpte Kalzium direkt erneut das SR verließ. Die SERCA wurde auf diese Weise funktional entkoppelt, weshalb der Decay des cCaT lediglich durch den NCX bestimmt wurde (k_{NCX}). Zur Analyse des k_{NCX} wurde ebenfalls eine Standard-Exponentialfunktion (Formel 7) an den Transienten angelegt. Da die

jeweiligen Anteile des mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporters und der sarkolemmalen Ca^{2+} -ATPase gering ausfallen, konnten sie an dieser Stelle unter Beachtung dieses systematischen Fehlers vernachlässigt werden. So ergab sich aus dem k_{NCX} und dem $k_{\text{SERCA+NCX}}$ die funktionelle SERCA-Aktivität k_{SERCA} .

$$k_{\text{SERCA}} = k_{\text{SERCA+NCX}} - k_{\text{NCX}}$$

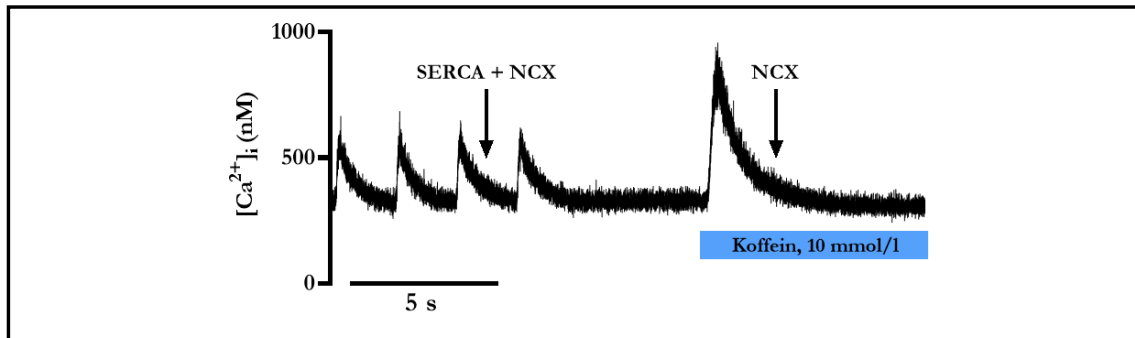


Abbildung 13: Koffeinprotokoll

Abgebildet ist ein beispielhaft gemessener cCaT ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ in nM) während der Durchführung des Koffeinprotokolls. Die ersten vier gezeigten CaT sind Antwort auf das Stimulationsprotokoll. Nach ca. fünf Sekunden Erholungsphase wird eine 10 mM Koffeinlösung appliziert, was eine massive Ca^{2+} -Freisetzung induziert. Durch die funktionale Entkopplung der SERCA spiegelt der cCaT-Decay die NCX-Aktivität wider.

2.7.5.2 Bestimmung der SR-Beladung

Da der NCX im Sarkolemm liegt und ein Ca^{2+} -Ion im Austausch gegen drei Na^+ -Ionen aus der Zelle transportiert wird, handelt es sich um einen elektrogenen Transport über die Zellmembran, was einem Membranstrom gleichkommt. Da netto eine positive Ladung in die Zelle gelangt, wird ein negativer NCX-Strom (I_{NCX}) während der Applikation von Koffein aufgezeichnet. Dieser I_{NCX} ist aufgrund der funktionalen SERCA-Entkopplung proportional zur verschobenen Ca^{2+} -Menge, weshalb deren Flächenintegral als ein genaues Maß für die gesamte Ca^{2+} -Menge des SR herangezogen werden kann (Abbildung 14 B).

Ebenso kann auch die Amplitude des cCaT verwendet werden, um auf die Beladung des SR zu schließen. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass es mit einem Fluoreszenzfarbstoff, wie Fluo-3, lediglich möglich ist die Konzentration des freien Kalziums zu einem bestimmten Zeitpunkt zu bestimmen, da dieser mit anderen Ca^{2+} -Puffern, wie TnC oder SERCA um die Bindung von Ca^{2+} -Ionen konkurriert. Da die freie Ca^{2+} -Konzentration demnach stark von der intrazellulären Ca^{2+} -Pufferung abhängig ist, ist sie im Vergleich zum Flächenintegral des I_{NCX} nur ungenügend geeignet, um die Ca^{2+} -Beladung des SR zu bestimmen (Smith und Eisner 2019). Dies gilt insbesondere, wenn man davon ausgehen kann, dass die intrazelluläre

Ca^{2+} -Pufferung im vorliegenden Modell verändert sein könnte. Durch die simultane Messung des I_{NCX} und Berechnung dessen Integral mittels Whole-Cell-Patch-Clamp-Technik im Voltage-Clamp-Modus war es möglich, unabhängig der intrazellulären Ca^{2+} -Pufferung die SR-Ladung zu bestimmen, da auf diese Weise die gesamte Ladungsverschiebung über das Sarkolemm berechnet werden konnte.

2.7.5.3 Bestimmung der Ca^{2+} -Pufferung

Zur Bestimmung der Ca^{2+} -Puffereigenschaften wurde das Integral des I_{NCX} (Abbildung 15 B), also die totale Ca^{2+} -Menge, gegen den cCaT (Abbildung 15 A), also die freie Ca^{2+} -Menge, aufgetragen. Das Verhältnis aus totalem und freiem Kalzium ergibt eine Ca^{2+} -Bindungskurve (Abbildung 15 C), welche mathematisch durch eine Michaelis-Menten-Funktion beschrieben werden kann (Formel 8). Zur Erstellung dieser Kurve wurde zunächst der Betrag des I_{NCX} auf die Membrankapazität normiert und gegen die freie $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aufgetragen (Abbildung 14 C). Dazu wurden nur Wertepaare ab dem maximalen Peak des cCaT verwendet. Eine lineare Regressionsgerade wurde durch die Punkte gelegt, um den funktionalen I_{NCX} darzustellen. Mithilfe dieser linearen Funktion und des kleinsten freien $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Wertes wurde der zugehörige I_{NCX} -Wert ermittelt, welcher dem Leckstrom entspricht (Abbildung 14 D). Dieser Leckstrom wurde vom I_{NCX} subtrahiert, um diesen betraglich exakt darzustellen. Um den Transienten zu korrigieren, wurde dessen diastolischer Endwert ebenfalls subtrahiert. Damit der Subtraktionsfehler des Hintergrundrauschens gering blieb, wurde dazu stets ein Mittelwert der letzten 30 Werte als diastolischer Endwert festgelegt. Um nun die Ca^{2+} -Bindungskurve abzubilden wurde jeweils der korrigierte und integrierte I_{NCX} als totale Ca^{2+} -Menge und die korrigierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ als freie Ca^{2+} -Menge verwendet und gegeneinander aufgetragen. Durch diese wurde eine modulierte Michaelis-Menten-Funktion entsprechend Formel 8 mit dem Programm Clampfit (Tabelle 8) gelegt. Dabei wurden ausschließlich positive Wertepaare in die mathematische Erstellung der Kurve einbezogen. Der B_{Max} -Wert bestimmt dabei die maximale Pufferkapazität der Zelle. Der k_d -Wert entspricht der freien $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des halbmaximalen B_{Max} und ist somit ein Maß der Pufferkinetik (Abbildung 15 D).

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} = \frac{B_{\text{Max}} \cdot [\text{Ca}^{2+}]_i}{k_d \cdot [\text{Ca}^{2+}]_i} + C$$

Formel 8: Modulierte Michaelis-Menten-Funktion

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}$ = totale Ca^{2+} -Konzentration; B_{Max} = maximale Pufferkapazität; k_d = Dissoziationskonstante;

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ = freie Ca^{2+} -Konzentration; C = y-Verschiebung

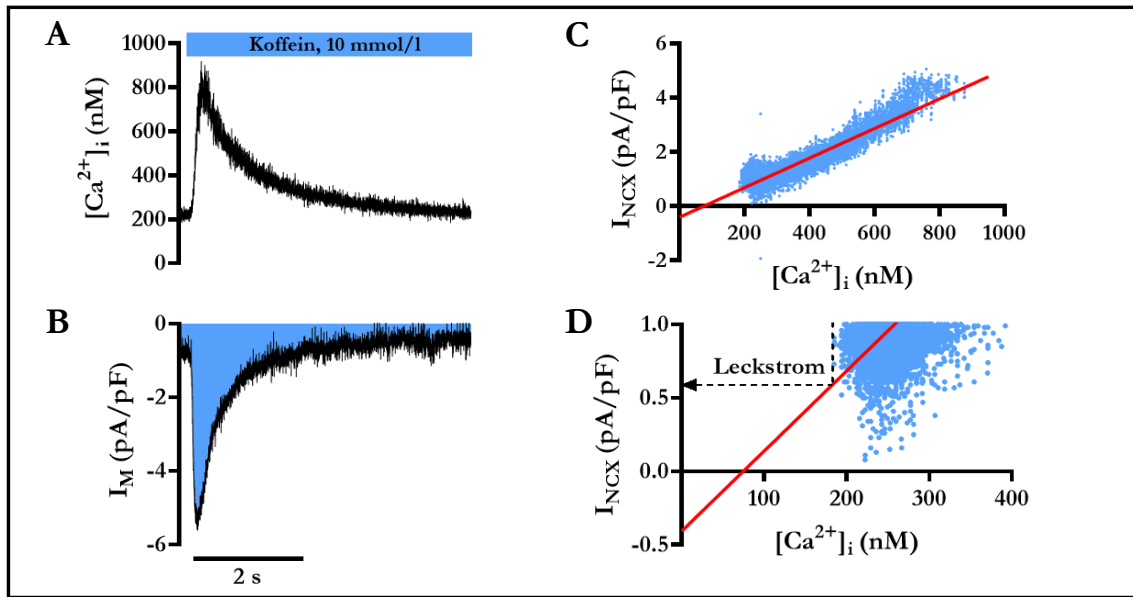


Abbildung 14: Analyse der Ca^{2+} -Pufferung Schritt 1

A: Koffeininduzierter CaT in nM. **B:** Koffeininduzierter I_{NCX} in pA/pF, das Integral ist als blaue Fläche dargestellt. **C:** Darstellung des funktionalen NCX durch Auftragung von I_{NCX} gegen die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (blaue Punkte), lineare Regressionsgerade (rote Linie). **D:** Vergrößerung von oben rechts zur Veranschaulichung der Ermittlung des Leckstromes (leak = 0,60 pA/pF).

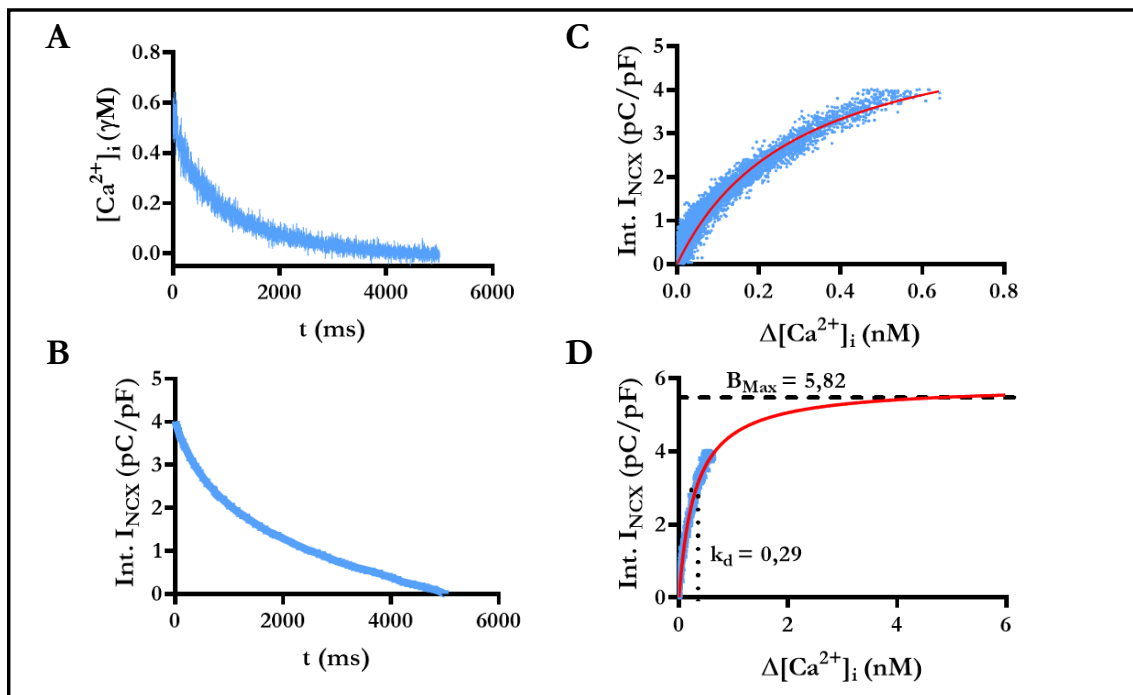


Abbildung 15: Analyse der Ca^{2+} -Pufferung Schritt 2

A: Relative freie $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in μM , beginnend bei dem Maximalwert. **B:** Integrierter I_{NCX} als Betrag in pC/pF, entsprechend des CaT. **C:** Freie $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gegenüber der totalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (blau) mit einer angelegten Michaelis-Menten-Funktion (rote Linie) **D:** Vollständige Michaelis-Menten-Funktion entsprechend der in C berechneten Funktion. Der B_{Max} -Wert bestimmt die maximale Pufferkapazität der (gestrichelte Linie). Der K_d -Wert entspricht der freien $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des halbmaximalen B_{Max} (gepunktete Linie).

2.8 Durchführung der Feldstimulationsversuche

2.8.1 Vorbereitung der Feldstimulationsversuche

Es wurde die Badlösung entsprechend Abschnitt 2.6 vorbereitet und die Zellen mit dem Protokoll aus Abschnitt 2.4.3 mit Fluo-3 beladen.

Für die Versuche wurde die Messkammer aus Abschnitt 2.3.2 verwendet und identisch zusammengesetzt. Zusätzlich wurde auf die Kammer ein Aufsatz mit zwei Elektroden zur Feldstimulation geschraubt (Abbildung 16). Die Stimulationselektroden ragten über eine Länge von etwa 1 cm in die Badlösung hinein, besaßen einen Abstand von etwa 1 cm zueinander und wurden mit dem Feldstimulator über ein Stimulationskabel verbunden. So konnte ein elektrisches Feld in der Badlösung und somit über den Zellen hergestellt werden. Dieses wurde für 3 ms mit einer Spannung von 30 mV erzeugt. Über die Software Clampex (Tabelle 8) konnte der Feldstimulator in seiner Frequenz moduliert und die erzeugten Messsignale aufgezeichnet werden.

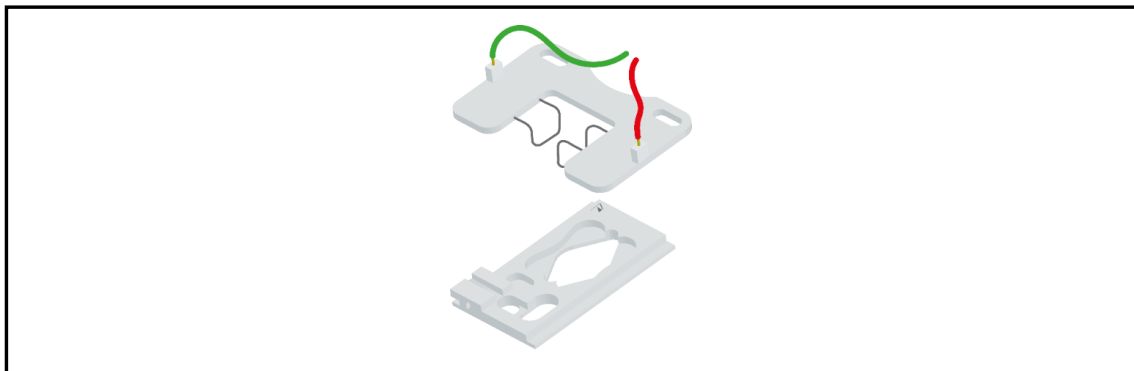


Abbildung 16: Messkammer mit Feldstimulationsaufsatz

Schematische Darstellung der verwendeten Messkammer mit dem dazugehörigen Aufsatz für die Feldstimulation und angeschlossenen Stimulationskabeln.

Quelle: Eigene Darstellung

Die Messkammer wurde am Messplatz (Abschnitt 2.3) in die Plattform des Mikroskops eingelegt, mit Badlösung befüllt bis die Stimulationselektroden Kontakt zur Flüssigkeit besaßen und auf 37 °C aufgeheizt. Wenn konstante Bedingungen erreicht waren, wurden die ausplattierten iPSC-CM in die Kammer gelegt. Zunächst wurde dann eine geeignete Zelle ausgesucht. Bei der Auswahl spielten Kriterien wie Größe und Morphologie der Zellen sowie deutlich sichtbare Kontraktionen als Antwort auf ein 0,5 Hz Testprotokoll eine Rolle. Wurde ein geeigneter Bereich gefunden, wurde die Kamera mittig über dem Kontraktionsmittelpunkt platziert und die Zelle, den Hintergrund abschirmend, eingerahmt. Nun wurde die Exzitationslampe und der PMT eingeschaltet und die Zellen anhand ihres

CaT erneut begutachtet. Nur Zellen, welche einen homogenen CaT aufwiesen, wurden für das weitere Messprozedere verwendet. Spontane Kontraktionen zusätzlich zur Stimulationsfrequenz waren kein Ausschlusskriterium, sofern diese bei höheren Frequenzen verschwanden. Wenn alle Kriterien erfüllt waren, wurde das Messprotokoll gestartet.

2.8.2 Messung feldstimulierter CaT

2.8.2.1 Messprotokoll

Zur Messung von feldstimulierten CaT wurden die Zellen schrittweise von 0,5 Hz bis zu 5 Hz stimuliert und die CaT aufgezeichnet (Abbildung 17). Zu Beginn wurde jeder Frequenzbereich für 60 Sekunden aufgezeichnet. Ab 3 Hz wurde jeweils nur noch für 30 Sekunden stimuliert, um den Zellstress gering zu halten.

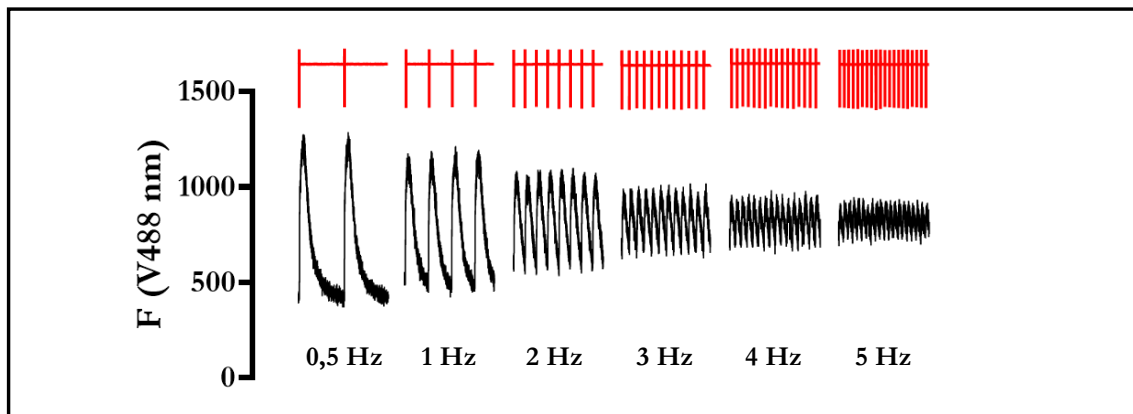


Abbildung 17: Messprotokoll der Feldstimulationsexperimente

Es ist schemenhaft das Messprotokoll einer repräsentativen Messung abgebildet. Die Transienten sind in relativen Werten der Emissionslichtstärke angegeben (V488 nm). Aus jedem Frequenzbereich wurden vier Sekunden aus einem stabilen Messbereich ausgewählt und abgebildet. Die Stimulationsartefakte sind als rote Stromlinie über den Transienten eingezeichnet und spiegeln ebenfalls die Stimulationsfrequenz wider.

2.8.2.2 Analyse der Messdaten

Da eine Kalibrierung der gemessenen Zellen aufgrund des Versuchsaufbaus nicht möglich war, konnten keine quantitativen Aussagen über die $[Ca^{2+}]_i$ getroffen werden. Um dennoch eine Vergleichbarkeit zu schaffen, wurden die CaT auf den minimalen diastolischen Wert unter 0,5 Hz Stimulation genormt ($\Delta F/F_0$). So konnte ein relativer systolischer Wert bestimmt und bei höheren Frequenzen ein tendenzieller Verlauf von Systole und Diastole dargestellt werden. Außerdem wurde ebenfalls die Zeitkonstante (τ) des Decays zu jeder Frequenz mittels einer Monoexponentialfunktion wie in Abschnitt 2.7.4.2 bestimmt. Der Fokus der Analyse lag auf dem Rhythmusverhalten der Zellen. Speziell wurden die Daten

auf CaT-Alternans untersucht. Typische Alternans wiesen ein 1:1 Muster auf, in seltenen Fällen traten auch 1:2- und 1:3-Alternans auf. Letztere wurden in dieser Arbeit jedoch nicht weiter differenziert und somit zusammen in die einfache Kategorie der CaT-Alternans eingeordnet. Die niedrigste Frequenz, bei der CaT-Alternans sichtbar wurden, wurde als Alternansschwelle festgelegt. Typische CaT-Alternans sind in Abbildung 18 dargestellt.

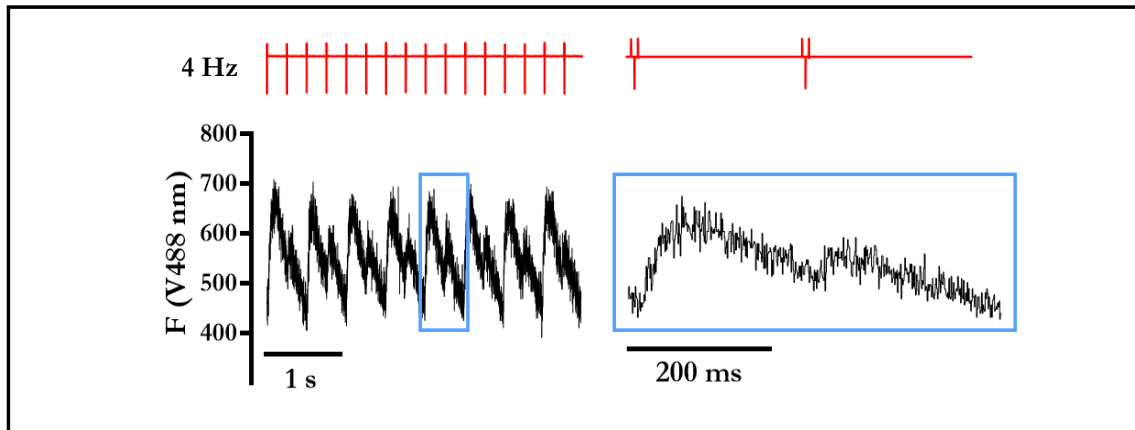


Abbildung 18: Beispielhafte Darstellung von CaT-Alternans bei 4 Hz

Links: Schemenhafte Darstellung von typischen Alternans bei einer Stimulation von 4 Hz über vier Sekunden.

Rechts: Vergrößerte Darstellung zweier Transienten zur Verdeutlichung der Amplitudendifferenz.

2.9 Computersoftware

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Computerprogramme verwendet. Diese wurden zur Generierung, Analyse, Sammlung und statistischen Auswertung der Daten herangezogen. Die entsprechenden Programme sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Software

| Software | Version | Entwickler |
|----------------|-----------------|----------------------------|
| Clampex | 10.7.0.3 | Molecular Devices LLC, USA |
| Clampfit | 10.7.0.3 | Molecular Devices LLC, USA |
| GraphPad Prism | 9.1.0 | GraphPad Software, USA |
| IonWizard | 6.6 revision 10 | IonOptix LCC, USA |
| MS Excel 2016 | 16.0 | Microsoft Corporation, USA |

2.10 Statistische Auswertung der Daten

Die Rohdaten dieser Arbeit wurden mittels dem Programm Clampfit (Tabelle 8) erhoben und durch das Programm MS Excel (Tabelle 8) umgerechnet, analysiert und gesammelt. Die statistischen Berechnungen und die Erstellung der Abbildungen erfolgten mit GraphPad Prism (Tabelle 8). Die ermittelten Parameter wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Zudem wurde die Anzahl der gemessenen Zellen sowie die Anzahl der gemessenen Zellchargen angegeben ($n = \text{Anzahl gemessener Zellen} / \text{Anzahl gemessener Zellchargen}$).

Kontinuierliche Daten mit einem Stichprobenumfang $n \geq 30$ wurden gemäß des zentralen Grenzwertsatzes als normalverteilt angenommen (Kwak und Kim 2017). Werte mit einer Verteilung zwischen $n = 10-30$ wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalität getestet. Normalverteilte Daten wurden, wenn nicht anders angegeben, mit dem ungepaarten zweiseitigen Zweistichproben-t-Test verglichen. Nicht normalverteilte Daten und alle Datensätze mit $n < 10$ wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen. Dies wurde entsprechend in den Abbildungslegenden mit dem Hinweis „U-Test“ angegeben. Die Daten der Kaplan-Meier-Kurve wurden mit dem Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test verglichen. Die Nullhypothese wurde verworfen, wenn der p-Wert $< 0,05$ war. Die statistische Signifikanz wurde dargestellt als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit basieren auf insgesamt 167 mittels Patch-Clamp gemessener iPSC-CM, wovon 114 Datensätze in die Statistik dieser Ergebnisse eingeflossen sind (Ctrl-1: 29/3; R173W: 46/5; Ctrl-2: 24/3; EMD57033: 15/3 [n/N = Zellen/Charge]). Ausgeschlossen wurden Messungen, welche keinen analysierbaren $I_{Ca,L}$ oder CaT aufwiesen oder deren diastolische $[Ca^{2+}]_i$ Werte über 500 nM lagen.

Von diesen 114 eingeschlossenen Datensätzen konnte bei 83 iPSC-CM erfolgreich die SR-Beladung und die Ca^{2+} -Pufferung quantifiziert werden (Ctrl-1: 21/3; R173W: 31/5; Ctrl-2: 19/3; EMD57033: 12/3 [n/N = Zellen/Charge]). Messungen, bei denen kein oder nur ein unvollständiger cCaT bzw. I_{NCX} gemessen werden konnte und deren cCaT in der Amplitude kleiner als der zugehörige CaT war, wurden aus der Ca^{2+} -Pufferanalyse ausgeschlossen, nicht aber aus der $I_{Ca,L}$ - und CaT-Analyse.

Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit CaT von 78 iPSC-CM mittels Feldstimulation untersucht (Ctrl-1: 12/2; R173W: 23/3; Ctrl-2: 22/4; EMD57033: 10/1; R173W-Blebbistatin: 11/1 [n/N = Zellen/Charge]).

3.1 Definition der Stromdichte

Bei der Arbeit mit iPSC-CM wurde schnell deutlich, dass diese eine sehr große Variabilität in der absoluten Stromamplitude besitzen (Mittelwert \pm SEM: $804,3\pm 42,16$ pA; Standardabweichung: 450,1 pA). Wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben, kann die Membrankapazität als hinreichende Variable für die Zelloberfläche herangezogen werden. Daher wurden in Abbildung 19 Absolutströme aller gemessenen Zellen in Abhängigkeit von deren Membrankapazität aufgetragen. Es zeigte sich daraufhin eine deutliche Korrelation. Der Bravais-Pearson-Korrelationskoeffizient (r) ist ein Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs und liegt bei den Zellen bei $r = -0,51$. Aus dem Quadrat des Korrelationskoeffizienten r ergibt sich der Determinationskoeffizient (r^2), welcher aussagt, wie groß der Anteil der erklärten Streuung an der gesamten Streuung ist. Dieser Anteil beträgt in der vorliegenden Arbeit rund 0,26 bzw. 26 %. Mit einem $p < 0,001$ ist die lineare Regression signifikant ungleich Null. Um auch geringere Unterschiede in den Strömen leichter detektieren zu können, wurden alle Absolutströme auf die Membrankapazität normiert. Alle Ströme werden daher als Stromdichte in pA/pF angegeben. Abbildung 20

zeigt die Stromdichten in Abhängigkeit der Membrankapazität. Die errechnete Stromdichte korreliert ebenfalls signifikant mit der Membrankapazität ($p < 0,01$), jedoch in umgekehrter linearer Proportionalität und mit deutlich geringerem Determinationskoeffizienten. Die Regressionsgerade besitzt einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,28$. Der Determinationskoeffizient beträgt rund 0,08 (8 %). Die Daten zeigen, dass eine Anpassung der Absolutströme an die Membrankapazität sinnvoll war, da der lineare Zusammenhang zwischen Strom und Membrankapazität so deutlich minimiert werden konnte. Dennoch zeigte sich weiterhin eine geringe lineare Regression zwischen Stromdichte und Membrankapazität, die nicht vollständig erklärt werden kann. Es wurde deutlich, dass Zellen großer Membrankapazität geringere Stromdichten aufweisen. Daher ist die vergleichende Betrachtung der Membrankapazitäten im Rahmen dieser Arbeit notwendig, obwohl diese bereits in die Stromdichte einberechnet wurden.

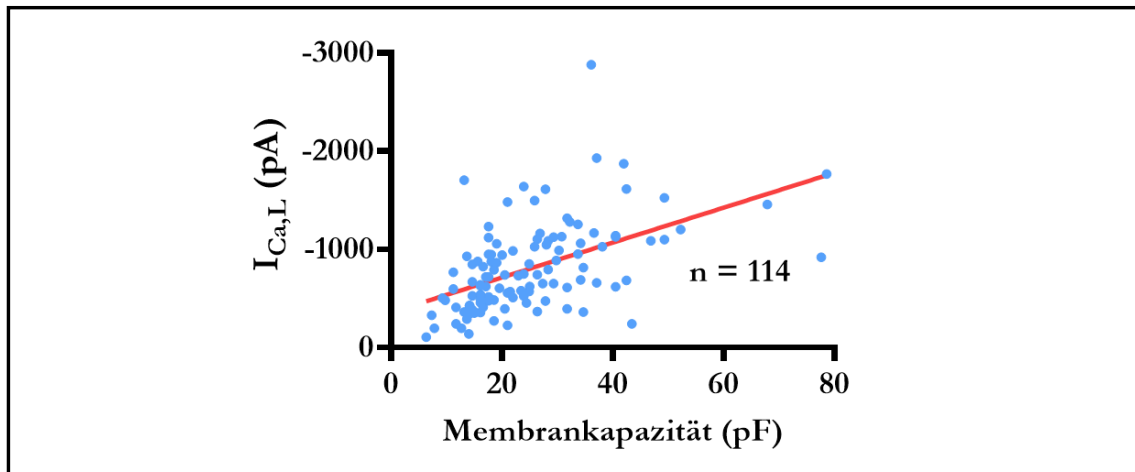


Abbildung 19: Absolutströme in Abhängigkeit der Membrankapazität

Es sind die Absolutströme $I_{Ca,L}$ (pA) aller gemessenen Zellen in Abhängigkeit von deren Membrankapazität (pF) aufgetragen. Der $I_{Ca,L}$ korreliert linear mit der Membrankapazität. Die lineare Regressionsgerade ist rot eingezeichnet. ($m = -17,7$; $r^2 = 0,26$; $p < 0,001$)

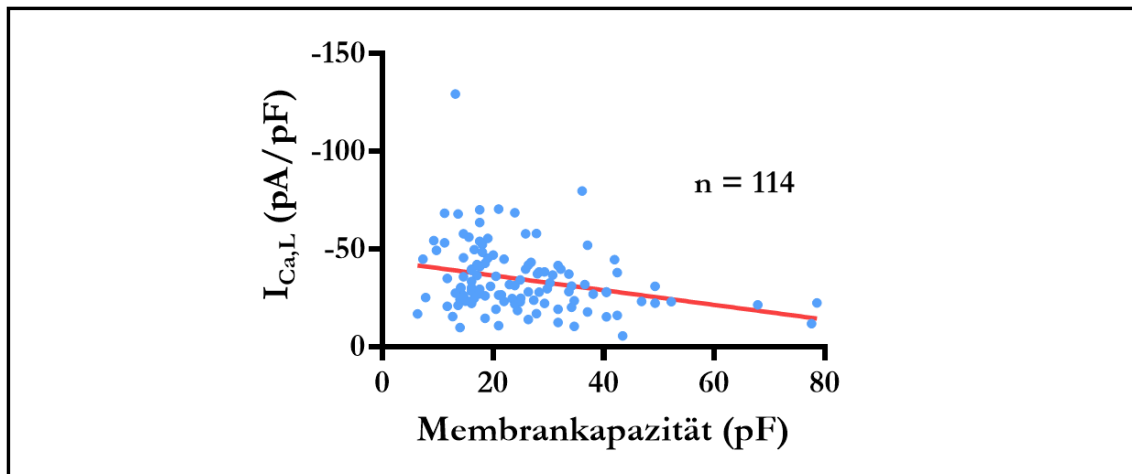


Abbildung 20: Stromdichte in Abhängigkeit der Membrankapazität

Es wurde die Stromdichte aller gemessenen Zellen in pA/pF in Abhängigkeit der Membrankapazität (pF) aufgetragen. Die Stromdichte korreliert linear mit der Membrankapazität. Die lineare Regressionsgerade ist rot eingezeichnet. ($m = 0,28$, $r^2 = 0,08$, $p < 0,01$)

3.2 Erhöhte Anfälligkeit für CaT-Alternans in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

Zur Untersuchung des Ca^{2+} -Handlings und potenzieller arrhythmogener Mechanismen wurden Fluo-3-beladene iPSC-CM von DCM-Patienten mit kardialer Troponin T-Mutation (DCM-cTnT-R173W) und von Gesunden der gleichen Familie (Ctrl-1) mit 0,5 Hz durch elektrische Feldstimulation stimuliert (Abschnitt 2.8). Repräsentative normalisierte Kurven sind in Abbildung 21 A (oben) dargestellt. Rein visuell und nicht quantifiziert konnte bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM eine reduzierte Kontraktilität beobachtet werden. Zudem zeigten DCM-cTnT-R173W iPSC-CM einen langsameren CaT-Anstieg (Abbildung 21 B, rechts) und eine reduzierte CaT-Amplitude (0,5 Hz, F/F_0 R173W: $0,85 \pm 0,09$ ms, $n/N = 15/2$ vs. Ctrl-1: $1,49 \pm 0,33$ ms, $n/N = 12/2$; $p < 0,05$; Daten nicht abgebildet). Die Zeitkonstante des Decays wurde durch Anlegen einer Monoexponentialfunktion an die Abklingphase der CaT (Abschnitt 2.7.4.2) quantifiziert. Sie war in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM im Vergleich zu Ctrl-1 verlangsamt (Abbildung 21 B, links).

Das Auftreten von CaT-Alternans in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM wurde durch schrittweise Erhöhung der Stimulationsfrequenz bis zu 5 Hz untersucht (Abbildung 21 B). Auffallend war, dass bei 5 Hz CaT-Alternans in allen DCM-cTnT-R173W iPSC-CM, aber nur in 25 % der Ctrl-1 iPSC-CM beobachtet wurden. Eine Kaplan-Meier-Analyse des Auftretens von CaT-Alternans über den gesamten Frequenzbereich zeigte eine signifikant

höhere Anfälligkeit für CaT-Alternans in R173W-mutierten Zellen (Abbildung 21 D). Darüber hinaus war die Schwelle für CaT-Alternans, d.h. die mittlere Frequenz, bei der Alternans erstmals auftraten, in der DCM-cTnT-R173W-Gruppe signifikant niedriger (Ctrl-1: $4,33 \pm 0,67$ Hz + 9 nicht-arrhythmisch, $n/N = 3/2 + 9/2$ vs. R173W: $2,80 \pm 0,26$ Hz + 0 nicht-arrhythmisch, $n/N = 15/2 + 0/2$; $p < 0,001$; Abbildung 21 C). Insgesamt zeigten DCM-cTnT-R173W iPSC-CM einen langsameren CaT-Anstieg, einen langsameren Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ und ein vermehrtes Auftreten von arrhythmogenen CaT-Alternans im Vergleich zu Ctrl-1 iPSC-CM.

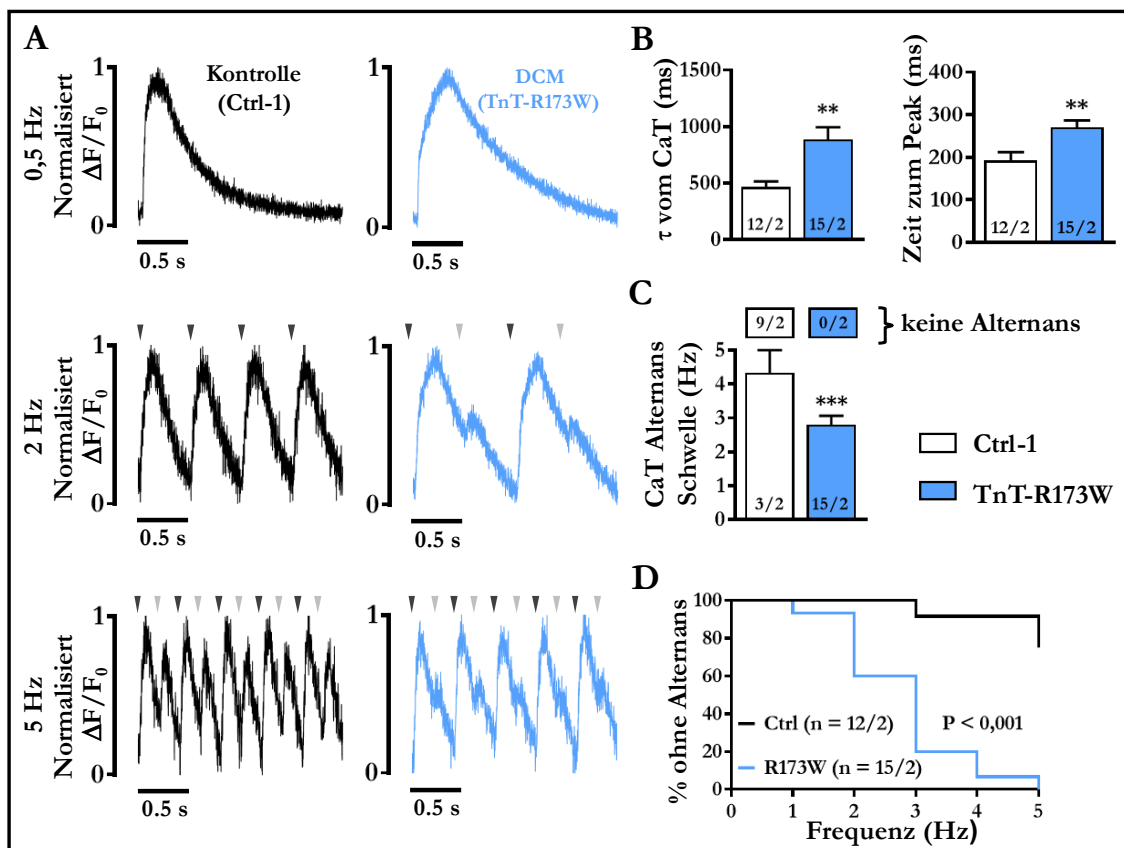


Abbildung 21: Auftreten von CaT-Alternans in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

A: Normalisierte repräsentative Messkurven von CaT bei 0,5 Hz, 2 Hz und 5 Hz. Graue Pfeile oberhalb der CaT dienen zur Veranschaulichung von Schlag-zu-Schlag-Änderungen. **B:** CaT-Zeitkonstante des Decays (links) und Zeit bis zum Peak (rechts). **C:** Niedrigste Frequenz, bei der Alternans auftraten; Zellen ohne Alternans sind in einem Kasten darüber dargestellt. Vergleich durchgeführt mit U-Test. **D:** Prozentualer Anteil der Zellen ohne Alternans in Relation zur jeweiligen Frequenz. Signifikanz bestimmt durch Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test. Alle Werte in B und C sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

$n/N =$ Zellen/Charge; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.3 Ca^{2+} -Homöostase der DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

Um weitere Mechanismen zu untersuchen, die dem gestörten Ca^{2+} -Handling (wie in Abschnitt 3.2 beschrieben) und einer erhöhten Arrhythmogenität zugrunde liegen, wurden die DCM-R173W-cTnT iPSC-CM umfangreichen elektrophysiologischen Untersuchungen unterzogen und erneut mit gesunden Kontrollzellen der gleichen Familie (Ctrl-1 iPSC-CM) verglichen. Dazu wurde der $I_{\text{Ca,L}}$ mittels Whole-Cell-Patch-Clamp-Technik im Voltage-Clamp-Modus und simultan dazu der zugehörige CaT mittels Epifluoreszenz (Fluo-3) gemessen (Abschnitt 2.7.3). Im Anschluss wurde an denselben Zellen mittels Koffeinprotokoll die Ca^{2+} -Pufferung quantifiziert (Abschnitt 2.7.5).

3.3.1 Vergleichbare Membrankapazität als Maß vergleichbarer Zellgröße

Bevor die nachfolgenden Ergebnisse in Beziehung zueinander gesetzt werden konnten, wurden die Membrankapazitäten der gemessenen iPSC-CM verglichen, um zu überprüfen, ob die R173W-cTnT Mutation Auswirkungen auf diese und konsekutiv auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse hatte. Es zeigte sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (R173W: $21,65 \pm 1,63$ pF, n/N = 46/5 vs. Ctrl-1: $27,38 \pm 3,28$ pF, n/N = 29/3; U-Test: $p = 0,33$; Abbildung 22). Somit konnte auf eine vergleichbare Zellgröße geschlossen werden.

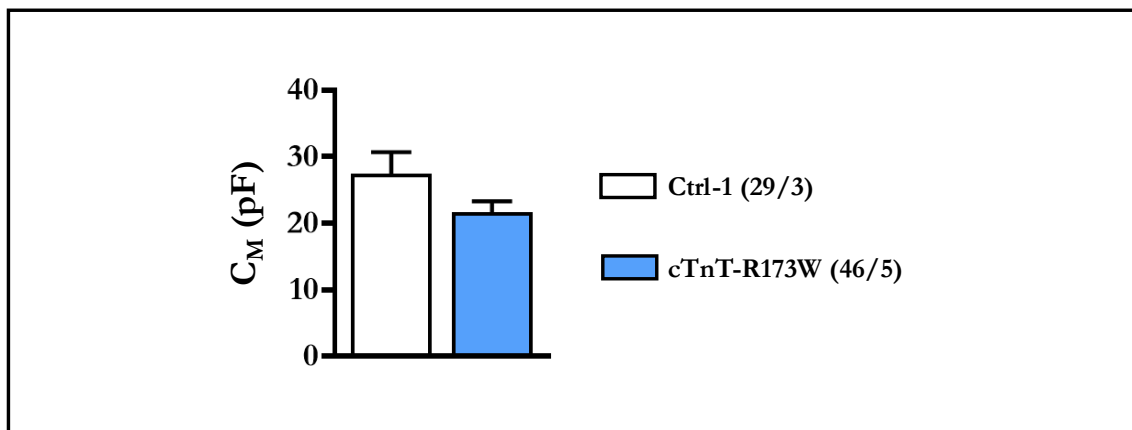


Abbildung 22: Membrankapazität (C_M)

Darstellung der Membrankapazität (C_M) von Ctrl-1 iPSC-CM (weiß) und DCM-cTnT-R173W iPSC-CM (blau) im Vergleich, U-Test ($p = 0,33$).

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n/N = Zellen/Charge

3.3.2 Erhöhter L-Typ- Ca^{2+} -Strom ($I_{\text{Ca,L}}$) in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

Sowohl der Peak (Abbildung 23 B) als auch das Integral des $I_{\text{Ca,L}}$ (Abbildung 23 C) zeigten sich bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM im Vergleich zu Ctrl-1 iPSC-CM deutlich erhöht. Dies bedeutet, dass im Vergleich zu Ctrl-1 iPSC-CM nicht nur initial mehr, sondern auch insgesamt mehr Kalzium pro Erregungszyklus in die Zelle strömte. Neben dem verstärkten $I_{\text{Ca,L}}$ zeigte sich auch in der Deaktivierung der LTCC eine signifikante Veränderung. τ_{slow} war signifikant erniedrigt, was eine schnellere VDI der Kanäle anzeigt (Abbildung 23 D, links), während τ_{fast} entsprechend der CDI unverändert blieb (Abbildung 23 D, rechts). Zudem schien der Anteil der CDI an der Gesamtinaktivierung signifikant erhöht zu sein (Abbildung 23 E).

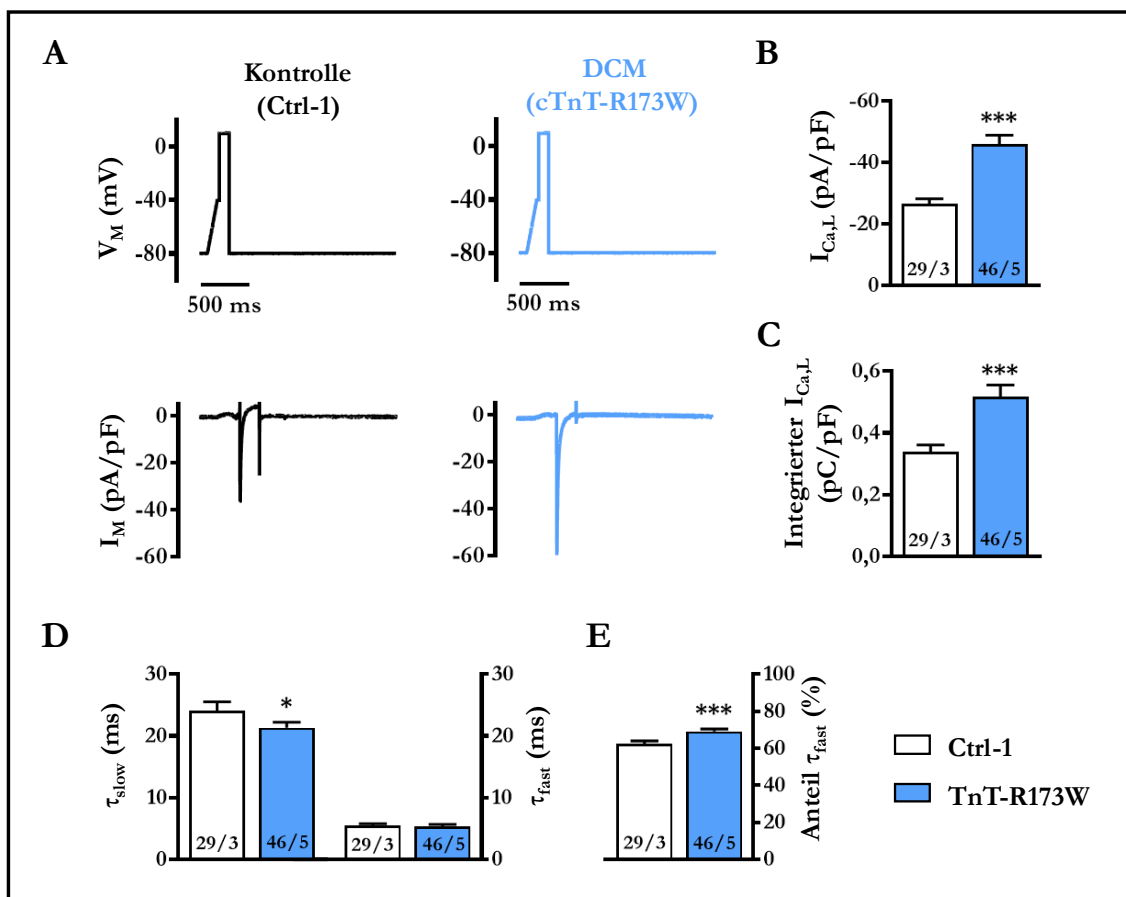


Abbildung 23: L-Typ- Ca^{2+} -Strom der DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

A: Rampenprotokoll mit repräsentativem L-Typ- Ca^{2+} -Strom ($I_{\text{Ca,L}}$) einer Ctrl-1 iPSC-CM (schwarz) und einer DCM-cTnT-R173W (blau); **B:** Stromdichte des $I_{\text{Ca,L}}$ Peak in pA/pF; **C:** Integrierte Stromdichte des gesamten $I_{\text{Ca,L}}$ über der Zeit in $\text{pA}\cdot\text{ms}/\text{pF} \triangleq \text{pC}/\text{pF}$; **D,E:** Darstellung der $I_{\text{Ca,L}}$ -Inaktivierung. Dargestellt ist die schnelle und langsame Zeitkonstante (τ_{slow} und τ_{fast} in ms) der angelegten biexponentiellen Funktion, U-Test (**D**) und der prozentuale Anteil der schnellen Inaktivierung an der Gesamtinaktivierung, U-Test (**E**).

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n/N = Zellen/Charge; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

Neben dem Ca^{2+} -Einstrom über die LTCC ($I_{\text{Ca,L}}$) wurde auch der Ca^{2+} -Ausstrom quantifiziert. Dazu wurde die Stromkurve nach Ende der Stimulation verwendet, welche am ehesten auf den NCX-vermittelten Ca^{2+} -Transport zurückzuführen ist. Dieser ist elektrogen, da der NCX drei Na^+ -Ionen gegen ein Ca^{2+} -Ion tauscht. Ein beispielhafter I_{NCX} ist in Abbildung 24 A im rechten Kasten dargestellt. Für jede Zelle wurde der Ca^{2+} -Ausstrom (Integrierter I_{NCX}) gegen den Ca^{2+} -Einstrom (Integrierter $I_{\text{Ca,L}}$) aufgetragen. Der Zusammenhang ist linear und zwischen DCM-cTnT-R173W und Ctrl-1 iPSC-CM vergleichbar, was an den linearen Korrelationsgeraden in Abbildung 24 B erkennbar ist. Dies deutet auf eine vergleichbare Ca^{2+} -Abhängigkeit der NCX-Aktivität hin. Entsprechend war der integrierte I_{NCX} proportional zum vergrößerten Integral des $I_{\text{Ca,L}}$ erhöht (Abbildung 24 C).

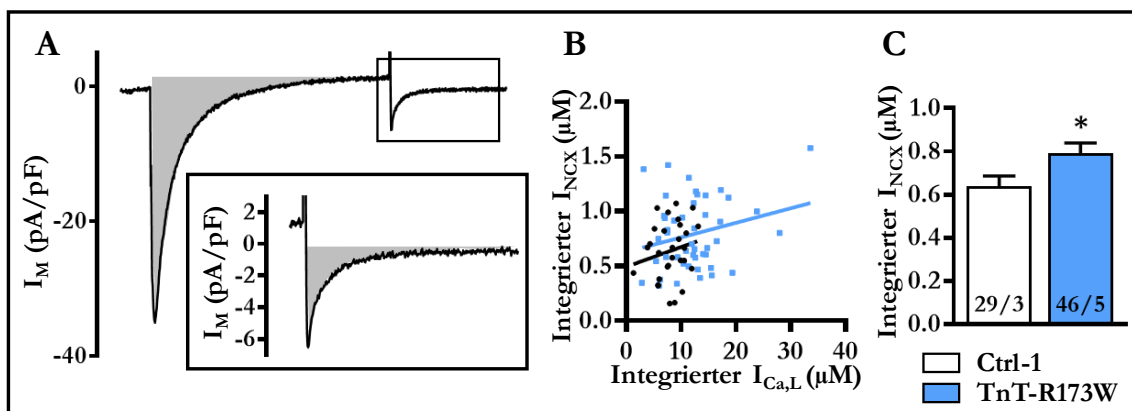


Abbildung 24: NCX-vermittelte Ca^{2+} -Extrusion der DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

A: Repräsentativer Membranstrom gemäß Abschnitt 2.7.3 mit $I_{\text{Ca,L}}$ (links) und I_{NCX} (rechts, eingerahmt). Der gestrichelte Bereich visualisiert den integrierten $I_{\text{Ca,L}}$, welcher den Ca^{2+} -Einstrom während der Stimulation darstellt. Der graue Bereich visualisiert den integrierten I_{NCX} , welcher den Ca^{2+} -Ausstrom darstellt. **B:** Integrierter I_{NCX} , aufgetragen gegen den integrierten $I_{\text{Ca,L}}$ von Ctrl-1 (schwarz) und DCM-cTnT-R173W iPSC-CM (blau), korreliert durch eine lineare Regression. Steigung von Ctrl-1 = 0,018, Steigung von DCM-cTnT-R173W = 0,013. **C:** Integrierter I_{NCX} .

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n/N = Zellen/Charge; * $p < 0,05$

3.3.3 Reduzierte Amplitude und langsamerer Decay des $I_{\text{Ca,L}}$ getriggerten CaT in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

Weiterführend wurden die simultan gemessenen CaT analysiert. Hier zeigte sich trotz des erhöhten $I_{\text{Ca,L}}$ während der Stimulation (Abbildung 23 B, C) eine erniedrigte Amplitude des CaT (Abbildung 25 B). Die Kopplungseffizienz zwischen einströmendem Kalzium und resultierendem CaT lässt sich durch einen Quotienten aus CaT und $I_{\text{Ca,L}}$ darstellen. Diese Kopplungseffizienz zeigte sich bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM im Vergleich zu Ctrl-1 iPSC-CM signifikant erniedrigt, was in Abbildung 25 E dargestellt ist. Die diastolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$

war in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM unverändert (Abbildung 25 B, links) und der systolische Wert leicht, aber nicht dem definierten Signifikanzniveau entsprechend ($p = 0,069$) erniedrigt (Abbildung 25 B, mittig).

Neben einer verkleinerten CaT-Amplitude und der reduzierten Kopplungseffizienz war konsistent zu den Ergebnissen aus den Feldstimulationsexperimenten (Abbildung 21 B, links) ebenfalls ein signifikant verlangsamer Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ zu beobachten, was durch eine erhöhte Zeitkonstante (τ) in Abbildung 25 D deutlich wird. Ein verzögerter CaT-Anstieg ließ sich in den Patch-Clamp-Messungen nicht reproduzieren (Abbildung 25 C).

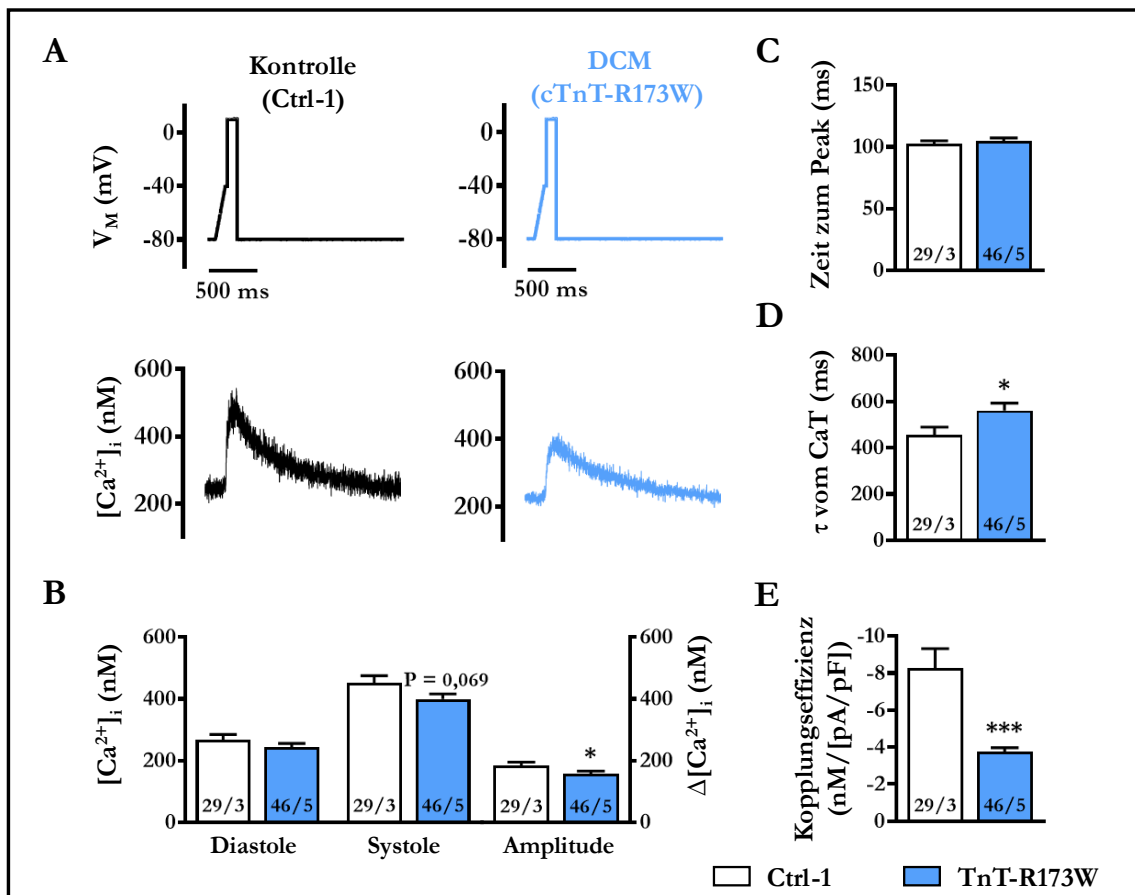


Abbildung 25: CaT der DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

A: Rampenprotokoll mit repräsentativem CaT eines Ctrl-1 iPSC-CM (schwarz) und eines DCM-cTnT-R173W iPSC-CM (blau); **B:** Abbildung des diastolischen und systolischen $[Ca^{2+}]_i$, sowie der Differenz beider Werte in nM; **C:** Darstellung der Zeit zwischen Erregung durch den Sprung des Rampenprotokolls auf +10 mV und dem maximalen Peak des CaT in ms, U-Test; **D:** Zeitkonstante der an den Transienten angelegten Exponentialfunktion in ms; **E:** Verhältnis aus der CaT-Amplitude und dem Peak des $I_{Ca,L}$ ergibt die Kopplungseffizienz, U-Test.

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n/N = Zellen/Charge; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

3.3.4 Reduzierte cCaT-Amplitude bei vergleichbarer SR Ca^{2+} -Beladung in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

Da die CaT-Amplitude neben dem $I_{\text{Ca,L}}$ durch verschiedene weitere Faktoren wie zum Beispiel der SR Ca^{2+} -Beladung beeinflusst wird, wurde diese im Anschluss mit Hilfe des Koffeinprotokolls aus Abschnitt 2.7.5 bestimmt. Zur Quantifizierung der Ca^{2+} -Beladung des SR eignen sich zwei Parameter, welche beide mittels der Applikation von Koffein bestimmt werden konnten (Abschnitt 2.7.5.2).

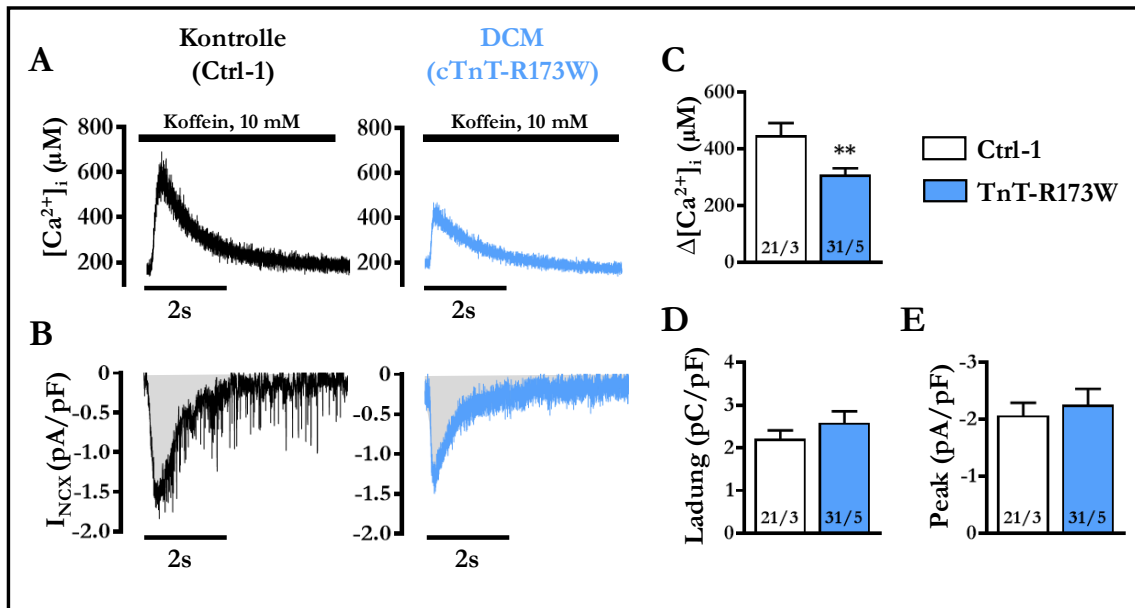


Abbildung 26: cCaT und I_{NCX} der DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

A: Darstellung eines repräsentativen cCaT einer Ctrl-1 iPSC-CM (links, schwarz) und einer DCM-cTnT-R173W iPSC-CM (rechts, blau); **B:** Simultane Messung des Ca^{2+} -induzierten Membranstromes, (I_{NCX}) mit grau hinterlegtem Integral der Stromkurve, welches ein Maß der Ca^{2+} -Beladung des SR darstellt; **C:** Amplitude des cCaT in nM; **D:** Integral des I_{NCX} , dargestellt als Ladungsdichte in pC/pF; **E:** Peak des I_{NCX} in pA/pF, U-Test. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n/N = Zellen/Charge; ** $p < 0,01$

Die cCaT-Amplitude war in den DCM-cTnT-R173W iPSC-CM signifikant reduziert, wie man der Abbildung 26 C entnehmen kann. Da aber, wie in Abschnitt 2.7.5.2 erläutert, eine reine Betrachtung der cCaT-Amplitude nicht ausreicht, um die SR-Beladung zu bestimmen, wurde fortgehend das Integral des I_{NCX} herangezogen. Dieses zeigte im Vergleich zwischen DCM-cTnT-R173W iPSC-CM und Ctrl-1 iPSC-CM keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 26 E). Der Peak des I_{NCX} war ebenfalls vergleichbar (Abbildung 26 F).

3.3.5 Erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

Die vergleichbare Gesamtmenge an Kalzium, die während der Koffeinapplikation aus dem SR freigesetzt wurde, steht im Kontrast zur kleineren cCaT-Amplitude in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM. Da letztere (wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben) nur die freie zytosolische Ca^{2+} -Konzentration abbildet, war eine weiterführende Quantifikation der intrazellulären Ca^{2+} -Pufferung erforderlich.

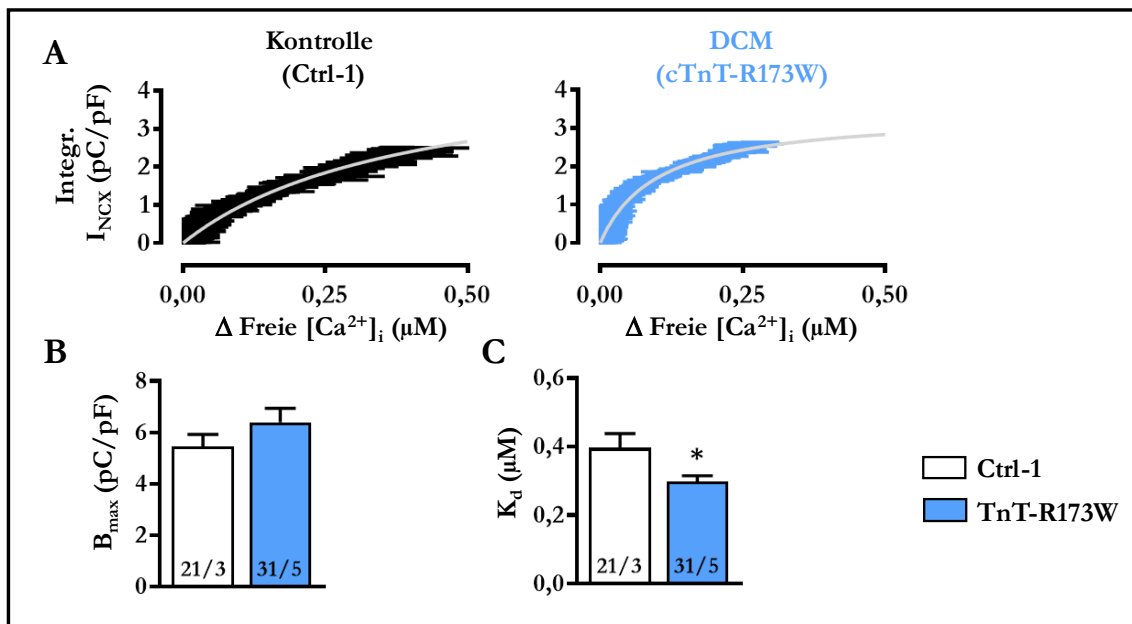


Abbildung 27: Intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

A: Darstellung einer repräsentativen Pufferkurve von einer Ctrl-1 iPSC-CM (links, schwarz) und einer DCM-cTnT-R173W iPSC-CM (rechts, blau); **B:** Maximale Pufferkapazität (B_{max}); **C:** Affinität der Puffer gegenüber Kalzium (K_d).

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n/N = Zellen/Charge; * $p < 0,05$

Um die intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung zu quantifizieren, wurde das Integral des koffeininduzierten NCX-Stroms gegen die freie Ca^{2+} -Konzentration aufgetragen (Abschnitt 2.7.5.3). An die Daten wurden eine Michaelis-Menten-Pufferkurve angelegt (Formel 8), durch welche die maximale Pufferkapazität (B_{max}) und die Konstante der Pufferkurve (K_d) bestimmt werden konnten. Die Pufferkapazität der DCM-cTnT-R173W iPSC-CM war im Vergleich zu den Ctrl-1 iPSC-CM unverändert, was auf eine vergleichbare Menge an zytosolischen Ca^{2+} -Puffern schließen lässt (Abbildung 27 B). Trotz vergleichbarem B_{max} erschien die Pufferkurve der DCM-cTnT-R173W iPSC-CM im Bereich physiologischer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ steiler, was durch einen signifikant erniedrigten K_d -Wert gezeigt werden konnte (Abbildung 27 C). Da sich der K_d -Wert antiproportional zur Affinität der Puffer gegenüber

Kalzium verhält, ist ein erniedrigter K_d -Wert Ausdruck einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Pufferung.

3.3.6 Quantifizierung totaler zytosolischer Ca^{2+} -Konzentrationen in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

Mit Hilfe der experimentell ermittelten Parameter K_d , B_{max} und Formel 1 ließ sich für jeden iPSC-CM aus dem CaT, welcher das freie Kalzium abbildet, eine totale Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_T$) über die Zeit berechnen. Dies wurde für jeden Datensatz durchgeführt. Repräsentative totale CaT sind in Abbildung 28 B dargestellt. Es zeigte sich im Vergleich der Amplituden des totalen CaT kein signifikanter Unterschied zwischen Ctrl-1 und DCM-cTnT-R173W iPSC-CM (Abbildung 28 C), was mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.3.4 vereinbar ist. Fortsetzend wurde die Kopplungseffizienz (Abschnitt 3.3.3) erneut mit dem totalen CaT berechnet, da dieser gegenüber der erhöhten Ca^{2+} -Pufferung bereits korrigiert ist. Die korrigierte Kopplungseffizienz zeigte sich weiterhin verringert (Abbildung 28 D).

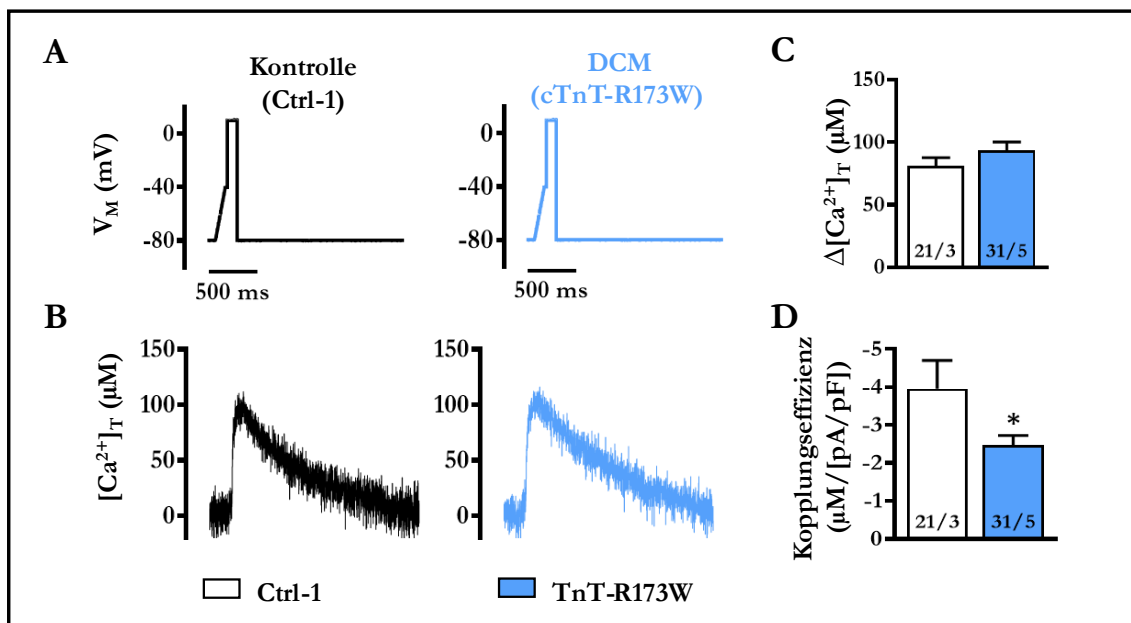


Abbildung 28: Totale CaT in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

A: Rampenprotokoll; **B:** Repräsentative totale zytosolische Ca^{2+} -Konzentration während eines $I_{Ca,L}$ -stimulierten CaT eines Ctrl-1 iPSC-CM (schwarz) und eines DCM-cTnT-R173W iPSC-CM (blau); **C:** Totale zytosolische Ca^{2+} -Amplitude; **D:** Verhältnis aus der totalen CaT-Amplitude und dem Peak des $I_{Ca,L}$ ergibt die korrigierte Kopplungseffizienz, U-Test.

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n/N = Zellen/Charge; * $p < 0,05$

3.3.7 Decay-Analyse und Quantifizierung der funktionellen NCX- und SERCA-Aktivität in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

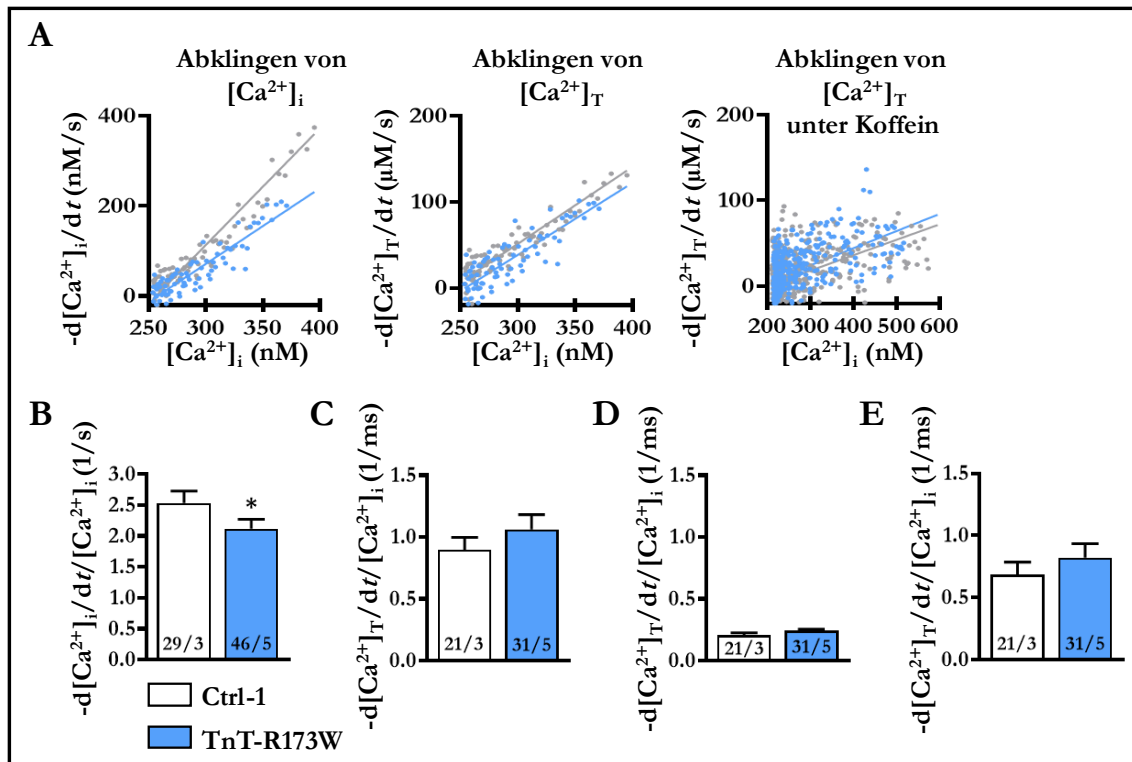


Abbildung 29: Quantifizierung des Decays der freien und totalen CaT und cCaT in DCM-TnT-R173W iPSC-CM

A: Repräsentativer Decay von freiem Ca^{2+} ($-d[Ca^{2+}]_i/dt$), aufgetragen gegen die freie $[Ca^{2+}]_i$ (links), repräsentativer Decay von totalem Ca^{2+} ($d[Ca^{2+}]_{total}/dt$), aufgetragen gegen die freie $[Ca^{2+}]_i$ (Mitte) und repräsentativer Decay von totalem Ca^{2+} des cCaT, aufgetragen gegen die entsprechende freie $[Ca^{2+}]_i$ (rechts) in Ctrl-1 (grau) und DCM-TnT-R173W iPSC-CM (blau). Die Steigungen sind als lineare Funktionen dargestellt.

B: Steigung von $-d[Ca^{2+}]_i/dt$, aufgetragen gegen $[Ca^{2+}]_i$, U-Test. **C:** Steigung von $d[Ca^{2+}]_T/dt$, aufgetragen gegen $[Ca^{2+}]_i$, U-Test. **D:** Steigung von $-d[Ca^{2+}]_T/dt$ während Koffein, aufgetragen gegen die entsprechende $[Ca^{2+}]_i$, was die Ca^{2+} -Abhängigkeit des NCX anzeigt. **E:** Differenz zwischen C und D, was die Ca^{2+} -Abhängigkeit der SERCA-Aktivität anzeigt, U-Test.

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n/N = Zellen/Charge; * $p < 0,05$

In Abschnitt 3.3.3 konnte bereits gezeigt werden, dass die $I_{Ca,L}$ -getriggerten CaT der DCM-cTnT-R173W iPSC-CM einen im Vergleich zu Ctrl-1 iPSC-CM verlangsamten Decay aufwiesen. Da der CaT nur das freie Kalzium abbildet, bleibt unklar, inwieweit der verlängerte Decay auf die in Abschnitt 3.3.5 beobachtete erhöhte Ca^{2+} -Pufferung zurückgeführt werden kann, oder ob eventuell die SERCA- oder NCX-Funktion unabhängig der $[Ca^{2+}]_i$ den CaT-Decay verlangsamte. Wie bereits beschrieben, wird der CaT-Decay im Wesentlichen durch die Entfernung des Kalziums aus dem Zytosol vornehmlich durch NCX und SERCA bestimmt. Da die SERCA- und NCX-Aktivität direkt von der $[Ca^{2+}]_i$ abhängt,

welche ihrerseits durch die Ca^{2+} -Pufferung beeinflusst wird, reichte die alleinige Analyse der CaT- und cCaT-Decays nicht aus, um Aussagen über die funktionelle NCX- und SERCA-Aktivität treffen zu können. Mit Hilfe der daraufhin bestimmten $[\text{Ca}^{2+}]_T$ und dessen Decay ließ sich die Quantifizierung des Decays vervollständigen, was Schätzungen zur $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Abhängigkeit der SERCA- und NCX-Aktivität zulässt. Abbildung 29 B zeigt äquivalent zu Abbildung 25 D einen signifikant verlangsamten Decay des CaT in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM. Der Decay des totalen CaT war hingegen unverändert (Abbildung 29 C). Diese Diskrepanz lässt sich somit quantitativ auf eine erhöhte Ca^{2+} -Pufferung in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM zurückführen. Des Weiteren wurde auch der Decay des totalen cCaT bestimmt. Durch die funktionelle Entkopplung der SERCA unter Koffeinapplikation konnte somit eine ausreichend genaue Schätzung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Abhängigkeit der NCX-Aktivität vorgenommen werden. Diese war in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM unverändert (Abbildung 29 D).

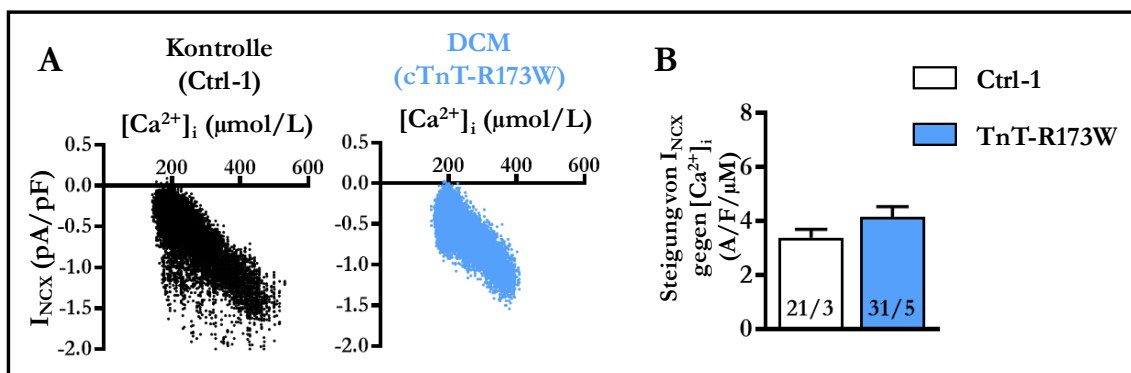


Abbildung 30: Funktionelle NCX-Aktivität in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

A: I_{NCX} im Verhältnis zu $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während des koffeininduzierten CaT aus repräsentativen Experimenten. **B:** Die Steigung einer angelegten linearen Funktion (in A nicht dargestellt) zeigt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Abhängigkeit der NCX-Funktion an.

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n/N = Zellen/Charge.

Zur weiteren Quantifizierung des NCX wurde der I_{NCX} mit der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Koffeinapplikation ins Verhältnis gesetzt. Das Ergebnis ist eine lineare Funktion, dessen Steigung ein Maß der funktionellen NCX-Aktivität abbildet (Abbildung 30). Auch hier konnte keine Abweichung in DCM-cTnT-R173W im Vergleich zu Ctrl-1 iPSC-CM festgestellt werden, was eine unveränderte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Abhängigkeit der NCX-Funktion unterstreicht (Abbildung 30 B). Durch die Differenz des totalen CaT-Decays (Abbildung 29 C; SERCA + NCX) und des totalen cCaT-Decays (Abbildung 29 D; NCX) ließ sich eine Schätzung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Abhängigkeit der SERCA-Aktivität vornehmen (Abbildung 29 E). Auch diese war bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM im Vergleich zu Ctrl-1 iPSC-CM unverändert.

3.4 Ca^{2+} -Homöostase gesunder iPSC-CM unter EMD57033

Zur pharmakologischen Simulation einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Pufferung und damit als ein positives Kontrollmodell wurden gesunde iPSC-CM unabhängig der DCM-Familie mit dem Ca^{2+} -Sensitizer EMD57033 inkubiert (Abschnitt 2.6.3). Der $I_{\text{Ca,L}}$ wurde mittels Whole-Cell-Patch-Clamp-Technik im Voltage-Clamp-Modus und simultan dazu der entsprechende CaT mittels Epifluoreszenz (Fluo-3) gemessen (Abschnitt 2.7.3). Im Anschluss wurde an derselben Zelle mittels Koffeinprotokoll die SR-Beladung und die Ca^{2+} -Pufferung bestimmt (Abschnitt 2.7.5).

3.4.1 Vergleichbare Membrankapazität als Maß vergleichbarer Zellgröße

Um zu überprüfen, ob EMD57033 die Membraneigenschaften der Zellen verändert, wurden die mittleren Membrankapazitäten der Kontrollgruppe sowie der EMD57033-Gruppe gemessen und miteinander verglichen. Hierbei wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (EMD57033: $25,44 \pm 2,87$ pF, $n/N = 15/3$ vs. Ctrl-2: $28,75 \pm 1,96$ pF, $n/N = 24/3$; $p = 0,33$; Abbildung 31).

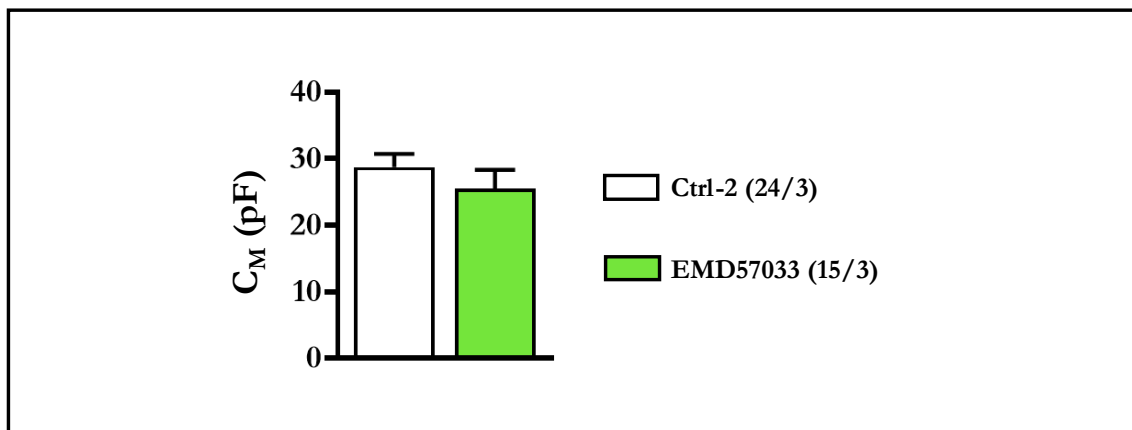


Abbildung 31: Membrankapazität (C_M)

Darstellung der Membrankapazität (C_M) der Kontrollgruppe (weiß) und der EMD57033 inkubierten Gruppe (grün) im Vergleich.

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. $n/N =$ Zellen/Charge

3.4.2 EMD57033 ohne Effekt auf den L-Typ- Ca^{2+} -Strom ($I_{\text{Ca,L}}$)

Sowohl der Peak (Abbildung 32 B) als auch das Integral (Abbildung 32 C) des $I_{\text{Ca,L}}$ blieben durch die pharmakologische Inkubation mit EMD57033 unverändert. Auch die Inaktivierung des $I_{\text{Ca,L}}$ zeigte sich unter der pharmakologischen Erhöhung der intrazellulären

Ca^{2+} -Sensitivität in den Parametern τ_{slow} , τ_{fast} und dem prozentualen Anteil von τ_{fast} an der gesamten Inaktivierung nicht signifikant verändert (Abbildung 32 D, E).

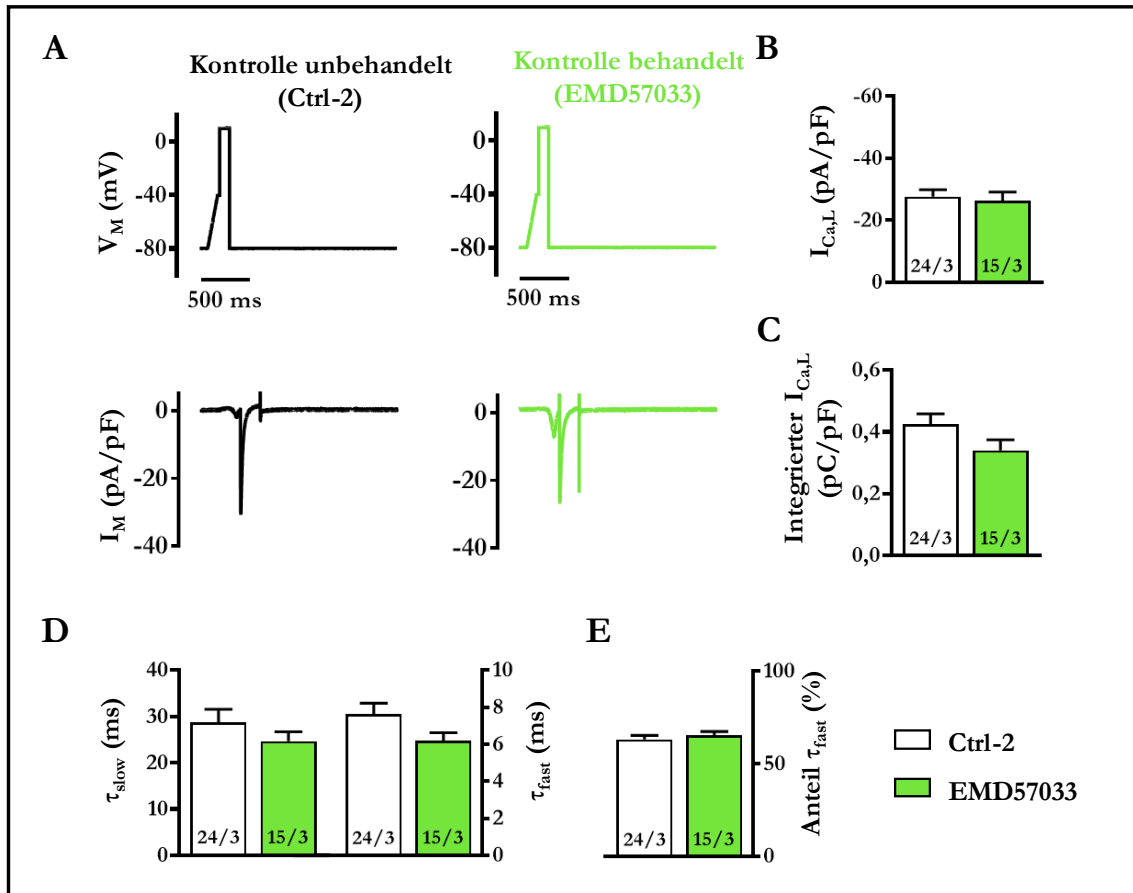


Abbildung 32: L-Typ- Ca^{2+} -Strom der EMD57033 inkubierten iPSC-CM

A: Rampenprotokoll mit repräsentativem L-Typ- Ca^{2+} -Strom ($I_{\text{Ca,L}}$) einer Ctrl-2 iPSC-CM (schwarz) und einer EMD57033 inkubierten iPSC-CM (grün); **B:** Stromdichte des $I_{\text{Ca,L}}$ Peak in pA/pF; **C:** Integrierte Stromdichte des gesamten $I_{\text{Ca,L}}$ über der Zeit in $\text{pA} \cdot \text{ms} / \text{pF} \cong \text{pC} / \text{pF}$; **D,E:** Darstellung der $I_{\text{Ca,L}}$ -Inaktivierung. Dargestellt ist die schnelle und langsame Zeitkonstante (τ_{slow} und τ_{fast} in ms) der angelegten biexponentiellen Funktion, U-Test (**D**) und der prozentuale Anteil der schnellen Inaktivierung an der Gesamtinaktivierung (**E**).

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n/N = Zellen/Charge

3.4.3 Reduzierte Amplitude und langsamerer Decay des $I_{\text{Ca,L}}$ getriggerten CaT unter EMD57033

Zunächst war die diastolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter EMD57033 unverändert. Der systolische Mittelwert zeigte sich jedoch leicht, aber nicht signifikant ($p = 0,077$) erniedrigt. Die CaT-Amplitude war entsprechend unter EMD57033 signifikant reduziert (Abbildung 33 B rechts). Abbildung 33 D zeigt die Zeitkonstante (τ) der an den Transienten angelegten Exponentialfunktion. Sie ist unter erhöhter Ca^{2+} -Sensitivität verlangsamt. Da die Amplitude

des CaT trotz vergleichbar großem $I_{Ca,L}$ erniedrigt ist, ergibt sich eine entsprechend signifikant erniedrigte Kopplungseffizienz (Abbildung 33 E).

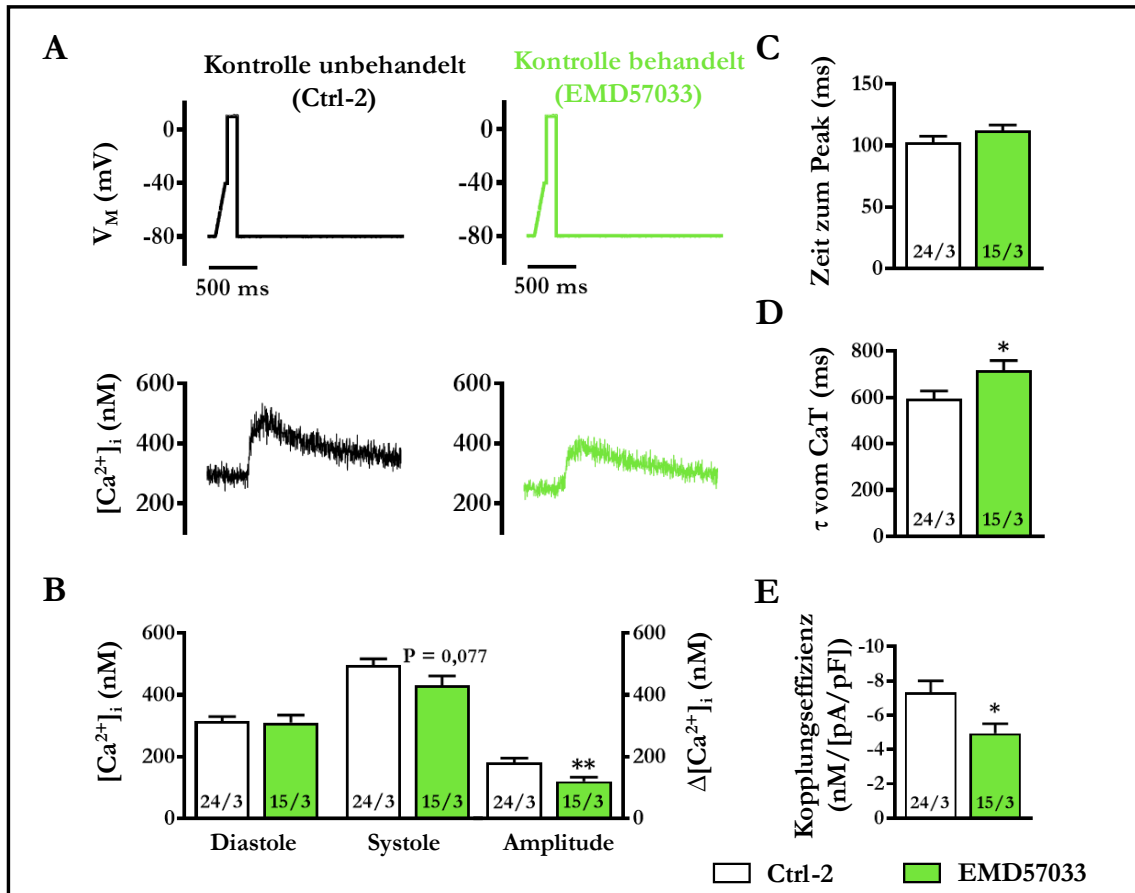


Abbildung 33: CaT der EMD57033 inkubierten iPSC-CM

A: Rampenprotokoll mit repräsentativem CaT einer Kontrollzelle (schwarz) und einer EMD57033 inkubierten iPSC-CM (grün); **B:** Abbildung des diastolischen und systolischen $[Ca^{2+}]_i$ sowie der Differenz beider Werte in nM, U-Test; **C:** Darstellung der Zeit zwischen Erregung durch den Sprung des Rampenprotokolls auf +10 mV und dem maximalen Peak des CaT in ms; **D:** Zeitkonstante der an den Transienten angelegten Exponentialfunktion in ms; **E:** Das Verhältnis aus der CaT-Amplitude und dem Peak des $I_{Ca,L}$ ergibt die Kopplungseffizienz, U-Test.

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n/N = Zellen/Charge; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

3.4.4 Reduzierte cCaT-Amplitude bei vergleichbarer SR Ca^{2+} -Beladung unter EMD57033

Die SR-Beladung unter EMD57033 wurde entsprechend dem Koffeinprotokoll quantifiziert (Abschnitt 2.7.5). Der cCaT zeigte sich unter EMD57033 in der Amplitude stark reduziert (Abbildung 34 C). Der I_{NCX} hingegen war sowohl im Peak als auch im Integral unter EMD57033 unverändert (Abbildung 34 E, F). Es zeigte sich somit eine deutliche Diskrepanz zwischen den beiden Parametern, welche für die Quantifizierung der SR-Beladung

herangezogen werden können.

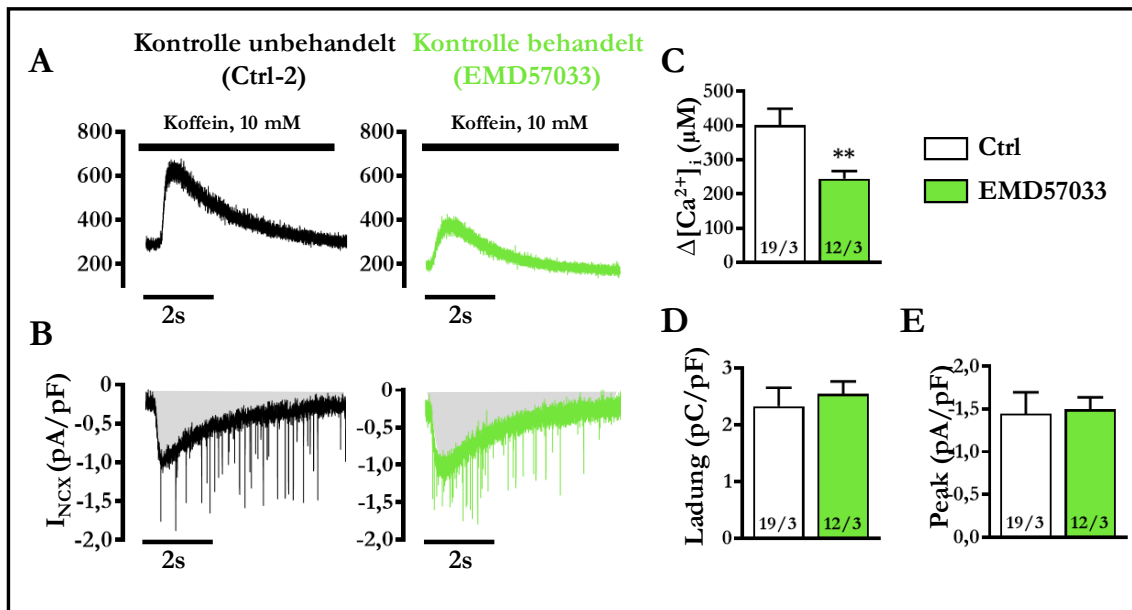


Abbildung 34: cCaT und I_{NCX} der EMD57033 inkubierten Zellen

A: Darstellung eines repräsentativen cCaT einer Kontrollzelle (links, schwarz) und einer EMD57033 inkubierten Zelle (rechts, grün); **B:** Simultane Messung des Ca^{2+} -induzierten Membranstromes (I_{NCX}) mit grau hinterlegtem Integral der Stromkurve, welches ein Maß der Ca^{2+} -Beladung des SR darstellt; **C:** Amplitude des cCaT in nM; **D:** Integral des I_{NCX} , dargestellt als Ladungsdichte in pC/pF; **E:** Peak des I_{NCX} in pA/pF, U-Test. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n/N = Zellen/Charge; * p < 0,05; ** p < 0,01

3.4.5 Erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung unter EMD57033

Durch das Auftragen des integrierten I_{NCX} gegen den cCaT wurde eine Pufferkurve generiert, um die intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung zu quantifizieren. Durch einen vergleichbaren B_{max} konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit EMD57033 die Gesamtpufferkapazität der iPSC-CM nicht veränderte (Abbildung 35 B). Der K_d -Wert war bei den EMD57033 inkubierten Zellen jedoch deutlich erniedrigt (Abbildung 35 C), was eine erhöhte Affinität der Ca^{2+} -Puffer gegenüber Kalzium und somit eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung anzeigt.

3.4.6 Quantifizierung totaler zytosolischer Ca^{2+} -Konzentrationen unter EMD57033

Die Quantifizierung der totalen I_{CaL} getriggerten Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_T$) ergab keinen Unterschied zwischen EMD57033 inkubierten und nicht inkubierten Ctrl-2 iPSC-CM (Abbildung 36 B, C). Entsprechend war die korrigierte Kopplungseffizienz, berechnet aus

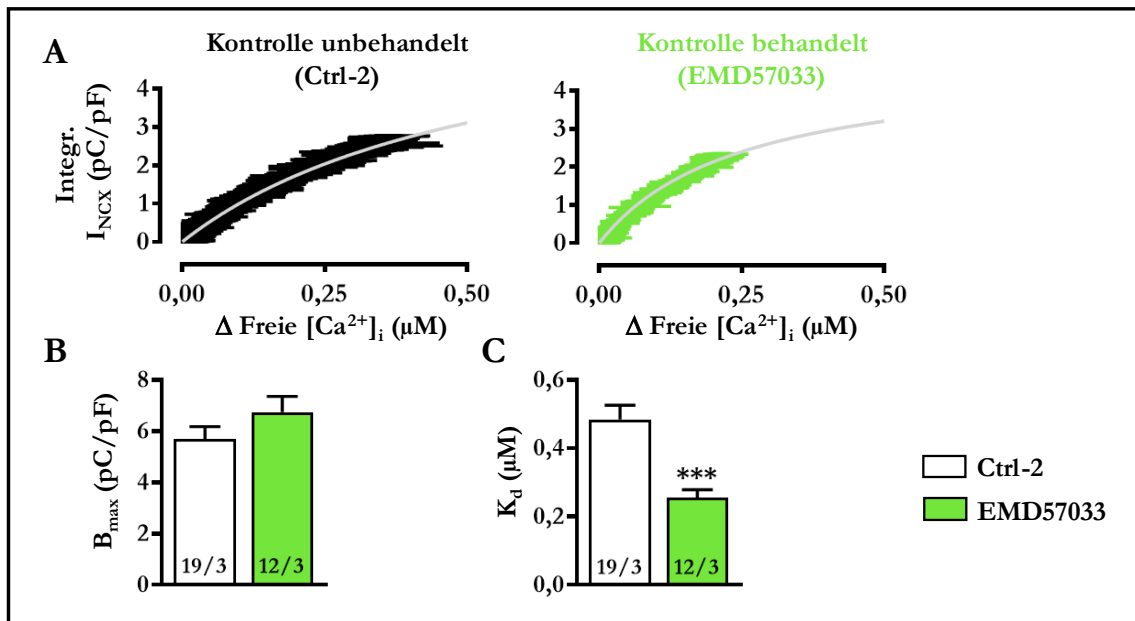


Abbildung 35: Intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung in EMD57033 inkubierten Zellen

A: Darstellung je einer repräsentativen Pufferkurve von einer Kontrollzelle (links, schwarz) und einer EMD57033 inkubierten Zelle (rechts, grün); **B:** Maximale Pufferkapazität (B_{max}); **C:** Affinität der Puffer gegenüber Kalzium (K_d).

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n/N = Zellen/Charge; *** $p < 0,001$

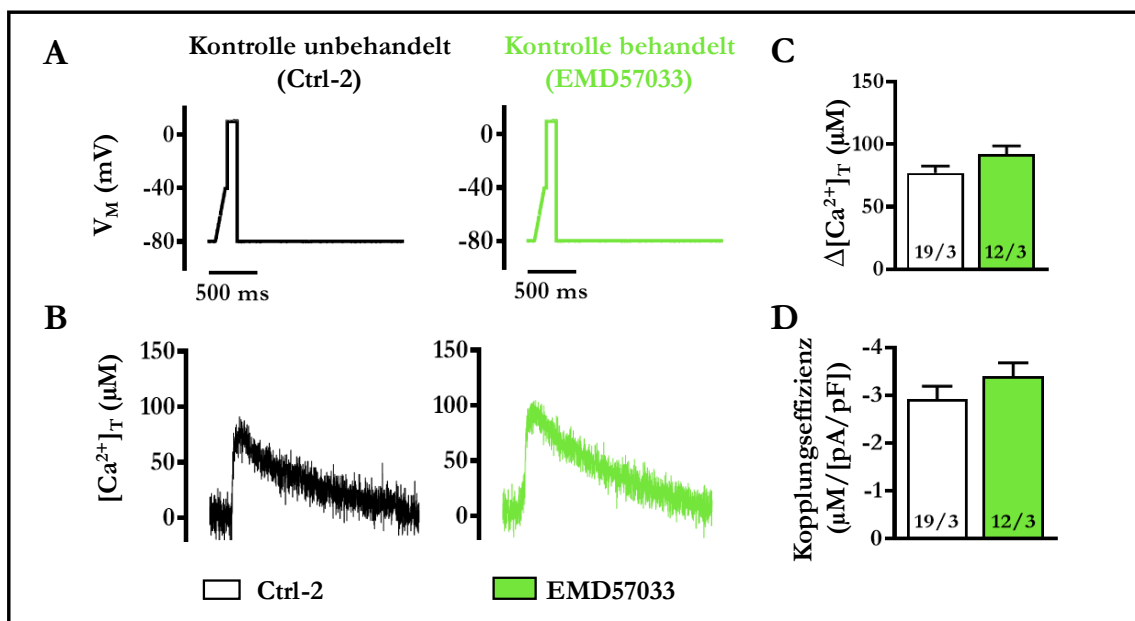


Abbildung 36: Totale CaT in EMD57033 inkubierten iPSC-CM

A: Rampenprotokoll; **B:** Repräsentative totale zytosolische Ca^{2+} -Konzentration während eines $I_{\text{Ca,L}}$ -stimulierten CaT eines Ctrl-2 iPSC-CM (schwarz) und eines EMD57033 inkubierten Ctrl-2 iPSC-CM (grün); **C:** Totale zytosolische Ca^{2+} -Amplitude; **D:** Das Verhältnis aus der totalen CaT-Amplitude und dem Peak des $I_{\text{Ca,L}}$ ergibt die korrigierte Kopplungseffizienz, U-Test.

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n/N = Zellen/Charge.

dem unveränderten $I_{Ca,L}$ -Peak und der unveränderten totalen CaT-Amplitude, nicht verringert (Abbildung 36 D).

3.4.7 Decay-Analyse und Quantifizierung der funktionellen NCX- und SERCA-Aktivität unter EMD57033

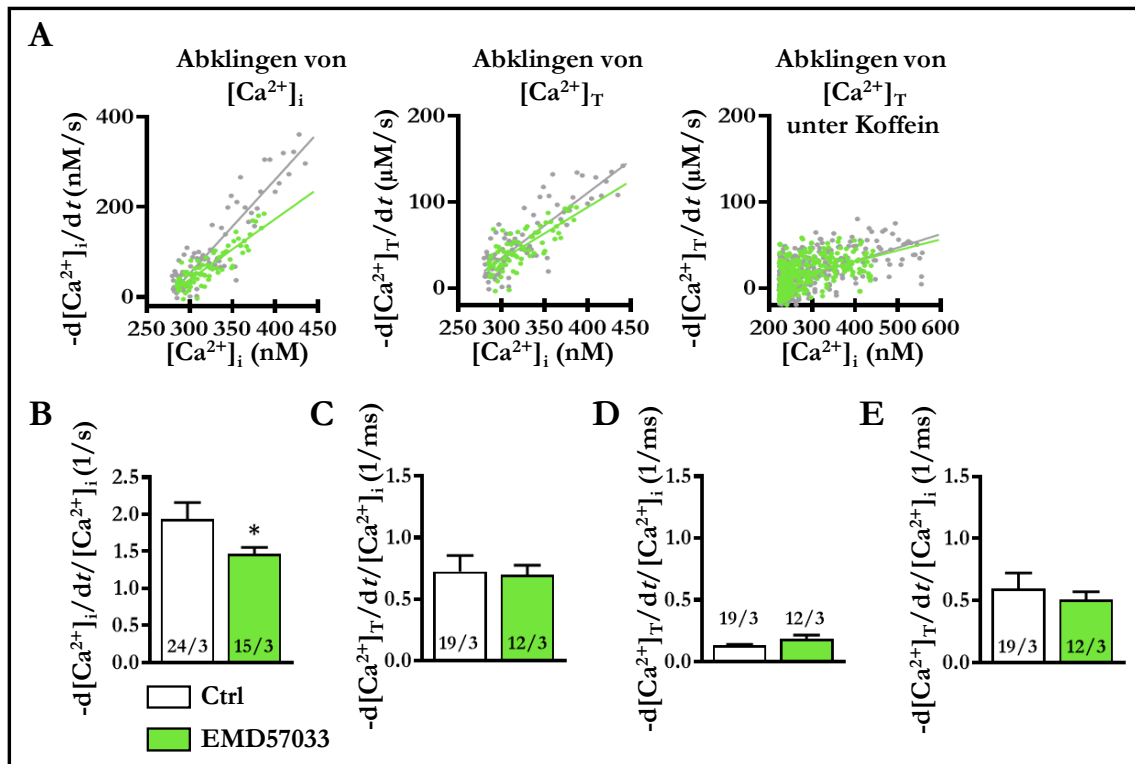


Abbildung 37: Quantifizierung des Decay der freien und totalen CaT und cCaT in EMD57033 inkubierten iPSC-CM

A: Repräsentativer Decay von freiem Ca^{2+} ($-d[Ca^{2+}]_i/dt$), aufgetragen gegen die freie $[Ca^{2+}]_i$ (links), repräsentativer Decay von totalem Ca^{2+} ($d[Ca^{2+}]_T/dt$), aufgetragen gegen die freie $[Ca^{2+}]_i$ (Mitte) und repräsentativer Decay von totalem Ca^{2+} des cCaT, aufgetragen gegen die entsprechende freie $[Ca^{2+}]_i$ (rechts) in Ctrl-2 (grau) und EMD57033 iPSC-CM (grün). Die Steigungen sind als lineare Funktionen dargestellt.

B: Steigung von $-d[Ca^{2+}]_i/dt$, aufgetragen gegen $[Ca^{2+}]_i$, U-Test. **C:** Steigung von $d[Ca^{2+}]_T/dt$, aufgetragen gegen $[Ca^{2+}]_i$, U-Test. **D:** Steigung von $-d[Ca^{2+}]_T/dt$ während Koffein, aufgetragen gegen die entsprechende $[Ca^{2+}]_i$, was die Ca^{2+} -Abhängigkeit des NCX anzeigt, U-Test. **E:** Differenz zwischen C und D, was die Ca^{2+} -Abhängigkeit der SERCA-Aktivität anzeigt, U-Test.

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n/N = Zellen/Charge; * $p < 0,05$

In Abbildung 33 D wurde bereits gezeigt, dass die Zeitkonstante τ vom Decay des CaT bei EMD57033 inkubierten iPSC-CM erhöht ist. Dieses erhöhte τ ist das Korrelat eines verlangsamten Decays, welcher in Abbildung 37 B dargestellt ist. Die erweiterte Decay-Analyse aus Abbildung 37 zeigt, dass der Decay des totalen CaT hingegen nicht verlängert ist (Abbildung 37 C). Diese Diskrepanz lässt sich quantitativ auf die in Abschnitt 3.4.5

gezeigte erhöhte Ca^{2+} -Pufferung zurückführen. Weiterhin lässt sich zeigen, dass die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Abhängigkeit der SERCA- und NCX-Aktivität unter EMD57033 nicht verändert ist (Abbildung 37 D, E)

3.5 Erhöhte Anfälligkeit gegenüber CaT-Alternans unter EMD57033

Es konnte gezeigt werden, dass DCM-cTnT-R173W iPSC-CM eine erhöhte Anfälligkeit für CaT-Alternans besitzen und dass diese Zellen eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung aufweisen. Um zu prüfen, ob die erhöhte Ca^{2+} -Pufferung die Ursache für diese proarrhythmische Basis sein könnte, wurde ein pharmakologisches Modell verwendet, um die zytosolische Ca^{2+} -Pufferung gezielt zu modifizieren. Es wurde gezeigt, dass sich die Behandlung mit EMD57033 eignet, den Ca^{2+} -Handling-Phänotyp von DCM-cTnT-R173W iPSC-CM pharmakologisch zu imitieren. Nun stellte sich die Frage, ob jene mit EMD57033 behandelten Ctrl-2 iPSC-CM ebenfalls eine erhöhte Neigung zu CaT-Alternans zeigen, wenn sie mit dem gleichen Messprotokoll unter Feldstimulation gemessen werden. Tatsächlich konnten sehr ähnliche Ergebnisse wie bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM unter EMD57033 erzielt werden. Es ergab sich ein verlangsamter Decay des CaT (Abbildung 38 B, links), wie er bereits in den Patch-Clamp-Messungen gezeigt werden konnte (Abschnitt 3.4.3) und ein verzögerter Ca^{2+} -Anstieg (Abbildung 38 B, rechts). In den unbehandelten Ctrl-2 iPSC-CM blieben insgesamt 45,5 % der gemessenen Zellen ohne nachweisbare CaT-Alternans, während unter EMD57033 nur 20 % der Zellen bis 5 Hz keinen arrhythmischen Phänotyp zeigten. Die Alternansschwelle war ebenfalls signifikant erniedrigt (Abbildung 38 C) und eine Kaplan-Meier-Analyse für das Auftreten von CaT-Alternans über den gesamten Frequenzbereich zeigte eine signifikant höhere Anfälligkeit gegenüber CaT-Alternans (Abbildung 38 D).

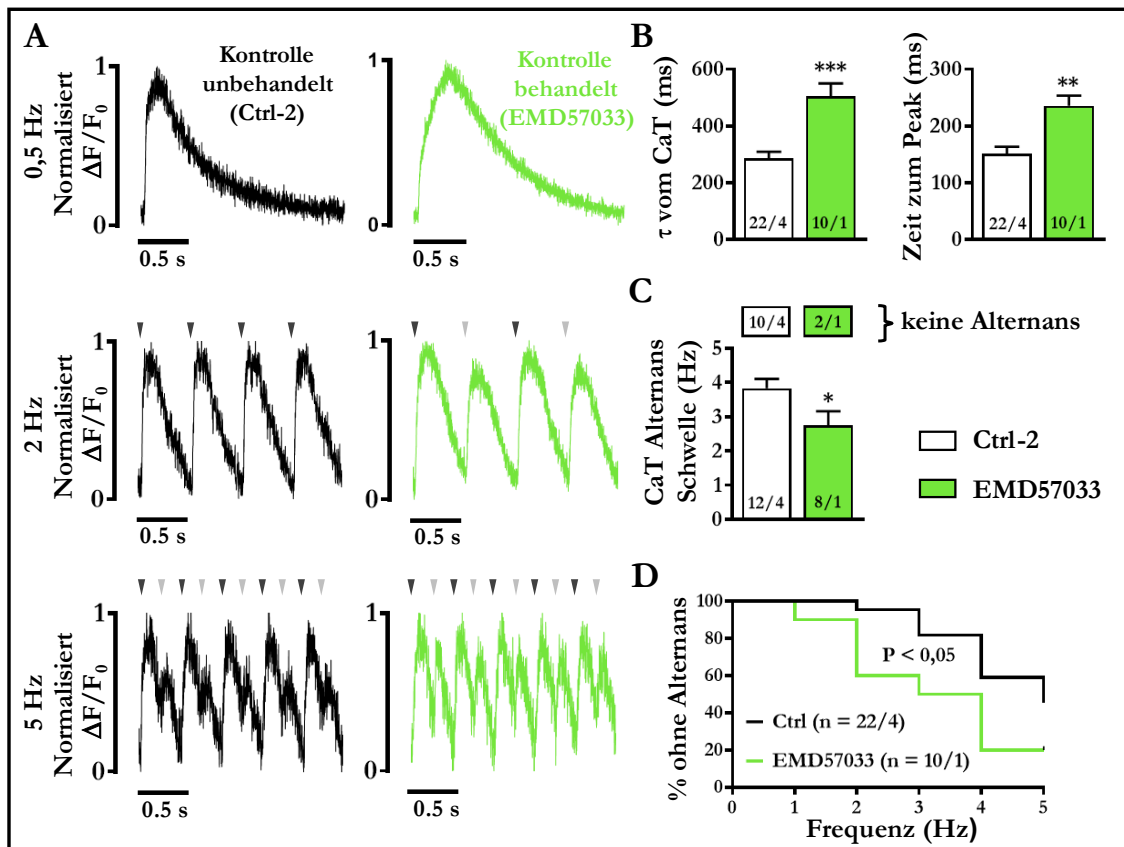


Abbildung 38: Auftreten von CaT-Alternans unter EMD57033

A: Normalisierte repräsentative Messkurven von CaT bei 0,5 Hz, 2 Hz und 5 Hz. Graue Pfeile oberhalb der CaT dienen der Veranschaulichung von Schlag-zu-Schlag-Änderungen. **B:** CaT-Zeitkonstante des Abfalls (links), U-Test und Zeit bis zum Peak (rechts), U-Test. **C:** Niedrigste Frequenz, bei der Alternans auftraten; Zellen ohne Alternans sind in einem Kasten darüber dargestellt. Vergleich durchgeführt mit U-Test. **D:** Prozentualer Anteil der Zellen ohne Alternans in Relation zur jeweiligen Frequenz. Signifikanz bestimmt durch Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test. Alle Werte in B und C sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n/N = Zellen/Charge; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

3.6 Blebbistatin reduziert die Alternans-Anfälligkeit in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung in direktem Zusammenhang mit dem Auftreten von proarrhythmischen CaT-Alternans stehen. Um diese Hypothese zu festigen, wurde die erhöhte Ca^{2+} -Pufferung der DCM-cTnT-R173W iPSC-CM in einem nächsten Schritt pharmakologisch reduziert, um so die Auftretenswahrscheinlichkeit von CaT-Alternans zu mindern. Zu diesem Zweck wurde Blebbistatin verwendet (Abschnitt 2.6.1). Wie in Abbildung 39 B visualisiert, näherte die Behandlung mit Blebbistatin die Zeit des Ca^{2+} -Anstiegs und die Zeitkonstante des Decays an jene der Kontrollzellen an. Darüber hinaus reduzierte Blebbistatin die Anfälligkeit für CaT-Alternans

in DCM-R173W iPSC-CM (Abbildung 39 D) und erhöhte die Schwellenfrequenz, bei der CaT-Alternans erstmals auftreten (Abbildung 39 C). Insgesamt ließ sich die Anzahl der Zellen, die CaT-Alternans zeigten, von 100 % auf 90,9 % und somit nur unwesentlich reduzieren. Bei genauerer Betrachtung des physiologischen Frequenzbereiches zwischen 0,5 Hz und 2 Hz in Abbildung 39 D ist der potenzielle Gewinn jedoch eindeutig zu erkennen.

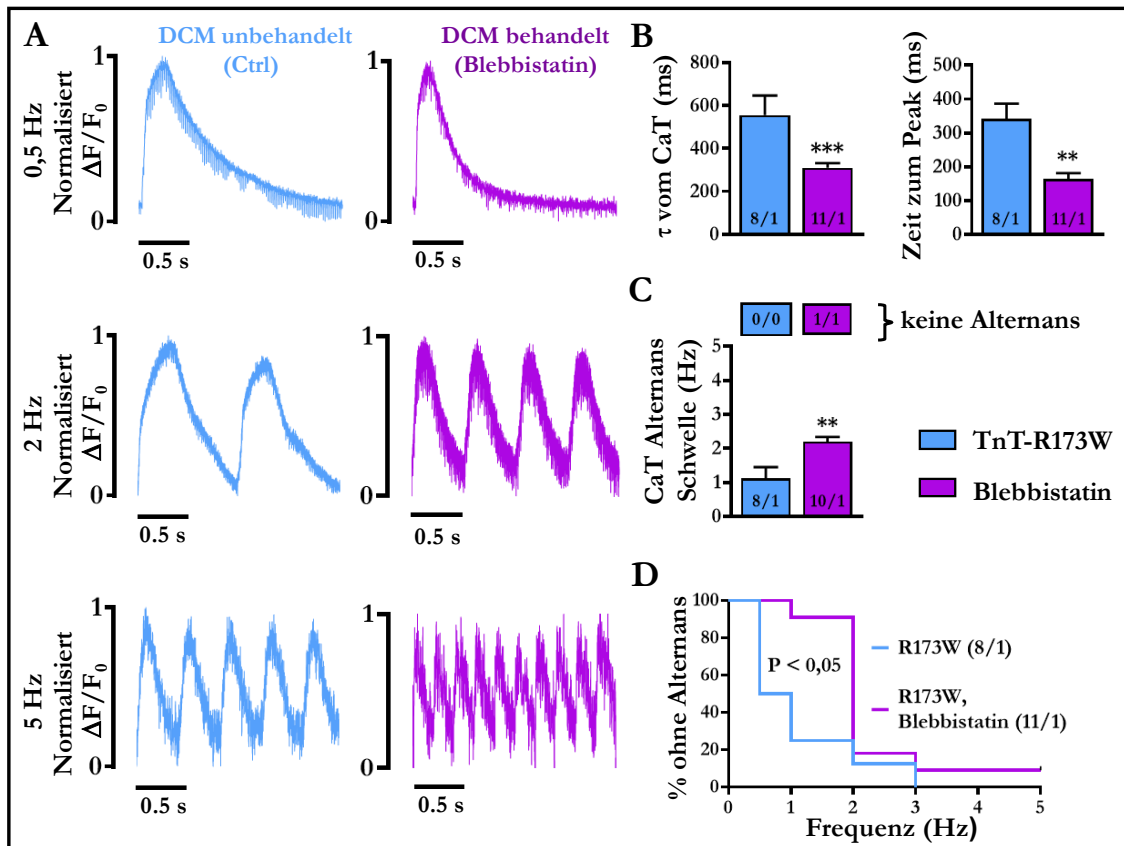


Abbildung 39: Auftreten von CaT-Alternans in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM unter Blebbistatin

A: Normalisierte repräsentative Messkurven von CaT bei 0,5 Hz, 2 Hz und 5 Hz. Graue Pfeile oberhalb der CaT dienen der Veranschaulichung von Schlag-zu-Schlag-Änderungen. **B:** CaT-Zeitkonstante des Abfalls (links), U-Test und Zeit bis zum Peak (rechts), U-Test. **C:** Niedrigste Frequenz, bei der Alternans auftreten; Zellen ohne Alternans sind in einem Kasten darüber dargestellt. Vergleich durchgeführt mit U-Test. **D:** Prozentualer Anteil der Zellen ohne Alternans in Relation zur jeweiligen Frequenz. Signifikanz bestimmt durch Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test. Alle Werte in B und C sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n/N = Zellen/Charge; ** p < 0,01; *** p < 0,001

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden iPSC-CM von Patienten mit DCM-cTnT-R173W-Mutation verwendet, um Anomalien im Ca^{2+} -Handling auf der einen Seite und arrhythmogene Mechanismen auf der anderen Seite zu untersuchen. Feldstimulationsexperimente zeigten eine erhöhte Anfälligkeit von DCM-cTnT-R173W iPSC-CM gegenüber CaT-Alternans. Weiterführende Whole-Cell-Patch-Clamp-Messungen wiesen eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM im Vergleich zu Ctrl-1 iPSC-CM nach. Darüber hinaus konnten diese Ergebnisse mithilfe von EMD57033 behandelten Ctrl-2 iPSC-CM reproduziert werden, was die Vermutung bestätigt, dass die gefundenen Veränderungen im zytosolischen Ca^{2+} -Handling durch eine erhöhte Ca^{2+} -Pufferung ausgelöst wurden. Zudem konnte die erhöhte Anfälligkeit gegenüber CaT-Alternans bei EMD57033 behandelten Zellen reproduziert werden; dieses Ergebnis zeigt auf, dass eine erhöhte Ca^{2+} -Pufferung prädisponierend für CaT-Alternans ist, welche potenziell das Substrat für eine vermehrte Arrhythmogenese bilden. Bemerkenswert ist, dass die Behandlung mit Blebbistatin, einem Myosin-ATPase-Inhibitor, welcher eine verminderte Ca^{2+} -Sensitivität des Myofilaments verursacht, das Auftreten von CaT-Alternans in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM reduzierte und den Phänotyp der CaT normalisierte.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Pufferung einen möglichen intrazellulären Mechanismus für das Auftreten von Arrhythmien darstellt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Modulation der Myofilament- Ca^{2+} -Sensitivität und somit der zytosolischen Ca^{2+} -Pufferung einen potenziellen antiarrhythmischen Ansatz in der Therapie von DCM-Patienten darstellt. Dies gilt insbesondere bei solchen, welche eine Mutation in cTnT aufweisen.

4.1 Mechanismen von Herzrhythmusstörungen bei DCM-Patienten

Patienten mit einer DCM sind generell anfällig für die Entwicklung von Herzrhythmusstörungen. Endorgandysfunktionen in Form einer Herzinsuffizienz oder Arrhythmien mit letalem Verlauf stellen die Haupttodesursachen bei DCM-Patienten dar (Towbin und Lorts 2011). Insgesamt werden ventrikuläre Extrasystolen bei 90 % und nicht-anhaltende ventrikuläre Tachykardien bei 60 % der DCM-Patienten beobachtet. Mono- oder polymorphe ventrikuläre Tachykardien können dabei jederzeit zu einem Kammerflimmern eskalieren und somit einen plötzlichen Herzstillstand provozieren (Kumar et al. 2015). Zur

ätiologischen Einordnung der Arrhythmogenese bei DCM-Patienten wurde bereits eine Vielzahl von potenziellen Mechanismen diskutiert, wobei der genaue Mechanismus gegenwärtig unklar bleibt (Kumar et al. 2015). Angesichts des breiten Spektrums genetischer und nicht-genetischer Faktoren, die zur Pathophysiologie der DCM beitragen, ist die Identifikation eines einzelnen Pathomechanismus, welcher der Arrhythmogenese bei allen DCM-Patienten zugrunde liegt, sehr unwahrscheinlich. Herzklappenerkrankungen, übermäßiger Alkoholkonsum, Bluthochdruck und Infektionskrankheiten sind beispielsweise akzeptierte ätiologische Faktoren, die mit krankheitsspezifischen Umbauprozessen assoziiert sind und so zu einer DCM führen (McNally und Mestroni 2017).

Eine Hypothese beruht auf dem häufigen Befund fibrotisch umgewandelten Myokards in multiplen fleckförmigen Bereichen. Diese Stellen könnten als Ausgangspunkt von Reentry-Mechanismen fungieren und somit zu ventrikulären Tachykardien oder SCD führen (Roberts et al. 1987; McCrohon et al. 2003). Andere Theorien beschäftigen sich mit der abnormen Wanddehnung des Myokards, die alle DCM-Patienten gemein haben. Eine erhöhte Wanddehnung führt zu Veränderungen in der Refraktärität der Myokardzellen und somit zu einem elektrophysiologischen Konstrukt, welches abnorme Herzaktivitäten begünstigt (Brachmann et al. 1997).

Des Weiteren wird angenommen, dass bei etwa 35 % der Patienten mit DCM genetische Faktoren eine signifikante Rolle spielen (Reichart et al. 2019). Dabei zeigt die DCM eine wesentlich heterogenere genetische Basis als beispielsweise die HCM (McNally et al. 2013). Zudem konnte in Studien gezeigt werden, dass Patienten mit nachgewiesener genetischer Belastung in sarkomerischen Proteinen, unter anderem in Troponin T, ein höheres Risiko für schwere klinische Verläufe insbesondere durch Komplikationen wie ventrikuläre Arrhythmien aufweisen (Mogensen et al. 2004; Merlo et al. 2013).

Die meisten Mutationen, welche eine DCM verursachen, befinden sich in Genen, die für zytoskelettale, nukleoskelettale, mitochondriale und Ca^{2+} -Handling Proteine kodieren (McNally und Mestroni 2017). Towbin und Lorts (2011) haben eine Störung in der Verbindung zwischen zytoskelettalen, sarkolemmalen und sarkomerischen Proteinen und die konsekutive Fehlfunktion der Ionenkanäle als den „letzten gemeinsamen Weg“ in der DCM-Arrhythmogenese vorgeschlagen.

Bei vielen DCM-verursachenden Mutationen, unter anderem auch bei der R173W-Mutation in Troponin T, wurde gezeigt, dass diese mehrere Parameter der Ca^{2+} -Homöostase in Herzmuskelzellen beeinflussen, einschließlich einer veränderten Bindung von Kalzium an Myofilamente sowie einer gestörten epigenetischen Regulation und Expression von Ca^{2+} -

Handling-Proteinen (Wu et al. 2015; Landstrom et al. 2017). Daraus folgt, dass ein abnormales Ca^{2+} -Handling auch eine potenzielle Schlüsselrolle in der DCM-bezogenen Arrhythmogenese spielen kann (Thomas et al. 2019).

4.2 Verändertes zytosolisches Ca^{2+} -Handling bei DCM-Patienten

Kalzium ist der Botenstoff, welcher bei der Erregungs-Kontraktions-Kopplung in Kardiomyozyten die direkte Translation einer elektrischen Erregung in eine mechanische Kontraktion bewirkt (Bers 2002). Spezifische Veränderungen im zellulären Ca^{2+} -Handling tragen daher wahrscheinlich zu einer beeinträchtigten kontraktile Funktion bei Patienten mit DCM bei (Sun et al. 2012). Dementsprechend scheint eine verringerte Amplitude der CaT, wie sie auch in dieser Studie gezeigt werden konnte (Abbildung 25), ein gemeinsamer Befund in allen DCM-Modellen zu sein, in denen das zytosolische Ca^{2+} -Handling untersucht wurde (Limas et al. 1987; Sun et al. 2012; Liu et al. 2015; Dai et al. 2020; Stroik et al. 2020). Es wird zu Teilen angenommen, dass die reduzierte CaT-Amplitude aus einer reduzierten SR- Ca^{2+} -Beladung resultiert. Letztere ist möglicherweise auf ein erhöhtes diastolisches Ca^{2+} -Leck aus dem SR zurückzuführen, welches durch undichte RyR2 vermittelt sein könnte (Bellinger et al. 2009; Sun et al. 2012). Eine reduzierte SR- Ca^{2+} -Beladung kann auch aus einer langsameren Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR aufgrund einer verminderten Aktivität der SERCA resultieren (Meyer et al. 1995). An dieser Stelle ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die reduzierte SR- Ca^{2+} -Beladung bei Sun et al. (2012) methodisch mit Hilfe des koffeininduzierten CaT bestimmt wurde, welcher in seiner Amplitude vermindert war. Dabei wurde die cCaT-Amplitude als alleiniges Maß für die Ca^{2+} -Beladung des SR verwendet. Die erniedrigte cCaT-Amplitude konnte in der vorliegenden Studie zwar reproduziert werden (Abbildung 26 C), es wurde jedoch zusätzlich eine Quantifizierung der SR-Beladung von DCM-cTnT-R173W iPSC-CM mittels Patch-Clamp-Experimenten durchgeführt, welche methodisch genauer sind. Diese Technik stellt die gesamte über die Membran transportierte Ladung dar und bildet nicht nur das freie intrazelluläre Kalzium ab. Sie wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals an DCM-cTnT-R173W iPSC-CM durchgeführt, und es konnten interessanterweise keine Veränderungen der SR-Beladung nachgewiesen werden (Abbildung 26 D), wie es zuvor von Sun et al. (2012) publiziert worden war. In der aktuellen Studie wird deshalb ein weiterer zellulärer Mechanismus beschrieben, welcher zu der reduzierten CaT-Amplitude bei DCM-Patienten beitragen könnte, obwohl die SR-Beladung unverändert ist.

4.3 Erhöhte Ca^{2+} -Pufferung als ein möglicher Mechanismus reduzierter CaT

Die beschriebenen Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die reduzierte CaT-Amplitude in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM nicht aus einer verringerten SR-Beladung, sondern aus einer erhöhten Ca^{2+} -Pufferung resultieren könnte, welche auf einer verstärkten Bindungsaffinität von Myofilamenten gegenüber Kalzium basiert (Sun et al. 2012; Eisner et al. 2017). Eine erhöhte Bindungsaffinität würde somit das Verhältnis von gebundenem und freiem Kalzium zu Gunsten des gebundenen Kalziums verschieben, weshalb weniger freies Kalzium im Zytosol vorliegen würde, welches durch Ca^{2+} -sensitive Farbstoffe messbar wäre. Diese Annahme ist mit einer früheren Publikation vereinbar, welche zeigen konnte, dass die DCM-cTnT-R173W-Mutation die Bindung von Proteinkinase A (PKA) an lokale Sarkomer-Mikrodomänen begrenzt und auf diese Weise die Phosphorylierung von TnI abschwächt (Dai et al. 2020). Es wird angenommen, dass der letztere Mechanismus die Ca^{2+} -Affinität von TnC erhöht und die Ca^{2+} -Bindung an Myofilamente entsprechend steigert. Dies würde konsekutiv zu einer verlangsamten Abdissoziation von Kalzium und somit zu einer verlängerten Kontraktion führen (Dai et al. 2020). Diese Überlegung wird durch die Ergebnisse unserer (Abbildung 21 B; Abbildung 25 D; Abbildung 29 B) und früherer Studien (Sun et al. 2012; Wu et al. 2015; Dai et al. 2020) untermauert, welche alle einen verlangsamten Decay des CaT und eine verlängerte Kontraktionszeit zeigen konnten.

Es ist an dieser Stelle wichtig zu beachten, dass trotz einer erhöhten Ca^{2+} -Bindung an Myofilamente in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM die resultierende funktionelle Kontraktionskraft aufgrund der beeinträchtigten Interaktion mit Tropomyosin abgeschwächt ist (Sun et al. 2012; Reda und Chandra 2019; Dai et al. 2020). Ein potenziell relevanter Faktor könnte in dieser Hinsicht eine reduzierte Interaktion zwischen TnT und Tropomyosin darstellen, da die DCM-TnT-R173-Mutation in einer der beiden Tropomyosin-Bindungsregionen von TnT lokalisiert ist (Katrukha 2013). Dies könnte die Freisetzung der Myosin-Bindungsstellen am Aktin beeinträchtigen und folglich die Kontraktion funktionell einschränken. Die Möglichkeit einer Diskrepanz zwischen Veränderungen der "scheinbaren" Ca^{2+} -Affinität kontraktile Proteine und Veränderungen der Ca^{2+} -Bindungsaffinität der Myofilamente wurde bereits einleitend erläutert (Abschnitt 1.2.1.1) und ist somit kein widersprüchlicher Befund.

Die Ausführungen des letzten Absatzes sind darüber hinaus vereinbar mit der rein visuellen und nicht objektivierten Beobachtung im Rahmen dieser Arbeit, dass DCM-cTnT-R173W iPSC-CM eine schlechtere kontraktile Funktion aufwies. Darüber hinaus wurde eine

erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität auch bei pädiatrischen Patienten mit DCM und in einem DCM-Hundemodell gefunden (Wolff et al. 1995; Nakano et al. 2019). Beide Studien konnten die Erhöhung der Ca^{2+} -Sensitivität mittels PKA-Behandlung aufheben, was die Vermutung unterstützt, dass die erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität bei DCM-cTnT-R173W-Mutation auf eine Reduktion der PKA-vermittelten Phosphorylierung von myofibrillären regulatorischen Proteinen zurückzuführen sein könnte.

4.4 Erhöhte Ca^{2+} -Pufferung als Ursache von CaT-Alternans bei DCM

Eine erhöhte Ca^{2+} -Pufferung hat, wie durch die Daten dieser Arbeit deutlich wird, einen großen Einfluss auf das Ca^{2+} -Handling und gängigen Theorien zufolge somit auch auf die Arrhythmogenese (Eisner et al. 2017; Smith und Eisner 2019). Es ist jedoch bisher erstaunlich wenig über die Rolle von abnormalem Ca^{2+} -Handling bei der Arrhythmogenese bei Patienten mit DCM bekannt. Frühere Publikationen haben gezeigt, dass eine erhöhte Inzidenz von spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR während der Diastole zur Arrhythmogenese beitragen kann (Bellinger et al. 2009; Stroik et al. 2020). Das freigesetzte Kalzium wird folglich vom NCX, welcher pro exportiertem Ca^{2+} -Ion drei Na^{+} -Ionen in die Zelle bringt, aus den Myozyten entfernt. Dabei handelt es sich um einen elektrogenen Transportmechanismus, sodass ein depolarisierender Einwärtsstrom entsteht. Wenn dieser Strom groß genug ist, kann er ein neues AP auslösen, welches als ektopische Aktivität Herzrhythmusstörungen auslösen kann (Huke und Knollmann 2010; Voigt et al. 2012; Voigt et al. 2014).

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass Kardiomyozyten von Patienten, die eine DCM-assoziierte Mutation tragen, verstärkt zur Entwicklung von CaT-Alternans neigen (Abbildung 21). Darüber hinaus wird hier erstmals dargelegt, dass DCM-cTnT-R173W iPSC-CM ein abnormes Ca^{2+} -Handling, hauptsächlich bedingt durch eine erhöhte Ca^{2+} -Pufferung, besitzen. Die Beobachtungen des veränderten Ca^{2+} -Handlings sowie der proarrhythmogenen CaT-Alternans konnten durch das Kontrollmodell der mit EMD57033 inkubierten iPSC-CM reproduziert werden, was die Kausalität zwischen erhöhter Ca^{2+} -Pufferung und dem veränderten Ca^{2+} -Handling sowie den CaT-Alternans unterstreicht.

CaT-Alternans werden durch Faktoren begünstigt, welche die SR- Ca^{2+} -Freisetzung erhöhen oder die Ca^{2+} -Entfernung aus dem Zytosol reduzieren. Dabei spielt beispielsweise ein erhöhter SR- Ca^{2+} -Leak bzw. eine reduzierte SERCA-Aktivität eine Rolle (Weiss et al. 2011). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Pufferung die SERCA-vermittelte Ca^{2+} -Wiederaufnahme in das SR reduziert (Díaz et al. 2001; Smith und Eisner

2019). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig einen verlangsamten CaT-Decay in iPSC-CM mit erhöhter Ca²⁺-Pufferung, sowohl in DCM-cTnT-R173W als auch in EMD57033 inkubierten iPSC-CM (Abbildung 21 B; Abbildung 25 D; Abbildung 29 B; Abbildung 33 D; Abbildung 38 B; Abbildung 37 B). Es wird vermutet, dass eine erhöhte Ca²⁺-Pufferung zu einer verlangsamten NCX- und SERCA-vermittelten Ca²⁺-Entfernung aus dem Zytosol beiträgt, da bei reduzierter freier [Ca²⁺]_i weniger Kalzium an NCX und SERCA binden kann, um in das SR oder den Extrazellularraum zurück transportiert zu werden. Die Daten aus Abbildung 29 und Abbildung 30 zeigen zudem, dass die [Ca²⁺]_i-Abhängigkeit von SERCA und NCX in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM unverändert ist, was die erhöhte Ca²⁺-Pufferung als Ursache einer verlangsamten NCX- und SERCA-vermittelten Ca²⁺-Entfernung nahelegt. Die Ergebnisse der EMD57033 inkubierten iPSC-CM bestätigen diese Vermutung (Abbildung 37). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass dabei die SERCA-Aktivität vermutlich aufgrund ihrer exponentiellen [Ca²⁺]_i-Abhängigkeit (Lytton et al. 1992) stärker in ihrer Aktivität beeinflusst ist als der NCX, welcher eher eine lineare [Ca²⁺]_i-Abhängigkeit aufweist (Barceñas-Ruiz et al. 1987; Smith und Eisner 2019). Zudem lässt sich der starke Einfluss der Ca²⁺-Pufferung auf die SERCA-vermittelte Ca²⁺-Entfernung aus dem Zytosol dadurch erklären, dass TnC und SERCA als die größten intrazellulären Ca²⁺-Puffer einen ähnlichen K_d-Wert besitzen, welcher mit ~ 0,6 μmol/l im Bereich physiologischer [Ca²⁺]_i liegt, weshalb folglich TnC und SERCA besonders stark um die Ca²⁺-Bindung konkurrieren. Eine erhöhte Ca²⁺-Bindungsaffinität von TnC bedeutet somit gleichzeitig eine reduzierte Ca²⁺-Bindung an SERCA und dementsprechend einen verlangsamten Rücktransport von Kalzium in das SR. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der SERCA-vermittelte Rücktransport von Kalzium ins SR bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM bedingt durch eine erhöhte Ca²⁺-Pufferung eingeschränkt ist. Interessanterweise konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression der SERCA die Kontraktilität bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM verbesserte und sich der CaT normalisieren ließ (Sun et al. 2012).

Die beschriebenen Veränderungen im Ca²⁺-Handling können gängigen Theorien zufolge das Substrat für die Entwicklung von CaT-Alternans darstellen (Xie et al. 2008; Weiss et al. 2011; Fakuade et al. 2021). Da die in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM beobachteten Veränderungen im Ca²⁺-Handling in gesunden iPSC-CM, die mit dem Ca²⁺-Sensitizer EMD57033 behandelt wurden, reproduziert werden konnten, unterstreicht dies die erhöhte Ca²⁺-Pufferung als Hauptursache für das gestörte Ca²⁺-Handling und die erhöhte Anfälligkeit für Alternans in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM.

4.5 CaT-Alternans als proarrhythmisches Substrat

Es wird vermutet, dass CaT-Alternans zu AP-Alternans führen können, d. h. Schlag-zu-Schlag-Änderungen im zytosolischen CaT werden aufgrund der Interaktion von zytosolischem Kalzium mit Ca^{2+} -abhängigen Ionenkanälen und Transportern, wie dem LTCC und dem NCX, in Alternans auf AP-Ebene übersetzt (Xie et al. 2008; Weiss et al. 2011). AP-Alternans auf zellulärer Ebene können im Gewebe zu räumlich diskordanten elektrischen Veränderungen der Erregbarkeit und zu elektrischer Heterogenität führen, welche ein Substrat für arrhythmogene Aktivitäten darstellt und so beispielsweise Reentry-Tachykardien begünstigt (Narayan et al. 2002; Florea und Blatter 2012). Beachtenswerterweise wurde ein ähnlicher arrhythmogener Mechanismus von Baudenbacher et al. (2008) in Mausmodellen mit cTnT-Mutationen, die mit einer hypertrophen Kardiomyopathie assoziiert sind, postuliert. Die Autoren zeigen, dass sich das Risiko, eine ventrikuläre Tachykardie zu entwickeln, direkt proportional zum Grad der durch die Mutation verursachten Ca^{2+} -Sensibilisierung verhält. Darüber hinaus zeigen in vitro Studien, dass HCM-verursachende Mutationen, welche die Myofilamente für Kalzium sensibilisieren, mit einem hohen Risiko für SCD verbunden sind (Knollmann und Potter 2001; Huke und Knollmann 2010; Fraysse et al. 2012; Schober et al. 2012; Wang et al. 2017). Es gibt zudem Hinweise auf eine erhöhte Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente in ventrikulären Myozyten nach einem Myokardinfarkt und auch von Patienten mit Herzinsuffizienz. Beide Erkrankungen sind mit einer hohen Inzidenz von ventrikulären Tachykardien und SCD verbunden (Wolff et al. 1996; van der Velden et al. 2003; van der Velden et al. 2004).

Die Daten dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal, dass eine erhöhte Ca^{2+} -Pufferung, einhergehend mit einer erhöhten Anfälligkeit für CaT-Alternans, auch in iPSC-CM von DCM-cTnT-R173W-Patienten zu beobachten ist und folglich die erhöhte Inzidenz von Herzrhythmusstörungen erklären könnte. Inwieweit diese Befunde auch für andere Untergruppen von DCM-Patienten gültig sind, bedarf weiterer Untersuchungen.

4.6 Blebbistatin als pharmakologische Leitstruktur antiarrhythmischer Behandlungskonzepte

Blebbistatin gehört zusammen mit Mavacamten zu den einzig bisher bekannten pharmakologischen Substanzen, welche die Ca^{2+} -Sensitivität in Kardiomyozyten reduzieren können. Dabei bindet Blebbistatin an die Zwischenprodukte der Myosin-ATPase (ADP und Phosphat) und verhindert so die Freisetzung des Phosphates. Auf diese Weise wird Myosin II in einem von Aktin losgelösten Zustand blockiert (Kovács et al. 2004). Diese spezifische

Hemmung der Aktin-Myosin-Interaktion, ohne dabei die Ca^{2+} -Homöostase in direkter Weise zu beeinflussen, macht das Pharmakon insbesondere für die medizinische Forschung an Skelett- und Herzmuskulatur interessant (Dou et al. 2007; Swift et al. 2012).

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.6 zeigen erstmalig, dass Blebbistatin auch in der Lage ist, die Auftretenswahrscheinlichkeit von CaT-Alternans in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM vor allem im physiologischen Frequenzbereich deutlich zu verringern. Diese Eigenschaft von Blebbistatin wurde bereits an Mäuseherzen mit einer cTnT-Mutation, die mit HCM assoziiert ist, nachgewiesen (Baudenbacher et al. 2008). Auch andere Publikationen konnten bereits einen antiarrhythmischen Effekt von Blebbistatin dokumentieren. So konnte an isolierten Kaninchenherzen im Langendorff-Modell gezeigt werden, dass während der Perfusion mit Blebbistatin eine deutlich niedrigere Inzidenz anhaltender Arrhythmien nach „Schock-On-T-Induktion“ auftrat (Lou et al. 2012). Blebbistatin scheint demnach nicht nur die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Arrhythmien zu verringern, sondern auch eine Selbsterminierung dieser zu begünstigen. Therapeutisch eingesetzt wird es bisher jedoch nicht, da es durch die Aktin-Myosin-Inhibition die kontraktile Kraft des Herzens massiv reduziert - ein Effekt, der bei Patienten mit eingeschränkter Ejektionsfraktion kontraindiziert wäre. Zudem ist Blebbistatin zytotoxisch, phototoxisch, fluoreszierend, schlecht wasserlöslich und anfällig für lichtabhängigen Zerfall (Kolega 2004; Rauscher et al. 2018). Die vielen photochemischen und fluoreszierenden Eigenschaften machen die genauere Quantifizierung der Ca^{2+} -Homöostase mittels Patch-Clamp-Experimenten sehr kompliziert, weshalb in dieser Arbeit lediglich die Alternans-Anfälligkeit untersucht werden konnte. Die Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Sensitivität und Ca^{2+} -Pufferung wurde mit Hilfe der Literatur vorausgesetzt (Baudenbacher et al. 2008; Schober et al. 2012; Smith und Eisner 2019).

Es werden künftig noch weitere Untersuchungen notwendig sein, um die Verbindung zwischen erhöhter Ca^{2+} -Pufferung und dem Auftreten von Arrhythmien genauer zu charakterisieren, sodass die Entwicklung dezidierter Therapiekonzepte erfolgen kann. Blebbistatin ist dabei für die pharmakologische Erschließung neuartiger antiarrhythmischer Strategien eine wichtige Leitstruktur, wenngleich es derzeit aufgrund der vielen ungünstigen Nebeneffekte keine therapeutische Anwendung findet.

4.7 Erhöhter L-Typ- Ca^{2+} -Strom bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM

In der vorliegenden Studie wurden erstmals Kardiomyozyten abgeleitet aus iPSC von Patienten mit cTnT-R173W-Mutation mittels Whole-Cell-Patch-Clamp-Experimenten im

Voltage-Clamp-Modus untersucht. Dabei lag der Fokus auf Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase und der Arrhythmogenese. Die Basis der Untersuchungen bildete dabei das in Abschnitt 2.7.3 beschriebene Messprotokoll. Durch dieses war es möglich, Zellen so zu stimulieren, dass isoliert der $I_{\text{Ca,L}}$ messbar wurde. In den vorliegenden Daten aus Abschnitt 3.3.2 wird deutlich, dass DCM-cTnT-R173W iPSC-CM einen signifikant größeren $I_{\text{Ca,L}}$ aufweisen. Sowohl Peak als auch Integral sind deutlich erhöht. Diese Beobachtungen belegen, dass bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM mehr Kalzium pro Stimulation in die Zelle einströmt. Weiterführend wurde die biphasische Inaktivierung des $I_{\text{Ca,L}}$ analysiert. Dabei wurde eine unveränderte Zeitkonstante der schnellen Komponente der Inaktivierung beobachtet (Abbildung 23 D), von welcher angenommen wird, dass sie hauptsächlich auf die Ca^{2+} -abhängige $I_{\text{Ca,L}}$ -Inhibition (CDI) zurückzuführen ist (Heijman et al. 2018). Es ist demnach unwahrscheinlich, dass der erhöhte $I_{\text{Ca,L}}$ auf einer verringerten CDI basiert, welche durch eine geringere Verfügbarkeit freiem Kalziums hätte erklärt werden können. Dementsprechend führte eine isoliert erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Pufferung durch die Inkubation mit EMD57033 zwar zu einer ähnlichen Abnahme der CaT-Amplitude, jedoch ohne einen vergleichbaren Einfluss auf den $I_{\text{Ca,L}}$ zu haben. Dies unterstreicht die Schlussfolgerung, dass eine verringerte CDI einen eher unwahrscheinlichen Mechanismus des erhöhten $I_{\text{Ca,L}}$ darstellt. Ob eine erhöhte Ca^{2+} -Pufferung durch EMD57033 längerfristig zu einem erhöhten $I_{\text{Ca,L}}$ führt, kann auf Basis dieser Arbeit nicht abschließend festgestellt werden.

Die Betrachtung dieser Befunde im Gesamtkontext legt daher nahe, dass der erhöhte $I_{\text{Ca,L}}$ nicht primär auf eine erhöhte Ca^{2+} -Pufferung zurückzuführen ist. Ergänzende Daten zeigen zudem eine im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ctrl-1) unveränderte mRNA-Expression der zugrundeliegenden Ca^{2+} -Kanaluntereinheit Cav1.2. Diese Daten wurden durch die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Ebert erhoben und sind in den Ergänzungen von Jung et al. 2022 veröffentlicht worden. Somit sind intrinsische genetische Unterschiede der Expressionsniveaus zwischen DCM-cTnT-R173W und Ctrl-1 iPSC-CM eher unwahrscheinlich. Der LTCC wird generell durch verschiedene posttranskriptionelle und posttranslationale Mechanismen reguliert, einschließlich microRNA-abhängiger Inhibition, Phosphorylierung und Expression akzessorischer Einheiten (Rougier und Abriel 2016; Heijman et al. 2018). Die genannten Mechanismen sind als Ursachen des erhöhten $I_{\text{Ca,L}}$ bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM denkbar und bedürfen einer gesonderten Betrachtung. Zukünftige Studien sind demnach notwendig, um zu untersuchen, ob diese Mechanismen zu $I_{\text{Ca,L}}$ -Veränderungen bei DCM-Patienten im Allgemeinen, aber auch bei solchen mit einer cTnT-R173W-Mutation im Speziellen beitragen.

Interessanterweise konnten bisherige Untersuchungen isolierter Kardiomyozyten von DCM-Patienten zeigen, dass die Verteilung der LTCC in diesen Zellen von den T-Tubuli auf die Zelloberfläche verlagert wurde (Sanchez-Alonso et al. 2020). Es wurde festgestellt, dass die LTCC-Dichte bei DCM-Kardiomyozyten auf dem Zellkamm wesentlich höher ist als jene in den T-Tubuli. Zudem konnte bei der DCM eine erhöhte LTCC-Öffnungswahrscheinlichkeit im Sarkolemm durch eine verstärkte Calcium-Calmodulin-Kinase-II (CaMK-II) vermittelte Phosphorylierung gezeigt werden, welche für frühe Nachdepolarisationen (EAD) prädisponiert. Diese sind bekanntermaßen ein Substrat für ventrikuläre Tachykardien (Fozzard 1992). Die Autoren konnten durch die Hemmung der CaMK-II vermittelten Phosphorylierung von LTCC die Auftretenswahrscheinlichkeit von EADs deutlich reduzieren (Sanchez-Alonso et al. 2016; Sanchez-Alonso et al. 2020). Ob diese Ergebnisse auf das hier verwendete Modell übertragen werden können, ist nicht klar. Studien, die jedoch die Desorganisation der zellulären Struktur bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM zeigen konnten, legen nahe, dass ähnliche Befunde auch in diesem Modell eruiert sein könnten (Sun et al. 2012; Liang et al. 2016; Dai et al. 2020). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine reduzierte Kopplungseffizienz zwischen LTCC und RyR2 bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM, was die Überlegung hin zu defizienten Mikrodomänen stärkt. Die Ergebnisse basieren auf der Relation zwischen dem $I_{Ca,L}$ -Peak und der CaT-Amplitude. Da die CaT-Amplitude bedingt durch eine erhöhte Ca^{2+} -Pufferung reduziert war, wurde die Kopplungseffizienz ebenfalls basierend auf totalen CaT bestimmt. Dabei wurde deutlich, dass diese nur bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM (Abbildung 28 D), nicht aber bei EMD57033 inkubierten iPSC-CM (Abbildung 36 D) reduziert war. Dies lässt den Schluss zu, dass eine erhöhte Ca^{2+} -Pufferung keinen direkten Einfluss auf die Interaktion zwischen LTCC und RyR2 hat. Eine strukturelle Beeinträchtigung, welche beispielsweise aus einer Umverteilung der LTCC resultieren könnte, ist bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM somit eine wahrscheinlichere Erklärung der reduzierten Kopplungseffizienz. Diese gestörte Interaktion zwischen LTCC und RyR2 könnte ebenfalls zu einer reduzierten CaT-Amplitude beitragen, wie sie in dieser Arbeit nachgewiesen wurde. Die weiter oben bereits beschriebenen posttranskriptionellen und posttranslationalen Mechanismen könnten möglicherweise zu einem größeren $I_{Ca,L}$ führen und so die gestörte LTCC-RyR2-Interaktion kompensieren. Inwieweit die Mikrodomänen bei DCM tatsächlich strukturell defizient sind und ob dies ein entscheidender Punkt für ein besseres Verständnis des Pathomechanismus bei DCM ist, kann im Rahmen weiterführender dezidierter Studien untersucht werden.

Im Gesamtbild wird jedoch deutlich, dass posttranskriptionelle und posttranslationale Mechanismen, darunter insbesondere eine erhöhte Phosphorylierung der LTCC, eine

hinreichende Erklärung des erhöhten $I_{Ca,L}$ liefern könnten und zudem bei den Überlegungen zu Mechanismen der Arrhythmogenese und deren pharmakologischer Prävention nicht außer Acht gelassen werden sollten.

Unabhängig der Mechanismen, welche zu einem erhöhten $I_{Ca,L}$ beitragen, stellt sich die Frage, weshalb die SR-Beladung trotz der größeren einströmenden Kalziummenge nicht vergrößert war. Um diese Frage zu klären, muss man die Balance zwischen Ca^{2+} -Einstrom und Ca^{2+} -Ausstrom betrachten, welche entscheidend für die SR-Beladung ist (Negretti et al. 1995; Trafford et al. 1997). Wenn der Ca^{2+} -Einstrom größer dem Ca^{2+} -Ausstrom wäre, so würde man eine stärkere Ca^{2+} -Beladung des SR erwarten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig einen größeren Ca^{2+} -Einstrom über LTCC bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM. Gleichzeitig konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die SR-Beladung unverändert blieb. Dieser vermeintliche Widerspruch lässt sich am ehesten durch eine erhöhte NCX-vermittelte Ca^{2+} -Entfernung aus dem Zytosol erklären. Um dies zu überprüfen, wurde weiterführend die Stromkurve quantifiziert, welche nach jeder Stimulation und somit nach dem $I_{Ca,L}$ bei jeder iPSC-CM messbar wurde (Abbildung 24 A). Diese ist am ehesten auf die NCX-vermittelte Ca^{2+} -Extrusion zurückzuführen. Abbildung 24 B zeigt den integrierten I_{NCX} , aufgetragen gegen den integrierten $I_{Ca,L}$. Das Verhältnis zeigt erneut eine vergleichbare Ca^{2+} -Abhängigkeit der NCX-Aktivität bei DCM-cTnT-R173W iPSC-CM, wie sie bereits in Abschnitt 3.3.7 gezeigt werden konnte. Der höhere Ca^{2+} -Einstrom verursachte einen proportionalen Anstieg des Ca^{2+} -Ausstromes (Abbildung 24 C), was somit die Ca^{2+} -Balance ausgleicht, um den SR- Ca^{2+} -Gehalt unverändert zu halten.

4.8 Limitationen

In der vorliegenden Studie wurden iPSC-CM verwendet, welche von DCM-Patienten einer Familie mit der cTnT-R173W-Mutation gewonnen wurden. Diese wurden mit iPSC-CM gesunder Probanden der gleichen Familie verglichen. Unter diesen Voraussetzungen muss die Frage gestellt werden, ob die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse vollumfänglich auch auf andere DCM-Patienten mit derselben Mutation außerhalb der betrachteten Familie übertragbar sind. Auch ist in diesem Zusammenhang herauszustellen, dass bei dem Vergleich zweier Zelllinien, die nicht demselben Individuum entstammen, neben der betrachteten Mutation immer auch weitere genetische Variationen vorliegen können, welche die Ergebnisse potenziell beeinflussen. Dieses Problem könnte durch die Generierung einer isogenen Zelllinie umgangen werden, in welcher die spezifische krankheitsverursachende Mutation durch Genomeditierung repariert wurde.

Eine weitere zentrale Limitation einer jeden Arbeit mit iPSC-CM ergibt sich aus dessen inhärenten Eigenschaften. Es stellt sich stets die Frage, inwieweit Ergebnisse eines aus iPSC abgeleiteten zweidimensionalen in-vitro-Modells auf adulte Kardiomyozyten übertragbar sind. Auch lassen Ergebnisse in Bezug auf das Ca^{2+} -Handling einzelner Zellen nicht automatisch auf elektrophysiologische Veränderungen auf der Organebene schließen. Das menschliche Herz ist durch seine dreidimensionale Struktur und das Zusammenspiel verschiedener Zell- und Gewebetypen deutlich komplexer, als es das hier verwendete Modell abbilden kann. Zudem repräsentieren iPSC-CM ein unreifes Entwicklungsstadium, selbst wenn sie adulten ventrikulären Kardiomyozyten in vielen Aspekten der zellulären Elektrophysiologie, des Ca^{2+} -Handlings und der kontraktile Funktion stark ähneln (Itzhaki et al. 2011; Hwang et al. 2015; Ebert et al. 2019). iPSC-CM stellen ein leicht verfügbares Modell menschlicher Herzzellen dar, welches bei Bedarf in großen Mengen generiert und modifiziert werden kann. Dies macht sie zu einem unentbehrlichen Modell für die Untersuchung von elektrophysiologischen Anomalien bei Patienten mit vererbten Herzerkrankungen (Burrige et al. 2014; Hnatiuk et al. 2021). Durch die hohe Replizierbarkeit der Zellen lassen sich die experimentellen Bedingungen stark standardisieren und kontrollieren, was zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse beiträgt. Dennoch ist es nicht immer möglich, alle systematischen Fehler der Methodik zu eliminieren. Es ist davon auszugehen, dass einige Faktoren einer gewissen Schwankungsbreite unterliegen. Diese sollen im Folgenden als weitere Limitationen dieser Arbeit diskutiert werden.

4.8.1 Temperatur als Einflussfaktor auf die Ca^{2+} -Homöostase

Die Temperatur stellt einen Parameter dar, welcher intrazelluläre Vorgänge, im Speziellen auch die Öffnungswahrscheinlichkeit von Ionenkanälen, maßgeblich beeinflussen kann. So konnte gezeigt werden, dass durch das experimentelle Abschalten der Perfusionsheizung während eines Messvorgangs zum einen die Stromdichte des $I_{\text{Ca,L}}$ deutlich abnahm, zum anderen die Hemmung der Na^+ -Ionenkanäle nur unvollständig war, sodass parallel zur rampenförmigen Spannungssteigerung ein Einwärtsstrom messbar wurde. Durch anschließendes Wiederanschalten der Perfusionsheizung zeigte sich dieser Effekt fast vollständig reversibel, was beweisend dafür ist, dass die Temperatur der alleinige verantwortliche Faktor der beschriebenen Effekte ist (Abbildung 40). Zudem stellt die Temperatur einen Einfluss dar, welcher bei der Ca^{2+} -Bindung eine entscheidende Rolle spielt. So wird aus Formel 6 deutlich, dass beispielsweise die Dissoziationskonstante (K_d) zur Kalibrierung des CaT temperaturabhängig ist. Die Temperatur ist demnach eine einflussreiche Größe, welche daher auch während der Durchführung aller Experimente

streng überwacht wurde. Dennoch unterliegen Messungen immer auch nicht beeinflussbaren Faktoren, wie jahreszeitenabhängigen Schwankungen, der Raumtemperatur oder Messungenauigkeiten der verwendeten Geräte. Um diese systematischen Fehler dennoch so gering wie möglich zu halten, wurden stets nur Gruppen verglichen, welche zu ähnlichen Zeitpunkten und mit identischen Geräten untersucht wurden.

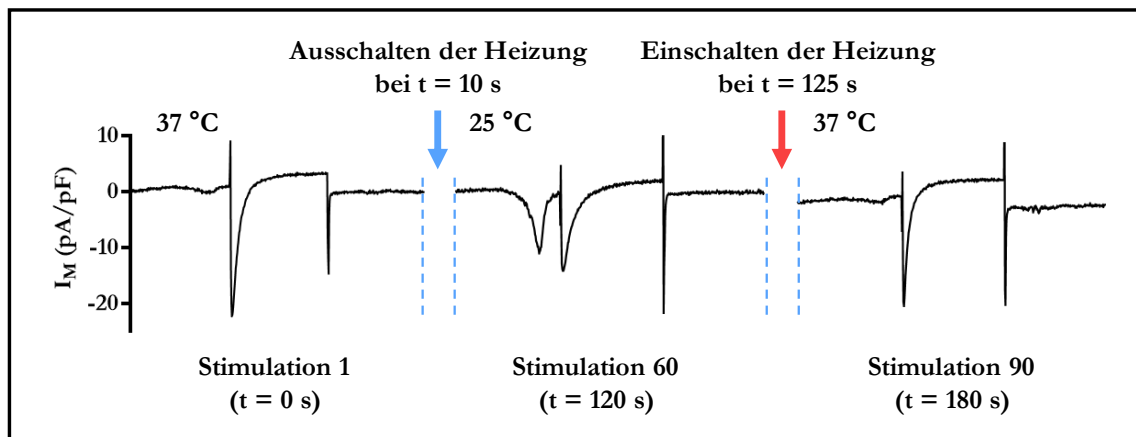


Abbildung 40: Untersuchung des Einflussfaktors Temperatur auf den $I_{Ca,L}$

Dargestellt sind drei Messungen des $I_{Ca,L}$ vor (links), während (Mitte) und nach (rechts) dem Abschalten der Perfusionsheizung einer gemessenen gesunden Kontrollzelle. Die Zelle wurde während der Stimulation durchgehend mit 4-AP Perfusionslösung perfundiert. Lediglich die Heizung dieser Lösung wurde ab- und wieder angeschaltet.

4.8.2 pH-Wert als Einflussfaktor auf die Ca^{2+} -Homöostase

Der pH-Wert ist als Störfaktor ebenfalls relevant, da er einen direkten Einfluss auf die Ca^{2+} -Pufferung haben könnte. Es ist bekannt, dass viele Ca^{2+} -Bindungsstellen unterschiedlicher Proteine des Ca^{2+} -Handlings ebenfalls Protonen an Stelle von Kalzium binden können und somit Ca^{2+} -Ionen und Protonen um die Bindungsstellen konkurrieren (Swietach et al. 2013; Smith und Eisner 2019). Ein niedrigerer pH-Wert würde folglich die Affinität der Ca^{2+} -Bindungsstellen reduzieren, was bereits an Myofibrillen von Hunden gezeigt werden konnte (Blanchard und Solaro 1984). Es wurde ebenfalls beschrieben, dass ein niedriger pH-Wert die NCX-Aktivität hemmt (Boyman et al. 2011). Ein direkter Einfluss des pH-Wertes auf die zytosolische Ca^{2+} -Pufferung konnte zwar nicht nachgewiesen werden (Choi et al. 2000), Smith und Eisner (2019) vermuten aber, dass dies darauf zurückzuführen ist, dass eine Verringerung der Ca^{2+} -Affinität von Puffern mit niedriger Affinität die Verringerung der Ca^{2+} -Affinität von Puffern mit sehr hoher Affinität bezüglich ihres Beitrages zur Gesamtpufferleistung ausgleichen könnte. Demzufolge wäre der Netto-Effekt zwar nicht

messbar, intrazelluläre Veränderungen an den Ca^{2+} -Puffern wären allerdings dennoch vorhanden. So wird beispielsweise auch eine räumliche Ca^{2+} -/ H^+ -Kopplung beschrieben, welche vor allem durch die löslichen Puffersysteme, hauptsächlich ATP und Histidin-Dipeptide, gebildet wird. Diese sind membranungebunden und puffern Ca^{2+} -Ionen und Protonen. Eine Ansäuerung des intrazellulären Milieus führt infolgedessen zu einer Verdrängung von Ca^{2+} -Ionen von den Bindungsstellen und dementsprechend zu einer Ca^{2+} -Freisetzung (Swietach et al. 2013). Da gleichzeitig die NCX-Aktivität verringert ist, steigt die Menge des freien Kalziums in der Zelle an, was zu einer Zunahme der SR- Ca^{2+} -Beladung führt (Choi et al. 2000; Boyman et al. 2011; Swietach et al. 2013). Anhand dieser Beispiele wird deutlich, dass der pH-Wert ein nicht zu vernachlässigender Faktor bei der Untersuchung der Ca^{2+} -Homöostase ist und somit unter Umständen auch einen direkten oder indirekten Einfluss auf die zytosolische Ca^{2+} -Pufferung haben kann. Trotz der exakten Einstellung des pH-Wertes, wie in Abschnitt 2.6 beschrieben, unterliegt er vielen Störgrößen und muss als potenzieller systematischer Fehler bedacht werden.

4.8.3 Fluo-3 und die CaT-Kalibrierung als möglicher Fehler

Wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben wurde in dieser Arbeit Fluo-3 als nicht-ratiometrischer Ca^{2+} -Indikator verwendet. Damit ist Fluo-3 nur über eine korrekt durchgeführte Kalibrierung in der Lage, absolute $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Werte zu liefern (Abschnitt 2.7.4). Jene Kalibrierung ist methodisch jedoch fehleranfällig, da sie nur verwendbar ist, wenn das intrazelluläre Fluo-3 dabei nicht aus der durchstochenen Zellmembran ausgeschwemmt wird und wenn die Glaspipette nicht zu Bruch geht. Daher wurde jeder Moment des jeweiligen Experiments per Kamera überwacht, sodass solche Fehler sofort visuell detektiert und bei der Analyse der Daten entsprechend berücksichtigt werden konnten. Wurde eine Kalibrierung unvollständig oder falsch ausgeführt, so wurden die Daten für die Ergebnisse dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Zusätzlich zur Kalibrierung ist zu beachten, dass Fluo-3 selbst Ca^{2+} -Ionen bindet und dadurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung erhöht. Mit einem K_d von ~ 390 nM bei 22 °C besitzt Fluo-3 allerdings eine vergleichsweise niedrige Affinität zu Kalzium. Zu beachten ist jedoch, dass der K_d -Wert von Fluo-3 sowohl temperatur- als auch pH-abhängig ist, weshalb die durchgängige Konstanz dieser Parameter auch in Bezug auf Fluo-3 eine wichtige Rolle spielt (Paredes et al. 2008). Bei 37 °C beträgt der K_d -Wert 864 nM (Merritt et al. 1990), weshalb dieser zur Kalibrierung in der vorliegenden Arbeit herangezogen wurde. Ausgehend von der Dissoziationskonstante (K_d) von 864 nM und einer geschätzten Pufferkonzentration (B_{max}) von 100 μM ist der Beitrag von Fluo-3 zu den berechneten Pufferkurven als gering

einzuschätzen (Trafford et al. 1999). Durch diese Aspekte und dadurch, dass alle Zellen nach dem gleichen Protokoll mit Fluo-3 beladen wurden, wird davon ausgegangen, dass Fluo-3 keinen Einfluss auf die beobachteten Ergebnisse dieser Studie ausgeübt hat.

Über die bereits beleuchteten Aspekte hinaus ist zu beachten, dass Fluoreszenzfarbstoffe einer Photobleichung unterliegen. Fluo-3 ist im Vergleich zu anderen Ca^{2+} -Indikatoren ein Farbstoff mit mittlerer Bleichrate (Thomas et al. 2000). In den Experimenten dieser Arbeit wurden jedoch keine Beobachtungen in Bezug auf das Phänomen der Photobleichung gemacht. Dies ist auf eine möglichst geringe Intensität des Exzitationslichts und die geringe Dauer der Versuchsprotokolle zurückzuführen.

4.9 Schlussfolgerung und Ausblick

Basierend auf unseren Ergebnissen und angesichts der Tatsache, dass eine erhöhte Affinität der Myofilamente für Kalzium und eine damit einhergehende erhöhte Ca^{2+} -Pufferung zur Entstehung von mitunter schweren Arrhythmien bei verschiedenen Herzerkrankungen beitragen kann, stellt die gezielte Modulation der myofilamentären Ca^{2+} -Sensitivität möglicherweise ein wichtiges zukünftiges Ziel zur Prävention von Herzrhythmusstörungen bei hereditären Kardiomyopathien, aber auch bei anderen strukturellen Herzerkrankungen dar (Baudenbacher et al. 2008; Smith und Eisner 2019).

Schon heute ist die Ca^{2+} -Sensitivität von Myofilamenten ein klassischer therapeutischer Angriffspunkt zur Verbesserung der kontraktile Funktion bei akut dekompensierter Herzinsuffizienz. Levosimendan und Omecamtiv sind bewährte Medikamente, welche darauf abzielen, die kontraktile Funktion durch eine Erhöhung der Ca^{2+} -Bindung an kraftproduzierende Ca^{2+} -Bindungsstellen zu verbessern (Malik et al. 2011; Ponikowski et al. 2016; Papp et al. 2020). Dennoch ist zu beachten, dass Levosimendan nur im Notfall einer akut dekompensierten Herzinsuffizienz eingesetzt wird, da es die Inzidenz von ventrikulären Arrhythmien bei Patienten mit Herzinsuffizienz erhöht (Flevari et al. 2006; Papp et al. 2020).

Blebbistatin ist nachgewiesener Weise in der Lage die Ca^{2+} -Empfindlichkeit der Myofilamente zu reduzieren (Baudenbacher et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass Blebbistatin die Anfälligkeit für CaT-Alternans in Mäuseherzen, welche eine Ca^{2+} -sensitivierende TnT-Mutationen tragen, in vitro reduzieren kann (Baudenbacher et al. 2008). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen ergänzend, dass Blebbistatin dazu in der Lage ist, auch CaT-Alternans in DCM-cTnT-R173W iPSC-CM zu reduzieren. Therapeutisch wird Blebbistatin bisher nicht eingesetzt, da es neben den zytotoxischen Eigenschaften in erster Linie die Aktin-Myosin-Interaktion unterbindet und somit die kardiale Kontraktionskraft

massiv reduziert (Rauscher et al. 2018). Mit Mavacamten ist jedoch erst kürzlich (April 2022) ein Pharmakon mit ähnlicher pharmakologischer Wirkweise zur Therapie der obstruktiven HCM von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) in den USA zugelassen worden (Chin und Day 2022). Diese Substanzklasse könnte als wichtige Leitstruktur für die Entwicklung neuer Verbindungen dienen, welche über eine gezielte Modifikation der intrazellulären Ca^{2+} -Pufferung eine antiarrhythmische Wirkung erzielen.

Insgesamt sind weitere zielgerichtete Untersuchungen im Bereich der zytosolischen Ca^{2+} -Pufferung im Zusammenhang mit der Entstehung von Arrhythmien erforderlich, um ein tiefergehendes Verständnis proarrhythmischer Pathomechanismen zu erhalten. In der Folge könnten sich neue Möglichkeiten im Bereich der pharmakotherapeutischen Behandlungsansätze erschließen, die Patienten mit hereditären Kardiomyopathien vor gefährlichen Herzrhythmusstörungen schützen.

5 Zusammenfassung

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine der häufigsten Kardiomyopathien des Menschen und ist durch eine pathologische Dilatation des linken Ventrikels und eine progrediente Herzinsuffizienz charakterisiert. Die schlechte klinische Prognose ist zu großen Teilen auf die hohe Auftretenswahrscheinlichkeit gefährlicher Arrhythmien zurückzuführen, welche insbesondere bei hereditären Formen der DCM gehäuft auftreten. Vorangegangene Studien konnten bereits zeigen, dass Anomalien im Ca^{2+} -Handling zur Pathogenese der DCM von Patienten beitragen, die eine Punktmutation im kardialen Troponin T (R173W) aufweisen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit das veränderte Ca^{2+} -Handling auch die Grundlage für die klinisch gesteigerte Arrhythmogenese bei diesen Patienten darstellt. In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese entwickelt, dass eine erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Pufferung als unabhängiger Mechanismus in Patienten mit cTnT-R173W-Mutation zu Arrhythmien beitragen könnte.

Um auf zellulärer Ebene elektrophysiologische Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase und mögliche proarrhythmogene Mechanismen zu identifizieren, wurden aus induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleitete Kardiomyozyten (iPSC-CM) eines DCM-Patienten mit R173W-Mutation als Modell gewählt. Als Kontrolle dienten iPSC-CM eines gesunden Familienmitglieds. Zur Quantifizierung der Arrhythmieeigung dienten Epifluoreszenzmessungen (Fluo-3) unter Feldstimulation. Dabei wurden die Ca^{2+} -Transienten (CaT) auf proarrhythmische CaT-Alternans untersucht. Weiterführend wurde das Ca^{2+} -Handling der iPSC-CM mittels Patch-Clamp-Technik in der Whole-Cell-Konfiguration umfassend untersucht. Dabei diente ein Stimulationsprotokoll im Voltage-Clamp Modus zur Messung der Membranströme (L-Typ- Ca^{2+} -Strom) und simultan dazu Epifluoreszenzmessungen der Quantifizierung von CaT. Ferner wurde der Ca^{2+} -Gehalt des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) sowie die Ca^{2+} -Puffereigenschaften der iPSC-CM durch ein Koffeinprotokoll untersucht. Als Positiv-Kontrollmodell dienten gesunde iPSC-CM, welche mit dem Ca^{2+} -Sensitizer EMD57033 behandelt wurden. Abschließend wurden R173W iPSC-CM mit dem Ca^{2+} -Desensitizer Blebbistatin behandelt.

Eine Kaplan-Meier-Analyse des Auftretens von CaT-Alternans ergab eine signifikant höhere Anfälligkeit in iPSC-CM mit R173W-Mutation. Diese zeigten zudem einen erhöhten $I_{\text{Ca,L}}$, während die Amplitude und der Decay der systolischen CaT reduziert waren. Die Amplitude der koffeininduzierten CaT (cCaT) war in der Mutationsgruppe ebenfalls signifikant kleiner,

während der Ca^{2+} -Gehalt des SR, quantifiziert durch das Integral des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschstroms (I_{NCX}), vergleichbar mit der Kontrolle war. Sowohl der reduzierte CaT als auch cCaT, bei unveränderter SR- Ca^{2+} -Beladung, deuten auf eine erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Pufferung in R173W iPSC-CM hin. Dies konnte durch einen verringerten K_d -Wert, einer an die Pufferkurven angelegten hyperbolischen Michaelis-Menten-Funktion, belegt werden. Alle Experimente wurden ebenfalls an gesunden EMD57033 inkubierten iPSC-CM durchgeführt. Es konnten die Ergebnisse des veränderten Ca^{2+} -Handlings und der erhöhten Ca^{2+} -Pufferung reproduziert werden und ebenfalls eine erhöhte Anfälligkeit für CaT-Alternans gezeigt werden. Schließlich konnte die Anwendung des Ca^{2+} -Desensitizers Blebbistatin die Ca^{2+} -Dynamik in R173W iPSC-CM verbessern, die CaT normalisieren und das Auftreten von CaT-Alternans im physiologischen Frequenzbereich minimieren.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Pufferung unabhängig von anderen Faktoren das Auftreten von zellulären CaT-Alternans fördert und so zur Arrhythmogenese bei DCM-Patienten mit einer R173W-Mutation beiträgt.

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass Herzmuskelzellen von Patienten mit einer hereditären Form der dilatativen Kardiomyopathie verstärkt zur Ausbildung proarrhythmogener CaT-Alternans neigen und dass dies vordergründig auf eine erhöhte Ca^{2+} -Pufferung zurückzuführen ist. Bei der Entstehung von CaT-Alternans werden vor allem Faktoren diskutiert, welche die Ca^{2+} -Freisetzung erhöhen oder die Ca^{2+} -Entfernung aus dem Zytosol reduzieren. Ausführliche Decay-Analysen der freien und totalen Ca^{2+} -Transienten ermöglichten es, die Ca^{2+} -Pufferung als alleinigen Faktor der verlangsamten Ca^{2+} -Entfernung aus dem Zytosol zu identifizieren, was nach oben genannter Theorie die Erklärung einer verstärkten Arrhythmie neigung liefern könnte. Ferner konnte diese Arbeit zum ersten Mal zeigen, dass Blebbistatin dazu in der Lage ist, die Auftretenswahrscheinlichkeit von CaT-Alternans in R173W iPSC-CM zu reduzieren. Dieses Ergebnis unterstreicht die kausalen Zusammenhänge zwischen einer gesteigerten Ca^{2+} -Pufferung und dem Auftreten von CaT-Alternans - darüber hinaus beleuchtet es potenzielle pharmakologische Therapieansätze zur Prävention gefährlicher Arrhythmien bei Patienten mit DCM.

Obwohl diese Arbeit neue Erkenntnisse im Bereich der intrazellulären Ca^{2+} -Pufferung bei dilatativer Kardiomyopathie liefert, bedarf es weiterer Untersuchungen, um ein tieferes Verständnis auf dem Gebiet der proarrhythmogenen Pathomechanismen und den hieraus resultierenden pharmakotherapeutischen Implikationen zu erlangen. Auch sollte im Rahmen weiterführender Studien der Frage nachgegangen werden, inwieweit die gewonnenen Erkenntnisse auf andere Untergruppen der dilatativen Kardiomyopathie übertragbar sind.

6 Literaturverzeichnis

- Abilez OJ, Tzatzalos E, Yang H, Zhao MT, Jung G, Zöllner AM, Tiburcy M, Riegler J, Matsa E, Shukla P, et al. (2018): Passive Stretch Induces Structural and Functional Maturation of Engineered Heart Muscle as Predicted by Computational Modeling. *Stem Cells* 36, 265–277
- Adamczak DM, Oko-Sarnowska Z (2018): Sudden Cardiac Death in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Cardiol Rev* 26, 145–151
- Asp ML, Sjaastad FV, Siddiqui JK, Davis JP, Metzger JM (2016): Effects of Modified Parvalbumin EF-Hand Motifs on Cardiac Myocyte Contractile Function. *Biophysical Journal* 110, 2094
- Barcenas-Ruiz L, Beuckelmann DJ, Wier WG (1987): Sodium-calcium exchange in heart: membrane currents and changes in $[Ca^{2+}]_i$. *Science* 238, 1720–1722
- Baudenbacher F, Schober T, Pinto JR, Sidorov VY, Hilliard F, Solaro RJ, Potter JD, Knollmann BC (2008): Myofilament Ca^{2+} sensitization causes susceptibility to cardiac arrhythmia in mice. *J Clin Invest* 118, 3893–3903
- Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, Yasuzawa-Amano S, Trofimova I, Siggins RW, Lecapitaine N, et al. (2007): Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14068–14073
- Bellinger AM, Reiken S, Carlson C, Mongillo M, Liu X, Rothman L, Matecki S, Lacampagne A, Marks AR (2009): Hypernitrosylated ryanodine receptor/calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat Med* 15, 325–330
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, et al. (2003): Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763–776
- Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, et al. (2009): Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science* 324, 98–102
- Bernstein SA, Morley GE (2006): Gap junctions and propagation of the cardiac action potential. *Adv Cardiol* 42, 71–85
- Bers DM: Cardiac Action Potential and Ion Channels. In: Bers DM (Hrsg.): *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force (Developments in Cardiovascular Medicine)*. Springer Netherlands, Dordrecht 2001, 63–100
- Bers DM (2002): Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415, 198–205
- Bers DM (2008): Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Annu Rev Psychol* 70, 23–49
- Biesiadecki BJ, Kobayashi T, Walker JS, Solaro RJ, de Tombe PP (2007): The troponin C G159D mutation blunts myofilament desensitization induced by troponin I Ser23/24 phosphorylation. *Circ Res* 100, 1486–1493
- Blanchard EM, Solaro RJ (1984): Inhibition of the activation and troponin calcium binding of dog cardiac myofibrils by acidic pH. *Circ Res* 55, 382–391

- Blazeski A, Zhu R, Hunter DW, Weinberg SH, Zambidis ET, Tung L (2012): Cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells as models for normal and diseased cardiac electrophysiology and contractility. *Prog Biophys Mol Biol* 110, 166–177
- Bollen IAE, Schuldt M, Harakalova M, Vink A, Asselbergs FW, Pinto JR, Krüger M, Kuster DWD, van der Velden J (2017): Genotype-specific pathogenic effects in human dilated cardiomyopathy. *J Physiol* 595, 4677–4693
- Boyman L, Hagen BM, Giladi M, Hiller R, Lederer WJ, Khananshvili D (2011): Proton-sensing Ca²⁺ binding domains regulate the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* 286, 28811–28820
- Bozkurt B, Colvin M, Cook J, Cooper LT, Deswal A, Fonarow GC, Francis GS, Lenihan D, Lewis EF, McNamara DM, et al. (2016): Current Diagnostic and Treatment Strategies for Specific Dilated Cardiomyopathies: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 134, e579–e646
- Brachmann J, Hilbel T, Grünig E, Benz A, Haass M, Kübler W (1997): Ventricular arrhythmias in dilated cardiomyopathy. *Pacing Clin Electrophysiol* 20, 2714–2718
- Briggs R, King TJ (1952): Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 38, 455–463
- Broughton KM, Li J, Sarmah E, Warren CM, Lin Y-H, Henze MP, Sanchez-Freire V, Solaro RJ, Russell B (2016): A myosin activator improves actin assembly and sarcomere function of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes with a troponin T point mutation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 311, H1107–H1117
- BurrIDGE PW, Keller G, Gold JD, Wu JC (2012): Production of De Novo Cardiomyocytes: Human Pluripotent Stem Cell Differentiation and Direct Reprogramming. *Cell Stem Cell* 10, 16–28
- BurrIDGE PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD, Lan F, Diecke S, Huber B, Mordwinkin NM, et al. (2014): Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods* 11, 855–860
- Cadet JS, Kamp TJ (2017): A Recipe for T-tubules in Human iPS Cell-derived Cardiomyocytes. *Circ Res* 121, 1294–1295
- Campbell N, Sinagra G, Jones KL, Slavov D, Gowan K, Merlo M, Carniel E, Fain PR, Aragona P, Lenarda AD, et al. (2013): Whole Exome Sequencing Identifies a Troponin T Mutation Hot Spot in Familial Dilated Cardiomyopathy. *PLoS One* 8, e78104
- Chin AC, Day SM (2022): Myosin modulators move forward with FDA approval of mavacamten. *Nat Cardiovasc Res* 1, 595–596
- Choi HS, Trafford AW, Orchard CH, Eisner DA (2000): The effect of acidosis on systolic Ca²⁺ and sarcoplasmic reticulum calcium content in isolated rat ventricular myocytes. *J Physiol* 529 Pt 3, 661–668
- Cole KS (1979): Mostly Membranes. *Annu Rev Physiol* 41, 1–23
- Dai Y, Amenov A, Ignatyeva N, Koschinski A, Xu H, Soong PL, Tiburcy M, Linke WA, Zaccolo M, Hasenfuss G, et al. (2020): Troponin destabilization impairs sarcomere-cytoskeleton interactions in iPSC-derived cardiomyocytes from dilated cardiomyopathy patients. *Sci Rep* 10
- Díaz ME, Trafford AW, Eisner DA (2001): The effects of exogenous calcium buffers on the systolic calcium transient in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 80, 1915–1925

- DiFrancesco D (2010): The Role of the Funny Current in Pacemaker Activity. *Circ Res* 106, 434–446
- Dou Y, Arlock P, Arner A (2007): Blebbistatin specifically inhibits actin-myosin interaction in mouse cardiac muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C1148–C1153
- Ebert AD, Diecke S, Chen IY, Wu JC (2015): Reprogramming and transdifferentiation for cardiovascular development and regenerative medicine: where do we stand? *EMBO Mol Med* 7, 1090–1103
- Ebert AD, Joshi AU, Andorf S, Dai Y, Sampathkumar S, Chen H, Li Y, Garg P, Toischer K, Hasenfuss G, et al. (2019): Proteasome-Dependent Regulation of Distinct Metabolic States During Long-Term Culture of Human iPSC-Derived Cardiomyocytes. *Circ Res* 125, 90–103
- Edwards JN, Blatter LA (2014): Cardiac alternans and intracellular calcium cycling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41, 524–532
- Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW (2017): Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ Res* 121, 181–195
- Evans MJ, Kaufman MH (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156
- Fabiato A (1983): Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol Cell Physiol* 245, C1–C14
- Fakuade FE, Steckmeister V, Seibertz F, Gronwald J, Kestel S, Menzel J, Pronto JRD, Taha K, Haghghi F, Kensah G, et al. (2021): Altered atrial cytosolic calcium handling contributes to the development of postoperative atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 117, 1790–1801
- Fawcett DW, McNutt NS (1969): The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle. *J Cell Biol* 42, 1–45
- Fearnley CJ, Roderick HL, Bootman MD (2011): Calcium Signaling in Cardiac Myocytes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a004242
- Flevari P, Parissis JT, Leftheriotis D, Panou F, Kourea K, Kremastinos DT (2006): Effect of levosimendan on ventricular arrhythmias and prognostic autonomic indexes in patients with decompensated advanced heart failure secondary to ischemic or dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 98, 1641–1645
- Florea SM, Blatter LA (2012): Regulation of cardiac alternans by β -adrenergic signaling pathways. *Am J Physiol-Heart Circul Physiol* 303, H1047-1056
- Fozzard HA (1992): Afterdepolarizations and triggered activity. *Basic Res Cardiol* 87 Suppl 2, 105–113
- Fraysse B, Weinberger F, Bardswell SC, Cuello F, Vignier N, Geertz B, Starbatty J, Krämer E, Coirault C, Eschenhagen T, et al. (2012): Increased myofilament Ca²⁺ sensitivity and diastolic dysfunction as early consequences of Mybpc3 mutation in heterozygous knock-in mice. *J Mol Cell Cardiol* 52, 1299–1307
- Ganesh SK, Arnett DK, Assimes TL, Basson CT, Chakravarti A, Ellinor PT, Engler MB, Goldmuntz E, Herrington DM, Hershberger RE, et al. (2013): Genetics and Genomics for the Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease: Update. *Circulation* 128, 2813–2851

- Gattoni S, Røe ÅT, Frisk M, Louch WE, Niederer SA, Smith NP (2016): The calcium-frequency response in the rat ventricular myocyte: an experimental and modelling study. *J Physiol* 594, 4193–4224
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391, 85–100
- Heijman J, Molina CE, Voigt N: Voltage-gated calcium channels and their roles in cardiac electrophysiology. In: Thomas D, Remme CA (Hrsg.): *Channelopathies in Heart Disease (Cardiac and Vascular Biology)*. Springer International Publishing, Cham 2018, 77–96
- Hershberger RE, Morales A: Dilated Cardiomyopathy Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Mirzaa G, Amemiya A (Hrsg.): *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle, Seattle (WA) 2007
- Hershberger RE, Pinto JR, Parks SB, Kushner JD, Li D, Ludwigsen S, Cowan J, Morales A, Parvatiyar MS, Potter JD (2009): Clinical and functional characterization of TNNT2 mutations identified in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2, 306–313
- Hershberger RE, Morales A, Siegfried JD (2010): Clinical and genetic issues in dilated cardiomyopathy: A review for genetics professionals. *Genet Med* 12, 655–667
- Hershberger RE, Hedges DJ, Morales A (2013): Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nat Rev Cardiol* 10, 531–547
- Higgins ER, Cannell MB, Sneyd J (2006): A Buffering SERCA Pump in Models of Calcium Dynamics. *Biophys J* 91, 151–163
- Himmel HM (2013): Drug-induced functional cardiotoxicity screening in stem cell-derived human and mouse cardiomyocytes: effects of reference compounds. *J Pharmacol Toxicol Methods* 68, 97–111
- Hnatiuk AP, Briganti F, Staudt DW, Mercola M (2021): Human iPSC modeling of heart disease for drug development. *Cell Chem Biol* 28, 271–282
- Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, Spinale FG, Francis GS, Prabhu SD, Rockman HA, Kass DA, Molkenin JD, Sussman MA, et al. (2012): Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res* 111, 131–150
- Huke S, Knollmann BC (2010): Increased myofilament Ca²⁺-sensitivity and arrhythmia susceptibility. *J Mol Cell Cardiol* 48, 824–833
- Huxley H, Hanson J (1954): Changes in the Cross-Striations of Muscle during Contraction and Stretch and their Structural Interpretation. *Nature* 173, 973–976
- Hwang HS, Kryshtal DO, Feaster TK, Sánchez-Freire V, Zhang J, Kamp TJ, Hong CC, Wu JC, Knollmann BC (2015): Comparable Calcium Handling Of Human iPSC-derived Cardiomyocytes Generated By Multiple Laboratories. *J Mol Cell Cardiol* 85, 79–88
- Itzhaki I, Rapoport S, Huber I, Mizrahi I, Zwi-Dantsis L, Arbel G, Schiller J, Gepstein L (2011): Calcium handling in human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *PLoS One* 6, e18037
- Jung P, Seibertz F, Fakuade FE, Ignatyeva N, Sampathkumar S, Ritter M, Li H, Mason FE, Ebert A, Voigt N (2022): Increased cytosolic calcium buffering contributes to a cellular

- arrhythmogenic substrate in iPSC-cardiomyocytes from patients with dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 117, 5
- Kao JP, Harootunian AT, Tsien RY (1989): Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J Biol Chem* 264, 8179–8184
- Karakikes I, Ameen M, Termglinchan V, Wu JC (2015): Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: Insights into Molecular, Cellular, and Functional Phenotypes. *Circ Res* 117, 80–88
- Katrukha IA (2013): Human cardiac troponin complex. Structure and functions. *Biochem (Mosc)* 78, 1447–1465
- Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, Dubois NC, Niapour M, Hotta A, Ellis J, Keller G (2011): Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell* 8, 228–240
- Kawai M, Lee JA, Orchard CH (2000): Effects of the Ca²⁺ sensitizer EMD 57033 on intracellular Ca²⁺ in rat ventricular myocytes: relevance to arrhythmogenesis during positive inotropy. *Clin Sci* 99, 547–554
- Kelly SJ (1977): Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *J Exp Zool* 200, 365–376
- Kim C, Wong J, Wen J, Wang S, Wang C, Spiering S, Kan NG, Forcales S, Puri PL, Leone TC, et al. (2013): Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature* 494, 105–110
- Kim D, Kim C-H, Moon J-I, Chung Y-G, Chang M-Y, Han B-S, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim K-S (2009): Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472–476
- Knollmann BC, Potter JD (2001): Altered regulation of cardiac muscle contraction by troponin T mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Trends Cardiovasc Med* 11, 206–212
- Kolega J (2004): Phototoxicity and photoinactivation of blebbistatin in UV and visible light. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 1020–1025
- Kornyejev D, Reyes M, Escobar AL (2010): Luminal Ca(2+) content regulates intracellular Ca(2+) release in subepicardial myocytes of intact beating mouse hearts: effect of exogenous buffers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298, H2138-2153
- Kovács M, Tóth J, Hetényi C, Málnási-Csizmadia A, Sellers JR (2004): Mechanism of Blebbistatin Inhibition of Myosin II. *J Biol Chem* 279, 35557–35563
- Kretsinger RH, Nockolds CE (1973): Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem* 248, 3313–3326
- Kumar S, Stevenson WG, John RM (2015): Arrhythmias in dilated cardiomyopathy. *Card Electrophysiol Clin* 7, 221–233
- Kumar VD, Lee L, Edwards BFP (1990): Refined crystal structure of calcium-liganded carp parvalbumin 4.25 at 1.5-Å resolution. *Biochemistry* 29, 1404–1412
- Kwak SG, Kim JH (2017): Central limit theorem: the cornerstone of modern statistics. *Korean J Anesthesiol* 70, 144–156

- Lakdawala NK, Winterfield JR, Funke BH (2013): Dilated Cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 6, 228–237
- Lan F, Lee AS, Liang P, Sanchez-Freire V, Nguyen PK, Wang L, Han L, Yen M, Wang Y, Sun N, et al. (2013): Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 12, 101–113
- Landstrom AP, Dobrev D, Wehrens XHT (2017): Calcium signaling and cardiac arrhythmias. *Circ Res* 120, 1969–1993
- Lee Y-K, Ng K-M, Lai W-H, Chan Y-C, Lau Y-M, Lian Q, Tse H-F, Siu C-W (2011): Calcium homeostasis in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Rev Rep* 7, 976–986
- Li MX, Hwang PM (2015): Structure and function of cardiac troponin C (TNNC1): Implications for heart failure, cardiomyopathies, and troponin modulating drugs. *Gene* 571, 153–166
- Li S, Chen G, Li RA (2013): Calcium signalling of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Physiol* 591, 5279–5290
- Li Z, Chen P, Li C, Tan L, Xu J, Wang H, Sun Y, Wang Y, Zhao C, Link MS, et al. (2020): Genetic arrhythmias complicating patients with dilated cardiomyopathy. *Heart Rhythm* 17, 305–312
- Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, Hsiao C, Kamp TJ, Palecek SP (2013): Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc* 8, 162–175
- Liang P, Lan F, Lee AS, Gong T, Sanchez-Freire V, Wang Y, Diecke S, Sallam K, Knowles JW, Wang PJ, et al. (2013): Drug Screening Using a Library of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Reveals Disease Specific Patterns of Cardiotoxicity. *Circulation* 127
- Liang P, Sallam K, Wu H, Li Y, Itzhaki I, Garg P, Zhang Y, Vermglinchan V, Lan F, Gu M, et al. (2016): Patient-Specific and Genome-Edited Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Elucidate Single-Cell Phenotype of Brugada Syndrome. *J Am Coll Cardiol* 68, 2086–2096
- Limas CJ, Olivari M-T, Goldenberg IF, Levine TB, Benditt DG, Simon A (1987): Calcium uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum in human dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 21, 601–605
- Liu G-S, Morales A, Vafiadaki E, Lam CK, Cai W-F, Haghghi K, Adly G, Hershberger RE, Kranias EG (2015): A novel human R25C-phospholamban mutation is associated with super-inhibition of calcium cycling and ventricular arrhythmia. *Cardiovasc Res* 107, 164–174
- Lou Q, Li W, Efimov IR (2012): The role of dynamic instability and wavelength in arrhythmia maintenance as revealed by panoramic imaging with blebbistatin vs. 2,3-butanedione monoxime. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302, H262-269
- Lu Q-W, Morimoto S, Harada K, Du C-K, Takahashi-Yanaga F, Miwa Y, Sasaguri T, Ohtsuki I (2003): Cardiac troponin T mutation R141W found in dilated cardiomyopathy stabilizes the troponin T-tropomyosin interaction and causes a Ca²⁺ desensitization. *J Mol Cell Cardiol* 35, 1421–1427

- Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan DH (1992): Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem* 267, 14483–14489
- Ma J, Guo L, Fiene SJ, Anson BD, Thomson JA, Kamp TJ, Kolaja KL, Swanson BJ, January CT (2011): High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H2006–H2017
- Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marbán L, Mendizabal A, Johnston PV, et al. (2012): Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 379, 895–904
- Malik FI, Hartman JJ, Elias KA, Morgan BP, Rodriguez H, Brejc K, Anderson RL, Sueoka SH, Lee KH, Finer JT, et al. (2011): Cardiac myosin activation: a potential therapeutic approach for systolic heart failure. *Science* 331, 1439–1443
- Malkovskiy AV, Ignatyeva N, Dai Y, Hasenfuss G, Rajadas J, Ebert AD (2020): Integrated Ca²⁺ flux and AFM force analysis in human iPSC-derived cardiomyocytes. *Biol Chem* 402, 113–121
- Manning EP, Tardiff JC, Schwartz SD (2011): A model of calcium activation of the cardiac thin filament. *Biochemistry* 50, 7405–7413
- Martin GR (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 7634
- McCrohon JA, Moon JCC, Prasad SK, McKenna WJ, Lorenz CH, Coats AJS, Pennell DJ (2003): Differentiation of heart failure related to dilated cardiomyopathy and coronary artery disease using gadolinium-enhanced cardiovascular magnetic resonance. *Circulation* 108, 54–59
- McNally EM, Mestroni L (2017): Dilated cardiomyopathy: genetic determinants and mechanisms. *Circ Res* 121, 731–748
- McNally EM, Golbus JR, Puckelwartz MJ (2013): Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 123, 19–26
- Merlo M, Sinagra G, Carniel E, Slavov D, Zhu X, Barbati G, Spezzacatene A, Ramani F, Salcedo E, Lenarda AD, et al. (2013): Poor Prognosis of Rare Sarcomeric Gene Variants in Patients with Dilated Cardiomyopathy. *Clin Transl Sci* 6, 424–428
- Merritt JE, McCarthy SA, Davies MP, Moores KE (1990): Use of fluo-3 to measure cytosolic Ca²⁺ in platelets and neutrophils. Loading cells with the dye, calibration of traces, measurements in the presence of plasma, and buffering of cytosolic Ca²⁺. *Biochem J* 269, 513–519
- Messer AE, Marston SB (2014): Investigating the role of uncoupling of troponin I phosphorylation from changes in myofibrillar Ca(2+)-sensitivity in the pathogenesis of cardiomyopathy. *Front Physiol* 5, 315
- Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann, Posival H, Kuwajima G, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G (1995): Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 92, 778–784
- Milos M, Schaer JJ, Comte M, Cox JA (1986): Calcium-proton and calcium-magnesium antagonisms in calmodulin: microcalorimetric and potentiometric analyses. *Biochemistry* 25, 6279–6287

- Mogensen J, Murphy Ross T., Shaw Tony, Bahl Ajay, Redwood Charles, Watkins Hugh, Burke Margaret, Elliott Perry M., McKenna William J. (2004): Severe disease expression of cardiac troponin C and T mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **44**, 2033–2040
- Molleman A: Patch Clamping: An Introductory Guide To Patch Clamp Electrophysiology. 1. Auflage; John Wiley And Sons, Ltd, New York 2002
- Moorman A, Webb S, Brown NA, Lamers W, Anderson RH (2003): Development of the heart: (1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart* **89**, 806–814
- Morad M, Tung L (1982): Ionic events responsible for the cardiac resting and action potential. *Am J Card* **49**, 584–594
- Moretti A, Bellin M, Welling A, Jung CB, Lam JT, Bott-Flügel L, Dorn T, Goedel A, Höhnke C, Hofmann F, et al. (2010): Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *New Engl J Med* **363**, 1397–1409
- Morimoto S, Lu Q-W, Harada K, Takahashi-Yanaga F, Minakami R, Ohta M, Sasaguri T, Ohtsuki I (2002): Ca(2+)-desensitizing effect of a deletion mutation Delta K210 in cardiac troponin T that causes familial dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 913–918
- Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ (1997): Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology. *Cell* **88**, 287–298
- Nakano SJ, Walker JS, Walker LA, Li X, Du Y, Miyamoto SD, Sucharov CC, Garcia AM, Mitchell MB, Ambardekar AV, Stauffer BL (2019): Increased myocyte calcium sensitivity in end-stage pediatric dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **317**, H1221–H1230
- Narayan SM, Bode F, Karasik PL, Franz MR (2002): Alternans of atrial action potentials during atrial flutter as a precursor to atrial fibrillation. *Circulation* **106**, 1968–1973
- Negretti N, Varro A, Eisner DA (1995): Estimate of net calcium fluxes and sarcoplasmic reticulum calcium content during systole in rat ventricular myocytes. *J Physiol* **486**, 581–591
- Neher E (1992): Nobel lecture. Ion channels for communication between and within cells. *Neuron* **8**, 605–612
- Neher E, Sakmann B (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799–802
- Nguyen PK, Rhee J-W, Wu JC (2016): Adult Stem Cell Therapy and Heart Failure, 2000 to 2016: A Systematic Review. *JAMA Cardiol* **1**, 831–841
- Nivala M, Qu Z (2012): Calcium alternans in a couplon network model of ventricular myocytes: role of sarcoplasmic reticulum load. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **303**, H341–352
- Numberger M, Draguhn A: Patch-Clamp-Technik (Labor im Fokus). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1996
- Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S (2008): Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science* **322**, 949–953
- Paige SL, Osugi T, Afanasiev OK, Pabon L, Reinecke H, Murry CE (2010): Endogenous Wnt/beta-catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells. *PLoS One* **5**, e11134

- Papp Z, Agostoni P, Alvarez J, Bettex D, Bouchez S, Brito D, Černý V, Comin-Colet J, Crespo-Leiro MG, Delgado JF, et al. (2020): Levosimendan Efficacy and Safety: 20 years of SIMDAX in Clinical Use. *Card Fail Rev* 6
- Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD (2008): Chemical calcium indicators. *Methods* 46, 143–151
- Park I-H, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ (2008): Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141–146
- Pauls TL, Cox JA, Berchtold MW (1996): The Ca²⁺-binding proteins parvalbumin and oncomodulin and their genes: new structural and functional findings. *Biochim Biophys Acta, Gene Struct Expr* 1306, 39–54
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, et al. (2016): 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 18, 891–975
- Powers FM, Solaro RJ (1995): Caffeine alters cardiac myofilament activity and regulation independently of Ca²⁺ binding to troponin C. *Am J Physiol* 268, C1348-1353
- Rauscher AÁ, Gyimesi M, Kovács M, Málnási-Csizmadia A (2018): Targeting Myosin by Blebbistatin Derivatives: Optimization and Pharmacological Potential. *Trends Biochem Sci* 43, 700–713
- Reda SM, Chandra M (2019): Dilated cardiomyopathy mutation (R174W) in troponin T attenuates the length-mediated increase in cross-bridge recruitment and myofilament Ca²⁺ sensitivity. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 317, H648–H657
- Reichart D, Magnussen C, Zeller T, Blankenberg S (2019): Dilated cardiomyopathy: from epidemiologic to genetic phenotypes: A translational review of current literature. *J Intern Med* 286, 362–372
- Ringer S (1882): Concerning the Influence exerted by each of the Constituents of the Blood on the Contraction of the Ventricle. *J Physiol* 3, 380–393
- Ringer S (1883): A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol* 4, 29–42
- Roberts WC, Siegel RJ, McManus BM (1987): Idiopathic dilated cardiomyopathy: Analysis of 152 necropsy patients. *Am J Cardiol* 60, 1340–1355
- Robinson P, Griffiths, Watkins H, Redwood CS (2007): Dilated and Hypertrophic Cardiomyopathy Mutations in Troponin and α -Tropomyosin Have Opposing Effects on the Calcium Affinity of Cardiac Thin Filaments. *Circ Res* 101, 1266–1273
- Robinson P, Liu X, Sparrow A, Patel S, Zhang Y-H, Casadei B, Watkins H, Redwood C (2018): Hypertrophic cardiomyopathy mutations increase myofilament Ca²⁺ buffering, alter intracellular Ca²⁺ handling, and stimulate Ca²⁺-dependent signaling. *J Biol Chem* 293, 10487–10499
- Robinton DA, Daley GQ (2012): The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481, 295–305

- Rougier J-S, Abriel H (2016): Cardiac voltage-gated calcium channel macromolecular complexes. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Res* 1863, 1806–1812
- Sanchez-Alonso JL, Bhargava A, O'Hara T, Glukhov AV, Schobesberger S, Bhogal N, Sikkell MB, Mansfield C, Korchev YE, Lyon AR, et al. (2016): Microdomain-Specific Modulation of L-Type Calcium Channels Leads to Triggered Ventricular Arrhythmia in Heart Failure. *Circ Res* 119, 944–955
- Sanchez-Alonso JL, Loucks A, Schobesberger S, van Cromvoirt AM, Poulet C, Chowdhury RA, Trayanova N, Gorelik J (2020): Nanoscale regulation of L-type calcium channels differentiates between ischemic and dilated cardiomyopathies. *EBioMedicine* 57, 102845
- Santana LF, Cheng EP, Lederer WJ (2010): How does the shape of the cardiac action potential control calcium signaling and contraction in the heart? *J Mol Cell Cardiol* 49, 901–903
- Schober T, Huke S, Venkataraman R, Gryshchenko O, Kryshtal D, Hwang HS, Baudenbacher F, Knollmann BC (2012): Myofilament Ca sensitization increases cytosolic Ca binding affinity, alters intracellular Ca homeostasis, and causes pause-dependent Ca-triggered arrhythmia. *Circ Res* 111, 170–179
- Schultheiss H-P, Fairweather D, Caforio ALP, Escher F, Hershberger RE, Lipshultz SE, Liu PP, Matsumori A, Mazzanti A, McMurray J, Priori SG (2019): Dilated cardiomyopathy. *Nat Rev Dis Primers* 5, 32
- Seggewiss H, Blank C, Pfeiffer B, Rigopoulos A (2009): Hypertrophic cardiomyopathy as a cause of sudden death. *Herz* 34, 305–314
- Shannon TR, Wang F, Puglisi J, Weber C, Bers DM (2004): A Mathematical Treatment of Integrated Ca Dynamics within the Ventricular Myocyte. *Biophysical Journal* 87, 3351–3371
- Shore S, Grau-Sepulveda MV, Bhatt DL, Heidenreich PA, Eapen ZJ, Hernandez AF, Yancy CW, Fonarow GC (2015): Characteristics, Treatments, and Outcomes of Hospitalized Heart Failure Patients Stratified by Etiologies of Cardiomyopathy. *JACC Heart Fail* 3, 906–916
- Siddiqui JK, Tikunova SB, Walton SD, Liu B, Meyer M, Tombe PP de, Neilson N, Kekenus-Huskey PM, Salhi HE, Janssen PML, et al. (2016): Myofilament Calcium Sensitivity: Consequences of the Effective Concentration of Troponin I. *Front Physiol* 7, 632
- Silverman ME, Grove D, Upshaw CB (2006): Why does the heart beat? The discovery of the electrical system of the heart. *Circulation* 113, 2775–2781
- Smith GL, Eisner DA (2019): Calcium Buffering in the Heart in Health and Disease. *Circulation* 139, 2358–2371
- Solaro R, John, Rarick Helen M. (1998): Troponin and Tropomyosin. *Circ Res* 83, 471–480
- Sommese RF, Nag S, Sutton S, Miller SM, Spudich JA, Ruppel KM (2013): Effects of Troponin T Cardiomyopathy Mutations on the Calcium Sensitivity of the Regulated Thin Filament and the Actomyosin Cross-Bridge Kinetics of Human β -Cardiac Myosin. *PLoS One* 8, e83403
- Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K (2008): Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. *Science* 322, 945–949
- Stroik DR, Ceholski DK, Bidwell PA, Mleczko J, Thanel PF, Kamdar F, Autry JM, Cornea RL, Thomas DD (2020): Viral expression of a SERCA2a-activating PLB mutant improves calcium cycling and synchronicity in dilated cardiomyopathic hiPSC-CMs. *J Mol Cell Cardiol* 138, 59–65

- Sun N, Yazawa M, Liu J, Han L, Sanchez-Freire V, Abilez OJ, Navarrete EG, Hu S, Wang L, Lee A, et al. (2012): Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med* **4**, 130ra47
- Sweeney HL, Houdusse A (2010): Structural and Functional Insights into the Myosin Motor Mechanism. *Annu Rev Biophys* **39**, 539–557
- Swietach P, Youm J-B, Saegusa N, Leem C-H, Spitzer KW, Vaughan-Jones RD (2013): Coupled Ca²⁺/H⁺ transport by cytoplasmic buffers regulates local Ca²⁺ and H⁺ ion signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E2064-2073
- Swift LM, Asfour H, Posnack NG, Arutunyan A, Kay MW, Sarvazyan N (2012): Properties of blebbistatin for cardiac optical mapping and other imaging applications. *Pflugers Arch* **464**, 503–512
- Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T (2001): Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* **11**, 1553–1558
- Takahashi K, Yamanaka S (2006): Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676
- 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**, 861–872
- Tanaka T, Tohyama S, Murata M, Nomura F, Kaneko T, Chen H, Hattori F, Egashira T, Seki T, Ohno Y, et al. (2009): In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **385**, 497–502
- Taylor MRG, Carniel E, Mestroni L (2006): Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet J Rare Dis* **1**, 27
- Ter Keurs HEDJ, Boyden PA (2007): Calcium and Arrhythmogenesis. *Physiol Rev* **87**, 457–506
- Thomas D, Tovey SC, Collins TJ, Bootman MD, Berridge MJ, Lipp P (2000): A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals. *Cell Calcium* **28**, 213–223
- Thomas D, Christ T, Fabritz L, Goette A, Hammwöhner M, Heijman J, Kocksämper J, Linz D, Odening KE, Schweizer PA, et al. (2019): German Cardiac Society Working Group on Cellular Electrophysiology state-of-the-art paper: impact of molecular mechanisms on clinical arrhythmia management. *Clin Res Cardiol* **108**, 577–599
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998): Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147
- Towbin JA, Lorts A (2011): Arrhythmias and dilated cardiomyopathy common pathogenetic pathways? *J Am Coll Cardiol* **57**, 2169–2171
- Trafford AW, Díaz ME, Negretti N, Eisner DA (1997): Enhanced Ca²⁺ current and decreased Ca²⁺ efflux restore sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content after depletion. *Circ Res* **81**, 477–484
- Trafford AW, Díaz ME, Eisner DA (1999): A novel, rapid and reversible method to measure Ca buffering and time-course of total sarcoplasmic reticulum Ca content in cardiac ventricular myocytes. *Pflugers Arch* **437**, 501–503

- van der Velden J, Papp Z, Zaremba R, Boontje NM, de Jong JW, Owen VJ, Burton PBJ, Goldmann P, Jaquet K, Stienen GJM (2003): Increased Ca²⁺-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res* 57, 37–47
- van der Velden J, Merkus D, Klarenbeek BR, James AT, Boontje NM, Dekkers DHW, Stienen GJM, Lamers MJJ, Duncker DJ (2004): Alterations in myofilament function contribute to left ventricular dysfunction in pigs early after myocardial infarction. *Circ Res* 95, e85-95
- Voigt N: Phosphorylierungsabhängige Regulation der einwärtsgerichtenden Kaliumkanäle an Vorhofmyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern. doctor medicinae. Dresden 2006
- Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, Sun Q, Wieland T, Ravens U, Nattel S, et al. (2012): Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 125, 2059–2070
- Voigt N, Heijman J, Wang Q, Chiang DY, Li N, Karck M, Wehrens XHT, Nattel S, Dobrev D (2014): Cellular and molecular mechanisms of atrial arrhythmogenesis in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation* 129, 145–156
- Wang L, Kryshtal DO, Kim K, Parikh S, Cadar AG, Bersell KR, He H, Pinto JR, Knollmann BC (2017): Myofilament Ca-buffering dependent action potential triangulation in human iPSC model of hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 70, 2600–2602
- Wang L, Kim K, Parikh S, Cadar AG, Bersell KR, He H, Pinto JR, Kryshtal DO, Knollmann BC (2018): Hypertrophic cardiomyopathy-linked mutation in Troponin T causes myofibrillar disarray and pro-arrhythmic action potential changes in human iPSC cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 114, 320–327
- Weintraub RG, Semsarian C, Macdonald P (2017): Dilated cardiomyopathy. *Lancet* 390, 400–414
- Weiss JN, Nivala M, Garfinkel A, Qu Z (2011): Alternans and arrhythmias: from cell to heart. *Circ Res* 108, 98–112
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813
- Wolff MR, Whitesell LF, Moss RL (1995): Calcium sensitivity of isometric tension is increased in canine experimental heart failure. *Circ Res* 76, 781–789
- Wolff MR, Buck SH, Stoker SW, Greaser ML, Mentzer RM (1996): Myofibrillar calcium sensitivity of isometric tension is increased in human dilated cardiomyopathies: role of altered beta-adrenergically mediated protein phosphorylation. *J Clin Invest* 98, 167–176
- Wu H, Lee J, Vincent LG, Wang Q, Gu M, Lan F, Churko JM, Sallam KI, Matsa E, Sharma A, et al. (2015): Epigenetic Regulation of Phosphodiesterases 2A and 3A Underlies Compromised β -Adrenergic Signaling in an iPSC Model of Dilated Cardiomyopathy. *Cell Stem Cell* 17, 89–100
- Xie L-H, Sato D, Garfinkel A, Qu Z, Weiss JN (2008): Intracellular Ca alternans: coordinated regulation by sarcoplasmic reticulum release, uptake, and leak. *Biophys J* 95, 3100–3110
- Yamanaka S (2013): The winding road to pluripotency (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 52, 13900–13909
- Yoshida Y, Yamanaka S (2011): iPSC cells: A source of cardiac regeneration. *J Mol Cell Cardiol* 50, 327–332

- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, et al. (2007): Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* 318, 1917–1920
- Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, Thomson JA, Kamp TJ (2009): Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 104, e30-41
- Zhang J, Klos M, Wilson GF, Herman AM, Lian X, Raval KK, Barron MR, Hou L, Soerens AG, Yu J, et al. (2012): Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method. *Circ Res* 111, 1125–1136
- Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, et al. (2009): Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381–384
- Zwi L, Caspi O, Arbel G, Huber I, Gepstein A, Park I-H, Gepstein L (2009): Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Circulation* 120, 1513–1523

Danksagung

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Niels Voigt für das Überlassen dieses Promotionsthemas und die außerordentlich engagierte, freundliche und umfassende Unterstützung. Des Weiteren bedanke ich mich für die Gelegenheit, dieses Projekt sowohl national als auch international präsentieren zu dürfen und nicht zuletzt für die Möglichkeit, die Ergebnisse dieser Arbeit in einer Fachzeitschrift veröffentlichen zu können.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Frau Prof. Dr. Katrin Streckfuß-Bömeke, welche als Ko-Betreuerin durch ihre Expertise wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Auch bedanke ich mich für die intensive Unterstützung bei der Vorbereitung auf die Kongressbeiträge.

Ich danke zudem Frau PD Dr. Antje Ebert und ihrer gesamten Arbeitsgruppe außerordentlich für die zuverlässige Kooperation im Rahmen dieses Projektes sowie für die Vorbereitung und Überlassung der verwendeten Zellen.

Zudem bedanke ich mich beim Promotionskolleg für Medizinstudierende (Jacob-Henle-Programm) der Universitätsmedizin Göttingen für die ideelle und finanzielle Förderung meines Promotionsvorhabens.

Auch gilt mein Dank an dieser Stelle dem Deutschen Zentrum für Herz- und Kreislaufforschung, welche durch ihre Nachwuchsförderung (Young-DZHK) die Reisekosten nach Leipzig und nach San Francisco vollständig übernahmen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Dank an alle Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Niels Voigt richten, welche für jede meiner Fragen und jedes Problem die passende Lösung fanden. Insbesondere die freundliche, kollegiale und stets professionelle Arbeitsatmosphäre im gesamten Team hat maßgeblich zu dem Erfolg dieser Arbeit beigetragen.