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

Zelluläre Elektrophysiologie und Calciumhomöostase an Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen von einem Patienten mit Fallot'scher Tetralogie

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Rebekka Dülk, geb. Härer

aus

Schwäbisch Gmünd

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in	Prof. Dr. med. N. Voigt
Ko-Betreuer/in:	Prof. Dr. med. K. Toischer

Prüfungskommission

Referent/in	Prof. Dr. med. N. Voigt (Betreuer)
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. K. Toischer (Korreferent)
Drittreferent/in:	Prof. Dr. med. R. Dressel (Promotor)

Datum der mündlichen Prüfung: 07. September 2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Zelluläre Elektrophysiologie und Calciumhomöostase an Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen von einem Patienten mit Fallot'scher Tetralogie“ 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:

Dülk R, Voigt N: Calcium handling abnormalities in iPS-cell derived cardiomyocytes from patients with Tetralogy of Fallot (TOF). Vortrag im Rahmen der Göttingen Channels 2017 „of Benches and Beds“, Göttingen, 22. – 23.09.2017 (vgl. Voigt et al. 2018)

Dülk R, Mason FE, Schönhals S, Dobrev D, Zimmermann WH, Rickert-Sperling S, Voigt N (2018): Abnormal cellular electrophysiology and calcium handling in iPSC-CMs from a patient with Tetralogy of Fallot. In: Abstracts of the 84th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT) and the 20th Annual Meeting of the Association of the Clinical Pharmacology Germany (VKliPha) with contribution of the Arbeitsgemeinschaft für Angewandte Humanpharmakologie e. V. (AGAH). Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 391, 69

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis III

Tabellenverzeichnis IV

Abkürzungsverzeichnis V

1 Einleitung 1

1.1 Die Fallot'sche Tetralogie 1

1.2 Zelluläre Elektrophysiologie und Calciumhomöostase 5

1.3 Aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnene Kardiomyozyten 9

1.4 Veränderungen der zellulären Elektrophysiologie und Calciumhomöostase bei Fallot'scher Tetralogie 12

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit 14

2 Material und Methoden 15

2.1 Die Patch-Clamp-Technik 15

2.2 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration und der systolischen Calciumtransienten 21

2.3 Bestimmung der sarkoplasmatischen Calciumkonzentration und Berechnung der SERCA2a-Aktivität 23

2.4 Der Patch-Clamp-Messplatz 24

2.5 Versuchsobjekt 32

2.6 Lösungen und Chemikalien 34

2.7 Durchführung der Messungen zur Calciumhomöostase 37

2.8 Durchführung der Aktionspotential-Messungen 40

2.9 Statistische Auswertung der Daten 42

3 Ergebnisse 44

3.1 Beobachtungen in der Zellkultur 44

3.2 Morphologie der Zellen 45

3.3 Zellgröße 45

3.4 Messungen zur Calciumhomöostase 47

3.5 Aktionspotentialmessungen 62

4 Diskussion 71

4.1 Versuchsobjekt 71

4.2 Beobachtungen in der Zellkultur 74

4.3 Zellgröße 75

4.4 Messungen zur Calciumhomöostase 76

4.5 Aktionspotentialmessungen 84

4.6 Limitationen der vorliegenden Arbeit 91

4.7 Schlussfolgerung 91
4.8 Ausblick 92

5 Zusammenfassung 94

6 Literaturverzeichnis 96

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Fallot'sche Tetralogie. 2
Abbildung 2: Das Aktionspotential des Herzens. 6
Abbildung 3: Die elektromechanische Kopplung des Herzens. 8
Abbildung 4: Generierung von Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen. 9
Abbildung 5: Stammbaum des Patienten mit Fallot'scher Tetralogie (TOF). 12
Abbildung 6: Die verschiedenen Patch-Clamp-Konfigurationen. 17
Abbildung 7: Versuchsaufbau zur Messung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration. 22
Abbildung 8: Berechnung der sarkoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration. 24
Abbildung 9: Das Patch-Clamp-Setup. 25
Abbildung 10: Aufbau der Messkammer. 27
Abbildung 11: Detailaufnahme des Patch-Clamp-Setups. 28
Abbildung 12: Aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnene Kardiomyozyten (iPSC-CMs). 39
Abbildung 13: Messprotokolle. 40
Abbildung 14: Schneller Na^{+}-Strom bei Perforated-Patch-Clamp-Experimenten. 41
Abbildung 15: Ergebnisse des Casytons. 44
Abbildung 16: Morphologie der iPSC-CMs. 45
Abbildung 17: Zellgröße. 46
Abbildung 18: Unterschiedlich dicht ausplattierte Zellen. 47
Abbildung 19: Zeitabhängigkeit in den Ctl-Zellen – Strom-Spannungs-Kurve. 48
Abbildung 20: Zeitabhängigkeit in den Ctl-Zellen – L-Typ-Ca^{2+}-Strom und getriggerte Ca^{2+}-Transienten. 49
Abbildung 21: Unterschiede zwischen Ctl- und TOF-Zellen – Strom-Spannungs-Kurve. 51
Abbildung 22: Unterschiede zwischen Ctl- und TOF-Zellen – L-Typ-Ca^{2+}-Strom und getriggerte Ca^{2+}-Transienten. 52
Abbildung 23: Nifedipinsensitivität der alten Ctl-Zellen (d52 – 66) – Strom-Spannungs-Kurve. 53
Abbildung 24: Nifedipinsensitivität der TOF-Zellen (d30) – Strom-Spannungs-Kurve. 54
Abbildung 25: Nifedipinsensitivität der jungen Ctl-Zellen (d29 – 34) – L-Typ-Ca^{2+}-Strom und getriggerte Ca^{2+}-Transienten. 55
Abbildung 26: Nifedipinsensitivität der alten Ctl-Zellen (d52 – 66) – L-Typ-Ca^{2+}-Strom und getriggerte Ca^{2+}-Transienten. 57
Abbildung 27: Nifedipinsensitivität der TOF-Zellen (d27 – 40) – L-Typ-Ca^{2+}-Strom und getriggerte Ca^{2+}-Transienten. 58
Abbildung 28: Bestimmung der Ca^{2+}-Konzentration des sarkoplasmatischen Retikulums und Berechnung und SERCA2a-Aktivität. 60
Abbildung 29: Zeitabhängigkeit des NCX-Stroms und der SERCA2a-Aktivität in den Ctl-Zellen. 62
Abbildung 30: Vergleich der beiden Methoden zur Aktionspotentialmessung in TOF-iPSC-CMs (d33 – 36). 63
Abbildung 31: Unterschiede zwischen jungen Ctl- und jungen TOF-Zellen (d30 – 42) in den Aktionspotentialen. 65
Abbildung 32: Unterschiede zwischen alten Ctl- und alten TOF-Zellen (d63 – 76) in den Aktionspotentialen. 66
Abbildung 33: Zeitabhängigkeit der Aktionspotentialdauer in den Ctl-Zellen. 68

Abbildung 34: Zeitabhängigkeit der Aktionspotentialdauer in den TOF-Zellen.....69
Abbildung 35: Späte Nachdepolarisationen und spontane elektrische Aktivität in den TOF-Zellen (d33 – 76).....70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Filter und Strahlteiler zur Messung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration.....22
Tabelle 2: Geräteliste.....31
Tabelle 3: Tyrode-Lösung.....34
Tabelle 4: Pipettenlösung.....35
Tabelle 5: 4-Aminopyridin-Lösung.....36
Tabelle 6: Serumfreies Medium.....37

Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4-Aminopyridin
AP	Aktionspotential
APA	Aktionspotentialamplitude
APD	Aktionspotentialdauer
APD_{20}	Aktionspotentialdauer bei 20 % der Repolarisation
APD_{50}	Aktionspotentialdauer bei 50 % der Repolarisation
APD_{90}	Aktionspotentialdauer bei 90 % der Repolarisation
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Calciumkonzentration
CaT	Calciumtransient
CM	*cardiomyocyte* (Kardiomyozyt)
C_M	Membrankapazität
Ctl	*control* (Kontrollgruppe)
d	*day of differentiation* (Tag der Differenzierung)
DAD	*delayed afterdepolarisation* (späte Nachdepolarisation)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAD	*early afterdepolarisation* (frühe Nachdepolarisation)
Fluo-3-AM	Fluo-3-acetomethylester
hESC	*human embryonal stem cell* (humane embryonale Stammzelle)
hESC-CM	*human embryonal stem cell derived cardiomyocyte* (aus humanen embryonalen Stammzellen gewonnener Kardiomyozyt)
$I_{Ca,L}$	L-Typ-Calciumstrom
I_F	Strom über den Rückkopplungswiderstand
I_f	Schrittmacherstrom (f für *funny*)
I_{K1}	einwärtsgleichgerichteter Kaliumstrom
I_{Kr}	schnelle Komponente des verzögert auswärtsgleichgerichteten Kaliumstroms (r für *rapid*)
I_{Ks}	langsame Komponente des verzögert auswärtsgleichgerichteten Kaliumstroms (s für *slow*)
I_M	Membranstrom
I_{Na}	schneller Natriumstrom
I_{NCX}	depolarisierender Einwärtsstrom durch den Natrium-Calcium-Austauscher
I_P	Pipettenstrom (entspricht dem Kompensationsstrom)
iPSC	*induced pluripotent stem cell* (induzierte pluripotente Stammzelle)
iPSC-CM	*induced pluripotent stem cell derived cardiomyocyte* (aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnener Kardiomyozyt)
I_{to}	transienter auswärtsgerichteter Kaliumstrom
IV-Kurve	Strom-Spannungs-Kurve
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
PLN	Phospholamban
PMT	Photomultiplier

RF	Repolarisationsfraktion
R_F	Rückkopplungswiderstand
R_M	Membranwiderstand
RMP	Ruhemembranpotential
R_S	Serienwiderstand
rTOF	*repaired Tetralogy of Fallot* (Fallot'sche Tetralogie nach Korrekturoperation)
RVOTO	*right ventricular outflow tract obstruction* (Obstruktion des rechtsventrikulären Ausflusstraktes)
RyR2	Ryanodinrezeptor (Isoform des Herzens)
SEA	spontane elektrische Aktivität
SERCA2a	*sacroplasmic reticulum calcium ATPase* (Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums, Isoform des Herzens)
SF-Medium	serumfreies Medium
SLN	Sarkolipin
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
U_F	Spannung über dem Rückkopplungswiderstand
U_P	Pipettenspannung (entspricht der Membranspannung)
U_{Soll}	Sollspannung
TOF	*Tetralogy of Fallot* (Fallot'sche Tetralogie)
VSD	Ventrikelseptumdefekt
VT	ventrikuläre Tachykardie

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurden aus induzierten pluripotenten Stammzellen (*induced pluripotent stem cells*, iPSCs) gewonnene Kardiomyozyten (*induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes*, iPSC-CMs) elektrophysiologisch charakterisiert. Auch die Ca^{2+}-Homöostase der Zellen wurde untersucht. Die iPSC-CMs stammten von einem Patient mit Fallot'scher Tetralogie (*Tetralogy of Fallot*, TOF). Als Kontrollgruppe (*control*, Ctl) dienten iPSC-CMs des gesunden Vaters des Patienten.

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Kooperationsprojektes der Arbeitsgruppe Molekulare Pharmakologie von Herrn Prof. Dr. med. N. Voigt mit der Arbeitsgruppe Kardiovaskuläre Genetik von Frau Prof. Dr. med. S. Rickert-Sperling (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Charité, Universitätsmedizin Berlin).

1.1 Die Fallot'sche Tetralogie

1.1.1 Definition

Die Fallot'sche Tetralogie zählt zu den schweren angeborenen Herzfehlern (Hoffman und Kaplan 2002). Erstmals beschrieben wurde sie im Jahr 1571 von N. Stensen (Apitz 1998). Namensgeber war 1888 der französische Pathologe É.-L. A. Fallot (Lahm et al. 2015). Das Hauptmerkmal der Fallot'schen Tetralogie ist eine Verlagerung des Infundibulumseptums nach rechts antero-cephal während der Embryonalentwicklung. Daraus resultieren die vier typischen Defekte (Abbildung 1): Erstens die Obstruktion des rechtsventrikulären Ausflusstraktes (*right ventricular outflow tract obstruction*, RVOTO; Pulmonalstenose) und damit verbunden zweitens die Hypertrophie des rechten Ventrikels. Weitere Merkmale sind drittens ein Ventrikelseptumdefekt (VSD) und viertens eine nach rechts verlagerte, über dem VSD reitende Aorta (Herold 2016). Somit zählt die Fallot'sche Tetralogie zu den sog. konotrunkalen, also die Ausflussbahn der Herzkammern betreffenden, Herzfehlern.

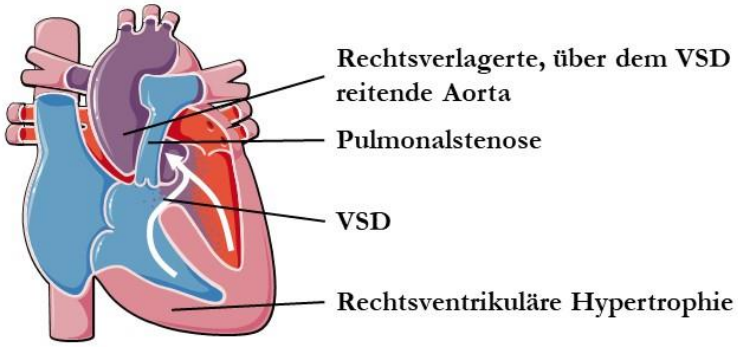

Abbildung 1: Die Fallot'sche Tetralogie.
Die Fallot'sche Tetralogie ist ein aus vier einzelnen Defekten bestehender angeborener Herzfehler. Durch den Ventrikelseptumdefekt (VSD) fließt gemischtes Blut aus rechtem und linkem Ventrikel in die Aorta (weißer Pfeil).
Abbildung modifiziert nach Smart Servier Medical Art: Anatomy and the human body: Cardiovascular system: Heart – pathophysiology. Les Laboratoires Servier, Suresnes; https://smart.servier.com/smart_image/congenital-heart-disease-4/; abgerufen am 18.02.2020. CC BY 3.0.

1.1.2 Epidemiologie

Die epidemiologischen Angaben für angeborener Herzfehler variieren in der Literatur (van der Linde et al. 2011). Allgemein wird die Inzidenz angeborener Herzfehler auf 8/1.000 Lebendgeburten geschätzt (Bernier et al. 2010). In Deutschland beträgt die Gesamtprävalenz angeborener zyanotischer und azyanotischer Herzfehler 1,08 % (Lindinger et al. 2010).

Etwa 10 % aller angeborener Herzfehler gehen auf die Fallot'sche Tetralogie zurück (Herold 2016). Damit ist sie mit einer Prävalenz von 2,7 % der häufigste angeborene zyanotische Herzfehler (Lindinger et al. 2010).

1.1.3 Ätiologie

Über die Ätiologie der meisten Herzfehler ist aufgrund ihrer Komplexität bisher wenig bekannt. Ihre Entstehung ist zumeist multifaktoriell bedingt, d. h. sowohl genetische Ursachen als auch Umwelteinflüsse spielen eine Rolle (Rickert-Sperling et al. 2016). Der Großteil der angeborenen Herzfehler (ca. 80 %) tritt sporadisch auf (Lahm et al. 2015). Etwa 12 % sind auf Chromosomenaberrationen (Trisomien 13, 18 und 21 sowie Deletion 22q11) zurückzuführen (Hartman et al. 2011).

Bei der Fallot'sche Tetralogie findet sich eine genetische Basis. Dies zeigt sich durch ein erhöhtes Wiederholungsrisiko bei Geschwistern bzw. in dokumentierten familiären Fällen (Eldadah et al. 2001). Dennoch treten auch hier die meisten Fälle sporadisch isoliert auf, weshalb die genauen Ursachen der Erkrankung unbekannt sind (Grunert et al. 2014).

Grunert et al. (2014) konnten zeigen, dass die Fallot'sche Tetralogie einen polygenetischen Ursprung hat: Verantwortlich für die Erkrankung in isolierten TOF-Fällen ist eine Kombination einmaliger und seltener Mutationen bestimmter Gene. Diese Gene spielen eine Rolle bei der Apoptose und im Zellwachstum. Des Weiteren sind sie für die Anordnung des Sarkomers in der Neuralleiste und dem sekundären Herzfeld essentiell. Das sekundäre Herzfeld stellt die zelluläre Basis für den rechten Ventrikel und den rechtsventrikulären Ausflusstrakt dar. Die betroffenen Gene bilden ein gemeinsames funktionelles Interaktionsnetzwerk. Störungen in diesem Netzwerk führen zur phänotypischen Ausbildung der Fallot'schen Tetralogie. Alle identifizierten Gene werden während der Herzentwicklung exprimiert. Die meisten davon sind auch im Erwachsenenalter weiter aktiviert. Somit spielen sie sowohl bei der Herzentwicklung als auch im klinischen Verlauf der Erkrankung eine Rolle.

Zusammengefasst kann die Fallot'sche Tetralogie als Ergebnis einer veränderten Proliferation, Migration und Differenzierung von präkardialen Zellen betrachtet werden (Di Felice und Zummo 2009).

1.1.4 Pathophysiologie

Pathophysiologisch entscheidend ist vor allem die Verlagerung des infundibulären Septums und damit die Obstruktion des rechtsventrikulären Ausflusstraktes (Apitz 1998). Aufgrund der RVOTO kann das venöse Blut aus dem rechten Ventrikel nicht in die Lunge fließen. Stattdessen fließt es über den VSD in den linken Ventrikel und damit in den Systemkreislauf (vgl. Abbildung 1 in Abschnitt 1.1.1). Dies führt zur Mehrdurchblutung des Systemkreislaufs im Vergleich zum Lungenkreislauf und zur Zyanose. Die Hyperplasie des rechten Ventrikels ist Folge der Rechtsherzbelastung aufgrund der RVOTO (Blum et al. 2016; Herold 2016).

Die Schwere des Krankheitsbildes ist abhängig vom Ausmaß der RVOTO: Bei geringer Obstruktion überwiegt ein Links-Rechts-Shunt und die Patienten[1] sind nicht oder nur leicht zyanotisch. Bei starker Obstruktion kommt es dagegen zu einem Rechts-Links-Shunt mit ausgeprägter Zyanose (Apitz 1998; Herold 2016).

1.1.5 Klinik

Klinisch zeigt sich die Fallot'sche Tetralogie durch Atemnot, Leistungseinschränkung und lebensbedrohliche hypoxämische Anfälle. Besonders bei Belastung kommt es zu Symptomen. Die hypoxämische Anfälle treten vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern auf. Im Erwachsenenalter werden sie dagegen kaum noch beobachtet (Apitz 1998; Herold 2016).

[1] Wenn im Text allgemein von „Patienten" die Rede ist, beziehen sich die Angaben auf Angehörige aller Geschlechter. Aus Gründen der Lesbarkeit wurde die männliche Form gewählt. Diese ist als geschlechtsneutral zu verstehen.

Ein weiteres typisches klinisches Merkmal im Kindesalter ist die Hockstellung: Betroffene Kinder neigen dazu, in die Hocke zu gehen, was zur Erhöhung des Systemwiderstandes und damit zu einer verbesserten Lungenperfusion und vermehrten Perfusion der oberen Körperhälfte führt. Folglich steigt die Sauerstoffsättigung und die Zyanose wird verringert (Apitz 1998; Herold 2016).

Risiken des Rechts-Links-Shunts liegen in der Entwicklung einer hypoxämischen Hirnschädigung sowie der Entstehung von Hirnembolien und Hirnabszessen. Interessanterweise kommt es dennoch nur zu einer geringen Entwicklungsverzögerung der betroffenen Kinder. Weitere Folgen der Erkrankung sind Polyglobulie, Eisenmangelanämie und Thrombosen. Im Krankheitsverlauf werden ggf. Zeichen der chronischen zentralen Zyanose wie Trommelschlegelfinger und Uhrglasnägel sichtbar (Apitz 1998; Blum et al. 2016; Herold 2016).

1.1.6 Therapie

Die Therapie der Fallot'schen Tetralogie besteht in der operativen Primärkorrektur, welche meist im Alter von sechs bis achtzehn Monaten durchgeführt wird. Der genaue Operationszeitpunkt ist abhängig von der Sauerstoffsättigung und dem Auftreten hypoxämischer Krisen. Ziele der Operation sind die Herstellung normaler Flussverhältnisse, die Verringerung der Zyanose, die Verbesserung der Belastbarkeit des Patienten sowie eine Reduktion der Folgen des Herzfehlers. Dies wird durch Beseitigung der RVOTO erreicht, z. B. durch eine Pulmonalklappenvalvulotomie und/oder Resektion der hypertrophierten infundibulären Muskulatur. Außerdem wird der VSD mit einen Patch verschlossen. Falls notwendig wird vor der endgültigen Korrekturoperation eine Anastomosenoperation (z. B. Blalock-Taussig-Anastomose) durchgeführt, um die Lungendurchblutung zu verbessern (Apitz 1998; Blum et al. 2016; Herold 2016).

1.1.7 Verlauf und Prognose

Allgemein lässt sich sagen, dass der Verlauf der Erkrankung vom Zeitpunkt der Operation, von der Funktion der Pulmonalklappe und vom Druck im rechtsventrikulären Ausflusstrakt abhängt (Blum et al. 2016).

Heutzutage ist die Langzeitprognose nach operativer Korrektur der Fallot'schen Tetralogie sehr gut: Nach 30 Jahren beträgt die Überlebensrate ca. 90 % (Dennis et al. 2017; Hickey et al. 2009; Nollert et al. 1997). Nach 40 Jahren liegt sie noch bei 72 % (Cuypers et al. 2014). Damit ist die Lebenserwartung dennoch geringer als in der Normalbevölkerung (Apitz et al. 2009; Dennis et al. 2017). Die häufigsten Todesursachen stellen Herzversagen und plötzlicher Herztod dar (Cuypers et al. 2014; Dennis et al. 2017; Gatzoulis et al. 2000; Nollert et al. 1997).

Trotz guter Langzeitprognose ist die Morbidität bei TOF-Patienten erheblich: Bei etwa 50 – 60 % sind Reinterventionen erforderlich, vor allem ein Ersatz der Pulmonalklappe

aufgrund von Pulmonalklappeninsuffizienz (Cuypers et al. 2014; Dennis et al. 2017; Hickey et al. 2009). Ferner tritt im Langzeitverlauf oft eine Verschlechterung der rechts- und linksventrikulären Funktion ein (Bouzas et al. 2005; Broberg et al. 2011; Cuypers et al. 2014).

Eine weitere häufige Spätkomplikation besteht in der Ausbildung von Herzrhythmusstörungen (Gatzoulis et al. 2000). Die genaue Prävalenz und die Art der Arrhythmien variiert in der Literatur. Herzrhythmusstörungen können sowohl ventrikulären als auch supraventrikulären Ursprungs sein (Cuypers et al. 2014; Loomba et al. 2017). Etwa ein Viertel der TOF-Patienten entwickelt atriale Arrhythmien, v. a. Vorhofflimmern, Vorhofflattern und intraatriale Reentry-Tachykardien (Dennis et al. 2017; Khairy et al. 2010; Roos-Hesselink et al. 1995). Bei ca. 7 – 15 % der TOF-Patienten kommt es zur Ausbildung ventrikulärer Arrhythmien, meist ventrikulärer Tachykardien (VT) (Dennis et al. 2017; Khairy et al. 2010). Etwa 0,5 – 6 % der Patienten nach Korrekturoperation versterben am plötzlichen Herztod aufgrund dieser VTs (Di Felice und Zummo 2009). Als weitere mögliche Herzrhythmusstörung können AV-Blöcke II° auftreten (Loomba et al. 2017).

Die Ursachen für die Entwicklung solcher Arrhythmien sind noch nicht vollständig geklärt. OP-Narben und die Fibrosierung des Myokards sowie eine rechtventrikuläre Dilatation werden als arrhythmogene Substrate diskutiert (Blum et al. 2016; Bouzas et al. 2005; Dubes et al. 2018). Ebenso könnten Veränderungen des L-Typ-Ca^{2+}-Stroms ($I_{Ca,L}$) an der Arrhythmogenese in TOF-Patienten beteiligt sein (Pelzmann et al. 1998). Aber auch weitere, genetisch determinierte Ursachen scheinen eine Rolle zu spielen (Charron et al. 2015).

1.2 Zelluläre Elektrophysiologie und Calciumhomöostase

Die folgenden Ausführungen zur Elektrophysiologie und Ca^{2+}-Homöostase des Herzens beziehen sich auf adulte humane ventrikuläre Kardiomyozyten (*cardiomyocytes*, CMs) und dienen dem physiologischen Hintergrundverständnis.

1.2.1 Das Aktionspotential des Herzens

Das ventrikuläre Aktionspotential (AP) des Herzens wird ab einem Schwellenpotential von ca. -65 mV ausgelöst und dauert etwa 300 ms. Es besteht aus vier verschiedenen Phasen, in denen jeweils unterschiedliche Ionenströme zum Tragen kommen (Abbildung 2).

Phase 0, der Aufstrich des APs, entspricht der schnellen Depolarisation auf Werte von +20 mV bis +40 mV (sog. *overshoot*). Dieser entsteht durch die Aktivierung spannungsabhängiger schneller Na^+-Kanäle (I_{Na}). Daran schließt sich Phase 1, die initiale Repolarisation, an, welche durch den transienten auswärtsgerichteten K^+-Strom (I_{to}) getragen wird. Phase 2 entspricht der charakteristischen Plateauphase ventrikulärer APs.

Hier halten sich ein langsam depolarisierender Ca^{2+}-Einstrom durch L-Typ-Ca^{2+}-Kanäle ($I_{Ca,L}$) und ein K^+-Ausstrom durch spannungsabhängige K^+-Kanäle die Waage. Danach folgt die abschließende Repolarisation (Phase 3), welche durch einen maximalen Auswärtsstrom von K^+-Ionen zustande kommt. Der verzögert auswärtsgleichgerichtete K^+-Strom hat eine schnelle (I_{Kr}, r für *rapid*) und eine langsame (I_{Ks}, s für *slow*) Komponente. Phase 4 des Aktionspotentials entspricht dem Ruhemembranpotential (RMP) von ca. -85 mV, welches durch den einwärtsgleichgerichteten K^+-Strom (I_{K1}) aufrechterhalten wird (Bers 2001; Hall 2016; Haverkamp und Breithardt 2003; Heijman et al. 2014; Hoekstra et al. 2012; Schrader et al. 2014).

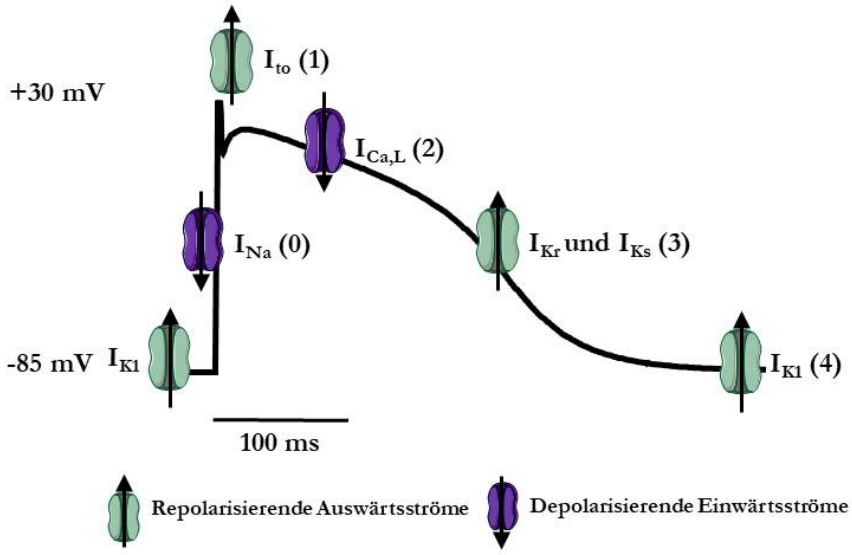

Abbildung 2: Das Aktionspotential des Herzens.

I_{K1} einwärtsgleichgerichteter K^+-Strom, I_{Na} schneller Na^+-Strom, I_{to} transienter auswärtsgerichteter K^+-Strom, $I_{Ca,L}$ L-Typ-Ca^{2+}-Strom, I_{Kr} und I_{Ks} schnelle (r für *rapid*) bzw. langsame (s für *slow*) Komponente des verzögert auswärtsgleichgerichteten K^+-Stroms.

Das ventrikuläre Aktionspotential gliedert sich in folgende Phasen: (0) Depolarisation durch Aktivierung spannungsabhängiger schneller Na^+-Kanäle (I_{Na}), (1) initiale Repolarisation durch einen transienten K^+-Auswärtsstrom (I_{to}), (2) von L-Typ-Ca^{2+}-Kanälen ($I_{Ca,L}$) getragene Plateauphase und (3) abschließende Repolarisation durch den Ausstrom von K^+-Ionen (I_{Kr} und I_{Ks}). Das Ruhemembranpotential (4) wird durch den einwärtsgleichgerichteten K^+-Strom (I_{K1}) aufrecht gehalten.

Abbildung angelehnt an Voigt und Dobrev (2011). Ionenkanäle modifiziert nach Smart Servier Medical Art: Cellular biology: Receptors and channels. Les Laboratoires Servier, Suresnes; https://smart.servier.com/smart_image/channel-85/; abgerufen am 18.02.2020. CC BY 3.0.

1.2.2 Der L-Typ-Calciumstrom

Der $I_{Ca,L}$ hat mehrere physiologische Funktionen im Herzen inne: In allen Herzmuskelzellen spielt er eine große Rolle bei der Dauer des Aktionspotentials. In Schrittmacherzellen ist er zudem an der spontanen Depolarisation beteiligt. In nodalen

Zellen ist der $I_{Ca,L}$ für den Aufstrich des Aktionspotentials und die Leitungsgeschwindigkeit mitverantwortlich. Des Weiteren sind die durch L-Typ-Ca^{2+}-Kanäle in die Zelle eintretenden Ca^{2+}-Ionen entscheidend für die elektromechanische Kopplung des Herzens (vgl. Abschnitt 1.2.3) (Pelzmann et al. 1998; Schrader et al. 2014). Der Peak des $I_{Ca,L}$ triggert die Ca^{2+}-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), während der restliche Strom zur Beladung der Zelle und des SRs mit Ca^{2+} führt. Diese zwei gegensätzlichen Effekte gleichen sich unter physiologischen Bedingungen aus (Eisner et al. 2017).

1.2.3 Die elektromechanische Kopplung des Herzens

Im Herzen führt die elektrische Erregung des Myokards (also das Aktionspotential) zu einer geordneten Kontraktion. Dieser Vorgang wird als elektromechanische Kopplung bezeichnet (Abbildung 3). Entscheidend ist hierfür ist die räumliche Nähe von L-Typ-Ca^{2+}-Kanälen in der Membran von T-Tubuli zu den Ryanodinrezeptoren (RyR2, Isoform des Herzens) des SRs. Dieses sog. kardiale Dyade ist fundamental für die Entstehung des systolischen Ca^{2+}-Transienten (CaT) (Eisner et al. 2017).

Calcium wird als entscheidender Faktor in der elektromechanischen Kopplung des Herzens gesehen: Die Depolarisation durch das Aktionspotential aktiviert spannungsabhängige L-Typ-Ca^{2+}-Kanäle. Ca^{2+}-Ionen, welche während der Plateauphase des APs in die Zelle strömen, aktivieren RyR2s und triggern so eine weitaus größere Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR (Ca^{2+}-induzierte Ca^{2+}-Freisetzung). Die Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration wird auch als systolischer CaT bezeichnet. Das freigesetzte Ca^{2+} bindet an Troponin C und initiiert so die zelluläre Kontraktion. Folglich bestimmt die Amplitude des systolischen CaT die Kontraktilität des Herzens. Umgekehrt sind Veränderungen der Amplitude des CaT ein wichtiges Werkzeug, um die Kontraktilität des Herzens zu beeinflussen (Bers 2001; Eisner 2014; Eisner et al. 2017; Hall 2016; Heijman et al. 2014; Schrader et al. 2014; Wakili et al. 2011).

In der Diastole wird das freigesetzte Ca^{2+} aus dem Zytosol wieder entfernt: Entweder pumpt die Ca^{2+}-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (*sacroplasmic reticulum calcium ATPase*, SERCA2a, Isoform des Herzens) das Ca^{2+} zurück ins SR oder es wird – hauptsächlich durch den Na^{+}-Ca^{2+}-Austauscher (NCX) – in den Extrazellulärraum hinaus befördert (Bers 2001; Hall 2016; Heijman et al. 2014; Schrader et al. 2014; Wakili et al. 2011).

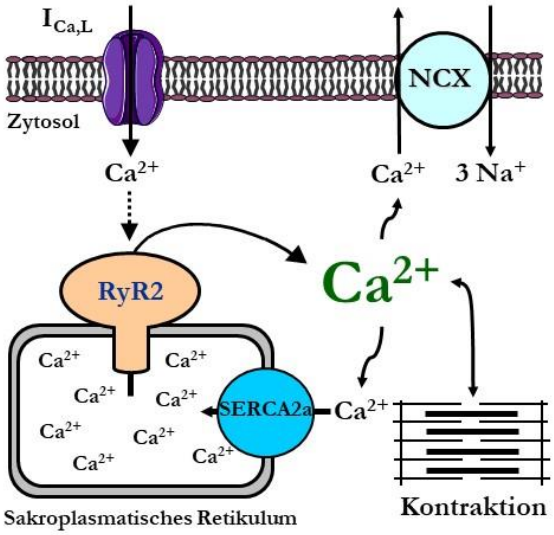

Abbildung 3: Die elektromechanische Kopplung des Herzens.
$I_{Ca,L}$ L-Typ-Ca^{2+}-Strom, RyR2 Ryanodinrezeptor (Isoform des Herzens), SERCA2a Ca^{2+}-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (Isoform des Herzens), NCX Na^+-Ca^{2+}-Austauscher.
Calcium ist der entscheidende Mediator der elektromechanischen Kopplung: Der $I_{Ca,L}$ triggert über die Aktivierung von RyR2 die Ca^{2+}-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Das freigesetzte Ca^{2+} bindet an kontraktile Proteine und initiiert so die zelluläre Kontraktion. In der Diastole wird das Ca^{2+} über die SERCA2a und den NCX aus dem Zytosol entfernt.
Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. N. Voigt (Arbeitsgruppe Molekulare Pharmakologie des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsmedizin Göttingen).

1.2.4 Regulation der Calciumhomöostase des Herzens

Die kardiale Kontraktilität wird durch Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) reguliert. Entscheidend für die Ca^{2+}-Homöostase ist das Gleichgewicht zwischen Ein- und Ausstrom von Ca^{2+}-Ionen (Eisner 2014; Eisner et al. 2017).

Die SERCA2a wird als Hauptregulator der $[Ca^{2+}]_i$ gesehen. Sie selbst wird durch Phospholamban (PLN) und Sarkolipin (SLN) moduliert. Damit kann die Ca^{2+}-Aufnahme ins SR angepasst werden (Schrader et al. 2014; Vittorini et al. 2007; Wu et al. 2012). Veränderungen der Ca^{2+}-Konzentration des SRs wiederum führen zu Veränderungen der Amplitude des systolischen CaT. Einer Erhöhung des Ca^{2+}-Gehalts des SRs folgt eine erhöhte Ca^{2+}-Freisetzung, was wiederum eine höhere Konzentration freier Ca^{2+}-Ionen im Zytoplasma nach sich zieht. Eine veränderte Expression oder Aktivität wichtiger Proteine der Ca^{2+}-Homöostase (L-Typ-Ca^{2+}-Kanäle, NCX, SERCA2a oder RyR2) verändert somit auch die Regulation des SR-Ca^{2+}-Gehalts (Eisner 2014).

1.3 Aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnene Kardiomyozyten

1.3.1 Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen

Pluripotente Stammzellen definieren sich über die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und in alle somatischen Zelllinien ausdifferenzieren zu können (Jaenisch und Young 2008). Induzierte pluripotente Stammzellen können mithilfe retroviraler Transduktion der vier sog. Yamanaka-Faktoren (Oct3/4, Sox2, Klf4 und c-Myc) aus humanen dermalen Fibroblasten und anderen somatischen Zellen generiert werden (Takahashi et al. 2007) (Abbildung 4). Induzierte pluripotente Stammzellen sind vergleichbar mit humanen embryonalen Stammzellen (*human embryonal stem cells*, hESCs), u. a. bezüglich Morphologie, Proliferation und Genexpression (Takahashi et al. 2007). Im Gegensatz zu hESCs sind die ethischen Bedenken bei iPS-Zellen jedoch geringer. Ein weiterer großer Vorteil der iPS-Zellen besteht in der Möglichkeit, patienten- und krankheitsspezifische Zelllinien zu generieren (Yamanaka 2007). Damit können Mechanismen, die einer Erkrankung zugrunde liegen, patientenspezifisch *in vitro* untersuchen werden (Takahashi et al. 2007).

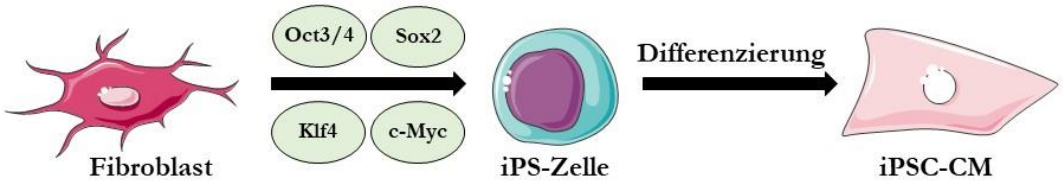

Abbildung 4: Generierung von Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen.
Mithilfe der sog. Yamanaka-Faktoren (Oct3/4, Sox2, Klf4 und c-Myc) können aus Fibroblasten induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) generiert werden, welche anschließend in Kardiomyozyten (iPSC-CMs) ausdifferenziert werden.
Zellen in der Abbildung modifiziert nach Smart Servier Medical Art: Anatomy and the human body: Locomotor system: Bone structure. Les Laboratoires Servier, Suresnes; https://smart.servier.com/smart_image/osteocyte-3/; abgerufen am 18.02.2020. CC BY 3.0 (Fibroblast) bzw. Smart Servier Medical Art: Medical specialties. Rheumatology. Bone structure. Les Laboratoires Servier, Suresnes; https://smart.servier.com/smart_image/stem-cell-2/; abgerufen am 18.02.2020. CC BY 3.0 (iPS-Zelle) bzw. Smart Servier Medical Art: Anatomy and the human body: Cardiovascular system: Heart – physiology. Les Laboratoires Servier, Suresnes; https://smart.servier.com/smart_image/cardiomyocyte-5/; abgerufen am 18.02.2020. CC BY 3.0 (iPSC-CM).

1.3.2 Ausdifferenzierung von induzierten pluripotenten Stammzellen zu Kardiomyozyten

Induzierte pluripotente Stammzellen lassen sich *in vitro* zu Kardiomyozyten ausdifferenzieren (Abbildung 4 in Abschnitt 1.3.1). Dabei durchlaufen sie verschiedene

Stadien, beginnend mit der Induktion des kardialen Mesoderms, welches sich in kardiale Progenitorzellen differenziert. Anschließend entwickeln sich die Zellen weiter zu Kardiomyozyten, welche herzspezifische Gene und Proteine exprimieren (Karakikes et al. 2015; Kattman et al. 2011; Ma et al. 2011; Yang et al. 2014).

Es gibt verschiedene Strategien und Protokolle, um die Differenzierung von iPS-Zellen in Kardiomyozyten zu erreichen (Hoekstra et al. 2012). Entscheidend ist die richtige Dosis an Wachstumsfaktoren in der richtigen Zusammensetzung zum richtigen Zeitpunkt (Priori et al. 2013). Hierzu sind *in vitro* relativ wenige, aber klar definierte Mediumbestandteile notwendig (Burridge et al. 2014; Lian et al. 2013). Durch sie erfolgt die Modulation bestimmter Signalwege, die bei der Differenzierung eine Rolle spielen, beispielsweise des Wnt/β-Catenin-Signalwegs (Lian et al. 2013) oder des Activin/Nodal/TGFβ- und BMP-Signalwegs (Kattman et al. 2011). Neben dem Medium spielt auch die Matrix, auf der die Zellen ausplattiert werden, eine wichtige Rolle (Burridge et al. 2014). Mit den heutigen Differenzierungsprotokollen wird eine Reinheit der Zellen von über 90 % erreicht (Abilez et al. 2018). Folglich können effizient humane iPSC-CMs produziert werden, welche dann in der Forschung zu Bereichen der Herzentwicklung, Herzerkrankungen, Medikamenten-entwicklung und Entwicklung zellulärer Therapien Anwendung finden (Lian et al. 2013).

Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen bieten die Möglichkeit, die zelluläre Elektrophysiologie von jedem Individuum nicht-invasiv zu untersuchen und ermöglichen somit, die Lücke zwischen experimenteller und klinischer Elektrophysiologie zu schließen. Idealerweise können iPSC-CMs das arrhythmogene Risiko und die Effizienz von Medikamenten vorhersagen und so zur personalisierten Medizin beitragen (Thomas et al. 2019). Sie tragen außerdem zu einem besseren Verständnis von Genotyp-Phänotyp-Beziehungen bei (Hoekstra et al. 2012).

1.3.3 Phänotyp von aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnenen Kardiomoyzyten

Typischerweise schlagen iPSC-CMs spontan und rhythmisch. Dagegen ist bei adulten humanen CMs ein spontanes Schlagen nicht physiologisch. Aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnene Kardiomyozyten bilden gemischte Populationen aus ventrikulären, atrialen und nodalen CMs (Ma et al. 2011). Außerdem existiert ein intermediärer Phänotyp (Ben-Ari et al. 2016; Priori et al. 2013).

Im Vergleich zu adulten humanen CMs sind iPSC-CMs kleiner und haben eine eher runde bis ovale Form ohne erkennbare Querstreifung. In Hinblick auf ihre morphologischen und funktionellen Eigenschaften ähneln iPSC-CMs somit mehr fetalen als adulten CMs (Karakikes et al. 2015; Yang et al. 2014).

1.3.4 Elektrophysiologie und Calciumhomöostase in aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnenen Kardiomyozyten

Aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnene Kardiomyozyten zeigen herzspezifische Eigenschaften bezüglich ihrer Elektrophysiologie und Ca^{2+}-Homöostase (Priori et al. 2013; Matsa et al. 2014): Vor allem der ventrikuläre Phänotyp hat viele elektrophysiologische Eigenschaften analog zu adulten humanen CMs. Beispielsweise exprimieren iPSC-CMs typische Ionenströme, die auch dem AP von adulten humanen CMs unterliegen (wie z. B. I_{Na}, $I_{Ca,L}$, I_{to}, I_{Kr} und I_{Ks}) (vgl. Abschnitt 1.2.1). Die Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften der Ionenkanäle sind ebenfalls vergleichbar. Zudem zeigen iPSC-CMs eine intakte Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR mit systolischen CaTs und besitzen eine funktionelle elektromechanische Kopplung, die der adulter CMs ähnelt (vgl. Abschnitt 1.2.3) (Karakikes et al. 2015; Ma et al. 2011; Yang et al. 2014; Zhao et al. 2018).

Dennoch bestehen Unterschiede im AP-Profil zwischen adulten humanen CMs und iPSC-CMs: In manchen Studien wird ein reduzierter I_{K1} beschrieben, was zu einem höheren RMP von ca. -60 mV und spontaner Aktivität der Zellen führt. Außerdem haben iPSC-CMs einen prominenten Schrittmacherstrom (I_f; f für *funny*), welcher ebenfalls für das spontane Schlagen der Zellen mitverantwortlich ist. Das RMP in iPSC-CMs wird von multiplen Ionenkanälen aufrechterhalten. Aufgrund des positiveren RMPs ist der I_{Na} partiell inaktiviert, was zu einer langsameren Aufstrichgeschwindigkeit des APs führt. Zudem ist der $I_{Ca,L}$ in iPSC-CMs im Vergleich zu humanen adulten CMs kleiner und zieht damit eine kürzere Plateauphase des APs nach sich. Insgesamt ergeben sich morphologisch heterogene Aktionspotentiale (Horváth et al. 2018; Karakikes et al. 2015; Meijer van Putten et al. 2015; Vaidyanathan et al. 2016; Yang et al. 2014; Zhao et al. 2018).

Aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnene Kardiomyozyten sind des Weiteren in der Lage, mit pathologischen Nachdepolarisationen zu reagieren (*early bzw. delayed afterdepolarisations*; EADs bzw. DADs) (Ma et al. 2011).

In iPSC-CMs werden wichtige Schlüsselproteine der Ca^{2+}-Homöostase (z. B. RyR2, SERCA2a, NCX, L-Typ-Ca^{2+}-Kanäle) exprimiert (Hoekstra et al. 2012). Allerdings werden der Reifungsgrad und die Regulation der elektromechanischen Kopplung in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Unreife der Ca^{2+}-Homöostase von iPSC-CMs zeigt sich beispielsweise in einem schwach entwickelten SR, einem unterentwickelten kontraktilen Apparat und einer langsameren Kinetik des Ca^{2+}-Cyclings. T-Tubuli, eine Schlüsselkomponente der elektromechanischen Kopplung, fehlen in iPSC-CMs. Dies führt zu unsynchronisierten CaTs innerhalb der Zelle. Dennoch zeigen iPSC-CMs den Mechanismus der Ca^{2+}-getriggerten Ca^{2+}-Freisetzung (vgl. Abschnitt 1.2.3) und stellen somit ein geeignetes Modell für die Ca^{2+}-Homöostase von Herzmuskelzellen dar (Karakikes et al. 2015; Yang et al. 2014; Zhang et al. 2013).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass iPSC-CMs einen unreifen elektrophysiologischen Phänotyp besitzen (Hoekstra et al. 2012). Trotzdem reproduzieren sie zuverlässig kardiale

elektrophysiologische Eigenschaften (Ma et al. 2011). Die Langzeitkultur von iPSC-CMs führt zu deren elektrophysiologischen Reifung, inkl. der Reifung von I_{K1} und $I_{Ca,L}$ (Yang et al. 2014). Auch bzgl. der Ca^{2+}-Homöostase ist eine zunehmende Reifung in älteren iPSC-CMs zu beobachten (Ivashchenko et al. 2013). Zur genaueren elektrophysiologischen Charakterisierung von iPSC-CMs sind noch weitere Studien notwendig (Karakikes et al. 2015; Priori et al. 2013).

1.3.5 *In-vitro*-Modell für die Fallot'sche Tetralogie

Bisher wurde noch kein *In-vitro*-iPS-Zell-Modell für die Fallot'sche Tetralogie beschrieben. Somit stellt die oben genannte Studie das erste *In-vitro*-Modell für TOF dar. Die hier verwendeten iPSC-CMs wurden in einem 2D-Modell kultiviert. Sie stammten von einem Patienten mit Fallot'scher Tetralogie und dessen gesundem Vater als Kontrollgruppe (Abbildung 5).

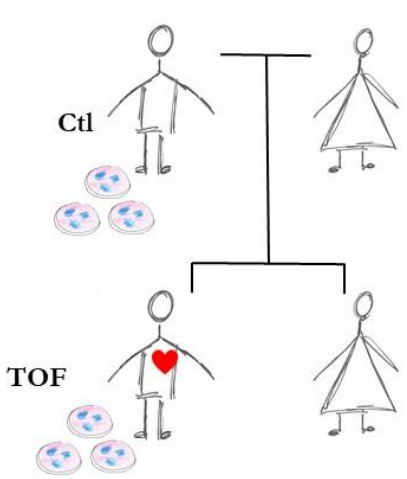

Abbildung 5: Stammbaum des Patienten mit Fallot'scher Tetralogie (TOF).
Das rote Herz markiert den TOF-Patienten. Als Kontrolle (Ctl) wurden aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnene Kardiomyozyten des gesunden Vaters verwendet.
Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Frau Prof. Dr. med. S. Rickert-Sperling (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Charité, Universitätsmedizin Berlin).

1.4 Veränderungen der zellulären Elektrophysiologie und Calciumhomöostase bei Fallot'scher Tetralogie

Bisher ist wenig über die Veränderungen der zellulären Elektrophysiologie in humanen CMs von TOF-Patienten bekannt.

Pelzmann et al. (1998) konnten zeigen, dass bei humanen ventrikulären CMs betroffener Kindern eine verlängerte Aktionspotentialdauer (APD) und ein über einen breiten Spannungsumfang hinweg aktiver $I_{Ca,L}$ (sog. *calcium window current*) vorliegen. Des Weiteren konnten sie frühe Nachdepolarisationen aufzeichnen. Auch Schaffer et al. (1999) konnten

EADs in humanen CMs von Kindern mit TOF nachweisen. Außerdem diskutieren die Autoren einen potentiell arrhythmogenen I_f in Nicht-Schrittmacher-Zellen. Ein weiterer möglicher Unterschied zu gesunden humanen CMs könnten Veränderungen in K^+-Kanälen (z. B. ein heterogener I_{to}) sein.

Auch bzgl. der Ca^{2+}-Homöostase und der Expression von Proteinen des Kontraktions-Relaxations-Zyklus in humanen CMs von Patienten mit Fallot'scher Tetralogie ist bisher wenig bekannt. Vittorini et al. (2007) fanden bei TOF-Patienten im Vergleich zu VSD-Patienten eine erniedrigte Genexpression von PLN und SLN, zwei Regulationsproteinen der SERCA2a. Die Expression von SERCA2a selbst war unverändert. Im Gegensatz dazu war bei Wu et al. (2012) eine Downregulation von SERCA2a auf mRNA-Ebene, aber keine veränderte Expression von PLN und SLN nachweisbar. Jedoch war Ser^{16}-phosphoryliertes PLN downreguliert. Weitere Proteine der Ca^{2+}-Homöostase, z. B. der RyR2 oder der NCX schienen in ihrer Genexpression nicht verändert zu sein (Vittorini et al. 2007; Wu et al. 2012).

Besser untersucht sind die Veränderungen der zellulären Elektrophysiologie und Ca^{2+}-Homöostase im Tiermodell von TOF. Hierzu werden Schweine oder Hunde einer Operation unterzogen, welche dem Zweck dient, ähnliche anatomische und hämodynamische Verhältnisse herzustellen wie bei TOF-Patienten nach Korrekturoperation (sog. *repaired Tetralogy of Fallot*, rTOF).

In den rTOF-Tiermodellen kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe häufiger zu spontanen Arrhythmien und es konnte ein rechts- und linksventrikuläres Remodelling im Hinblick auf die Repolarisation und Erregungsleitung nachgewiesen werden (Benoist et al. 2017; Dubes et al. 2018). Dieses Remodelling führte zu einer größeren Heterogenität der APD. Allerdings gibt es Widersprüche in der Literatur, ob die APD verlängert (Benoist et al. 2017; Dubes et al. 2018; Lambert et al. 2010) oder verkürzt (Chiu et al. 2015) ist. Bei Lambert et al. (2010) war ferner die Aktionspotentialamplitude (APA) erhöht.

Als Ursache für das Remodelling wird von manchen Autoren eine allgemeine Downregulation von Ionenkanälen diskutiert (Chiu et al. 2015). Zudem konnte eine veränderte Expression bestimmter K^+-Kanäle (Kv4.3 und miRP1) nachgewiesen werden (Benoist et al. 2017). Auch die Dysregulation von Genen der Ca^{2+}-Homöostase scheint eine Rolle zu spielen. Beispielsweise zeigte sich das Gen *ATP2A2*, welches für die SERCA2a kodiert, im Tiermodell downreguliert (Charron et al. 2015).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Veränderungen der zellulären Elektrophysiologie und Ca^{2+}-Homöostase bei Patienten mit Fallot'scher Tetralogie bisher wenig erforscht sind. Insbesondere für humane CMs gibt es nur wenige Studien. Zudem ist bisher nicht genauer unterschieden worden, welche Veränderungen durch die gestörte Hämodynamik bei TOF bzw. nach Korrektur-OP zustande kommen und welche genetisch bedingt sind. Die vorliegende Arbeit stellt das erste *In-vitro*-TOF-iPS-Zell-Modell dar, an dem elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt wurden.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Fallot'sche Tetralogie ist der häufigste angeborene zyanotische Herzfehler. Im Verlauf der Erkrankung entwickeln viele Patienten ventrikuläre und/oder atriale Herzrhythmusstörungen mit konsekutivem Risiko des plötzlichen Herztodes. Die Ursachen dieser Arrhythmien sind noch nicht abschließend geklärt.

Um neue Einblicke in die Pathogenese von TOF und die Entstehung der Arrhythmien zu bekommen, wurde im Rahmen einer größeren Studie in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Kardiovaskuläre Genetik von Frau Prof. Dr. med. S. Rickert-Sperling (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Charité, Universitätsmedizin Berlin) erstmals ein *In-vitro*-iPS-Zell-Modell für TOF etabliert.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit lautete, dass veränderte zelluläre elektrophysiologische Eigenschaften und eine veränderte Ca^{2+}-Homöostase zur Arrhythmogenese in TOF-Patienten beitragen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden iPSC-CMs eines TOF-Patienten im Vergleich zu iPSC-CMs des gesunden Vaters elektrophysiologisch mithilfe der Patch-Clamp-Technik und mittels Epifluoreszenz untersucht. Der $I_{Ca,L}$ wurde zeitgleich mit den korrespondierenden CaTs aufgezeichnet und bezüglich seiner Strom-Spannungs-Kurve und seiner Nifedipinsensitivität charakterisiert. Außerdem wurde die sarkoplasmatische Ca^{2+}-Konzentration bestimmt und die Aktivität der SERCA2a berechnet.

Des Weiteren wurden Aktionspotentialmessungen durchgeführt. Dabei wurde eine neue Methode, APs mithilfe von Feldstimulation und Perforated-Patch-Clamp-Technik zu messen, in unserer Arbeitsgruppe etabliert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern neue Einsichten in krankheitsspezifische funktionelle Eigenschaften von iPSC-CMs eines TOF-Patienten. Diese Erkenntnisse können zur Klärung der Pathogenese von TOF und der Entstehung von Herzrhythmusstörungen im Rahmen der Erkrankung beitragen. Außerdem stellen sie eine Ergänzung zur allgemeinen elektrophysiologischen Charakterisierung von iPSC-CMs dar.

2 Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen elektrophysiologisch untersucht.

Experimentell kann die Erregung auf zellulärer Ebene durch die Patch-Clamp-Technik simuliert werden: Die Applikation eines depolarisierenden Spannungspulses durch die Patch-Clamp-Pipette führt zur Aktivierung eines Membranstroms, welcher wiederum über die Patch-Clamp-Pipette gemessen werden kann (Molleman 2003). Das Ca^{2+}-Signal kann mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs visualisiert werden. Dieser fluoresziert, wenn das in der Systole freigesetzte Ca^{2+} an ihn bindet (Paredes et al. 2008; Schrader et al. 2014).

Der L-Typ-Ca^{2+}-Strom wurde mittels Whole-Cell-Patch-Clamp-Technik im Voltage-Clamp-Modus gemessen, während simultan die korrespondierenden Ca^{2+}-Transienten mithilfe von Epifluoreszenz (Fluo-3) aufgenommen wurden. Des Weiteren wurde die sarkoplasmatische Ca^{2+}-Konzentration bestimmt und die Aktivität der SERCA2a berechnet.

Aktionspotentiale wurden mit Perforated-Patch-Clamp-Technik im Current-Clamp-Modus gemessen.

Der entsprechende Ethik-Antrag an der Universitätsmedizin Göttingen wurde unter der Antragsnummer 10/9/15 genehmigt.

2.1 Die Patch-Clamp-Technik

Die folgenden Ausführungen zur Patch-Clamp-Technik wurden mithilfe des Buches „Patch-Clamp-Technik“ von M. Numberger und A. Draguhn (Numberger und Draguhn 1996) und der Dissertation von Prof. Dr. med. N. Voigt (Voigt 2006) erarbeitet.

2.1.1 Die Geschichte der Patch-Clamp-Technik

Die physiologische Ursache hinter der elektrischen Erregbarkeit von Zellen liegt in Ionenströmen, die durch Ionenkanäle fließen.

Die Theorie von „tierischer Elektrizität“ wurde bereits im 18. Jahrhundert vom italienischen Arzt L. A. Galvani entwickelt. Als Gründer der Elektrophysiologie gilt E. du Bois-Reymonds, welcher von 1848 bis 1884 die tierische Elektrizität untersuchte. Im Jahr 1912 postulierte dann J. Bernstein, dass das Ruhepotential von Zellen auf einer ungleichen Ionenverteilung an einer selektiv permeablen Membran beruhe (Bernstein 1912). Diese Hypothese konnte jedoch erst Ende der 30er Jahre des 20. Jahrhunderts bestätigt werden, als K. S. Cole und H. J. Curtis die Spannungsklemme entwickelten. In ihren Experimenten

wiesen sie nach, dass die Leitfähigkeit einer Membran bei Erregung steigt und dass Aktionspotentiale durch Ionenströme zustande kommen (Cole 1979).

In den folgenden Jahren untersuchten A. Hodgkin und A. Huxley die Entstehung des Aktionspotentials am Riesenaxon von Tintenfischen (Hodgkin 1976), wofür sie 1963 den Medizin-Nobel-Preis erhielten.

Die Göttinger B. Sakmann und E. Neher entwickelten schließlich in den 70er und 80er Jahren des letzten Jahrhunderts die Patch-Clamp-Technik. Ihnen gelang es, einzelne Ionenkanäle direkt zu beobachten. Dazu untersuchten sie mithilfe einer Glaspipette einen elektrisch isolierten Abschnitt der Zellmembran. Der Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Zelle musste sehr hoch sein, damit das Hintergrundrauschen möglichst minimiert wurde. So konnten sie rechteckige Strompulse nachweisen, die sie als die Aktivität einzelner Ionenkanäle interpretierten (Neher 1992). Mit Entdeckung des Gigaseals im Jahr 1980 konnten die vier klassischen Patch-Clamp-Techniken entwickelt werden: Cell-Attached- und Whole-Cell-Konfiguration für Messungen von Strömen der gesamten Membran und Inside-Out- bzw. Outside-Out-Konfiguration für die Messung von zellfreien Kanälen (Hamill et al. 1981). Für ihre Arbeit erhielten B. Sakmann und E. Neher 1991 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie.

Heutzutage ist die Patch-Clamp-Technik eine der am häufigsten verwendeten Methoden in der zellulären Elektrophysiologie (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

2.1.2 Die Seal-Bildung und Cell-Attached-Konfiguration

Die Grundlage für Patch-Clamp-Experimente ist der Gigaseal, d. h. die Herstellung eines sehr hohen Abdichtungswiderstandes (> 1 GΩ) zwischen Zellmembran und Pipettenwand. Dieser wird durch Anlegen eines leichten Sogs an die Pipette bei Berührung der Zelloberfläche erreicht. Mit Ausbildung des Gigaseals befindet man sich in der Cell-Attached-Konfiguration (Abbildung 6.A). Durch den hohen Abdichtungswiderstand werden die Leckströme sehr klein und das Rauschen deutlich geringer (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

Der Verstärker ist in der Cell-Attached-Konfiguration auf Voltage-Clamp-Modus gestellt. Merkmale dieser Konfiguration sind die intakte Zellmembran und dass intrazelluläre Proteine (z. B. Second-Messenger-Systeme) unbeeinflusst bleiben. Die Cell-Attached-Konfiguration stellt den Ausgangspunkt für die Whole-Cell-Konfiguration und für Perforated-Patch-Clamp-Messungen dar (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

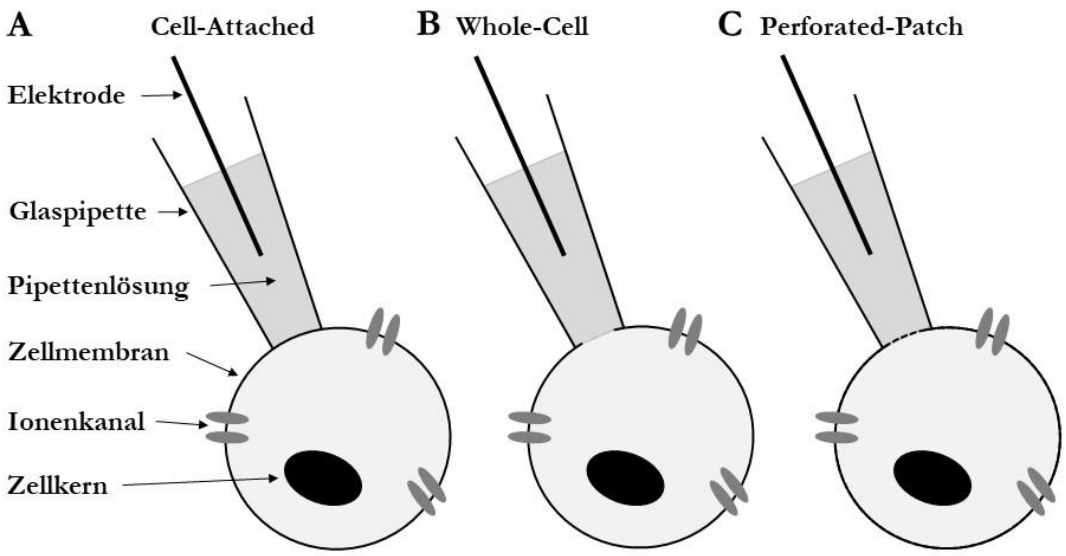

Abbildung 6: Die verschiedenen Patch-Clamp-Konfigurationen.
A: Durch Anlegen eines leichten Sogs an die Pipette wird bei einem hohen Abdichtungswiderstand (sog. Gigaseal) die Cell-Attached-Konfiguration erreicht.
B: Ausgehend von der Cell-Attached-Konfiguration wird unter starkem Sog die Zellmembran eingerissen. Dies wird als Whole-Cell-Konfiguration bezeichnet.
C: Ausgehend von der Cell-Attached-Konfiguration wird bei der Perforated-Patch-Clamp-Technik mithilfe von Porenbildern ein Zugang zum Zellinneren geschaffen.
Abbildung basierend auf Voigt (2006).

2.1.3 Die Whole-Cell-Konfiguration

Die Whole-Cell-Konfiguration zeichnet sich dadurch aus, dass die gesamte Zellmembran betrachtet wird und somit der gemessene Strom der Summe aller Einzelkanalströme entspricht (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

Die Whole-Cell-Konfiguration wird folgendermaßen hergestellt: Nachdem die Cell-Attached-Konfiguration erreicht ist und die kapazitativen Ströme kompensiert sind, wird ein Haltepotential von 0 mV an die Zelle angelegt. Anschließend wird die Membran durch Sog an der Pipette durchbrochen, wobei der Seal erhalten bleibt (Abbildung 6.B in Abschnitt 2.1.2). Reaktiv ändert sich die Stromantwort auf den Testpuls und die kapazitativen Ladungsströme nehmen zu, weil nun die gesamte Membran anstatt nur das Membranstück unter der Pipette umgeladen werden muss. Zudem nimmt der Offset-Strom zu, da die große Membranfläche einen kleineren Widerstand besitzt (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

Innerhalb kurzer Zeit wird nun das Zellinnere durch die Pipettenlösung ersetzt. Dies hat den Vorteil, dass das intrazelluläre Milieu genau kontrolliert werden kann und beispielsweise Farbstoffe leicht in die Zelle eingewaschen werden können. Allerdings wird die natürliche Zusammensetzung des Zytoplasmas in der Whole-Cell-Konfiguration verändert (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

2.1.4 Die Perforated-Patch-Clamp-Technik

Der Vorteil von Perforated-Patch-Clamp-Experimenten gegenüber der Whole-Cell-Konfiguration liegt darin, dass ein Verlust intrazellulärer Substanzen vermieden wird und die experimentellen Bedingungen so eher physiologischen Bedingungen entsprechen (Hoekstra et al. 2012; Ma et al. 2011; Numberger und Draguhn 1996).

Das Prinzip des Perforated-Patchs besteht darin, mithilfe von Porenbildnern die Membran unter der Pipette zu perforieren und damit eine Verbindung zum Zytoplasma zu schaffen, die der Whole-Cell-Konfiguration ähnlich ist (Abbildung 6.C in Abschnitt 2.1.2). In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu Amphotericin B-haltige Pipettenlösung verwendet. Amphotericin B wird in die Membran eingebaut und bildet etwa 0,8 nm große Poren (Numberger und Draguhn 1996; Rae et al. 1991).

2.1.5 Der Voltage-Clamp-Modus

Patch-Clamp-Experimente können entweder im sog. Voltage-Clamp- oder im sog. Current-Clamp-Modus durchgeführt werden. Im Voltage-Clamp-Modus wird die Membranspannung durch den Experimentator bestimmt und die hierzu nötigen Kompensationsströme können gemessen werden (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

Das Prinzip besteht darin, Änderungen des Membranpotentials zu verhindern, indem ein Strom in die Zelle injiziert wird. Dabei ist der Kompensationsstrom (I_P) genauso groß wie der Strom, welcher durch die Membran fließt (I_M), diesem jedoch entgegengerichtet. Durch Messung des Kompensationsstroms können Rückschlüsse auf die Leitfähigkeit der Membran gezogen werden.

$$I_P = -I_M$$

Der Patch-Clamp-Verstärker hat also zwei wesentliche Aufgaben: Erstens soll er die Membranspannung (diese entspricht der Pipettenspannung U_P) an die vorgegebene Sollspannung (U_{Soll}) angleichen. Und zweitens misst der Verstärker den dafür notwendigen Kompensationsstrom (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

$$U_P = U_{Soll}$$

2.1.5.1 Funktionsprinzip des Vorverstärkers

Das zentrale Bauteil des Vorverstärkers ist ein Strom-Spannungs-Wandler, welcher aus einem Rückkopplungswiderstand (R_F) und einem Operationsverstärker besteht. Dieser Schaltungsaufbau bewirkt, dass die Membranspannung (U_P) auf dem konstanten Wert der Sollspannung (U_{Soll}) gehalten wird. Dabei entspricht der Strom über dem Rückkopplungswiderstand (I_F) dem Kompensationsstrom (I_P) (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

$$I_F = I_P$$

Laut Ohm'schem Gesetzt ist die Spannung über dem Rückkopplungswiderstand (U_F) somit proportional zum Kompensationsstrom (I_P).

$$U_F = R_F \cdot I_F = R_F \cdot I_p$$

Bei bekanntem Wert für den Rückkopplungswiderstand (R_F), genügt es damit, die Spannung U_F zu messen, um den Kompensationsstrom (I_P) zu berechnen. Dies geschieht durch einen Differenzverstärker. Ein Differenzverstärker enthält mehrere Operationsverstärker (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

2.1.5.2 Merkmale der Whole-Cell-Konfiguration

Whole-Cell-Patch-Clamp-Experimente werden im Voltage-Clamp-Modus durchgeführt. Dabei besteht eine leitende Verbindung zwischen Pipette und Zellinnerem, wobei der Widerstand zwischen Pipettenelektrode und Zytoplasma als Serienwiderstand (R_S) bezeichnet wird. Genauer gesagt setzt sich der Serienwiderstand aus dem Pipettenwiderstand (R_P) und Membranresten in der Pipettenspitze zusammen. Damit ist der Serienwiderstand deutlich höher als der eigentliche Widerstand der Pipetten (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006). Der Pipettenwiderstand betrug je nach Experiment in der vorliegenden Arbeit 2,5 – 6,0 MΩ.

Die Zellmembran kann als eine Kombination aus Membranwiderstand (R_M), welcher vom Öffnungszustand der Ionenkanäle abhängig ist, und einer parallel dazu angeordneten Kapazität (C_M) betrachtet werden. Die hydrophilen Außen- und Innenseiten der Lipiddoppelschicht fungieren dabei als Platten eines Kondensators, während die hydrophobe Mittelschicht ein nicht-leitendes Dielektrikum darstellt. Die Gesamtkapazität der Membran ist abhängig von ihrer Fläche (1 $\mu F/cm^2$) (Gentet et al. 2000).

Es ist bekannt, dass ein großer Kondensator länger zum Aufladen braucht und ein hoher Serienwiderstand die dafür notwendige Ladungsmenge nur verzögert passieren lässt.

Im Voltage-Clamp-Modus sollen Spannungsänderungen der Zellmembran verhindert werden, indem ein Strom injiziert wird. Dazu ist ein möglichst geringer Serienwiderstand (R_S) notwendig, denn je kleiner R_S, desto schneller wird die gewünschte Spannung im Zellinneren erreicht und desto mehr entspricht diese tatsächlich der Sollspannung. Somit ist ein im Vergleich zum Membranwiderstand deutlich geringerer Serienwiderstand ($R_S << R_M$) eine wichtige Voraussetzung für Whole-Cell-Patch-Clamp-Experimente (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

2.1.5.3 Kapazitätskompensation

Jeder Änderung der Sollspannung (U_{Soll}) folgt zunächst ein Umladeprozess der Membrankapazität (C_M). Das Problem hierbei besteht in einer Sättigung des Systems, da jeder Kondensator eine maximale Spannungsfestigkeit besitzt. Deshalb sollten die kapazitativen Ströme, welche zum Laden des Membrankondensators notwendig sind,

möglichst gering gehalten werden. Hierfür dient die Kapazitätskompensation (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

Dabei wird ein Injektionskondensator verwendet, welcher den injizierten Strom moduliert. Dies geschieht manuell am Verstärker durch Anpassung an die Membrankapazität (C_M) und den Serienwiderstand (R_S). Dabei müssen R_S und C_M für jede Zelle neu ermittelt werden (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

Insgesamt benötigt ein Patch-Clamp-Verstärker mindestens zwei solcher Kompensationsmechanismen: Einen ersten mit schnellerer Zeitkonstante und kleiner Amplitude zur Kapazitätskompensation der Pipettenwand (geschieht vor Einreißen der Zellmembran), sowie einen zweiten mit langsamerer Zeitkonstante und größerer Amplitude zur Kompensation der Kapazität der Zelle selbst (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

2.1.5.4 Kompensation des Serienwiderstandes

Wie bereits oben beschrieben, setzt sich der Serienwiderstand (R_S) aus dem Pipettenwiderstand (R_P) und Membranresten in der Pipette zusammen. Ein hoher Serienwiderstand verlangsamt einerseits das Umladen der Zellmembran und anderseits fällt ein Teil der Sollspannung (U_{Soll}) über R_S ab, womit das ursprüngliche Ziel $U_P = U_{Soll}$ nicht mehr erreicht wird. Der Serienwiderstand wird deshalb durch das Hinzuaddieren einer Spannung (U_A) zu U_{Soll} kompensiert (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

Dies führt zu einer verbesserten und schnelleren Regulation der Membranspannung. Allerdings stellt dieses Kompensationssystem einen positiven Rückkopplungsmechanismus dar, weshalb der Serienwiderstand nicht vollständig kompensierbar ist, da das System sonst instabil werden würde (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde der Kompensationsfaktor auf c = 60 % eingestellt.

2.1.6 Der Current-Clamp-Modus

Im Gegensatz zum Voltage-Clamp-Modus, bei welchem die Membranspannung vorgegeben ist und die Kompensationsströme gemessen werden, wird im Current-Clamp-Modus der Membranstrom vorgegeben und die darauf folgende Spannungsänderung aufgezeichnet (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

Der Current-Clamp-Modus ist im Vergleich zum Voltage-Clamp-Modus besser dazu geeignet, das physiologische Erregungsmuster von Zellen zu untersuchen. Natürlicherweise besteht das Verhalten von erregbaren Zellen aus Potentialschwankungen, die sich aus der Summe der offenen Ionenkanäle ergeben (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

Im klassischen Current-Clamp-Modus wird ein rechteckiger Strompuls injiziert, woraufhin die Potentialänderung im Zellinneren gemessen werden kann. Vor der Strominjektion kann das Ruhemembranpotential der Zelle bestimmt werden. Bei erregbaren Zellen löst die

Injektion eines depolarisierenden Stroms ab einer gewissen Schwelle ein Aktionspotential aus (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

Wichtig im Current-Clamp-Modus ist vor allem die korrekte Kompensation der kapazitativen Artefakte (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

2.2 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration und der systolischen Calciumtransienten

Die ersten direkten Messungen der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration wurden 1978 von D. Allen und J. Blinks am Froschherzen durchgeführt (Allen und Blinks 1978). Heutzutage ist es Standard, die $[Ca^{2+}]_i$ mithilfe von fluoreszierenden Ca^{2+}-Indikatoren zu untersuchen. Diese Indikatoren ändern ihre Fluoreszenzeigenschaften, wenn freie Ca^{2+}-Ionen an sie binden. Um zytosolische Ca^{2+}-Level zu quantifizieren, werden Indikatoren mit hoher Affinität verwendet. Dabei beschreibt die Dissoziationskonstante (k_d), wie stark ein Indikator die Ca^{2+}-Ionen bindet. Die Bindungseigenschaften sind u. a. abhängig von Temperatur, pH-Wert, Proteinbindung und dem Vorhandensein anderer Ionen (Paredes et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde die $[Ca^{2+}]_i$ simultan zum L-Typ-Ca^{2+}-Strom mithilfe von Fluo-3 gemessen (vgl. Voigt et al. 2012). Fluo-3 ist einer der bekanntesten und meistverwendesten Single-Wave-Length-Indikatoren. Seine Fluoreszenz steigt um das 100-Fache, wenn Ca^{2+} an ihn gebunden ist (Paredes et al. 2008).

Fluo-3 wird von einer Xenon-Lampe mit nachgeschaltetem Anregungsfilter durch Licht der Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm angeregt und emittiert daraufhin Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 525$ nm (Voigt et al. 2014).

Abbildung 7 zeigt den Versuchsaufbau: Das Anregungslicht wurde über einen Filter (Ex) und einen Strahlteiler (M-BS) auf die mit Fluo-3 gefärbte Zelle geworfen. Das emittierte Licht ($\lambda > 520$ nm) wurde über einen Spiegel in die Detektionseinheit (BS1 und Em1) des Photomultipliers (PMT) geleitet. Außerdem gelangte das Licht über einen sog. *cold mirror* (= BS2) zur Kamera. Die genauen Eigenschaften der Filter und Strahlteiler sind in Tabelle 1 aufgeführt.

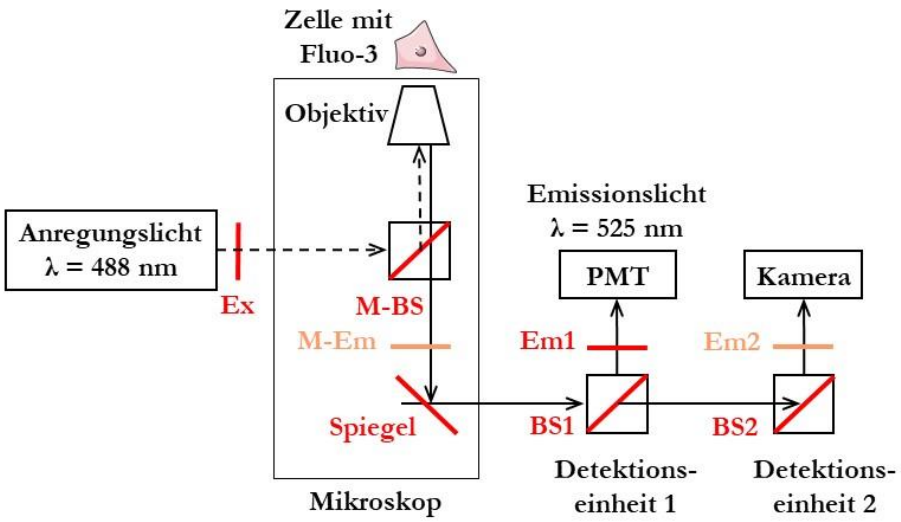

Abbildung 7: Versuchsaufbau zur Messung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration.
Ex Anregungsfilter, M-BS Strahlteiler Mikroskop, M-Em Emissionsfilter Mikroskop, BS1 Strahlteiler Detektionseinheit 1, Em1 Emissionsfilter Detektionseinheit 1, PMT Photomultiplier, BS2 Strahlteiler Detektionseinheit 2, Em2 Emissionsfilter Detektionseinheit 2.
Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge λ = 488 nm fängt die mit Fluo-3 gefärbte Zelle an zu fluoreszieren. Das Signal wird durch den PMT detektiert und in die intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration umgerechnet.
Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Voigt et al. (Arbeitsgruppe Molekulare Pharmakologie des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, Universistätsmedizin Göttingen).

Tabelle 1: Filter und Strahlteiler zur Messung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration.

Filter/Strahlteiler	Eigenschaften	Hersteller
Anregungsfilter (Ex)	ET470/40x	Cairn Research, UK
Strahlteiler Mikroskop (M-BS)	495LP	Cairn Research, UK
Emissionsfilter Mikroskop (M-Em)	leer	–
Strahlteiler Detektionseinheit 1 (BS1)	T565lpxr	Cairn Research, UK
Emissionsfilter Detektionseinheit 1 (Em1)	ET535/50m	Cairn Research, UK
Strahlteiler Detektionseinheit 2 (BS2)	T660lpxr	Cairn Research, UK
Emissionsfilter Detektionseinheit 2 (Em2)	leer	–

Das gemessene Signal konnte anschließend in die $[Ca^{2+}]_i$ umgerechnet werden:

$$[Ca^{2+}]_i = k_d \cdot \frac{F}{F_{max} - F}$$

Hierbei stellt k_d die Dissoziationskonstante von Fluo-3 (864 nM/l) dar. Das F steht für die Fluo-3-Fluoreszenz. Dabei ist F_{max} die Ca^{2+}-gesättigte Fluoreszenz, welche am Ende jedes Versuches bestimmt wurde, indem die Zelle mit der Patch-Clamp-Pipette durchstochen

wurde. Dieser Vorgang führte zu einem maximalen Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle (Trafford et al. 1997; 1999; Voigt et al. 2014). Die Hintergrundfluoreszenz wurde bestimmt, indem die Zelle anschließend aus dem Bild geschoben wurde (Spencer et al. 2014).

2.3 Bestimmung der sarkoplasmatischen Calciumkonzentration und Berechnung der SERCA2a-Aktivität

Zur Bestimmung der Ca^{2+}-Konzentration des SRs wurden die iPSC-CMs zuerst im Voltage-Clamp-Modus mit demselben Protokoll wie zur Messung des L-Typ-Ca^{2+}-Stroms (vgl. Abbildung 13.A in Abschnitt 2.7.4) stimuliert. Anschließend wurde die Stimulation gestoppt und die Zellen auf -80 mV geklemmt. Daraufhin wurde 10 mM Koffein appliziert (Varro et al. 1993). Durch Bindung an Ryanodinrezeptoren führt Koffein in dieser Konzentration zu einer fast vollständigen Entleerung des sarkoplasmatischen Ca^{2+}-Speichers, was sich im koffeininduzierten CaT zeigt. Das freigesetzte Ca^{2+} wird sofort über den NCX aus der Zelle entfernt. Im Austausch für ein Ca^{2+}-Ion transportiert der NCX drei Na^{+}-Ionen in die Zelle. Dadurch entsteht als Antwort auf den koffeininduzierten CaT ein depolarisierender Einwärtsstrom. Der integrierte NCX-Strom ist ein akzeptiertes Maß für die sarkoplasmatische Ca^{2+}-Konzentration, da er die totale aus der Zelle heraustransportierte Ladung widerspiegelt (Abbildung 8) (Eisner 2014; Zhang et al. 2013).

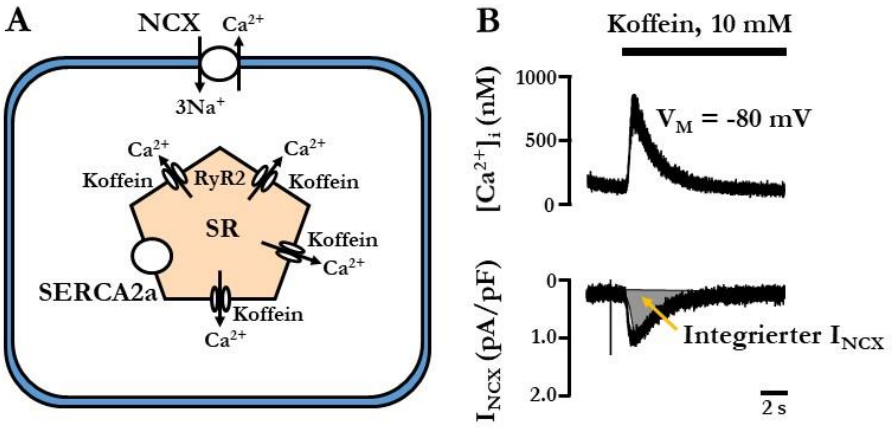

Abbildung 8: Berechnung der sarkoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration.
NCX Na^+-Ca^{2+}-Austauscher, RyR2 Ryanodinrezeptor (Isoform des Herzens), SERCA2a Ca^{2+}-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (Isoform des Herzens), $[Ca^{2+}]_i$ intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration, I_{NCX} depolarisierender Einwärtsstrom durch den Na^+-Ca^{2+}-Austauscher, V_M Membranspannung.
A: Die Bindung von Koffein an die RyR2 führt zur vollständigen Entleerung des SRs. Das freigesetzte Ca^{2+} wird über den NCX aus der Zelle gepumpt.
B: Die Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR spiegelt sich im Ca^{2+}-induzierten Ca^{2+}-Transienten wider. Der integrierte I_{NCX} ist ein akzeptiertes Maß für den Ca^{2+}-Gehalt des SRs.
Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. N. Voigt (Arbeitsgruppe Molekulare Pharmakologie des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, Universistätsmedizin Göttingen).

Zur Analyse wurden einzelne Monoexponentialfunktionen den Abklingphasen der systolischen und koffeininduzierten CaTs angepasst.

$$f(x) = A \cdot e^{\frac{-t}{\tau}} = A \cdot e^{-t \cdot k}$$

Durch Subtraktion der Abklingkonstanten (k) des koffeininduzierten CaT von der Abklingkonstanten des systolischen CaT konnte die SERCA2a-Aktivität berechnet werden (Diaz et al. 2004).

2.4 Der Patch-Clamp-Messplatz

Der Gesamtaufbau des Patch-Clamp-Setups ist in Abbildung 9 dargestellt. Detaillierte Ausführungen zu den einzelnen Bestandteilen finden sich in den folgenden Abschnitten. Diese wurden mithilfe des Buches „Patch-Clamp-Technik“ von M. Numberger und A. Draguhn (Numberger und Draguhn 1996) und der Dissertation von Prof. Dr. med. N. Voigt (Voigt 2006) erarbeitet.

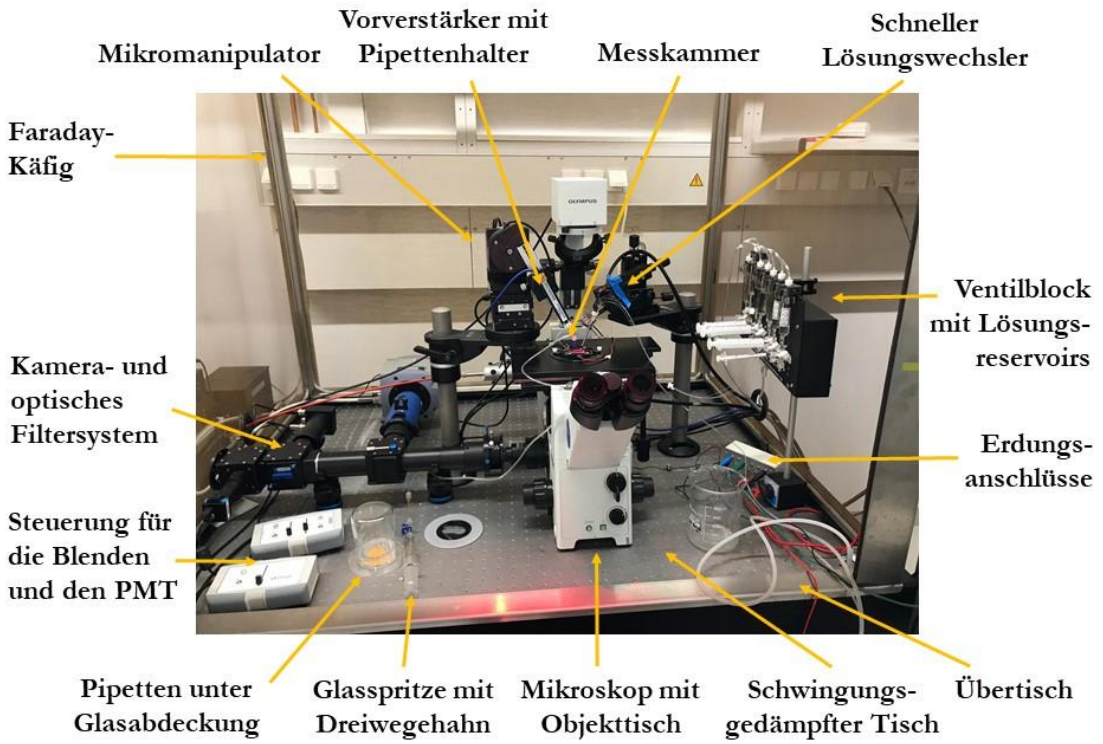

Abbildung 9: Das Patch-Clamp-Setup.
Um Erschütterungen zu minimieren, wurden das Mikroskop mit Messkammer und Objekttisch, der Mikromanipulator, der Vorverstärker mit Pipettenhalter, der Ventilblock mit Lösungsreservoirs und schnellem Lösungswechsler sowie die Kamera mit optischem Filtersystem auf einem schwingungsgedämpften Tisch, welcher auf einem Übertisch stand, montiert. Zur elektrischen Abschirmung war das gesamte Setup von einem Faraday-Käfig umgeben. Alle Bestandteile des Setups wurden geerdet, um das elektrische Rauschen zu minimieren. Über eine Glasspritze konnte mithilfe eines Dreiwegehahns Druck in die Patch-Clamp-Pipette appliziert werden. Die Pipetten wurden am Messtag neu hergestellt und zum Schutz unter einer Glasabdeckung aufbewahrt. Rechts des Setups befand sich der Photomultiplier (PMT; nicht abgebildet), links zwei Computer, an denen die Kamera, das Perfusionssystem, die Heizung, der Hauptverstärker und der Analog-Digital-Wandler angeschlossen waren (nicht abgebildet).

2.4.1 Mechanische und elektrische Abschirmung

Schon kleinste Erschütterungen können die Durchführung eines Patch-Clamp-Experiments unmöglich machen. Deshalb wurden das Mikroskop mit Messkammer und Objekttisch, der Mikromanipulator, der Vorverstärker, der Pipettenhalter, der Ventilblock mit Lösungsreservoirs sowie die Kamera und das optische Filtersystem auf einem druckluftbetriebenen schwingungsgedämpften Tisch aufgebaut. Dieser war auf einem Übertisch montiert und dämpfte mechanische Schwingungen und Erschütterungen (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

Um das elektrische Hintergrundrauschen des öffentlichen Stromnetzes (sog. Netzbrummen) zu minimieren, musste das Setup elektrisch abgeschirmt werden. Dies geschah durch einen Faraday-Käfig, der nach vorne hin offen war und ebenfalls auf dem

Übertisch stand. Der Käfig wurde über ein Kabel am Erdungseingang des Verstärkers geerdet. Auch alle anderen Komponenten des Setups wurden geerdet, um das Rauschen zu minimieren (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

2.4.2 Das Mikroskop

Für die Experimente wurde ein inverses Mikroskop (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10) verwendet. Dies hatte im Gegensatz zu einem aufrechten Mikroskop folgende Vorteile: Erstens war über dem Objekttisch mehr Platz, was das Heranführen der Pipette an die Zelle erleichterte. Zweitens wurden zum Fokussieren die Objektive und nicht der Objekttisch bewegt, was bei der Vermeidung ungewollter Bewegungen zwischen Zelle und Pipette half. Und drittens erlaubte das inverse Mikroskop die Verwendung von Objektiven mit höherer numerischer Apertur, da das Objektiv sehr nah an das Versuchsobjekt herangeführt werden konnte. Dadurch ergab sich eine hohe Auflösung, auch bei starker Vergrößerung (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde eine 200-fache Vergrößerung gewählt.

2.4.3 Videotechnik, Photomultiplier und Filter

Die Verwendung von Videotechnik (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10) ermöglichte, dass die Pipette mit der Zelle und der Pipettenwiderstand während der Sealbildung gleichzeitig am Monitor überwacht werden konnten. Auch während des restlichen Experiments bot Videotechnik den Vorteil, dass die Zelle immer zu sehen war, ohne ins Mikroskop schauen zu müssen, was leicht zu Erschütterungen hätte führen können (Numberger und Draguhn 1996; Voigt 2006).

Zur Detektion der CaTs wurden ein PMT und diverse Strahlteiler und Filter (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10) verwendet (vgl. Abbildung 7 und Tabelle 1 in Abschnitt 2.2).

2.4.4 Messkammer

Für die Patch-Clamp-Experimente wurden die Cover-Slips (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10), auf denen die Zellen kultiviert wurden, in eine spezielle Messkammer aus Polycarbonat (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10) gelegt. Die Messkammer mit der Badlösung wurde auf 37 °C erwärmt (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10). Für Aktionspotentialmessungen konnten Elektroden zur Feldstimulation auf die Kammer aufgeschraubt werden (Abbildung 10).

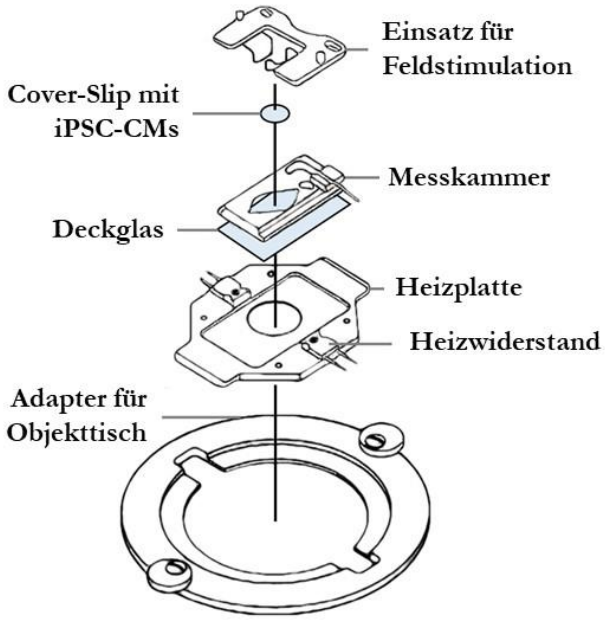

Abbildung 10: Aufbau der Messkammer.
Der Cover-Slip mit den aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnenen Kardiomyozyten (iPSC-CMs) wurde in eine Messkammer aus Polycarbonat gelegt, welche nach unten hin mit einem Deckglas verschlossen wurde. Die Messkammer mit der Badlösung wurde über eine Heizplatte auf 37 °C erwärmt. Über einen Adaptar konnte die Kammer mit der Heizplatte auf dem Objekttisch befestigt werden. Zusätzlich bestand die Möglichkeit, Elektroden zur Feldstimulation auf die Messkammer aufzuschrauben.
Abbildung mit freundlicher Genehmigung von F. Seibertz (Arbeitsgruppe Molekulare Pharmakologie des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, Universistätsmedizin Göttingen) (Seibertz 2019).

2.4.5 Pipetten, Pipettenhalter und Mikromanipulator

Die Pipetten für die Versuche wurden an jedem Versuchstag aus Borsilicatglas (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10) neu hergestellt. Das Pipettenglas hatte einen Außendurchmesser von 1,5 mm, einen Innendurchmesser von 1,12 mm und enthielt ein inneres Filament, um das Füllen der Pipette zu beschleunigen.

Zuerst wurde das Glas mithilfe eines Glasschneiders auf eine Länge von 6,5 cm zugeschnitten und anschließend mit einem Bunsenbrenner an beiden Enden poliert. Anschließend wurden die Pipetten mithilfe eines Pipettenziehgerätes (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10) gezogen. Ihr Widerstand betrug 2,5 – 4,0 MΩ für Whole-Cell-Patch-Clamp-Experimente bzw. 5,0 – 6,0 MΩ für Perforated-Patch-Clamp-Experimente. Dabei galt, dass der Serienwiderstand umso niedriger war, je geringer der Pipettenwiderstand. Anderseits war bei niederohmigen Pipetten die Sealbildung schwerer. Die Pipetten wurden am Versuchstag bis zur Verwendung unter einer Glasabdeckung aufbewahrt, um sie vor Staub zu schützen.

Der Pipettenhalter, in den die Pipette eingesetzt wurde, war direkt am Vorverstärker befestigt. Über einen dünnen Schlauch, der sich seitlich am Pipettenhalter befand, konnte mithilfe einer Spritze und eines Dreiwegehahns Druck appliziert werden (vgl. Abbildung 11). Hierbei musste auf eine gute Zugentlastung des Schlauchs geachtet werden, um ungewollte Bewegungen der Pipette während des Experiments zu vermeiden.

Zum präzisen Heranführen der Pipette an die Zelle wurde ein hydraulisch betriebener Mikromanipulator (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10) verwendet.

Abbildung 11 zeigt eine Detailaufnahme des Patch-Clamp-Setups.

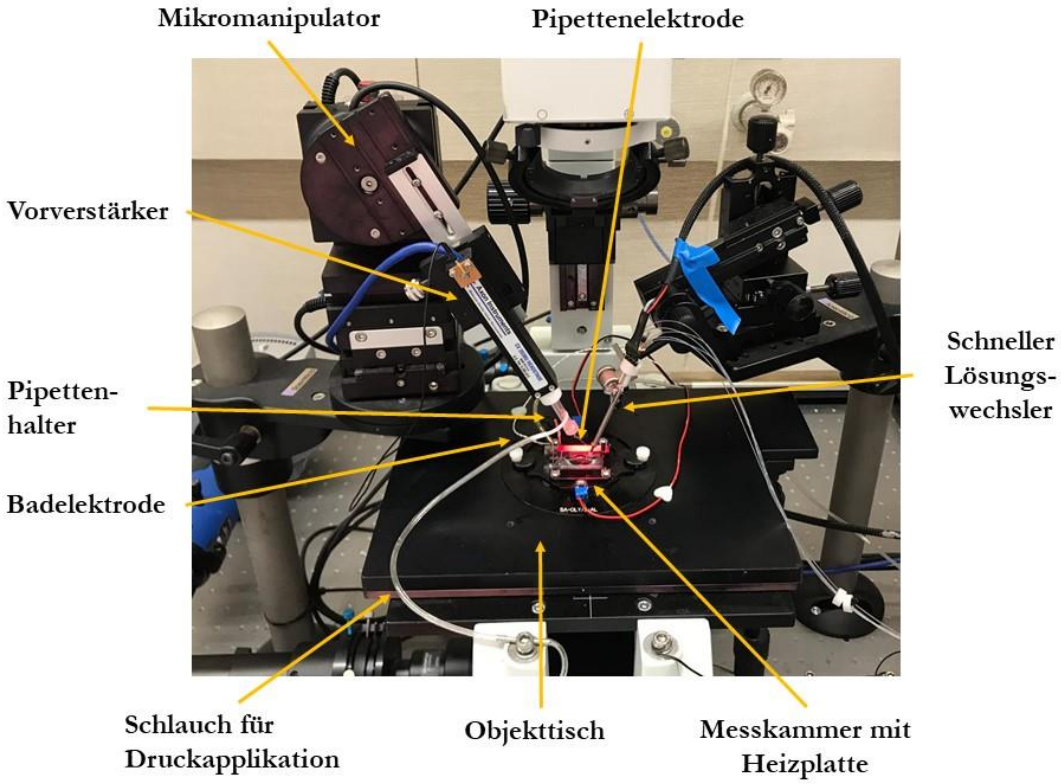

Abbildung 11: Detailaufnahme des Patch-Clamp-Setups.
Über einen Mikromanipulator konnte die Patch-Clamp-Pipette präzise an die Zelle herangeführt werden. Der Pipettenhalter war direkt am Vorverstärker montiert. Über einen Schlauch, der sich seitlich am Pipettenhalter befand, konnte mithilfe einer Spritze und eines Dreiwegehahns Druck in die Pipette appliziert werden. Die Pipetten- bzw. Referenzelektrode verband die Pipetten- bzw. Referenzelektrodenlösung mit dem Vorverstärker. Die Messkammer war auf dem Objekttisch befestigt. Über eine Heizplatte wurde die Badlösung auf 37 °C erwärmt. Der schnelle Lösungswechsler erlaubte es, das extrazelluläre Milieu innerhalb weniger Sekunden auszutauschen.

2.4.6 Elektroden

Am Patch-Clamp-Messplatz befanden sich zwei Elektroden: Die erste Elektrode (Pipettenelektrode) verband die Pipettenlösung, die zweite Elektrode (Referenzelektrode) den Extrazellulärraum mit dem Vorverstärker. Elektroden wandeln den Ionenstrom in

Lösungen in einen Elektronenstrom um, indem der Draht der Elektrode mit den Ionen in der Lösung reversibel reagiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein mit einer Silberchloridschicht überzogener Silberdraht verwendet, der mit den Cl^--Ionen aus der jeweiligen Lösung reagierte, wobei ein Elektron frei wurde.

$$Ag + Cl^- \Leftrightarrow AgCl + e^-$$

Hierbei war zu beachten, dass die Lösungen, in die beide Elektroden eintauchten, die gleiche Cl^--Konzentration enthielten, damit sich die elektrochemischen Potentiale der Elektroden aufhoben. Da die Badlösung eine deutlich höhere Cl^--Konzentration hatte als die Pipettenlösung, wurde die Referenzelektrode in eine 50 mM KCl-Lösung (Referenzelektrodenlösung) getaucht und diese über eine Agarbrücke (150 mM KCl, Agarosegel) mit der Badlösung verbunden. Die Agarbrücke wurde in 150 mM KCl bei 4 °C aufbewahrt.

Wenn die dunkelgraue Silberchloridschicht der Elektroden beschädigt war, wurde der Silberdraht mit Sandpapier abgeschmirgelt und anschließend mithilfe eines automatischen Elektrodenchlorierers (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10) und 2 M KCl-Lösung neu chloriert. Dies war im Durchschnitt etwa einmal pro Woche der Fall.

2.4.7 Verstärker und Vorverstärker

Der Vorverstärker (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10) war direkt neben dem Pipettenhalter installiert und über ein Kabel mit dem Hauptverstärker (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10) verbunden (vgl. Abbildung 11 in Abschnitt 2.4.5). Zur Verringerung des Rauschens und Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurde ein Low-Pass-Filter mit einer oberen Grenzfrequenz von 3 kHz verwendet.

Ein Analog-Digital-Wandler (10 kHZ DA-Frequenz, Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10) übertrug die analogen Daten an die Festplatte des Computers. Zur Datenerfassung, -speicherung und -verarbeitung wurde die Software Clampex10.7 (pClamp Software V10.7; Molecular Devices, USA) verwendet. Diese konnte außerdem programmierte Spannungsverläufe generieren und an den Verstärker weitergeben.

2.4.8 Perfusionssystem und schnelle Lösungsapplikation

Das Perfusionssystem (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10) mit schneller Lösungsapplikation erlaubte es, das extrazelluläre Milieu der zu messenden Zelle lokal und innerhalb weniger Millisekunden auszutauschen. Dazu wurde die Spitze des Lösungswechslers (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10) kurz vor der Zelle platziert (vgl. Abbildung 11 in Abschnitt 2.4.5). Die Applikationsspitze war über Polyamidschläuche an das jeweilige Reservoir der Lösung angeschlossen und wurde auf 37 °C erwärmt. Die insgesamt acht Reservoirs (Volumen je 5 ml) waren an einem Ventilblock innerhalb des Faraday-Käfigs montiert (vgl. Abbildung 9

in Abschnitt 2.4). Über eine Steuereinheit, welche an einen Computer angeschlossen war, konnten die Magnetventile der einzelnen Reservoirs geöffnet werden. Der Druck, mit dem die Lösung appliziert wurde, betrug 6,89 kPa.

Für Aktionspotentialmessungen wurden die Zellen kontinuierlich mit Tyrode-Lösung perfundiert.

Die Absaugung der Kammer erfolgte mithilfe einer Pumpe (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10) und eines Gummischlauchs und wurde so eingestellt, dass sich ein gleichmäßiger Fluss ergab.

2.4.9 Feldstimulation

Für Aktionspotentialmessungen wurden die Zellen vor der Messung mithilfe von Feldstimulation zum Schlagen gebracht. Hierzu wurden im Vorfeld verschiedene Stimulatoren getestet. Am Ende fiel die Wahl auf einen Stimulator von npi (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10), der mit einem Voltcraft verbunden war und über einen externen Impuls des Verstärkers getriggert werden konnte. Die Elektroden zur Feldstimulation waren an einer Plexiglasplatte befestigt und konnten direkt auf die Messkammer aufgeschraubt werden (vgl. Abbildung 10 in Abschnitt 2.4.4). Diese Vorrichtung hatte die feinmechanische Werkstatt in Göttingen selbst gebaut.

2.4.10 Geräteliste

Alle verwendeten Geräte sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Geräteliste.

Gerät	Hersteller
Analog-Digital-Wandler	Axon Digidata 1550B; Molecular Devices, USA
Automatischer Elektrodenchlorierer	ACI-01; npi electronic GmbH, Deutschland
Borsilicat-Pipettenglas	TW150F-3 / 1,5 mm Durchmesser; World-Precision-Instrument, USA
Casy	TTC; OLS OMNI, Life Science; Merck, Deutschland
Casy Ton	OLS OMNI Life Science; Merck, Deutschland
Cell-Trans Box	Cell-Trans 4016; Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Deutschland
Cover-Slips	Menzel-Gläser, Durchmesser 10 mm; Thermo Fischer scientific, USA
Hauptverstärker	Axopatch 200B; Molecular Devices, USA
Heizung	TC-20-W1; npi electronic GmbH, Deutschland
Kamera	DMK 72BUC02; The Imaging Source, Deutschland
Messkammer	Warner RC-26 und RC-26G; Warner Instruments, USA
Mikromanipulator	Modell UI-1000-i; Scientifica, UK
Mikroskop	IX71; Olympus, Japan
Perfusionssystem	Octaflow II; ALA-Scientific Instruments, USA
Photomultiplier	Optoscan; Cairn Research, UK
Pipettenziehgerät	Universal-Puller; Zeitz-Instruments, Deutschland
Pumpe	Vacuum Waste Kit; ALA-Scientific Instruments, USA
Schneller Lösungswechsler	ALA-VM8; ALA-Scientific Instruments, USA
Stimulator	ISO-01B; npi electronic GmbH, Deutschland
Strahlteiler und Filter	Cairn Research, UK (vgl. Tabelle 1)
Vortex	Vortex-Genie2; Scientific Industries, USA
Vorverstärker	Axopatch 1550B; Molecular Devices, USA

2.5 Versuchsobjekt

Alle Versuche wurden an iPSC-CMs durchgeführt, welche von einem Patienten mit Fallot'scher Tetralogie stammten. Als Kontrollgruppe dienten iPSC-CMs des gesunden Vaters (vgl. Abbildung 5 in Abschnitt 1.3.5).

2.5.1 Generierung von Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen

Die Generierung der iPSC-CMs erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. S. Rickert-Sperling (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Charité, Universitätsmedizin Berlin) und von Prof. Dr. rer. nat. K. Guan (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Technische Universität Dresden).

Sowohl von dem TOF-Patienten als auch von dem gesunden Vater wurde eine Hautbiopsie entnommen. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. K. Guan (damals noch Stem Cell Unit-Göttingen, Universitätsmedizin Göttingen) wurden aus Fibroblasten induzierte pluripotente Stammzellen generiert. Dies geschah nach einem etablierten Protokoll mithilfe des STEMCCA Systems (Streckfuss-Bömeke et al. 2013). Die entscheidenden Faktoren hierbei bilden die sog. Yamanaka-Faktoren (Takahashi und Yamanaka 2006) (vgl. Abbildung 4 in Abschnitt 1.3.1).

Anschließend wurden unter der Leitung von Prof. Rickert-Sperling in Berlin die iPS-Zellen durch Manipulation des Wnt-Signalwegs in Kardiomyozyten ausdifferenziert (vgl. Abbildung 4 in Abschnitt 1.3.1). Hierzu wurde das Protokoll von Lian et al. (2013) verwendet. Die Selektion der iPSC-CMs erfolgte an Tag 15 mithilfe von laktathaltigem Medium, um eine kardiale Ausdifferenzierung von ≥ 70 % zu erreichen (Wamstad et al. 2012). Durch laktathaltiges Medium gehen Nicht-Kardiomyozyten in Apoptose, da sie Laktat nicht verstoffwechseln können (Tohyama et al. 2013).

An Tag 19 (TOF) bzw. Tag 20 (Ctl) der Differenzierung wurden die iPSC-CMs bei -80 °C eingefroren und in einem 1 ml-Kryovial auf Trockeneis nach Göttingen zu unserer Arbeitsgruppe verschickt.

2.5.2 Auftauen und Ausplattieren der Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen

Die iPSC-CMs wurden für die Patch-Clamp-Versuche auf kleinen, autoklavierten Glas-Cover-Slips (Durchmesser 10 mm, Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10) ausplattiert.

Hierfür wurden die Cover-Slips mit Matrigel (1:120; Corning, USA) beschichtet. Je drei Cover-Slips wurden in eine Petri-Schale von 3 cm Durchmesser gelegt, wobei pro Schale 1 ml Matrigel verwendet wurde. Anschließend wurden die Schalen für mind. 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Zur weiteren Vorbereitung wurden 9 ml serumfreies Medium (SF-Medium, Tabelle 6 in Abschnitt 2.6.7) mit 5 µl Rho-assoziiertem Proteinkinase Inhibitor (ROCK-I; Stemolecule Reprocell, USA) versetzt. Dies wurde später zum Waschen der Zellen verwendet (sog. Waschmedium).

Um die Zellen aufzutauen, wurde das Kryovial mit den iPSC-CMs für drei Minuten unter fließendes warmes Wasser gehalten. Dann wurde der Inhalt des Kryovials mit einer 1000 µl-Pipette langsam und vorsichtig zum Waschmedium gegeben und das Kryovial mit ca. 500 µl Waschmedium gut ausgespült.

Anschließend wurde das Waschmedium mit den Zellen bei 1300 g für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml SF-Medium resuspendiert.

Danach wurden die Zellen mithilfe eines Casytons (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10) bzw. von Hand in der Neubauerzählkammer gezählt. Somit konnte berechnet werden, wie viele Zellen sich in einem Milliliter Medium befanden.

Nun wurde zunächst das übrige Matrigel aus den Petri-Schalen abgesaugt. Anschließend wurden die iPSC-CMs mit einer Dichte von 25.000, 50.000, 65.000 oder 100.000 Zellen pro Cover-Slip ausplattiert. Daraufhin wurden die Zellen für mind. zehn Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen.

Pro Petri-Schale wurden nun 2 ml SF-Medium hinzugegeben und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden.

Übrige Zellen wurden in einer Flasche kultiviert und konnten bei Bedarf zu einem späteren Zeitpunkt auf die Cover-Slips ausplattiert werden.

2.5.3 Zellkultur

Die Patch-Clamp-Experimente wurden zwischen Tag 28 und Tag 96 nach Beginn der Differenzierung (d, *day of differentiation*) (entspricht Tag 8 – 76 nach Auftauen und Ausplattieren der Zellen) durchgeführt.

Pro Versuchstag wurden ein bis drei Cover-Slips verwendet. Die übrigen Cover-Slips wurden weiterhin bei 37 °C und 5 % CO_2 mit SF-Medium inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte zweimal wöchentlich, wobei pro Petri-Schale 2 ml SF-Medium verwendet wurden.

2.6 Lösungen und Chemikalien

Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser (Milli-Q®-Wasser) hergestellt.

2.6.1 Inkubation der Zellen mit Fluo-3-acetomethylester

Zur Bestimmung der zytosolische Ca^{2+}-Konzentration wurde Fluo-3 verwendet. Die Zellen wurden mit Fluo-3-acetomethylester (Fluo-3-AM; Invitrogen, USA) gefärbt, einer Esterverbindung, welche die Zellmembran passieren konnte. Intrazellulär wurde das Acetomethyl durch Esterasen abgespalten und das Fluo-3, der eigentliche Farbstoff, konnte die Zelle nicht mehr verlassen (Paredes et al. 2008).

Zur Herstellung der Stammlösung wurden 50 µg Fluo-3-AM in 44 µg 20 %-iger Pluronsäure (2 g Pluronsäure in 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)) gelöst (c = 1 mM). Die Stammlösung wurde lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Färbung der Zellen wurden 10 µl Stammlösung je Milliliter Zellen verwendet (c = 10 µM). Die Zellen wurden 20 Minuten vor Licht geschützt bei 37 °C und 5 % CO_2 in einer Cell-Trans Box (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10) inkubiert und anschließend mit Tyrode-Lösung (Tabelle 3 in Abschnitt 2.6.2) gewaschen.

2.6.2 Badlösung

Die Messungen wurden in Tyrode-Lösung (Tabelle 3) durchgeführt. Die Stammlösung wurde in Ein-Liter-Glasflaschen bei 4 °C aufbewahrt. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH bzw. HCl auf pH = 7,35 eingestellt.

Calciumchlorid und Glukose wurden erst am Versuchstag zur Stammlösung hinzugefügt, um die endgültige Badlösung zu erhalten. Diese wurde anschließend 30 Minuten im Ultraschallbad behandelt, um eine Blasenbildung im Perfusionssystem zu verhindern.

Tabelle 3: Tyrode-Lösung.

Substanz	Konzentration (mM)	Hersteller
HEPES	10	ROTH, Deutschland
Probenecid	2	Sigma-Aldrich, USA
NaCl	140	ROTH, Deutschland
KCl	4	ROTH, Deutschland
$MgCl_2$	1	PanReac AppliChem GmbH, Deutschland
$CaCl_2$	2	ROTH, Deutschland
Glukose	10	PanReac AppliChem GmbH, Deutschland

2.6.3 Pipettenlösung

Nach Einreißen bzw. Perforation der Zellmembran diffundierte die Pipettenlösung (Tabelle 4) ins Zytoplasma, weshalb sie ähnlich zusammengesetzt sein musste wie das Innere der Zelle. Der pH-Wert wurde mit KOH auf pH = 7,2 eingestellt. Die Pipettenlösung wurde in 1,5 ml-Eppendorf-Cups bei -20 °C aufbewahrt. Auch während des Versuches wurde die Pipettenlösung auf Eis gelagert.

Zur Pipettenlösung konnte je nach Versuch Fluo-3 für die Messung der CaTs oder Amphotericin B für Perforated-Patch-Clamp-Experimente hinzugefügt werden.

Tabelle 4: Pipettenlösung.

Substanz	Konzentration (mM)	Hersteller
DL-Aspartat K^+-Salz	92	Sigma-Aldrich, USA
KCl	48	ROTH, Deutschland
Mg-ATP	1	ROTH, Deutschland
Na_2-ATP	4	Sigma-Aldrich, USA
EGTA	0,02	PanReac AppliChem GmbH, Deutschland
GTP-Tris	0,1	Sigma-Aldrich, USA
HEPES	10	ROTH, Deutschland

2.6.3.1 Pipettenlösung mit Fluo-3

Für die Messung der CaTs wurden die Zellen mit Fluo-3-AM beladen. Da durch das Einreißen der Zellenmembran der Ca^{2+}-Indikator langsam aus der Zelle heraus diffundieren würde, musste die Pipettenlösung ebenfalls Fluo-3 enthalten.

Dazu wurde 1 mg Fluo-3-Pentapotassium-Salz (Invitrogen, USA) in 1042 µl Pipettenlösung gelöst. 100 µl dieser Stammlösung wurden mit 900 µl Pipettenlösung verdünnt. Somit enthielt die fertige Gebrauchslösung 0,1 mM Fluo-3.

Stammlösung und Pipettenlösung wurden lichtgeschützt bei -20 °C bzw. während des Versuches auf Eis aufbewahrt.

2.6.3.2 Pipettenlösung mit Amphotericin B

Amphotericin B ist ein Antimykotikum, welches Zellmembranen durchlöchert (Numberger und Draguhn 1996; Rae et al. 1991). Das Amphoterin-Pulver (Sigma-Aldrich, USA) wurde lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Für Perforated-Patch-Clamp-Experimente wurden 2 mg Amphotercin B in 25 µl DMSO gelöst (c = 80 mg/ml). Um ein vollständiges Lösen des Amphotericins zu gewährleisten,

wurde die Lösung „gevortext“ (Tabelle 2 in Abschnitt 2.4.10). Anschließend wurden 2,25 µl dieser Stammlösung mit 500 µl Pipettenlösung verdünnt. Somit enthielt die fertige Gebrauchslösung 400 µg/ml Amphotericin B. Die Gebrauchslösung wurde für wenige Sekunden im Ultraschallbad behandelt, damit sich das Amphotericin vollständig löste.

Stammlösung und Pipettenlösung wurden jeden Tag neu hergestellt und während des Versuches vor Licht geschützt auf Eis aufbewahrt.

2.6.4 4-Aminopyridin

4-Aminopyridin (4-AP) ist ein reversibler K^+-Kanalblocker. Die 4-AP-Lösung (Tabelle 5) kam bei der Messung des $I_{Ca,L}$ zur Anwendung, um den I_{to} zu inaktivieren. Zur Inaktivierung des I_{K1} enthielt die Lösung zusätzlich Bariumchlorid.

Die Stammlösung wurde in 1-Liter-Glasflaschen bei 4 °C aufbewahrt. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH bzw. HCl auf pH = 7,35 eingestellt.

Calciumchlorid und Glukose wurden auch hier erst am Versuchstag zur Stammlösung hinzugefügt, um die endgültige Gebrauchslösung zu erhalten. Diese wurde anschließend ebenfalls 30 Minuten im Ultraschallbad behandelt, um eine Blasenbildung im Perfusionssystem zu verhindern.

Tabelle 5: 4-Aminopyridin-Lösung.

Substanz	Konzentration (mM)	Hersteller
4-Aminopyridin	5	Sigma-Aldrich, USA
HEPES	10	ROTH, Deutschland
Probenecid	2	Sigma-Aldrich, USA
NaCl	140	ROTH, Deutschland
KCl	4	ROTH, Deutschland
$MgCl_2$	1	PanReac AppliChem GmbH, Deutschland
$BaCl_2$	0,1	Sigma-Aldrich, USA
$CaCl_2$	2	ROTH, Deutschland
Glukose	10	PanReac AppliChem GmbH, Deutschland

2.6.5 Koffein

Koffein bindet an die Ryanodinrezeptoren des sarkoplasmatischen Retikulums der Zelle und führt so zu einer kompletten Freisetzung des dort gespeicherten Ca^{2+}. Damit kann die Ca^{2+}-Beladung des SRs bestimmt werden (Varro et al. 1993) (vgl. Abschnitt 2.3).

Die gebrauchsfertige Koffeinlösung wurde an jedem Versuchstag neu hergestellt, indem zur Stammlösung von 4-Aminopyridin neben Calciumchlorid und Glukose zusätzlich Koffein (c = 10 mM; Sigma-Aldrich, USA) hinzugegeben wurde. Die fertige Gebrauchslösung wurde anschließend 30 Minuten im Ultraschallbad behandelt, um eine Blasenbildung im Perfusionssystem zu verhindern.

2.6.6 Nifedipin

Nifedipin ist ein selektiver L-Typ-Ca^{2+}-Kanalblocker. Somit kann mithilfe von Nifedipin überprüft werden, ob ein depolarisierender Einwärtsstrom wirklich ein L-Typ-Ca^{2+}-Strom ist.

Die Stammlösung von Nifedipin (c = 100 mM; Sigma-Aldrich, USA) wurde lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahrt. Am Versuchstag wurden aus der Stammlösung eine 1 µM und eine 10 µM Gebrauchslösung hergestellt, indem das Nifedipin in 4-Aminopyridin verdünnt wurde. Die Gebrauchslösungen wurden während des Experiments vor Licht geschützt, indem das entsprechende Reservoir des Lösungswechslers mit Aluminiumfolie umwickelt wurde.

2.6.7 Serumfreies Medium

Die iPSC-CMs wurden mit SF-Medium (Tabelle 6) inkubiert. Das Medium selbst wurde bei 4 °C aufbewahrt und vor dem Mediumwechsel im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Tabelle 6: Serumfreies Medium.

Substanz	Menge (ml)	Hersteller
RPMI Medium 1640 + GlutaMAX^{Tm}-I	500	Life Technologies, USA
Penicillin/Streptomycin (1:100)	5	Life Technologies, USA
Natriumpyruvat (100 mM)	5	Life Technologies, USA
B27-Zusatz plus Insulin	10	Life Technologies, USA
L-Ascorbin-Säure-2-Phophat-Sesquimagnesium-Salz-Hydrat (200 mM)	0,521	Sigma-Aldrich, USA

2.7 Durchführung der Messungen zur Calciumhomöostase

Alle Experimente zur Ca^{2+}-Homöostase wurden mittels Whole-Cell-Patch-Clamp-Technik im Voltage-Clamp-Modus durchgeführt. Der L-Typ-Ca^{2+}-Strom wurde simultan zu den entsprechenden Ca^{2+}-Transienten gemessen. Diese wurden mithilfe von Epifluoreszenz registriert. Des Weiteren wurde die Strom-Spannungs-Kurve (IV-Kurve) des $I_{Ca,L}$ bestimmt und seine Supprimierbarkeit durch Nifedipin getestet. Außerdem wurde die sarkoplasmastische Ca^{2+}-Konzentration ermittelt und die SERCA2a-Aktivität berechnet.

Da spannungsabhängige Ionenströme temperaturabhängig sind, wurden alle Messungen bei 37 °C durchgeführt (Pelzmann et al. 1998).

Die folgenden Ausführungen zur praktischen Durchführung der Patch-Clamp-Experimente wurden mithilfe des Buches „Patch-Clamp-Technik“ von M. Numberger und A. Draguhn (Numberger und Draguhn 1996) und der Dissertation von Prof. Dr. med. N. Voigt (Voigt 2006) erarbeitet.

2.7.1 Vorbereitungen

Für die Messungen zur Ca^{2+}-Homöostase wurden Zellen in der Dichte von 25.000 bis 65.000 Zellen pro Cover-Slip verwendet. In dieser Dichte lagen die Zellen isoliert vor und bildeten keine Zell-Zell-Verbindungen untereinander aus (vgl. Abbildung 18 in Abschnitt 3.3).

Vor dem Experiment wurden die Zellen mit Fluo-3-AM beladen (vgl. Abschnitt 2.6.1) und der Raum vollständig abgedunkelt. Anschließend wurde ein Cover-Slip in die mit Badlösung gefüllte Messkammer transferiert. Die übrigen zwei Cover-Slips verblieben bis zur Verwendung am selben Versuchstag in 2 ml Tyrode-Lösung in der Petri-Schale bei 37 °C und 5 % CO_2 in der Cell-Trans Box.

Die Auswahl einer geeigneten Zelle erfolgte anhand der Kriterien Form, Begrenzung und Lage in der Messkammer (Abbildung 12). Nun wurde die Spitze des Lösungswechslers etwa 200 – 300 µm vor der Zelle platziert.

Anschließend wurde die Pipette von hinten mithilfe einer 1 ml-Spritze und eines dünnen Filaments mit Fluo-3-haltiger-Pipettenlösung befüllt, sodass die Pipettenelektrode gerade eben in die Lösung tauchte. Beim Eintauchen der Pipette in die Messkammer wurde ein leichter Überdruck angelegt, um ein Verstopfen der Pipettenspitze zu verhindern. Am Verstärker erfolgte der Nullabgleich zwischen Pipetten- & Referenzelektrode. Zwischen den Elektroden lag ein Kontrollspannungspuls von +5 mV mit einer Frequenz von 33,3 Hz an. Nun wurde der Pipettenwiderstand ermittelt, wobei nur Pipetten mit einem Widerstand von 2,5 bis 4,0 MΩ verwendet wurden.

Anschließend wurde die Pipette der Zelle angenähert, das Bild auf Kamera umgestellt, die Zelle mithilfe der Blenden isoliert und die Belichtung des Präparats minimiert.

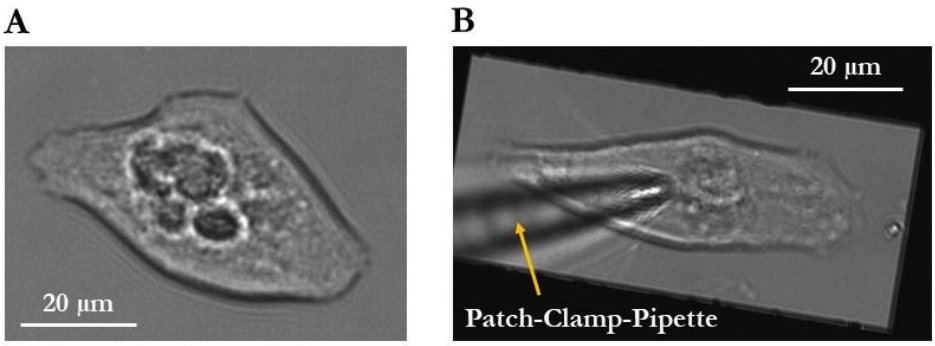

Abbildung 12: Aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnene Kardiomyozyten (iPSC-CMs).
A: Für einen Versuch geeignete Zelle mit scharf abgrenzbarer Zellmembran und ohne Apoptosekörperchen.
B: Gepatchte Zelle.

2.7.2 Herstellen der Cell-Attached-Konfiguration

Bei unmittelbarer Nähe der Pipettenspitze zur Zellmembran erhöhte sich der Pipettenwiderstand leicht und ein charakteristischer Lichtreflex wurde sichtbar. Nun wurde der Überdruck aus der Pipette abgelassen und ggf. ein leichter Sog angelegt. Dies führte zur schnellen Ausbildung eines Gigaseals mit Abdichtungswiderständen von über 1 GΩ. Zur Erleichterung der Sealbildung half es, die Badperfusion mit Tyrodelösung anzustellen. Die kapazitativen Ströme wurden am Verstärker kompensiert.

2.7.3 Herstellen der Whole-Cell-Konfiguration

Zur Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration, wurde ein Sog an die Pipette gelegt und so die Zellmembran durchbrochen. Dies wurde durch die Veränderung der kapazitativen Ströme sichtbar (vgl. Abschnitt 2.1.3). Nun wurde die Membrankapazität mithilfe der Patch-Clamp-Software bestimmt. Anschließend wurden die kapazitativen Artefakte und der Serienwiderstand kompensiert (vgl. Abschnitt 2.1.5.3 und 2.1.5.4).

2.7.4 Messprotokolle

Zur Messung des L-Typ-Ca^{2+}-Stroms wurde folgendes Rampenprotokoll verwendet: Ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV wurde ein 100 ms-Rampen-Puls auf -40 mV appliziert, um die schnellen Na^{+}-Ströme zu inaktivieren. Darauf folgte ein 100 ms-Testpuls auf +10 mV bei 0,5 Hz, um den $I_{Ca,L}$ zu aktivieren (Abbildung 13.A).

Für die Aufzeichnung der Strom-Spannungs-Kurve wurde das oben genannte Protokoll folgendermaßen modifiziert: Auf den Rampen-Puls folgte ein Testpuls auf -40 mV, welcher alle zwei Sekunden schrittweise um 5 mV erhöht wurde, bis am Ende ein Testpuls von +60 mV appliziert wurde (Abbildung 13.B).

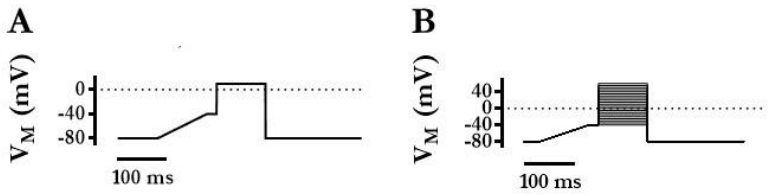

Abbildung 13: Messprotokolle.
V_M Membranspannung.
A: Rampenprotokoll zur Messung des $I_{Ca,L}$ (0,5 Hz).
B: Rampenprotokoll zur Messung der IV-Kurve (0,5 Hz).

2.7.5 Reihenfolge der Messprotokolle

Zur simultanen Messung des $I_{Ca,L}$ und der CaTs wurde die Zelle mit 4-Aminopyridin perfundiert, der PMT aktiviert und das entsprechende Protokoll (Abbildung 13.A in Abschnitt 2.7.4) gestartet. Im Anschluss wurde unter Perfusion mit 4-AP direkt die IV-Kurve des $I_{Ca,L}$ aufgezeichnet (Protokoll in Abbildung 13.B in Abschnitt 2.7.4).

Daraufhin wurde die Supprimierbarkeit des gemessenen Stroms durch Nifedipin getestet und eine IV-Kurve unter Nifedipin aufgezeichnet. Anschließend wurde die Zelle nochmals mit 4-AP perfundiert, bis sich der $I_{Ca,L}$ vollständig erholt hatte.

Zur Bestimmung der sarkoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration wurde die Zelle auf -80 mV geklemmt und mit 10 mM Koffein perfundiert (vgl. Abschnitt 2.3). Anschließend wurden erneut der $I_{Ca,L}$ und der korrespondierende CaT bestimmt, bis sich die CaTs erholt hatten.

Am Ende des Versuchs wurde die Zelle auf -80 mV geklemmt und unter Perfusion mit Tyrode-Lösung mit der Pipettenspitze durchstochen. Dies führte zu einem maximalen Ca^{2+}-Einstrom (F_{max}). Zur Registrierung der Hintergrundfluoreszenz (Nulllinie) wurde die Zelle aus dem Bild geschoben (vgl. Abschnitt 2.2).

Während des laufenden Experiments wurde von jeder Zelle ein Foto gemacht und darauf geachtet, ob die Zelle spontan oder durch Stimulation schlug. Von schlagenden Zellen wurde ein Video aufgenommen.

2.8 Durchführung der Aktionspotential-Messungen

Aktionspotentiale wurden mittels Perforated-Patch-Clamp-Technik im Current-Clamp-Modus gemessen.

Hierzu wurden Cover-Slips mit iPSC-CMs in der Dichte von 75.000 bis 100.000 Zellen pro Cover-Slip verwendet. Die höhere Dichte bewirkte, dass die Zellen besser über ein elektrisches Feld zu stimulieren waren. Die Stimulation erfolgte mit 10 – 30 V bei einer Frequenz von 0,25 – 1 Hz und einer Impulsdauer von 1 – 4 ms. Es wurden nur Zellen

gepatcht, welche sich durch Stimulation zur Kontraktion bringen ließen. So konnte sichergestellt werden, dass die Zellen in der Lage waren, ein Aktionspotential auszubilden.

Um die Zelle zu patchen, wurde die Stimulation pausiert. Die Schwierigkeit beim Perforated-Patch lag in der Herstellung eines guten Seals. Um die Sealbildung zu verbessern, wurde die Spitze der Pipette kurz in Tyrode-Lösung getaucht und anschließend mit Amphotericin B-haltiger Pipettenlösung von hinten befüllt. So konnte in der Zeit, die das Amphotericin benötigte, um zur Spitze der Pipette zu diffundieren, ein Seal hergestellt werden (Rae et al. 1991). Zudem wurde beim Eintauchen in das Bad möglichst kein Überdruck an die Pipette gelegt.

Nach Erreichen der Cell-Attached-Konfiguration wurde ein rechteckiger Testpuls (Haltepotential -80 mV, 100 ms Testpuls auf -40 mV bei 0,5 Hz) angelegt. Wenige Minuten später wurde als Antwort auf den Testpuls ein schneller Na^+-Strom sichtbar (Abbildung 14). Dies war die Bestätigung dafür, dass ein Zugang zur Zelle vorhanden war. Anschließend wurde der Verstärker auf Current-Clamp-Modus umgestellt.

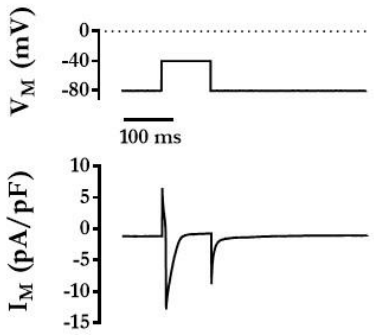

Abbildung 14: Schneller Na^+-Strom bei Perforated-Patch-Clamp-Experimenten.
V_M Membranspannung, I_M Membranstrom.
Als Bestätigung dafür, dass ein Zugang zur Zelle vorlag, wurde nach wenigen Minuten als Antwort auf einen Testpuls (0,5 Hz; oben) ein schneller Na^+-Strom (unten) sichtbar.

Es wurden zwei verschiedene Methoden zur Messung der Aktionspotentiale angewandt: Einerseits die „klassische" Version, bei der die Zelle über die Pipettenelektrode stimuliert wurde, und anderseits eine Methode, bei der die Stimulation der Zelle über ein elektrisches Feld erfolgte.

Die Stimulation über die Pipettenelektrode geschah in 0,2 nA Schritten von 0,2 – 2,0 nA (2 ms bei 1 Hz), wobei die Stromstärke solange um 0,2 nA erhöht wurde, bis ein AP auslösbar war. Erfolgte die Stimulation über ein elektrisches Feld, so wurde kein Strompuls injiziert. Die Stimulationsfrequenz betrug 0,25 – 1 Hz. Hierbei wurde für jede Zelle einzeln ausgetestet, bei welcher Frequenz, sich am besten ein AP auslösen ließ. Falls notwendig, wurde ggf. bei beiden Methoden ein hyperpolarisierender Strom injiziert, um das RMP auf unter -60 mV zu klemmen.

Für jede Zelle wurden das RMP, die APA und die APD bei 20 % (APD_{20}), 50 % (APD_{50}) und 90 % (APD_{90}) der Repolarisation bestimmt. Außerdem wurde die Repolarisationsfraktion (RF) berechnet (vgl. Horváth et al. 2018).

$$\boldsymbol{RF = \frac{APD_{90} - APD_{50}}{APD_{90}}}$$

2.9 Statistische Auswertung der Daten

2.9.1 Verwendete Software und verwendete statistische Tests

Zur Analyse der Rohdaten wurde die Software Clampfit 10.7 (pClamp Software V10.7, Molecular Devices, USA) verwendet.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (*standard error oft the mean*, SEM). Zudem wurde die Anzahl der untersuchten Zellen (n = Anzahl der iPSC-CMs) angegeben.

Daten mit einer n-Zahl ≥ 30 wurden als normalverteilt angesehen. Bei n-Zahlen zwischen 10 und 30 wurde mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung getestet. Lag keine Normalverteilung vor, erfolgte die Logarithmierung der Daten und anschließend erneut der Test auf Normalverteilung. Um auf Signifikanz zu testen, wurde bei normalverteilten Daten der Student's t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Wurde dieser an logarithmierten Daten durchgeführt, so ist dies bei einem signifikanten Ergebnis im Text und in den Legenden gekennzeichnet. Bei nicht-normalverteilten Daten und Daten mit einer n-Zahl unter zehn wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Auch hier wurden die entsprechenden Stellen im Falle einer Signifikanz gekennzeichnet. Als signifikant wurden Werte von $p \leq 0{,}05$ (*$p \leq 0{,}05$; **$p \leq 0{,}01$; ***$p \leq 0{,}001$, p**** $\leq 0{,}0001$) betrachtet. Für Experimente mit Nifedipin, bei denen die Ergebnisse unter 1 µM und 10 µM Nifedipin jeweils mit denen ohne Nifedipin verglichen wurden, wurde eine Bonferoni-Korrektur vorgenommen.

$$p_{korr} = p \cdot n$$

Hierbei entspricht der korrigierte p-Wert dem p-Wert des Experiments multipliziert mit der Anzahl der durchgeführten Tests (= n). Im Falle der Nifedipin-Experimente war n = 2.

Die Analyse, ob eine Abhängigkeit eines Messwerts von einem bestimmten Faktor (z. B. Zeitabhängigkeit) bestand, wurde mittels linearer Regression durchgeführt.

Unterschiede im Auftreten von späten Nachdepolarisationen bzw. spontaner elektrischer Aktivität im Vergleich zwischen Ctl- und TOF-Gruppe wurden mithilfe des Fisher-Tests auf Signifikanz geprüft.

Die statistischen Berechnungen erfolgten mithilfe des Computerprogramms GraphPad Prism7 (GraphPad Software, USA).

2.9.2 Ein- und Ausschlusskriterien in der Analyse

Für die Analysen zur Zellgröße wurden alle Versuche betrachtet (junge und alte Zellen, Messungen zur Ca^{2+}-Homöostase sowie AP-Messungen). Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Zelle doppelt verwendet wurde.

Bei den Messungen zur Ca^{2+}-Homöostase wurden für die Analyse des $I_{Ca,L}$ und des korrespondierenden CaT nur Zellen verwendet, bei denen sowohl der $I_{Ca,L}$ als auch ein korrespondierender CaT aufgezeichnet wurden. Eine Ausnahme bildete die Analyse zur Zeitabhängigkeit des $I_{Ca,L}$: Hierfür wurden alle $I_{Ca,L}$-Messungen verwendet, unabhängig davon, ob ein korrespondierender CaT aufgezeichnet wurde oder nicht. Um die CaTs zu analysieren, wurden nur Zellen verwendet, welche eine diastolische $[Ca^{2+}]_i$ unter 1.000 nM hatten.

In der Analyse der Strom-Spannungs-Kurven wurden nur vollständige IV-Kurven betrachtet.

Bei den Experimenten mit Nifedipin wurde zudem darauf geachtet, dass für jede Zelle eine IV-Kurve bzw. ein CaT mit und ohne Nifedipin vorhanden war.

Für die Bestimmung der sarkoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration und Berechnung der SERCA2a-Aktivität war entscheidend, dass in jeder Zelle sowohl ein koffeininduzierten CaT als auch ein NCX-Strom vorhanden war.

Beim Analysieren der AP-Messungen wurden nur Zellen verwendet, die einen Peak im Aktionspotential von über 0 mV hatten und deren Ruhemembranpotential unter -60 mV lag.

3 Ergebnisse

3.1 Beobachtungen in der Zellkultur

Im Rahmen des Ausplattierens der Zellen wurden diese mithilfe eines Casytons bzw. einer Neubauerzählkammer gezählt (vgl. Abschnitt 2.5.2).

Direkt nach dem Auftauen war der mittlere Durchmesser zwischen TOF- und Ctl-Zellen vergleichbar (Abbildung 15.A). Auch im mittleren Volumen bestand kein signifikanter Unterschied (Abbildung 15.B).

Die Viabilität war zwischen TOF- und Ctl-Zellen ebenfalls ähnlich (Abbildung 15.C).

Insgesamt befanden sich durchschnittlich $1{,}75 \pm 0{,}47 * 10^6$ Ctl-Zellen in einem Milliliter Lösung. Bei den TOF-Zellen waren es durchschnittlich $1{,}76 \pm 0{,}60 * 10^6$ Zellen pro Milliliter Lösung.

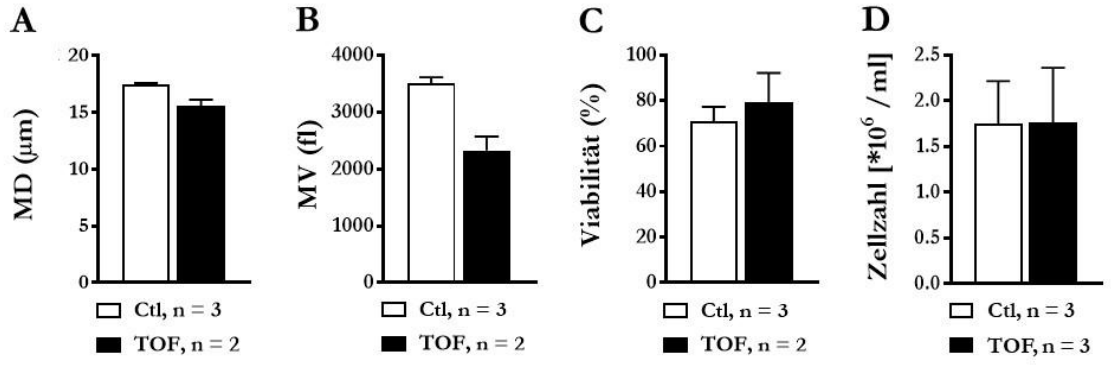

Abbildung 15: Ergebnisse des Casytons.
Vor dem Ausplattieren wurden die iPSC-CMs mithilfe eines Casytons bzw. einer Neubauerzählkammer gezählt.
A: Mittlerer Durchmesser (MD) der iPSC-CMs.
B: Mittleres Volumen (MV) der iPSC-CMs.
C: Viabilität der iPSC-CMs.
D: Zellzahl der iPSC-CMs pro Milliliter Lösung.
n entspricht der Anzahl der ausplattierten Chargen. Eine Charge enthielt ca. 6 Mio. Zellen.
Hinweis: Die unterschiedlichen n-Werte bei den TOF-Zellen kamen dadurch zustande, dass eine Charge manuell mithilfe einer Zählkammer gezählt wurden (der Casyton war defekt), weshalb mittlerer Durchmesser, mittleres Volumen und Viabilität nicht bestimmt werden konnten.

Etwa ab Tag 7 nach Auftauen und Ausplattieren der Zellen schlugen die ersten iPSC-CMs spontan. Nach 13 Tagen konnte ein regelmäßiges spontanes Schlagen beobachtet werden.

Ungefähr einen Monat nach Auftauen und Ausplattieren der Zellen waren die ersten toten Zellen auf den Cover-Slips zu sehen. Mit zunehmendem Alter bildeten die Zellen Vakuolen aus und schrumpften. Die Herstellung eines Gigaseals war dann erschwert.

3.2 Morphologie der Zellen

Die iPSC-CMs waren sowohl in der TOF- als auch in der Ctl-Grupppe relativ klein und hatten eine runde, ovale oder längliche Form (Abbildung 16).

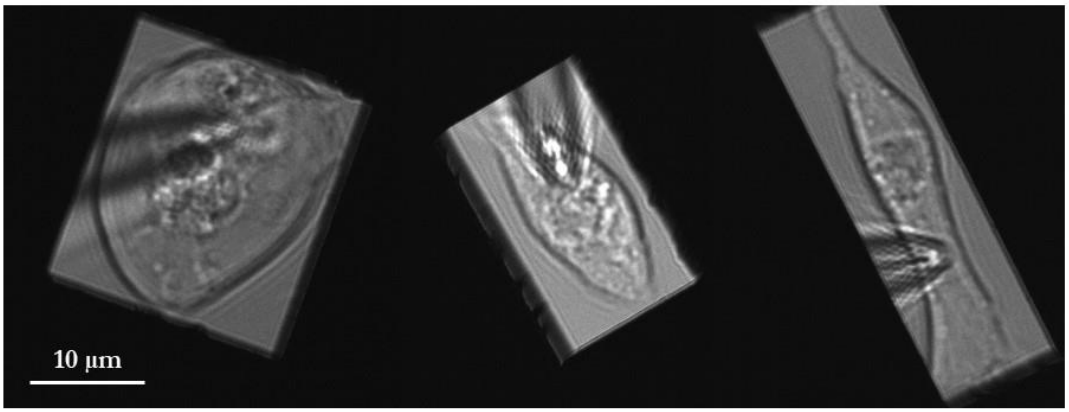

Abbildung 16: Morphologie der iPSC-CMs.
Runde, ovale oder längliche Form der iPSC-CMs.

3.3 Zellgröße

Bei jedem gemessenen iPSC-CM wurde die Membrankapazität bestimmt, welche eine Aussage über die Zellgröße erlaubte (vgl. Abschnitt 2.1.5.2). Im Durchschnitt waren TOF- und Ctl-Zellen gleich groß (51,38 ± 7,82 pF, n = 64 vs. 57,69 ± 9,00 pF, n = 105; p = 0,6294; Abbildung 17.A).

Jedoch zeigte sich, dass größere Zellen einen größeren $I_{Ca,L}$ ausbildeten (r^2 = 0,09928, n = 80; Abbildung 17.B). Der $I_{Ca,L}$ wurde daher auf die Zellgröße normiert und als Stromdichte in pA/pF angegeben.

Zudem fiel eine starke Abhängigkeit der Membrankapazität von der Zelldichte auf (Ctl: r^2 = 0,4943, n = 105 bzw. TOF: r^2 = 0,1048, n = 64; Abbildung 17.C und D).

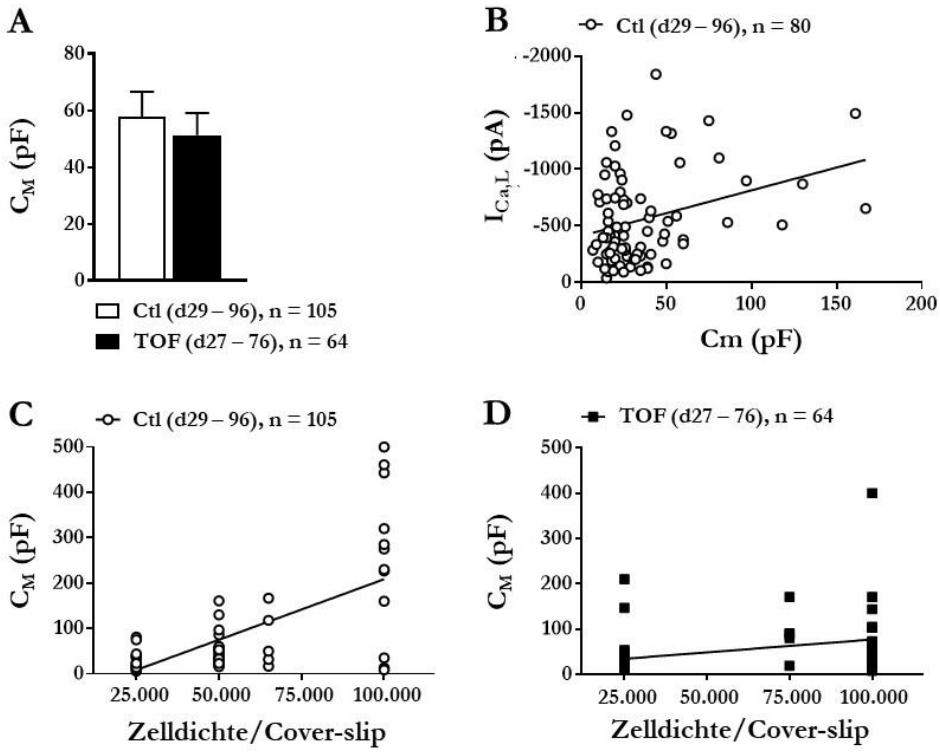

Abbildung 17: Zellgröße.

C_M Membrankapazität, $I_{Ca,L}$ L-Typ-Ca2+-Strom.

A: Mittelwert ± SEM der C_M in Ctl- und TOF-iPSC-CMs (alle Versuche).

B: Abhängigkeit des $I_{Ca,L}$ von der C_M in Ctl-iPSC-CMs.

C: Abhängigkeit der C_M von der Zelldichte pro Cover-Slip in den Ctl-iPSC-CMs.

D: Abhängigkeit der C_M von der Zelldichte pro Cover-Slip in den TOF-iPSC-CMs.

n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs .

Bei einer Dichte von 25.000 Zellen pro Cover-Slip lagen die iPSC-CMs einzeln isoliert vor. Bei einer Dichte von 100.000 Zellen pro Cover-Slip bestand eine enge räumliche Nähe der iPSC-CMs und sie bildeten ggf. ein funktionelles Synzytium aus (Abbildung 18). Messungen zur Ca^{2+}-Homöostase wurden bei einer Zelldichte von 25.000 bis 65.000 Zellen pro Cover-Slip, Aktionspotentialmessungen bei einer Dichte von 75.000 bis 100.000 Zellen pro Cover-Slip durchgeführt. Je dichter die Zellen ausplattiert waren, desto besser ließen sie sich feldstimulieren.

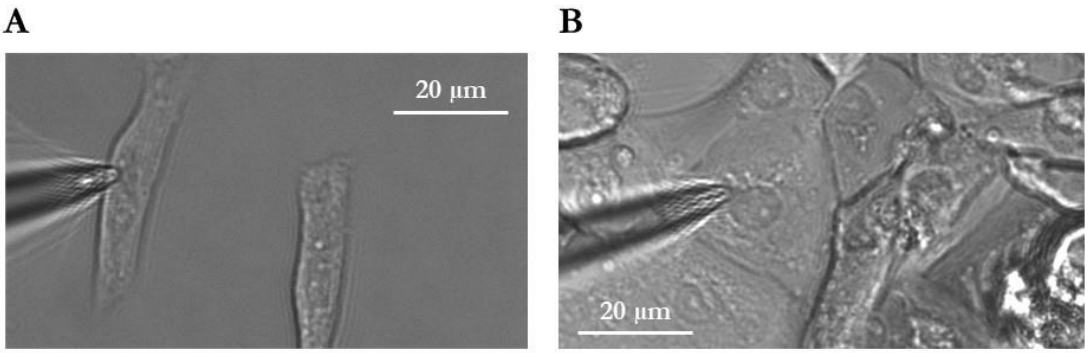

Abbildung 18: Unterschiedlich dicht ausplattierte Zellen.
A: Zelldichte von 25.000 Zellen pro Cover-Slip. Die Zellen liegen einzeln ohne Verbindung zueinander.
B: Zelldichte von 100.000 Zellen pro Cover-Slip. Die Zellen liegen eng beieinander und können Zell-Zell-Verbindungen ausbilden.

3.4 Messungen zur Calciumhomöostase

Der L-Typ-Ca^{2+}-Strom wurde simultan zu den korrespondierenden Ca^{2+}-Transienten mittels Whole-Cell-Patch-Clamp-Technik im Voltage-Clamp-Modus und Epifluoreszenz (Fluo-3) gemessen (vgl. Abschnitt 2.2 und Abschnitt 2.7).

3.4.1 Zeitabhängigkeit des L-Typ-Calciumstroms und der getriggerten Calciumtransienten

Beim Analysieren der Daten fiel auf, dass der L-Typ-Ca^{2+}-Strom der Ctl-iPSC-CMs in Abhängigkeit vom Messtag variierte: Im Zeitraum von Tag 29 bis Tag 42 der Differenzierung zeigte der $I_{Ca,L}$ eine geringe Streubreite. Auch die Herstellung eines Gigaseals gelang in diesem Zeitraum am besten. Je älter die Zellen wurden (d47 – 96), desto mehr variierte die Größe des $I_{Ca,L}$ und auch die Herstellung eines Gigaseals war erschwert (Abbildung 19.A).

In der Strom-Spannungs-Kurve zeigte sich, dass weiter differenzierte Ctl-Zellen einen durchschnittlich größeren $I_{Ca,L}$ (Abbildung 19.B und C) hatten. Zudem war der Peak der IV-Kurve bei den alten Zellen zu positiveren Werten hin verschoben (-3,08 ± 1,44 mV, n = 39 vs. -10,00 ± 1,88 mV, n = 16; p = 0,0025 im Mann-Whitney-Test; Abbildung 19.D).

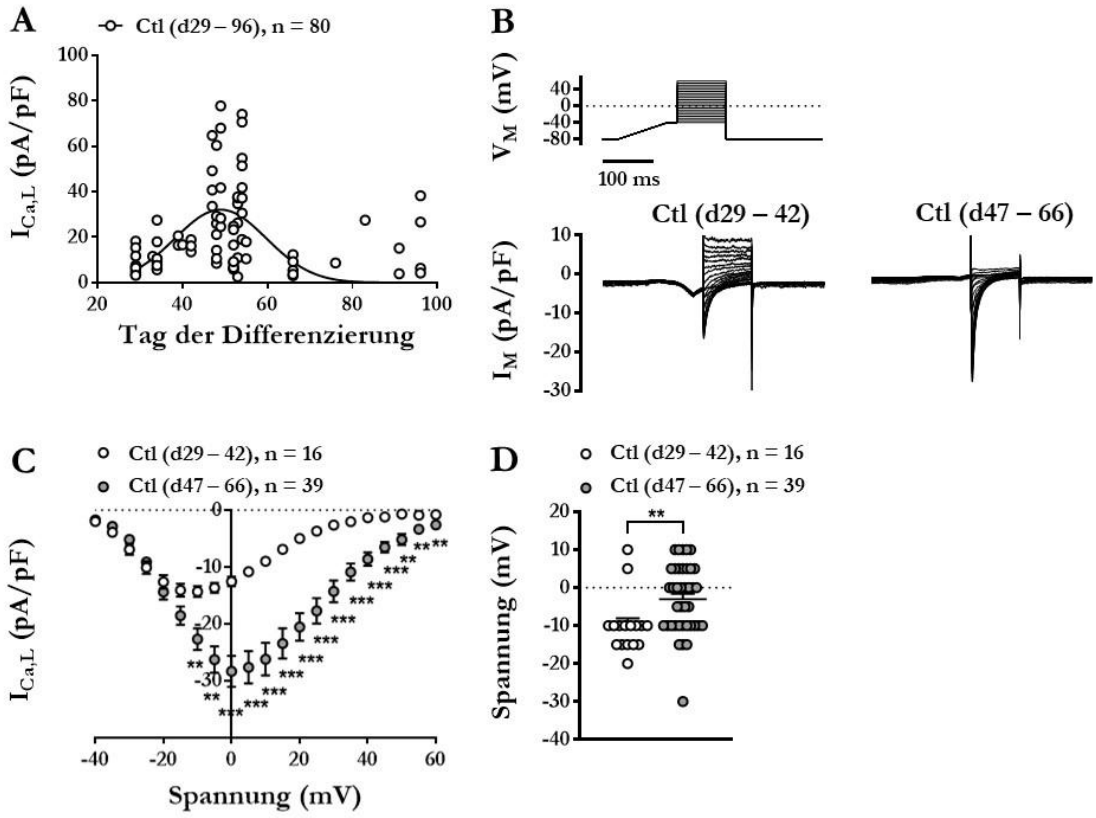

Abbildung 19: Zeitabhängigkeit in den Ctl-Zellen – Strom-Spannungs-Kurve.

$I_{Ca,L}$ L-Typ-Ca^{2+}-Strom, V_M Membranspannung, I_M Membranstrom.

A: Abhängigkeit des $I_{Ca,L}$ vom Messtag (alle Messwerte).

B: Voltage-Clamp-Protokoll (0,5 Hz; oben) und Beispiel-Messungen der IV-Kurve in jungen (links) und alten (rechts) Ctl-iPSC-CMs.

C: Mittelwerte der IV-Kurve in jungen und alten Ctl-iPSC-CMs. **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.
Hinweis: Bei +20 mV, +25 mV, +30 mV, +45 mV, +55 mV und +60 mV wurde der t-Test an logarithmierten Daten durchgeführt, um eine Normalverteilung zu erzielen.

D: Peak der IV-Kurve in jungen und alten Ctl-iPSC-CMs. **p ≤ 0,01 im Mann-Whitney-Test.
n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs.

Der Durchschnittswert des Peaks des $I_{Ca,L}$ war in den alten Ctl-iPSC-CMs (d47 – 66) im Vergleich zu den jungen Ctl-iPSC-CMs (d29 – 42) signifikant erhöht (-26,11 ± 3,03 pA/pF, n = 31 vs. -9,88 ± 1,07 pA/pF, n = 20; p = 0,0001; Abbildung 20.A und B).

Der höhere $I_{Ca,L}$ triggerte einen ebenfalls höheren CaT: Während die diastolische $[Ca^{2+}]_i$ sich zwischen jungen und alten Zellen nicht unterschied, war die systolische $[Ca^{2+}]_i$ und damit auch die Amplitude des CaT in den alten Zellen signifikant erhöht (systolische $[Ca^{2+}]_i$: 464,23 ± 34,09 nM, n = 31 vs. 356,25 ± 24,62 nM, n = 20; p = 0,0257; Amplitude: 194,34 ± 23,80 nM, n = 31 vs. 124,11 ± 19,18 nM, n = 20; p = 0,0383 im t-Test an logarithmierten Daten; Abbildung 20.A und D). Dagegen war die Zeit bis zum Peak des CaT in den alten Ctl-Zellen im Vergleich zu den jungen Ctl-Zellen verkürzt (116,34 ± 4,05 ms, n = 31 vs. 149,97 ± 10,21 ms, n = 20; p = 0,0007 im t-Test an logarithmierten Daten; Abbildung 20.E). Folglich zeigten auch die systolische $[Ca^{2+}]_i$ und

die Zeit bis zum Peak des CaT eine Abhängigkeit vom Messtag (systolische $[Ca^{2+}]_i$: $r^2 = 0{,}1862$, n = 51 bzw. Zeit bis zum Peak: $r^2 = 0{,}2394$, n = 51; Abbildung 20.F und G). Die Abklingkonstante des getriggerten systolischen CaT war in den alten Ctl-iPS-CMs im Vergleich zu den jungen Zellen erhöht (2,29 ± 0,32 s^{-1}, n = 31 vs. 1,17 ± 0,25 s^{-1}, n = 20; p = 0,0046 im Mann-Whitney-Test; Abbildung 20.C).

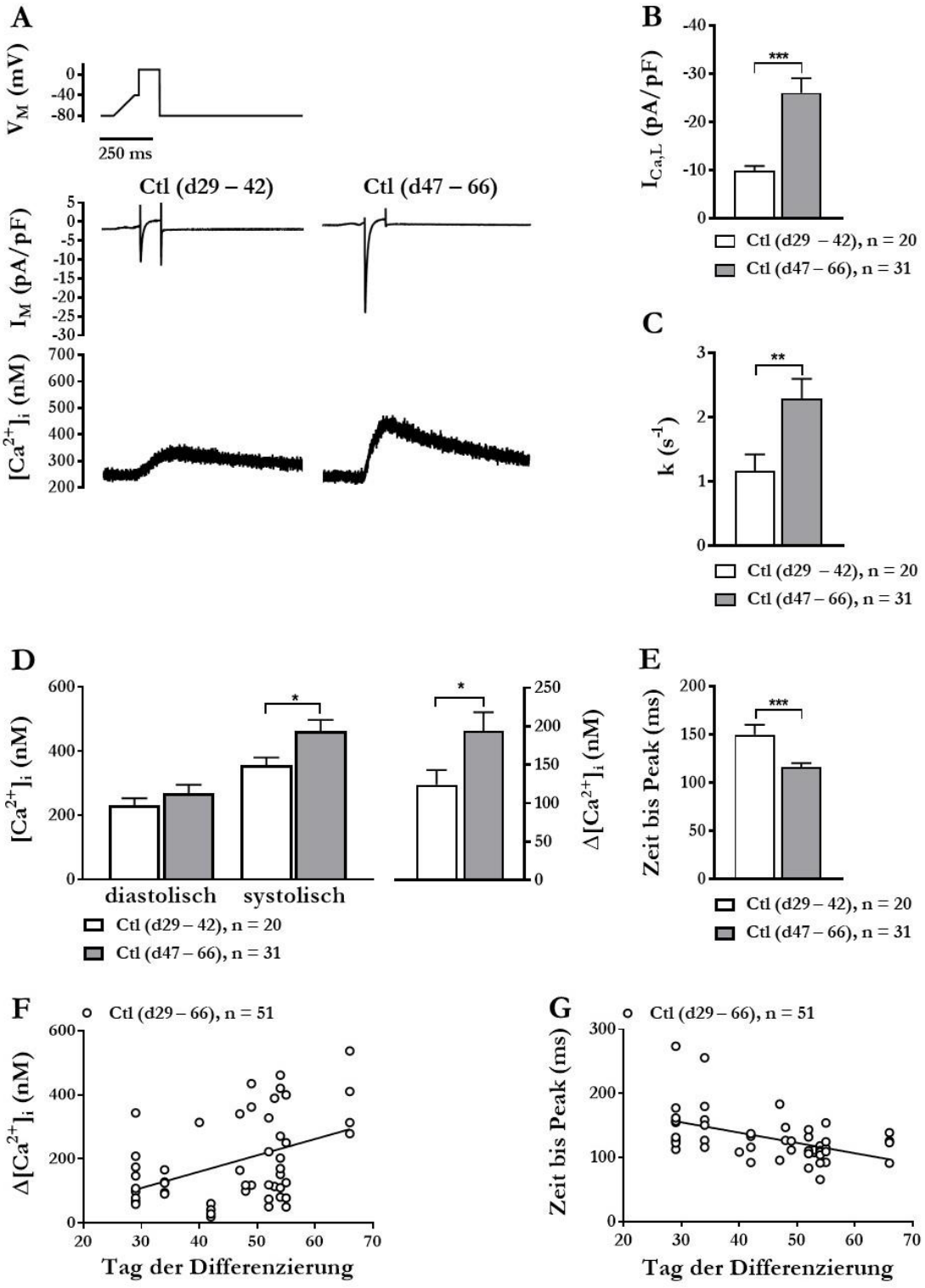

Abbildung 20: Zeitabhängigkeit in den Ctl-Zellen – L-Typ-Ca^{2+}-Strom und getriggerte Ca^{2+}-Transienten.

V_M Membranspannung, I_M Membranstrom, $[Ca^{2+}]_i$ intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration, $I_{Ca,L}$ L-Typ-Ca^{2+}-Strom, CaT Ca^{2+}-Transient.

A: Voltage-Clamp-Protokoll (0,5 Hz; oben) und simultane Beispiel-Messungen des $I_{Ca,L}$ (Mitte) sowie des getriggerten CaT (unten) in jungen (links) und alten (rechts) Ctl-iPSC-CMs.

B: Mittelwert ± SEM des Peaks des $I_{Ca,L}$ in jungen und alten Ctl-iPSC-CMs. ***$p \leq 0{,}001$.

C: Mittelwert ± SEM der Abklingkonstanten des getriggerten CaT in jungen und alten Ctl-iPSC-CMs. **$p \leq 0{,}01$ im Mann-Whitney-Test.

D: Mittelwert ± SEM der diastolischen und systolischen $[Ca^{2+}]_i$ (links) und der resultierenden CaT-Amplitude (rechts) in jungen und alten Ctl-iPSC-CMs. *$p \leq 0{,}05$.

Hinweis: Bei der Amplitude wurde der t-Test an logarithmierten Daten durchgeführt, um eine Normalverteilung zu erzielen.

E: Mittelwert ± SEM der Zeit bis zum Peak des CaT in jungen und alten Ctl-iPSC-CMs. ***$p \leq 0{,}001$.

Hinweis: Der t-Test wurde an logarithmierten Daten durchgeführt, um eine Normalverteilung zu erzielen.

F: Abhängigkeit der Amplitude des CaT vom Messtag.

G: Abhängigkeit der Zeit bis zum Peak des CaT vom Messtag.

n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde beschlossen, für die Messungen zur Ca^{2+}-Homöostase nur Ctl- bzw. TOF-Zellen im Zeitraum von Tag 27 bis Tag 42 der Differenzierung (entspricht Tag 7 bis Tag 22 nach Auftauen und Ausplattieren der Zellen) zu verwenden.

3.4.2 Unterschiede zwischen Kontroll- und TOF-Zellen

Auf depolarisierende Spannungssprünge zeigten sowohl die Ctl- als auch die TOF-iPSC-CMs L-Typ-Ca^{2+}-Ströme mit einer typischen glockenförmigen Strom-Spannungs-Beziehung. Die Form der IV-Kurve war zwischen Ctl- und TOF-Gruppe vergleichbar. Die Mittelwerte der IV-Kurve in den TOF-Zellen waren ab +5 mV signifikant größer (Abbildung 21.A und B). Dagegen war der Peak der IV-Kurve nicht verschoben (Abbildung 21.C).

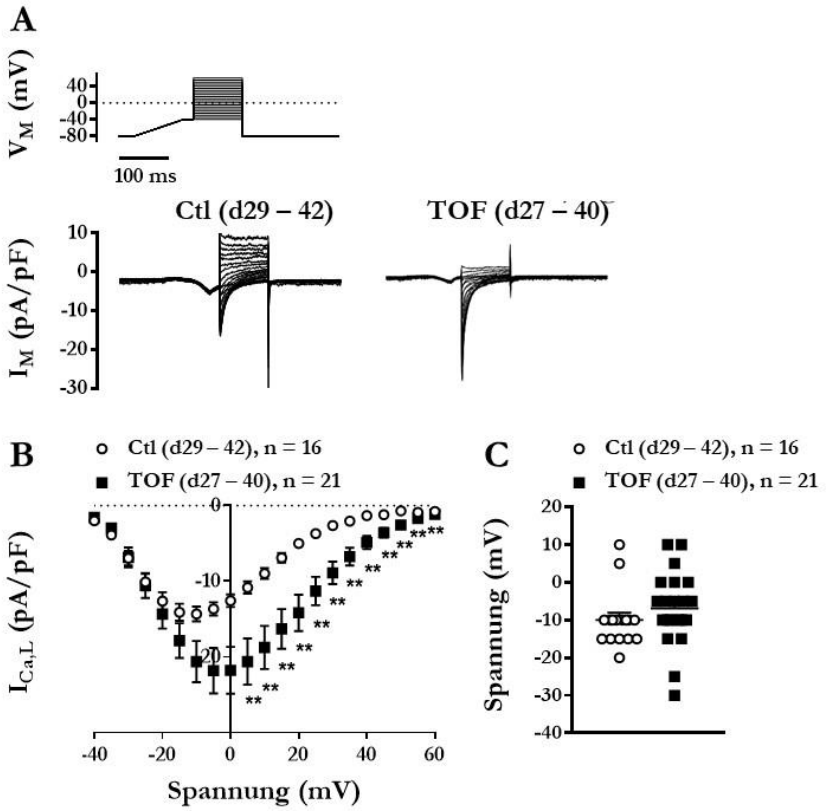

Abbildung 21: Unterschiede zwischen Ctl- und TOF-Zellen – Strom-Spannungs-Kurve.
V_M Membranspannung, I_M Membranstrom, $I_{Ca,L}$ L-Typ-Ca^{2+}-Strom.
A: Voltage-Clamp-Protokoll (0,5 Hz; oben) und Beispiel-Messungen der IV-Kurve in Ctl- (links) und TOF- (rechts) iPSC-CMs.
B: Mittelwerte der IV-Kurve in Ctl- und TOF-iPSC-CMs. **p ≤ 0,01.
Hinweis: Bei +20 mV bis +45 mV, +55 mV und +60 mV wurde der t-Test an logarithmierten Daten durchgeführt, um eine Normalverteilung zu erzielen.
C: Peak der IV-Kurve in Ctl- und TOF-iPSC-CMs.
n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs.

Die Amplitude des $I_{Ca,L}$ war in den TOF-Zellen im Vergleich zu den Ctl-Zellen signifikant erhöht (-19,43 ± 2,56 pA/pF, n = 23 vs. -9,88 ± 1,07 pA/pF, n = 20; p = 0,0022; Abbildung 22.A und B).

Der höhere $I_{Ca,L}$ triggerte einen ebenfalls höheren CaT: Sowohl die diastolische $[Ca^{2+}]_i$ (438,10 ± 53,16 nM, n = 23 vs. 232,13 ± 21,69 nM, n = 20; p = 0,0015) als auch die systolische $[Ca^{2+}]_i$ (663,53 ± 64,78 nM, n = 23 vs. 356,25 ± 24,62 nM, n = 20; p = 0,0001) war in den TOF-Zellen erhöht. Daraus folgte eine ebenfalls höhere Amplitude des CaT (225,43 ± 28,22 nM, n = 23 vs. 124,11 ± 19,18 nM, n = 20; p = 0,0093 im t-Test an logarithmierten Daten; Abbildung 22.A und D). Die Zeit bis zum Peak des CaT war zwischen Ctl- und TOF-Gruppe vergleichbar (Abbildung 22.E). Der Unterschied in der Abklingkonstante des getriggerten CaT zwischen TOF- und Ctl-iPSC-CMs war nicht signifikant (1,75 ± 0,42 s^{-1}, n = 23 vs. 1,17 ± 0,25 s^{-1}, n = 20; p = 0,1948 im Mann-Whitney-Test; Abbildung 22.C).

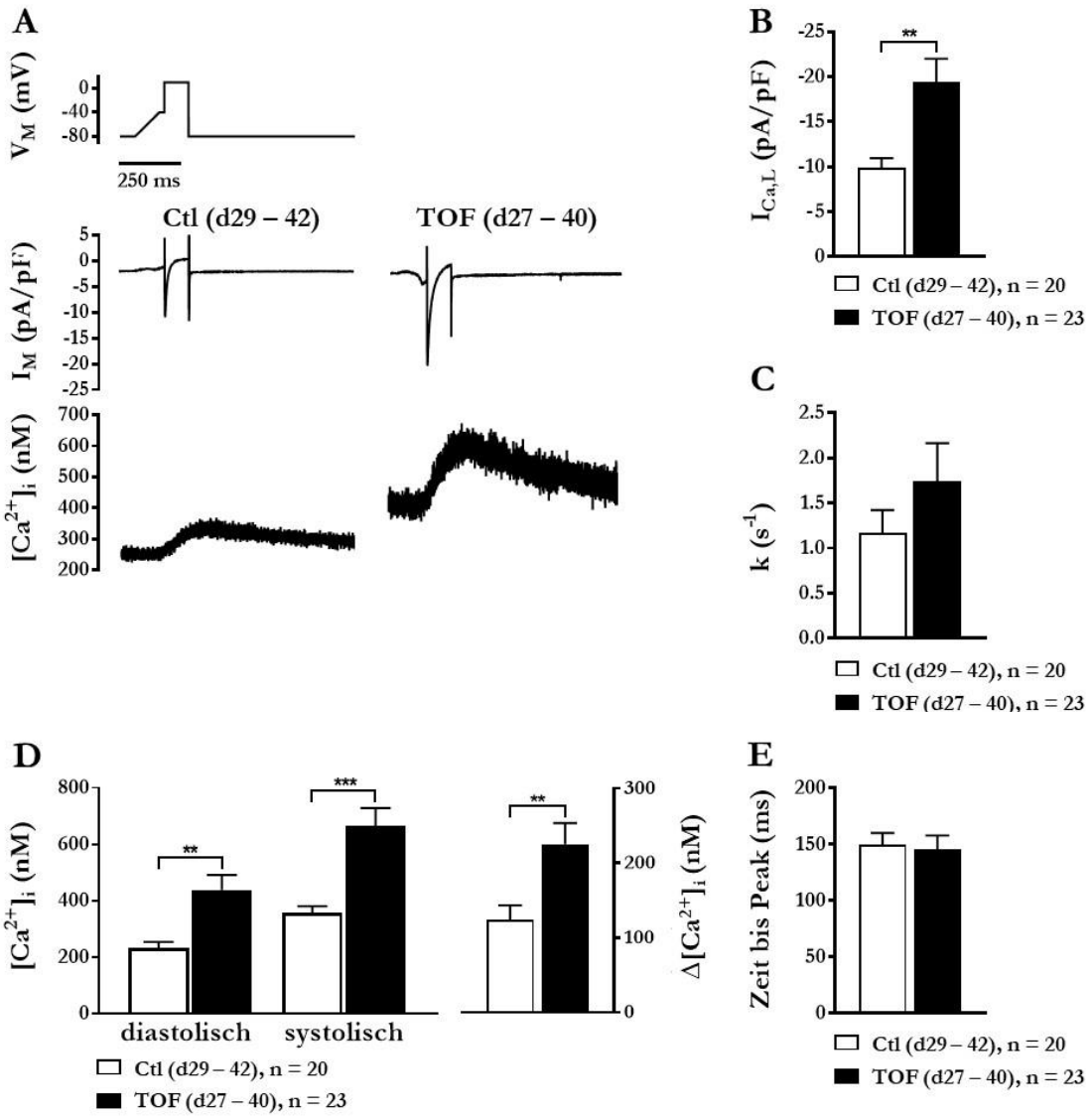

Abbildung 22: Unterschiede zwischen Ctl- und TOF-Zellen – L-Typ-Ca^{2+}-Strom und getriggerte Ca^{2+}-Transienten.

V_M Membranspannung, I_M Membranstrom, $[Ca^{2+}]_i$ intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration, $I_{Ca,L}$ L-Typ-Ca^{2+}-Strom, k Abklingkonstante des getriggerten Ca^{2+}-Transienten (CaT).

A: Voltage-Clamp-Protokoll (0,5 Hz; oben) und simultane Beispiel-Messungen des $I_{Ca,L}$ (Mitte) sowie des getriggerten CaT (unten) in Ctl- (links) und TOF- (rechts) iPSC-CMs.

B: Mittelwert ± SEM des Peaks des $I_{Ca,L}$ in Ctl- und TOF-iPSC-CMs. **$p \leq 0{,}01$.

C: Mittelwert ± SEM der Abklingkonstanten des getriggerten CaT in Ctl- und TOF-iPSC-CMs.

D: Mittelwert ± SEM der diastolischen und systolischen $[Ca^{2+}]_i$ (links) und der resultierenden CaT-Amplitude (rechts) in Ctl- und TOF-iPSC-CMs. **$p \leq 0{,}01$; ***$p \leq 0{,}001$.

Hinweis: Bei der Amplitude wurde der t-Test an logarithmierten Daten durchgeführt, um eine Normalverteilung zu erzielen

E: Mittelwert ± SEM der Zeit bis zum Peak des CaT in Ctl- und TOF-iPSC-CMs.

n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs.

3.4.3 Nifedipinsensitivität des L-Typ-Calciumstroms

Die Identität des gemessenen depolarisierenden Einwärtsstroms wurde durch Nifedipin bestätigt (vgl. Abschnitt 2.6.6 und Abschnitt 2.7).

3.4.3.1 Strom-Spannungs-Kurve

Beim Aufzeichnen der Strom-Spannungs-Kurve unter 1 µM und 10 µM Nifedipin zeigte sich, dass der $I_{Ca,L}$ sowohl in den Ctl-Zellen (d52 – 66, Abbildung 23.A und B) als auch in den TOF-Zellen (d30, Abbildung 24.A und B) durch Nifedipin fast vollständig supprimierbar war. Der Peak der IV-Kurve wurde durch Nifedipin in beiden Gruppen nicht verschoben (Abbildung 23.C und Abbildung 24.C).

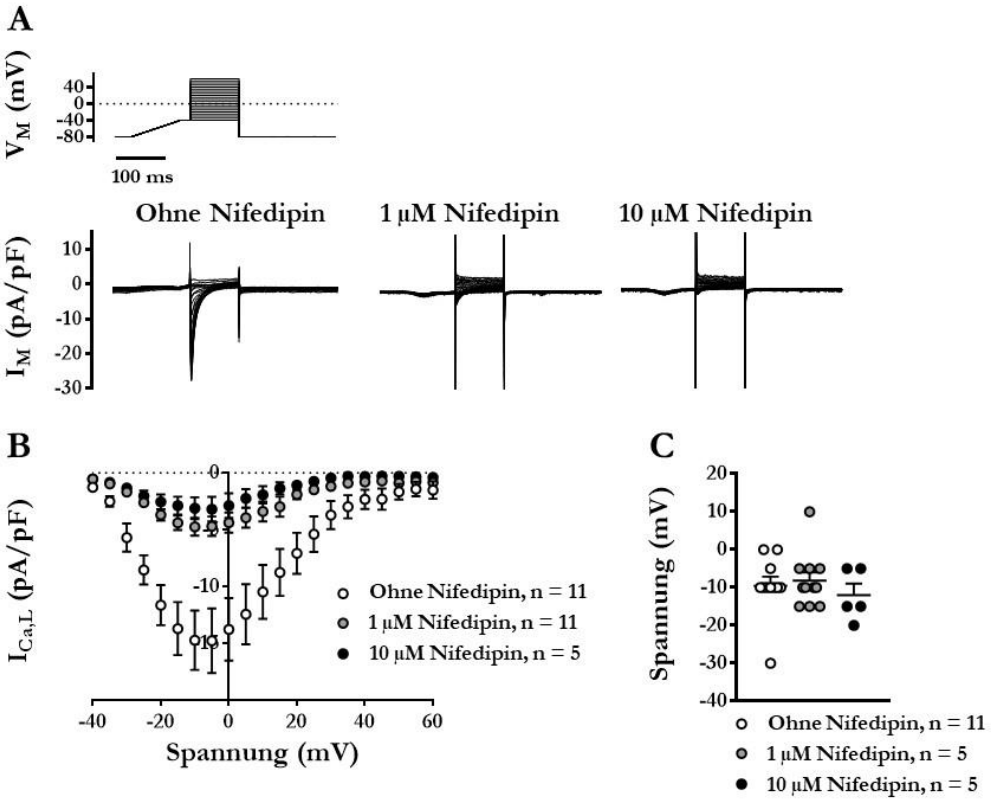

Abbildung 23: Nifedipinsensitivität der alten Ctl-Zellen (d52 – 66) – Strom-Spannungs-Kurve.

V_M Membranspannung, I_M Membranstrom, $I_{Ca,L}$ L-Typ-Ca^{2+}-Strom.

A: Voltage-Clamp-Protokoll (0,5 Hz; oben) und Beispiel-Messungen der IV-Kurve ohne Nifedipin (links), mit 1 µM Nifedipin (Mitte) und mit 10 µM Nifedipin (rechts).

B: Mittelwerte der IV-Kurve ohne Nifedipin, mit 1 µM Nifedipin und mit 10 µM Nifedipin.

Hinweis: Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf Signifikanzsternchen verzichtet.

C: Peak der IV-Kurve ohne Nifedipin, mit 1 µM Nifedipin und mit 10 µM Nifedipin.

n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs.

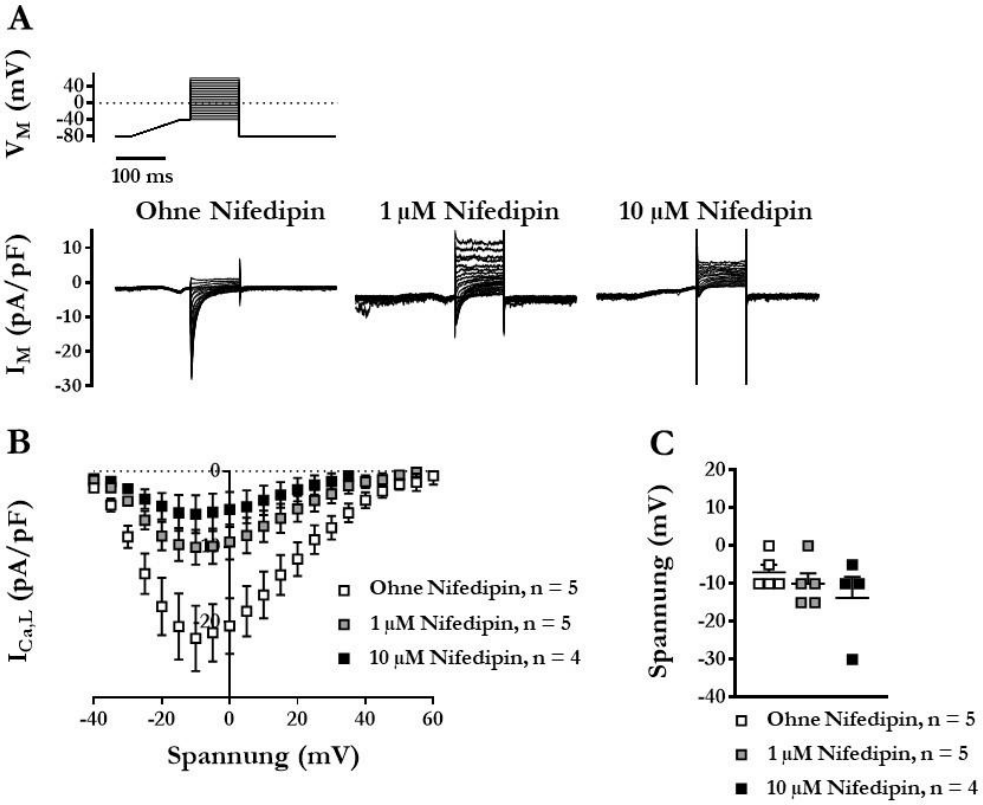

Abbildung 24: Nifedipinsensitivität der TOF-Zellen (d30) – Strom-Spannungs-Kurve.
V_M Membranspannung, I_M Membranstrom, $I_{Ca,L}$ L-Typ-Ca^{2+}-Strom.
A: Voltage-Clamp-Protokoll (0,5 Hz; oben) und Beispiel-Messungen der IV-Kurve ohne Nifedipin (links), mit 1 µM Nifedipin (Mitte) und mit 10 µM Nifedipin (rechts).
B: Mittelwerte der IV-Kurve ohne Nifedipin, mit 1 µM Nifedipin und mit 10 µM Nifedipin.
Hinweis: Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf Signifikanzsternchen verzichtet.
C: Peak der IV-Kurve ohne Nifedipin, mit 1 µM Nifedipin und mit 10 µM Nifedipin.
n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs.

3.4.3.2 Junge Kontrollzellen (d29 – 34)

Die Supprimierung des $I_{Ca,L}$ durch Nifedipin führte auch zu kleineren getriggerten CaTs: In den jungen Ctl-iPSC-CMs (d29 – 34) wurde nicht nur der $I_{Ca,L}$ durch 1 µM Nifedipin signifikant reduziert (-7,25 ± 0,67 pA/pF, n = 14 vs. -2,82 ± 0,52 pA/pF, n = 14; $p < 0{,}0001$ im t-Test an logarithmierten Daten; Abbildung 25.A und B), sondern auch die systolische $[Ca^{2+}]_i$ (338,57 ± 28,74 nM, n = 14 vs. 245,67 ± 31,79 nM, n = 14; p = 0,0395) und damit die Amplitude des CaT (133,61 ± 19,74 nM, n = 14 vs. 68,52 ± 17,71 nM, n = 14; p = 0,0009 im t-Test an logarithmierten Daten; Abbildung 25.A und C) waren unter Nifedipin signifikant kleiner.

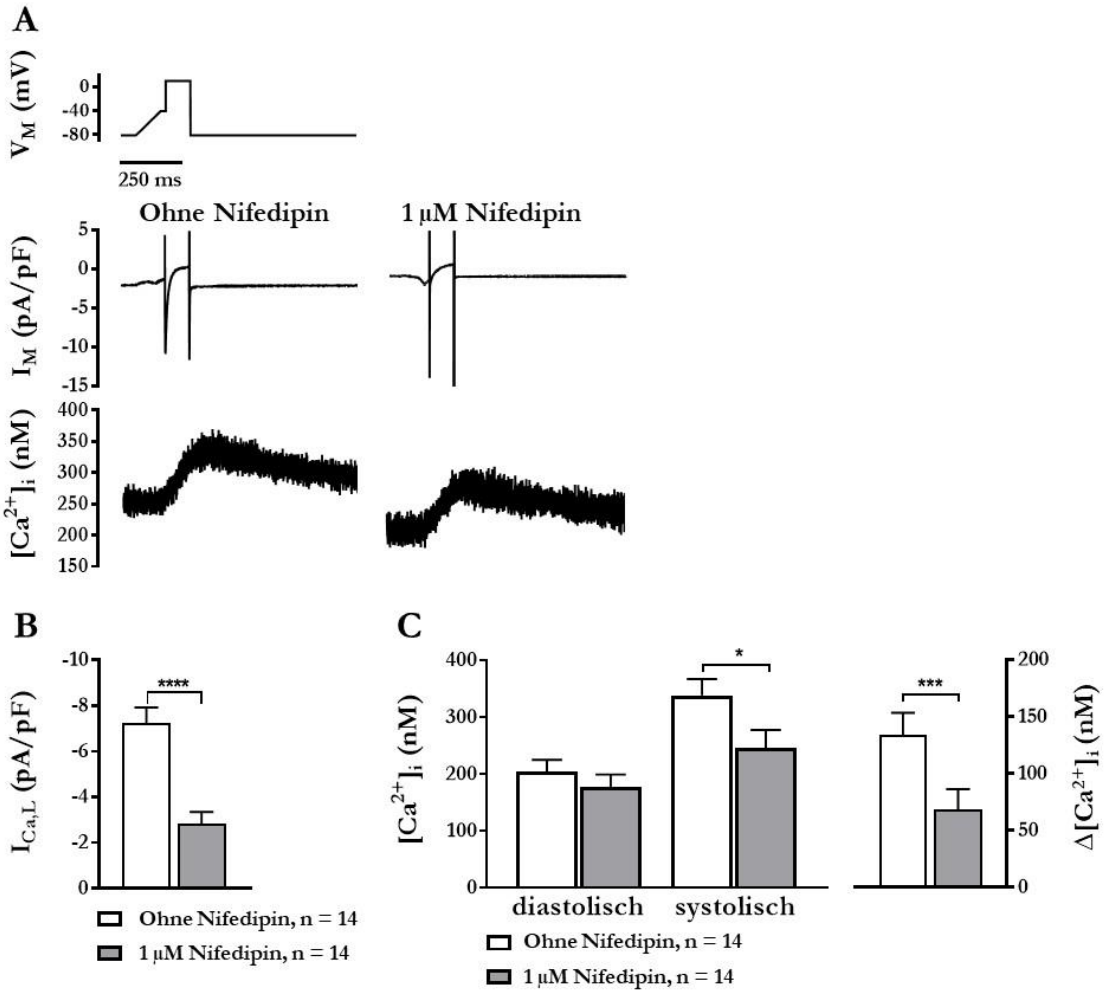

Abbildung 25: Nifedipinsensitivität der jungen Ctl-Zellen (d29 – 34) – L-Typ-Ca^{2+}-Strom und getriggerte Ca^{2+}-Transienten.

V_M Membranspannung, I_M Membranstrom, $[Ca^{2+}]_i$ intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration, $I_{Ca,L}$ L-Typ-Ca^{2+}-Strom, CaT Ca^{2+}-Transient.

A: Voltage-Clamp-Protokoll (0,5 Hz; oben) und simultane Beispiel-Messungen des $I_{Ca,L}$ (Mitte) sowie des getriggerten CaT (unten) in jungen Ctl-iPSC-CMs ohne Nifedipin (links) und mit 1 µM Nifedipin (rechts).

B: Mittelwert ± SEM des Peaks des $I_{Ca,L}$ in jungen Ctl-iPSC-CMs ohne Nifedipin und mit 1 µM Nifedipin. ****$p \leq 0{,}0001$.

Hinweis: Der t-Test wurde an logarithmierten Daten durchgeführt, um eine Normalverteilung zu erzielen.

C: Mittelwert ± SEM der diastolischen und systolischen $[Ca^{2+}]_i$ (links) und der resultierenden CaT-Amplitude (rechts) in jungen Ctl-iPSC-CMs ohne Nifedipin und mit 1 µM Nifedipin. *$p \leq 0{,}05$; ***$p \leq 0{,}001$.

Hinweis: Bei der Amplitude wurde der t-Test an logarithmierten Daten durchgeführt, um eine Normalverteilung zu erzielen.

n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs.

Hinweis: Messungen mit 10 μM Niefedipin wurden für die jungen Ctl-Zellen leider nicht durchgeführt, da sich erst im Verlauf der Experimente zeigte, dass eine höhere Konzentration an Nifedipin sinnvoll ist.

3.4.3.3 Alte Kontrollzellen (d52 – 66)

Auch in den alten Ctl-Zellen (d52 – 66) wurde der $I_{Ca,L}$ durch 1 μM und 10 μM Nifedipin deutlich reduziert (-7,99 ± 2,10 pA/pF, n = 9 ohne Nifedipin vs. -3,82 ± 1,00 pA/pF, n = 9 mit 1 μM Nifedipin; p_{korr} = 0,1006 im Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur bzw. -7,99 ± 2,10 pA/pF, n = 9 ohne Nifedipin vs. -2,44 ± 1,10 pA/pF, n = 5 mit 10 μM Nifedipin; p_{korr} = 0,0380 im Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur; Abbildung 26.A und B). Die systolische $[Ca^{2+}]_i$ war unter Nifedipin ebenfalls geringer (485,67 ± 89,83 mM, n = 9 ohne Nifedipin vs. 314,74 ± 39,83 mM, n = 9 mit 1 μM Nifedipin; p_{korr} = 0,2270 im Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur bzw. 485,67 ± 89,83 mM, n = 9 ohne Nifedipin vs. 260,40 ± 18,83 nM, n = 5 mit 10 μM Nifedipin; p_{korr} = 0,0350 im Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur; Abbildung 26.A und C), was folglich zu einer kleineren CaT-Amplitude führte (137,91 ± 32,69 nM, n = 9 ohne Nifedipin vs. 64,59 ± 24,24 nM, n = 9 mit 1 μM Nifedipin; p_{korr} = 0,0488 im Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur bzw. 137,91 ± 32,69 nM, n = 9 ohne Nifedipin vs. 23,29 ± 3,97 nM, n = 5 mit 10 μM Nifedipin; p = 0,0020 im Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur; Abbildung 26.A und C).

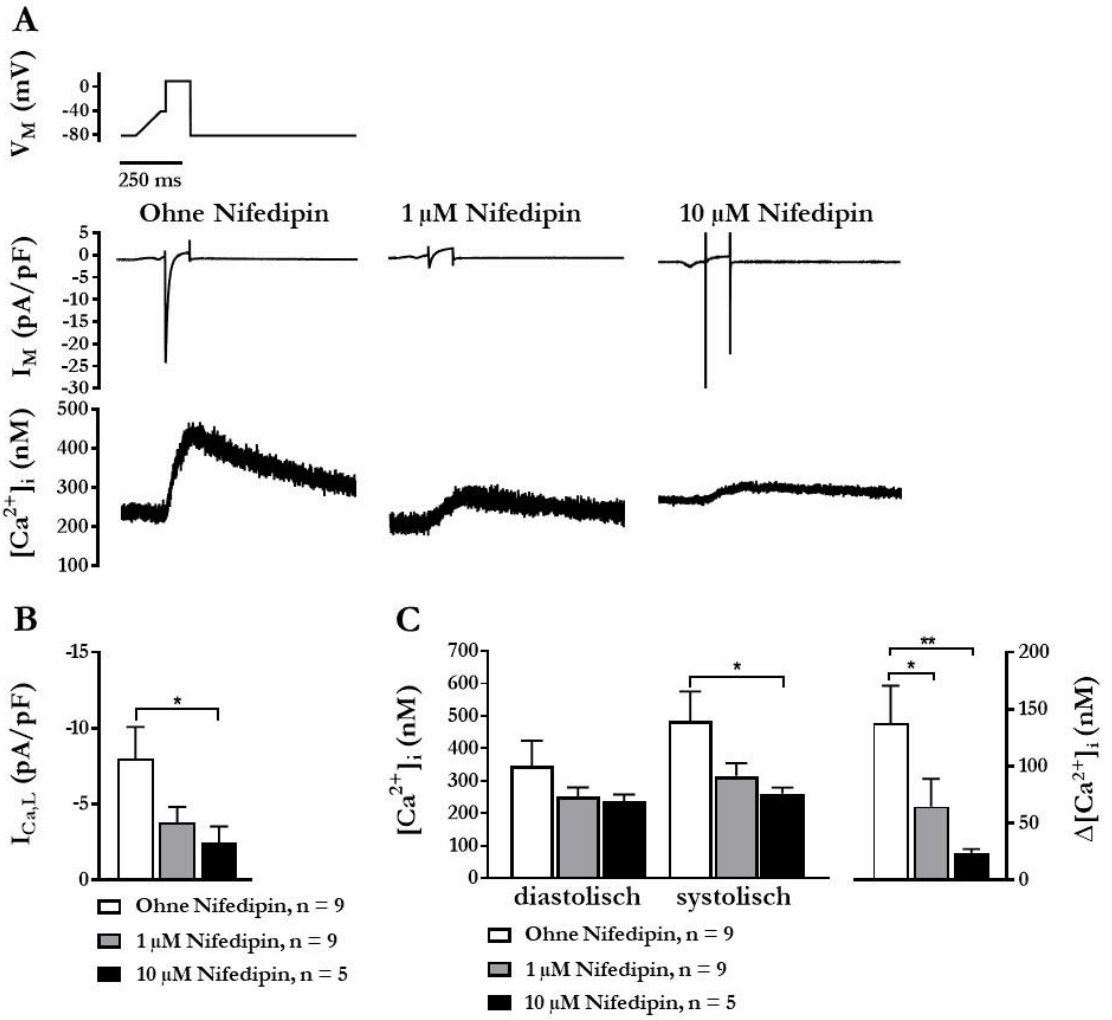

Abbildung 26: Nifedipinsensitivität der alten Ctl-Zellen (d52 – 66) – L-Typ-Ca^{2+}-Strom und getriggerte Ca^{2+}-Transienten.

V_M Membranspannung, I_M Membranstrom, $[Ca^{2+}]_i$ intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration, $I_{Ca,L}$ L-Typ-Ca^{2+}-Strom, CaT Ca^{2+}-Transient.

A: Voltage-Clamp-Protokoll (0,5 Hz; oben) und simultane Beispiel-Messungen des $I_{Ca,L}$ (Mitte) sowie des getriggerten CaT (unten) in alten Ctl-iPSC-CMs ohne Nifedipin (links), mit 1 µM Nifedipin (Mitte) und mit 10 µM Nifedipin (links).

B: Mittelwert ± SEM des Peaks des $I_{Ca,L}$ in alten Ctl-iPSC-CMs ohne Nifedipin, mit 1 µM Nifedipin und mit 10 µM Nifedipin. $*p_{korr} \leq 0{,}05$ im Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur.

C: Mittelwert ± SEM der diastolischen und systolischen $[Ca^{2+}]_i$ (links) und der resultierenden CaT-Amplitude (rechts) in alten Ctl-iPSC-CMs ohne Nifedipin, mit 1 µM Nifedipin und mit 10 µM Nifedipin. $*p_{korr} \leq 0{,}05$ im Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur; $**p_{korr} \leq 0{,}01$ im Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur.

n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs.

3.4.3.4 TOF-Zellen (d27 – 40)

Dasselbe Phänomen zeigte sich auch mit starker Tendenz in den TOF-Zellen (d27 – 40): 1 µM und 10 µM Nifedipin führten zu einem kleineren $I_{Ca,L}$ (-19,74 ± 4,54 pA/pF, n = 9 ohne Nifedipin vs. -8,82 ± 1,33 pA/pF, n = 9 mit 1 µM Nifedipin; p_{korr} = 0,0800 im Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur bzw. -19,74 ± 4,54 pA/pF, n = 9 ohne Nifedipin vs. -2,52 ± 1,07 pA/pF, n = 2 mit 10 µM Nifedipin; p_{korr} = 0,0728 im Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur; Abbildung 27.A und B). Folglich war auch die Amplitude des getriggerten CaT unter Nifedipin reduziert (410,77 ± 82,41 nM, n = 9 ohne Nifedipin vs. 127,02 ± 27,84 nM, n = 9 mit 1 µM Nifedipin; p_{korr} = 0,0016 im Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur bzw. 410,77 ± 82,41 nM, n = 9 ohne Nifedipin vs. 72,03 ± 25,04 nM, n = 2 mit 10 µM Nifedipin; p_{korr} = 0,0728 im Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur; Abbildung 27.A und C).

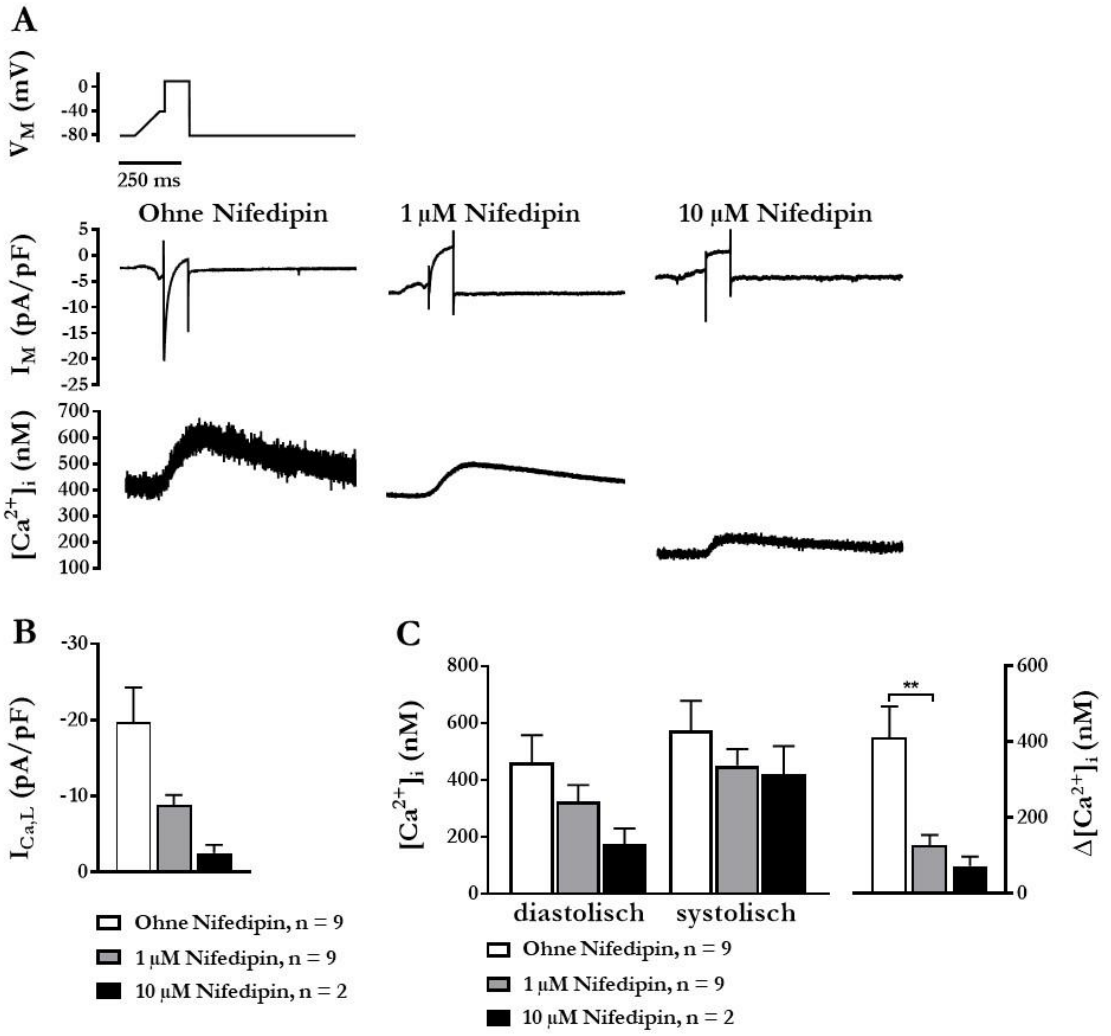

Abbildung 27: Nifedipinsensitivität der TOF-Zellen (d27 – 40) – L-Typ-Ca^{2+}-Strom und getriggerte Ca^{2+}-Transienten.

V_M Membranspannung, I_M Membranstrom, $[Ca^{2+}]_i$ intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration, $I_{Ca,L}$ L-Typ-Ca^{2+}-Strom, CaT Ca^{2+}-Transient.

A: Voltage-Clamp-Protokoll (0,5 Hz; oben) und simultane Beispiel-Messungen des $I_{Ca,L}$ (Mitte) sowie des getriggerten CaT (unten) in TOF-iPSC-CMs ohne Nifedipin (links), mit 1 μM Nifedipin (Mitte) und mit 10 μM Nifedipin (rechts).

B: Mittelwert ± SEM des Peaks des $I_{Ca,L}$ in TOF-iPSC-CMs ohne Nifedipin, mit 1 μM Nifedipin und mit 10 μM Nifedipin.

C: Mittelwert ± SEM der diastolischen und systolischen $[Ca^{2+}]_i$ (links) und der resultierenden CaT-Amplitude (rechts) in TOF-iPSC-CMs ohne Nifedipin, mit 1 μM Nifedipin und mit 10 μM Nifedipin. $^{**}p_{korr} \leq 0{,}01$ im Mann-Whitney-Test nach Bonferroni-Korrektur.

n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs.

3.4.4 Bestimmung der Calciumkonzentration des sarkoplasmatischen Retikulums und Berechnung der SERCA2a-Aktivität

Der Ca^{2+}-Gehalt des SRs wurde mithilfe von 10 mM Koffein bestimmt. Anschließend wurde aus den Abklingphasen der systolischen und koffeininduzierten CaT die SERCA2a-Aktivität berechnet (vgl. Abschnitt 2.3, Abschnitt 2.6.5 und Abschnitt 2.7).

Interessanterweise war der Unterschied in der SR-Ca^{2+}-Konzentration zwischen TOF- und Ctl-iPSC-CMs nicht signifikant: Die Amplitude des koffeininduzierten CaT (260,10 ± 80,74 nM, n = 10 vs. 295,11 ± 47,56 nM, n = 14; p = 0,6952) war vergleichbar. Die Ladung, welche über den NCX transportiert wurde (integrierter NCX-Strom) tendierte in den TOF-Zellen zu etwas geringeren Werten (1,20 ± 0,39 pC/pF, n = 10 vs. 2,26 ± 0,51 pC/pF, n = 14; p = 0,0639 im t-Test an logarithmierten Daten) (Abbildung 28.A und C).

Der depolarisierende Einwärtsstrom durch den NCX (I_{NCX}) war in den TOF-Zellen tendenziell ebenfalls geringer als in den Ctl-Zellen (-0,91 ± 0,09 pA/pF, n = 10 vs. -1,39 ± 0,48 pA/pF, n = 14; p = 0,3948 im Mann-Whitney-Test; Abbildung 28.B). Dagegen war die SERCA2a-Aktivität in der TOF-Gruppe im Vergleich zur Ctl-Gruppe signifikant erhöht (1,08 ± 0,21 s^{-1}, n = 10 vs. 0,53 ± 0,13 s^{-1}, n = 14; p = 0,0258; Abbildung 28.D).

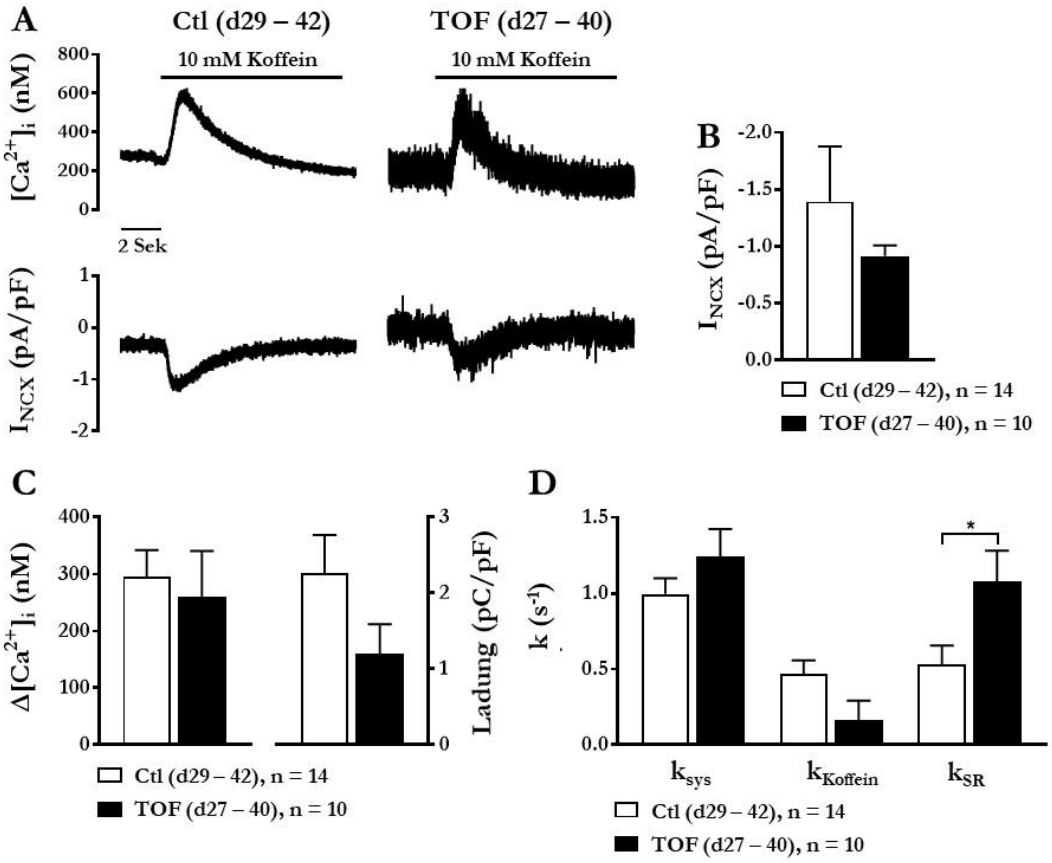

Abbildung 28: Bestimmung der Ca^{2+}-Konzentration des sarkoplasmatischen Retikulums und Berechnung und SERCA2a-Aktivität.

$[Ca^{2+}]_i$ intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration, I_{NCX} depolarisierender Einwärtsstrom durch den Na^+-Ca^{2+}-Austauscher (NCX), k Abklingkonstante des Ca^{2+}-Transienten (CaT).

A: Beispiel-Messungen des koffeininduzierten CaT (oben) und des einwärts gerichteten NCX-Stroms (unten) in Ctl- (links) und TOF-iPSC-CMs (rechts).

B: Mittelwert ± SEM des Peaks des I_{NCX} in Ctl- und TOF-iPSC-CMs.

C: Mittelwert ± SEM der Amplitude des koffeininduzierten CaT (links) und Ladungsakkumulation über den NCX (integrierter NCX-Strom) (rechts) in Ctl- und TOF-iPSC-CMs.

Hinweis: Bei der Ladungsakkumulation über den NCX wurde der t-Test an logarithmierten Daten durchgeführt, um eine Normalverteilung zu erzielen.

D: Mittelwert ± SEM der Abklingkonstanten des systolischen $I_{Ca,L}$-getriggerten CaT (k_{sys}), des koffeininduzierten CaT ($k_{Koffein}$) und berechnete SERCA2a-Aktivität (k_{SR}) in Ctl- und TOF-iPSC-CMs. *$p \leq 0{,}05$.

n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs.

3.4.5 Zeitabhängigkeit des NCX-Stroms, der Calciumkonzentration des sarkoplasmatischen Retikulums und der SERCA2a-Aktivität

Bei Vergleich der jungen Ctl-iPSC-CMs (d29 – 42) mit den alten Ctl-iPSC-CMs (d47 – 55) war kein Unterschied im Ca^{2+}-Gehalt des SRs zu sehen. Die Amplitude des koffeininduzierten CaT sowie die über den NCX transportierte Ladung waren vergleichbar

(Abbildung 29.A und C). Dagegen war die Abklingkonstante des koffeininduzierten CaT in den alten Ctl-Zellen im Vergleich zu den jungen Ctl-Zellen größer (0,91 ± 0,18 s^{-1}, n = 24 vs. 0,47 ± 0,09 s^{-1}, n = 14; p = 0,0005 im Mann-Whitney-Test) (Abbildung 29.D).

Der NCX-Strom war in den alten Ctl-iPSC-CMs im Vergleich zu den jungen Ctl-iPSC-CMs tendenziell etwas größer (-1,88 ± 0,48 pA/pF, n = 24 vs. -1,39 ± 0,48 pA/pF, n = 14; p = 0,2382 im Mann-Whitney-Test) (Abbildung 29.B).

In den älteren Ctl-Zellen zeigte sich eine im Vergleich zu den jungen Ctl-Zellen erhöhte SERCA2a-Aktivität (1,26 ± 0,29 s^{-1}, n = 24 vs. 0,53 ± 0,13 s^{-1}, n = 14; p = 0,0021 im Mann-Whitney-Test) (Abbildung 29.D).

Passend zu den Beobachtungen der Zeitabhängigkeit des $I_{Ca,L}$ und des systolischen CaT in den Ctl-Zellen (vgl. Abschnitt 3.4.1) war die Abklingkonstante des systolischen CaT in den alten Ctl-iPSC-CMs größer als in den jungen Ctl-iPSC-CMs (2,10 ± 0,19 s^{-1}, n = 24 vs. 1,00 ± 0,10 s^{-1}, n = 14; p = 0,0002) (Abbildung 29.D).

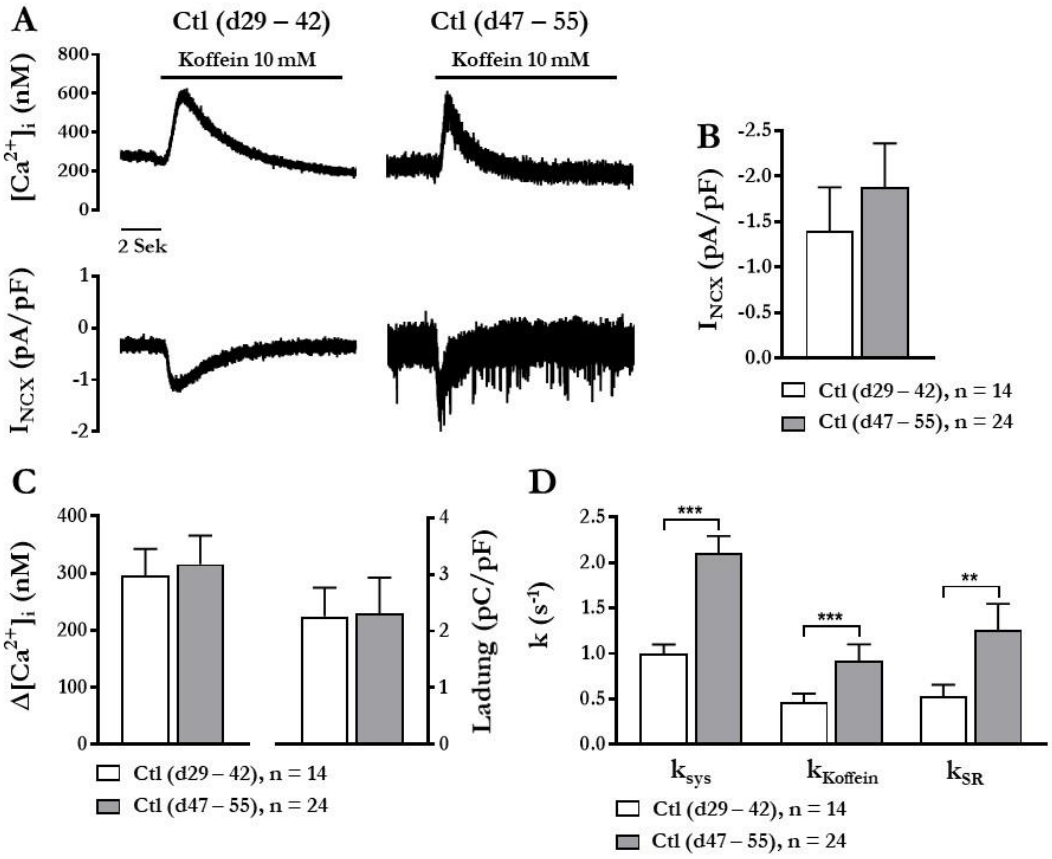

Abbildung 29: Zeitabhängigkeit des NCX-Stroms und der SERCA2a-Aktivität in den Ctl-Zellen.

$[Ca^{2+}]_i$ intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration, I_{NCX} depolarisierender Einwärtsstrom durch den Na^+-Ca^{2+}-Austauscher (NCX), k Abklingkonstante des Ca^{2+}-Transienten (CaT).

A: Beispiel-Messungen des koffeininduzierten CaT (oben) und des einwärts gerichteten NCX-Stroms (unten) in jungen (links) und alten Ctl-iPSC-CMs (rechts).

B: Mittelwert ± SEM des Peaks des I_{NCX} in jungen und alten Ctl-iPSC-CMs.

C: Mittelwert ± SEM der Amplitude des koffeininduzierten CaT (links) und Ladungsakkumulation über den NCX (integrierter NCX-Strom) (rechts) in jungen und alten Ctl-iPSC-CMs.

D: Mittelwert ± SEM der Abklingkonstanten des systolischen $I_{Ca,L}$-getriggerten CaT (k_{sys}), des koffeininduzierten CaT ($k_{Koffein}$) und berechnete SERCA2a-Aktivität (k_{SR}) in jungen und alten Ctl-iPSC-CMs. ***$p \leq 0{,}001$.

Hinweis: Bei $k_{Koffein}$ und k_{SR} wurde der Mann-Whitney-Test verwendet.

n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs.

3.5 Aktionspotentialmessungen

Alle Aktionspotentialmessungen wurden im Current-Clamp-Modus mittels Perforated-Patch-Clamp-Technik durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.1.4 und 2.8).

3.5.1 Vergleich der Messmethoden

Wie bereits im Methodenteil beschrieben, wurden für die Aktionspotentialmessungen zwei unterschiedliche Methoden angewandt (vgl. Abschnitt 2.8): Einerseits die „klassische" Version, bei der die Zelle über die Pipettenelektrode stimuliert wurde und anderseits eine in unserer Arbeitsgruppe neu etablierte Methode, bei der die Stimulation der Zellen über ein elektrisches Feld erfolgte. Zur Etablierung der zweiten Methode wurden einige TOF-Zellen doppelt gemessen. Beide Methoden lieferten identische Ergebnisse (Abbildung 30.A). Folglich konnten alle AP-Messungen gesammelt ausgewertet werden.

Falls notwendig wurde ein hyperpolarisierender Strom injiziert, um das RMP auf unter -60 mV zu klemmen. Die Menge des injizierten Stroms war in beiden Gruppen vergleichbar (Abbildung 30.B).

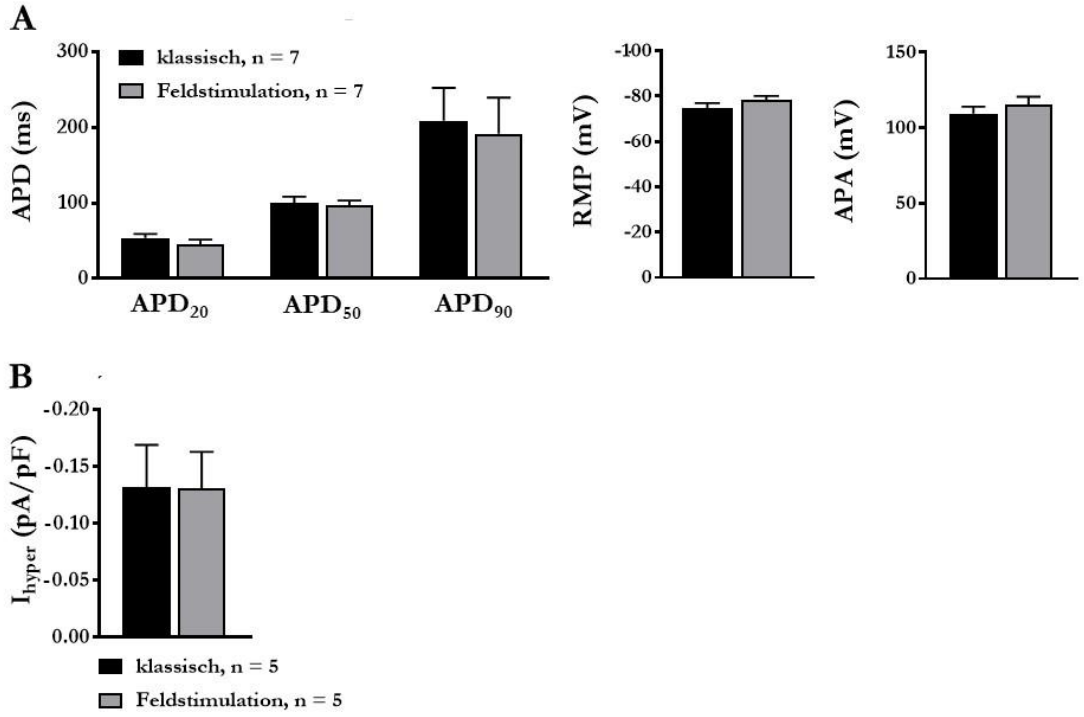

Abbildung 30: Vergleich der beiden Methoden zur Aktionspotentialmessung in TOF-iPSC-CMs (d33 – 36).

A: Mittelwert ± SEM der Aktionspotentialdauer (APD) (links) bei 20 % (APD_{20}), 50 % (APD_{50}) und 90 % (APD_{90}) der Repolarisation, Mittelwert ± SEM des Ruhemembranpotentials (RMP) (Mitte) und Mittelwert ± SEM der Aktionspotentialamplitude (APA) (rechts).

B: Mittelwert ± SEM des injizierten hyperpolarisierenden Stroms (I_{hyper}).

n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs.

3.5.2 Unterschiede zwischen Kontroll- und TOF-Zellen

3.5.2.1 Junge Zellen (d30 – 42)

Bei Vergleich der jungen TOF-iPSC-CMs (d33 – 36) mit den jungen Ctl-iPSC-CMs (d30 – 42) zeigte sich eine kürzere APD in den TOF-Zellen (Abbildung 31.A und B). Bei 20 % und 90 % der Repolarisation war dieser Unterschied signifikant (APD_{20}: 38,78 ± 6,01 ms, n = 18 vs. 67,43 ± 11,86 ms, n = 12; p = 0,0253; APD_{90}: 177,92 ± 22,72 ms, n = 18 vs. 299,74 ± 43,76 ms, n = 12; p = 0,0117) und auch bei 50 % der Repolarisation war eine eindeutige Tendenz erkennbar (87,32 ± 7,56 ms, n = 18 vs. 113,78 ± 16,90 ms, n = 12; p = 0,1211).

Das RMP war in den TOF-Zellen etwas negativer als in den Ctl-Zellen (-77,34 ± 1,41 mV, n = 18 vs. -71,14 ± 2,14 mV, n = 12; p = 0,0176; Abbildung 31.B). Allerdings wurde auch mehr hyperpolarisierender Strom in die TOF-Zellen als in die Ctl-Zellen injiziert (-0,23 ± 0,03 pA/pF, n = 15 vs. -0,19 ± 0,10 pA/pF, n = 8; p = 0,0337 im Mann-Whitney-Test; Abbildung 31.C). Dagegen war die APA in der TOF- und Ctl-Gruppe vergleichbar (Abbildung 31.B).

Die Berechnung der Repolarisationsfraktion (vgl. Abschnitt 2.8) ergab eine signifikant kleinere RF in den TOF-iPSC-CMs im Vergleich zu den Ctl-iPSC-CMs (0,46 ± 0,04, n = 18 vs. 0,61 ± 0,05, n = 12; p = 0,0297; Abbildung 31.D). Bei Auftragung der RF gegen das RMP konnten Ctl- und TOF-Zellen jedoch nicht eindeutig unterschieden werden (Abbildung 31.D).

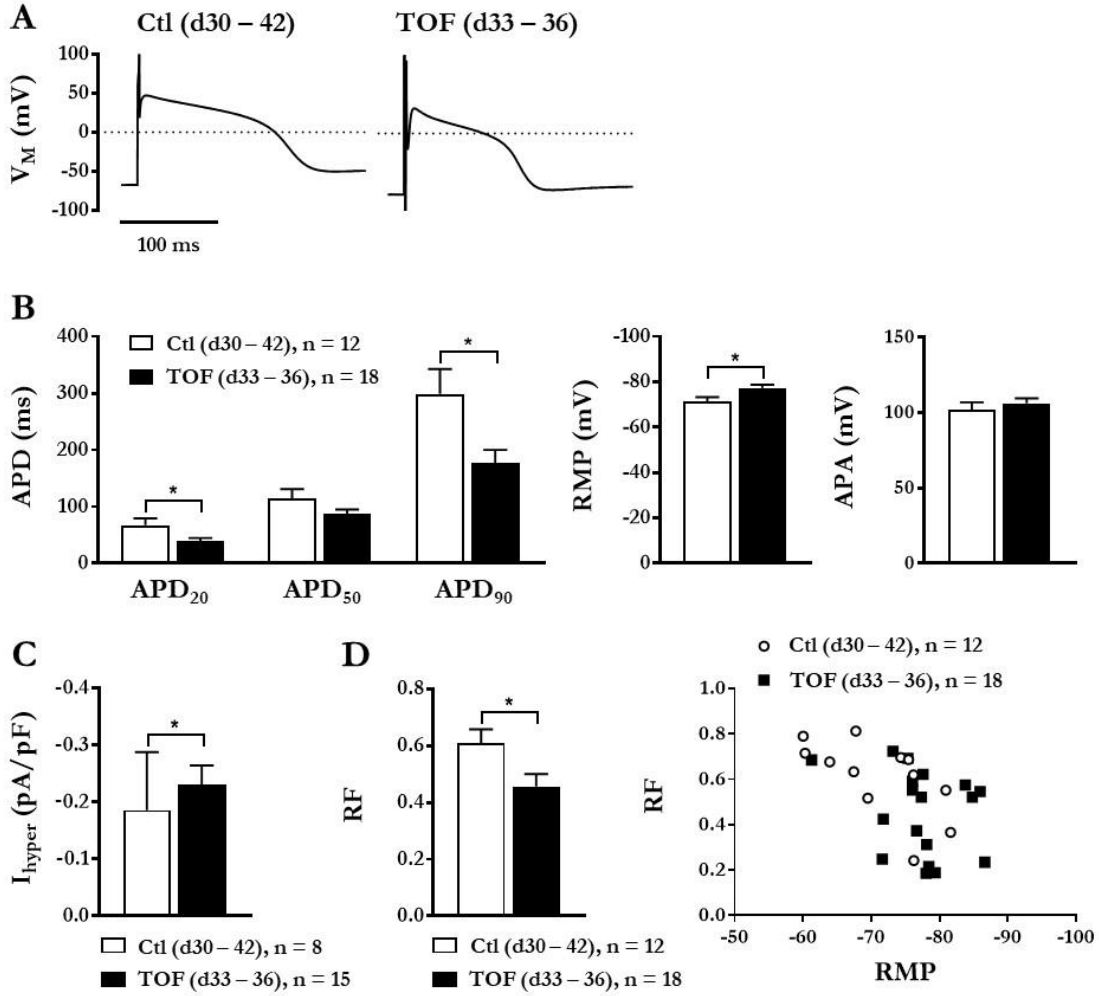

Abbildung 31: Unterschiede zwischen jungen Ctl- und jungen TOF-Zellen (d30 – 42) in den Aktionspotentialen.

A: Beispielmessungen. V_M Membranspannung.

B: Mittelwert ± SEM der Aktionspotentialdauer (APD) (links) bei 20 % (APD_{20}), 50 % (APD_{50}) und 90 % (APD_{90}) der Repolarisation, Mittelwert ± SEM des Ruhemembranpotentials (RMP) (Mitte) und Mittelwert ± SEM der Aktionspotentialamplitude (APA) (rechts) in Ctl- und TOF-iPSC-CMs. *p ≤ 0,05.

C: Mittelwert ± SEM des injizierten hyperpolarisierenden Stroms (I_{hyper}) in Ctl- und TOF-iPSC-CMs. *p ≤ 0,05 im Mann-Whitney-Test.

D: Mittelwert ± SEM der Repolarisationsfraktion (RF) (links) und RF in Abhängigkeit vom RMP (rechts) in Ctl- und TOF-iPSC-CMs. *p ≤ 0,05.

n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs.

3.5.2.2 Alte Zellen (d63 – 76)

Bei Vergleich der alten TOF-iPSC-CMs (d63 – 76) mit den alten Ctl-iPSC-CMs (d72 – 73) war dagegen die APD in den TOF-Zellen tendenziell länger als in den Ctl-Zellen (APD_{20}: 41,19 ± 8,64 ms, n = 13 vs. 19,07 ± 5,44 ms, n = 6; p = 0,1170; APD_{50}: 74,18 ± 12,87 ms,

n = 13 vs. 43,93 ± 8,69 ms , n = 6; p = 0,1499; APD_{90}: 168,75 ± 32,11 ms, n = 13 vs. 120,30 ± 16,08 ms, n = 6; p = 0,3382; Abbildung 32.A und B).

Das RMP und die APA waren in beiden Gruppen vergleichbar (Abbildung 32.B). Auch die Menge des injizierten Stroms war bei Ctl- und TOF-Zellen ähnlich (Abbildung 32.C).

Trotz der längeren APD in den TOF-Zellen war die RF im Vergleich zu den Ctl-Zellen tendenziell etwas kürzer (0,53 ± 0,05, n = 13 vs. 0,64 ± 0,06, n = 6; p = 0,1967; Abbildung 32.D). Bei Auftragung der RF gegen das RMP war jedoch auch hier keine Unterscheidung zwischen Ctl- und TOF-iPSC-CMs möglich (Abbildung 32.D).

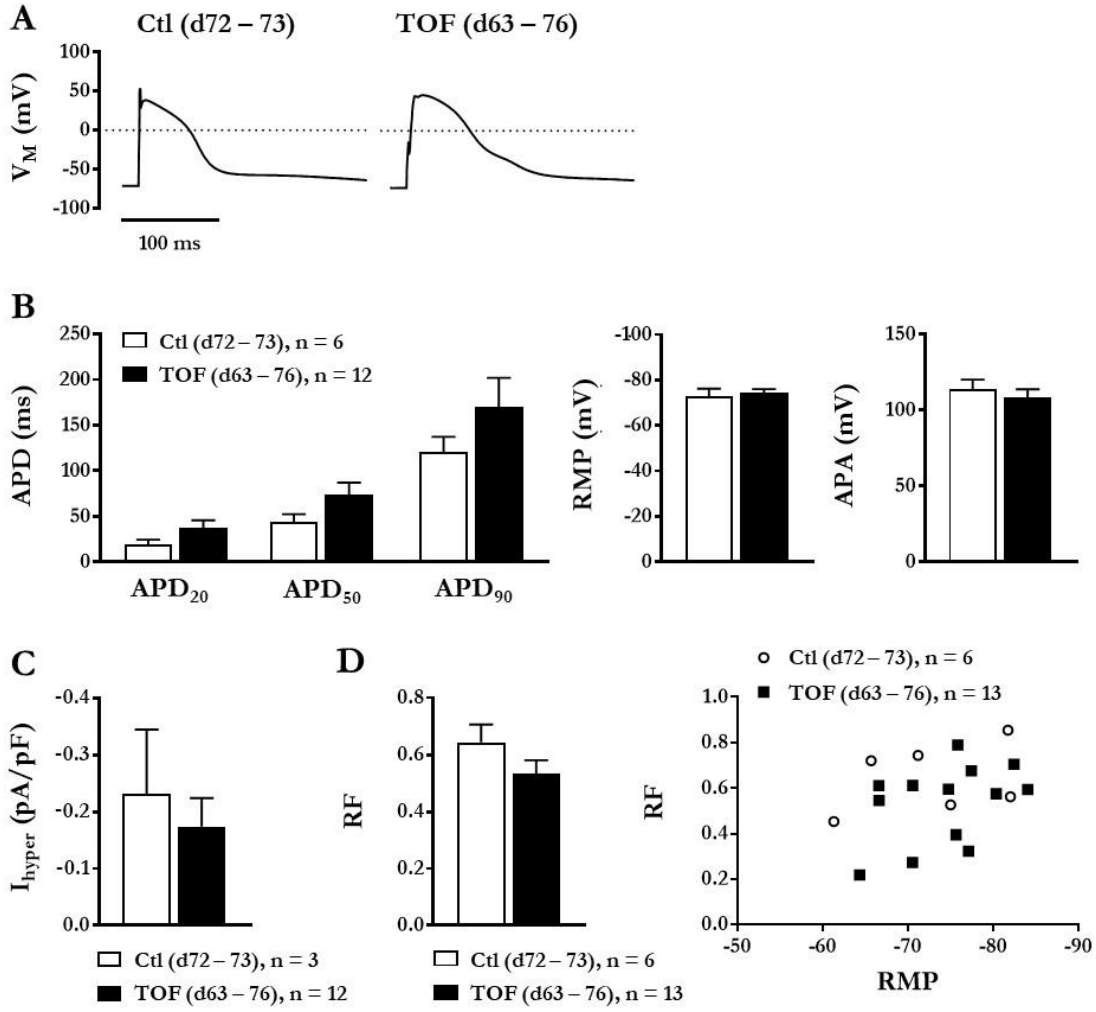

Abbildung 32: Unterschiede zwischen alten Ctl- und alten TOF-Zellen (d63 – 76) in den Aktionspotentialen.
A: Beispielmessungen. V_M Membranspannung.
B: Mittelwert ± SEM der Aktionspotentialdauer (APD) (links) bei 20 % (APD_{20}), 50 % (APD_{50}) und 90 % (APD_{90}) der Repolarisation, Mittelwert ± SEM des Ruhemembranpotentials (RMP) (Mitte) und Mittelwert ± SEM der Aktionspotentialamplitude (APA) (rechts) in Ctl- und TOF-iPSC-CMs.
C: Mittelwert ± SEM des injizierten hyperpolarisierenden Stroms (I_{hyper}) in Ctl- und TOF-iPSC-CMs.
D: Mittelwert ± SEM der Repolarisationsfraktion (RF) (links) und RF in Abhängigkeit vom RMP (rechts) in Ctl- und TOF-iPSC-CMs.
n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs.

3.5.3 Zeitabhängigkeit der Aktionspotentialdauer

3.5.3.1 Kontrollzellen

In den Ctl-iPSC-CMs zeigte sich, dass die APD der alten Zellen (d72 – 73) im Vergleich zur APD der jungen Zellen (d30 – 42) signifikant kürzer war (APD_{20}: 19,07 ± 5,44 ms, n = 6 vs. 67,43 ± 11,86 ms, n = 12; p = 0,0305 im Mann-Whitney-Test; APD_{50}: 43,93 ± 8,69 ms, n = 6 vs. 113,78 ± 16,90 ms, n = 12; p = 0,0320 im Mann-Whitney-Test; APD_{90}: 120,30 ± 16,08 ms, n = 6 vs. 299,74 ± 43,76 ms, n = 12; p = 0,0135 im Mann-Whitney-Test; Abbildung 33.A). Somit war eine eindeutige Abhängigkeit der APD vom Messtag festzustellen (APD_{20}: $r^2 = 0{,}3290$; APD_{50}: $r^2 = 0{,}3384$; APD_{90}: $r^2 = 0{,}2900$; Abbildung 33.A).

Dagegen zeigte sich in der Repolarisationsfraktion kein Unterschied zwischen jungen und alten Ctl-iPSC-CMs (Abbildung 33.B).

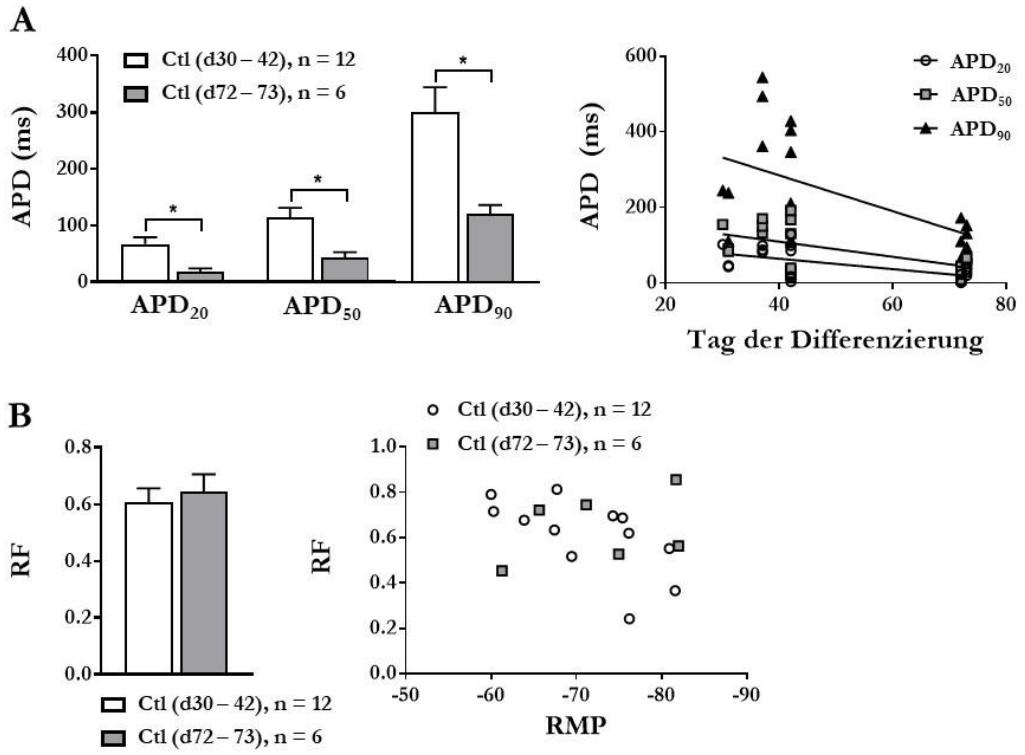

Abbildung 33: Zeitabhängigkeit der Aktionspotentialdauer in den Ctl-Zellen.
A: Mittelwert ± SEM der Aktionspotentialdauer (APD) (links) bei 20 % (APD_{20}), 50 % (APD_{50}) und 90 % (APD_{90}) der Repolarisation und APD in Abhängigkeit vom Messtag (rechts) in jungen und alten Ctl-iPSC-CMs. *p ≤ 0,05 im Mann-Whitney-Test.
B: Mittelwert ± SEM der Repolarisationsfraktion (RF) (links) und RF in Abhängigkeit vom Ruhemembranpotential (RMP) (rechts) in jungen und alten Ctl-iPSC-CMs.
n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs.

3.5.3.2 TOF-Zellen

Im Gegensatz zu den Ctl-iPSC-CMs gab es bei den TOF-iPSC-CMs keinen Unterschied in der APD zwischen jungen (d33 – 36) und alten (d63 – 76) Zellen (Abbildung 34.A). Somit war keine Abhängigkeit der APD vom Messtag festzustellen (Abbildung 34.A).

Auch die Repolarisationsfraktion war in jungen und alten TOF-Zellen vergleichbar (Abbildung 34.B).

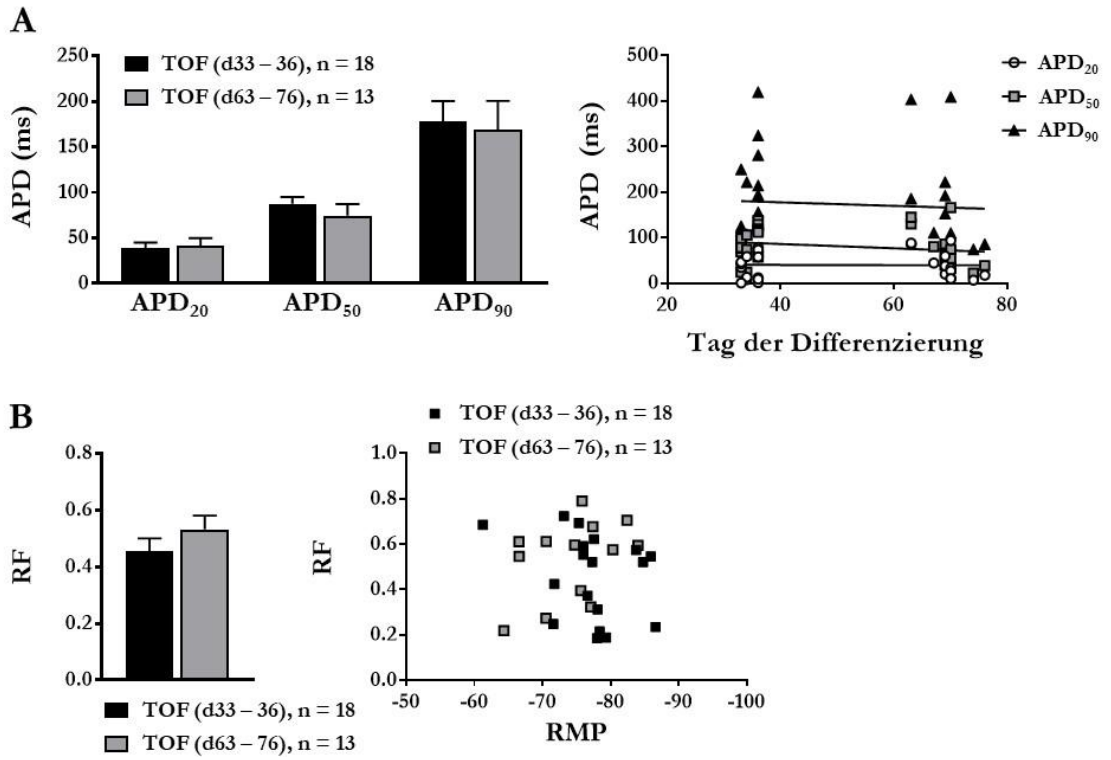

Abbildung 34: Zeitabhängigkeit der Aktionspotentialdauer in den TOF-Zellen.

A: Mittelwert ± SEM der Aktionspotentialdauer (APD) (links) bei 20 % (APD_{20}), 50 % (APD_{50}) und 90 % (APD_{90}) der Repolarisation und APD in Abhängigkeit vom Messtag (rechts) in jungen und alten TOF-iPSC-CMs.

B: Mittelwert ± SEM der Repolarisationsfraktion (RF) (links) und RF in Abhängigkeit vom Ruhemembranpotential (RMP) (rechts) in jungen und alten Ctl-iPSC-CMs.

n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs.

3.5.4 Späte Nachdepolarisationen und spontane elektrische Aktivität

Insgesamt zeigten 17 von 31 gemessenen TOF-iPSC-CMs (d33 – 76) DADs bzw. spontane elektrische Aktivität (SEA). Damit waren 55 % der Zellen anfällig für DADs/SEA. Bei den Ctl-iPSC-CMs (d30 – 73) zeigte keine der 18 gemessenen Zellen solche Auffälligkeiten ($p < 0{,}0001$ im Fisher-Test) (Abbildung 35).

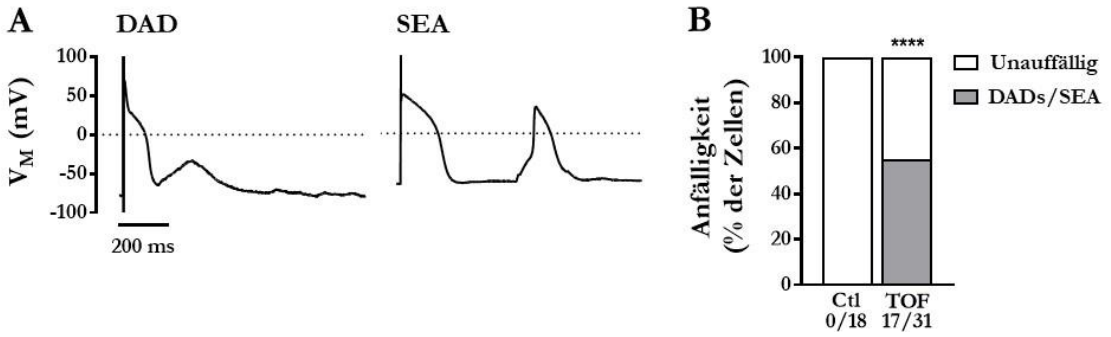

Abbildung 35: Späte Nachdepolarisationen und spontane elektrische Aktivität in den TOF-Zellen (d33 – 76).

A: Beispielmessungen in TOF-iPSC-CMs mit später Nachdepolarisation (*delayed afterdepolarisation*, DAD) bzw. spontaner elektrischer Aktivität (SEA).

B: Anfälligkeit für DADs bzw. SEA in Ctl- und TOF-iPSC-CMs. p**** < 0,0001 im Fisher-Test. n entspricht der Anzahl der iPSC-CMs.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein *In-vitro*-iPS-Zell-Modell für die Fallot'sche Tetralogie elektrophysiologisch untersucht. Als Kontrollgruppe dienten iPSC-CMs eines gesunden Spenders.

Sowohl in den Ctl- als auch in den TOF-iPSC-CMs konnte ein nifedipinsensitiver L-Typ-Ca^{2+}-Strom mit typischer glockenförmiger Strom-Spannungs-Kurve gemessen werden. Der $I_{Ca,L}$ und sein getriggerter CaT zeigten in den Ctl-Zellen eine starke Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Experiments, weshalb nur Messungen zwischen Tag 27 und 42 der Differenzierung betrachtet wurden. Die Amplitude des $I_{Ca,L}$ war in TOF-iPSC-CMs im Vergleich zur Ctl-Gruppe erhöht. Der größere $I_{Ca,L}$ führte zu einer ebenfalls größeren Amplitude des systolischen CaT. Interessanterweise war auch die diastolische $[Ca^{2+}]_i$ in den TOF-Zellen im Vergleich zu den Ctl-Zellen erhöht.

Des Weiteren wurde der Ca^{2+}-Gehalt des sarkoplasmatischen Retikulums bestimmt. Hier ließ sich kein Unterschied zwischen Ctl- und TOF-Gruppe feststellen. Die Amplitude des koffeininduzierten CaT und die Ladung, welche über den NCX transportiert wurde, waren in beiden Gruppen vergleichbar. Dagegen war die Aktivität der SERCA2a in den TOF-Zellen erhöht.

Die Aktionspotentialmessungen zeigten in den Ctl-iPSC-CMs eine starke Abhängigkeit der Aktionspotentialdauer vom Messtag. Diese Abhängigkeit war in den TOF-iPSC-CMs nicht zu beobachten. Somit ergab sich bei jüngeren Zellen (d30 – 42) eine kürzere APD der TOF-iPSC-CMs im Vergleich zur Ctl-Gruppe, bei älteren Zellen (d63 – 76) dagegen eine tendenziell längere APD. Die Repolarisationsfraktion war in den TOF-iPSC-CMs im Vergleich zur Ctl-Gruppe erniedrigt.

Interessanterweise zeigten insgesamt 55 % der gemessenen TOF-iPSC-CMs späte Nachdepolarisationen bzw. spontane elektrische Aktivität. Bei den Ctl-iPSC-CMs konnten keine spontanen Membrandepolarisationen registriert werden.

4.1 Versuchsobjekt

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten iPSC-CMs stellen das erste *In-vitro*-iPS-Zell-Modell für die Fallot'sche Tetralogie dar. Die Zellen wurden von einem Patienten mit Fallot'scher Tetralogie und dessen gesundem Vater als Kontrollgruppe gewonnen.

4.1.1 Vorteile eines *In-vitro*-iPS-Zell-Modells

Induzierte pluripotente Stammzellen und die aus ihnen generierten Zellen bieten die Möglichkeit, Mechanismen, die einer Erkrankung zu Grunde liegen, patientenspezifisch *in*

vitro untersuchen zu können (Takahashi et al. 2007). Damit werden Probleme vermieden, die bei der Übertragung von Ergebnissen aus Tiermodellen oder heterologen Expressionssystem, auf den Menschen entstehen (Hoekstra et al. 2012; Karakikes et al. 2015; Zhao et al. 2018). Die Gewinnung von iPSC-CMs ist ein minimalinvasiver Vorgang (eine Hautbiopsie oder Blutentnahme reicht aus) und es stehen theoretisch unbegrenzt viele Zellen zur Verfügung (Karakikes et al. 2015; Yang et al. 2014). Im Vergleich zu aus humanen embryonalen Stammzellen gewonnenen Kardiomyozyten (*human embryonal stem cell derived cardiomyocytes*, hESC-CMs) sind die ethischen Bedenken bei iPSC-CMs deutlich geringer (Yamanaka 2007).

4.1.2 Unreife der aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnenen Kardiomyozyten

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten iPSC-CMs wurden in einem 2D-Modell kultiviert. Der Nachteil hiervon liegt in der molekularen, strukturellen und funktionellen Unreife der Zellen (Abilez et al. 2018; Priori et al. 2013).

Trotz ihrer Unreife reproduzieren iPSC-CMs zuverlässig kardiale elektrophysiologische Eigenschaften (Ma et al. 2011): Sie besitzen spannungsgesteuerte Ionenkanäle, haben ein charakteristisches kardiales Aktionspotential, exprimieren wichtige Proteine der Ca^{2+}-Homöostase und zeigen Ca^{2+}-Transienten. Damit stellen sie ein geeignetes Modell dar, um Ionenströme und Komponenten der Ca^{2+}-Homöostase zu untersuchen (Karakikes et al. 2015; Yang et al. 2014; Zhang et al. 2013). 2D-Modelle sind zur Erforschung von angeborenen Herzfehlern, Kardiomyopathien oder Ionenkanalerkrankungen etabliert (Doyle et al. 2015; Itzhaki et al. 2011; Karakikes et al. 2015; Matsa et al. 2014; Wang et al. 2014). Dennoch bleibt die Frage, in welchem Maße Ergebnisse aus einem *In-vitro*-iPS-Zell-Modell auf humane adulte CMs übertragen werden können, da iPSC-CMs eine große Heterogenität in ihrer Elektrophysiologie zeigen (Priori et al. 2013).

4.1.3 Rekapitulation der Erkrankung im Modell

Allgemein ist zu diskutieren, ob ein *In-vitro*-iPS-Zell-Modell die Komplexität des menschlichen Herzens, welches aus vielen unterschiedlichen Zelltypen (z. B. Schrittmacherzellen, atriale und ventrikuläre CMs, Fibroblasten, usw.) besteht, erfassen kann (Priori et al. 2013). Insbesondere ist in Bezug auf diese Arbeit zu klären, ob der Phänotyp der Fallot'schen Tetralogie tatsächlich *in vitro* rekapituliert wurde, da die Fallot'sche Tetralogie ein v. a. struktureller Herzdefekt ist.

Durch den Strukturdefekt bedingte Veränderungen eines Herzfehlers wären somit besser im Tiermodell zu erfassen. Da jedoch auch genetische Komponenten bei der Entwicklung der Fallot'schen Tetralogie eine Rolle spielen (Grunert et al. 2014), stellen iPSC-CMs ein geeignetes Modell hierfür dar.

Damit es zur Manifestation des krankheitstypischen Phänotyps in iPSC-CMs kommt, ist die Expression von Krankheits-assoziierten Allelen wichtig (Karakikes et al. 2015). Zudem müssen die iPSC-CMs die Komplexität der elektrischen Heterogenität im Herzen replizieren, damit die Arrhythmogenese des Patienten modelliert werden kann (Priori et al. 2013). Deshalb wurden die in dieser Arbeit verwendeten iPSC-CMs im Vorfeld von der Arbeitsgruppe Kardiovaskuläre Genetik unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. S. Rickert-Sperling (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Charité, Universitätsmedizin Berlin) genetisch untersucht. Außerdem haben Studien erfolgreich gezeigt, dass iPSC-CMs von Patienten mit genetischen Herzerkrankungen die Schlüsselkomponenten der jeweiligen Erkrankung rekapitulieren können (Priori et al. 2013; Zhao et al. 2018).

4.1.4 Einfluss von Zelldifferenzierung und Kulturbedingungen

Die Heterogenität von iPSC-CMs im Vergleich zu nativen humanen CMs hängt vermutlich auch mit Unterschieden in der Differenzierung und Kultur von iPSC-CMs zusammen (Thomas et al. 2019). Variationen in der Zellkultur oder Zellinie können einen erheblichen Einfluss auf die Physiologie der Zellen haben (Sheng et al. 2012).

Zelllinien, welche mit unterschiedlichen Protokollen generiert wurden, können unterschiedliche Eigenschaften in Hinsicht auf die Expression und Funktion von Ionenkanälen zeigen. Dafür spricht, dass verschiedene Forschergruppen unterschiedliche Ergebnisse bzgl. der elektrophysiologischen Eigenschaften von iPSC-CMs erhalten haben. Allerdings wurden die Studien teilweise auch unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen (wie Temperatur oder Messprotokolle) durchgeführt (Zhao et al. 2018). Damit stellt sich die Frage, ob die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit auf iPSC-CMs bzw. die Zellen von Patienten mit Fallot'scher Tetralogie allgemein übertragbar sind bzw. inwiefern sie mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen verglichen werden können.

Es ist bekannt, dass Kulturbedingungen, wie das verwendete Medium oder die Oberfläche, auf welcher die iPSC-CMs kultiviert werden, die Ca^{2+}-Homöostase beeinflussen und zur Reifung von iPSC-CMs beitragen können (Lundy et al. 2013; Rao et al. 2013). Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten iPSC-CMs jedoch auf einfachen, Matrigel-beschichteten Glas-Cover-Slips kultiviert wurden, ist ein solcher Effekt unwahrscheinlich. Insgesamt waren die Kulturbedingungen in der vorliegenden Arbeit bei Ctl- und TOF-iPSC-CMs vergleichbar.

Aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnene Kardiomyozyten reifen mit zunehmender Kultivierungszeit (Ivashchenko et al. 2013; Yang et al. 2014). Deshalb wurden die Ergebnisse für junge (d27 – 42) und alte (d47 – 76) Zellen separat verglichen.

4.1.5 Phänotyp der aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnenen Kardiomyozyten

Aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnene Kardiomyozyten bilden i. d. R. gemischte Populationen aus ventrikulären, atrialen und nodalen CMs (Ma et al. 2011). Zur Unterscheidung existieren verschiedene Ansätze (beispielsweise die Länge des Aktionspotentials oder die Repolarisationsfraktion). Auf eine genaue Charakterisierung der iPSC-CMs in ventrikulär, atrial und nodal wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet, da Zellkulturbedingungen und Differenzierungsprotokolle die Eigenschaften der Aktionspotentiale beeinflussen (Karakikes et al. 2015). Zudem ist eine eindeutige Charakterisierung, die ausschließlich auf AP-Parametern beruht, nicht zuverlässig möglich (Ben-Ari et al. 2016). Generell sind AP-Messungen in iPSC-CMs mittels Patch-Clamp-Technik nicht immer technisch einwandfrei durchführbar (vgl. Abschnitt 4.5.1). Damit würde eine Klassifikation, die auf AP-Parametern beruht ggf. unterminiert werden (Horváth et al. 2018). Allgemein ist die Charakterisierung von unreifen Zellen schwierig, da der endgültige Phänotyp der Zellen ggf. noch nicht feststeht (Sheng et al. 2012).

4.2 Beobachtungen in der Zellkultur

Etwa 13 Tage nach Auftauen und Ausplattieren der Zellen konnte ein regelmäßiges spontanes Schlagen beobachtet werden (vgl. Abschnitt 3.1). Diese Beobachtung steht in Einklang mit der Literatur: Schlagende iPSC-CMs wurden innerhalb von 6 bis 15 Tagen nach Kulturbeginn beschrieben (Davis et al. 2012; Hoekstra et al. 2012; Ivashchenko et al. 2013; Yang et al. 2014).

Ungefähr einen Monat nach Auftauen und Ausplattieren der iPSC-CMs waren die ersten toten Zellen auf den Cover-Slips zu sehen. Mit zunehmendem Alter bildeten die iPSC-CMs mehr Vakuolen bzw. Apoptosekörperchen aus und schrumpften. Die Herstellung eines Gigaseals war dann erschwert (vgl. Abschnitt 3.1). Es ist bekannt, dass die Langzeitkultur von iPSC-CMs zur ultrastrukturellen, elektrophysiologischen und morphologischen Reifung der Zellen führt (Rao et al. 2013; Yang et al. 2014). Die schlechtere Qualität der älteren Zellen in der vorliegenden Arbeit ist vermutlich auf die Kulturbedingungen zurückzuführen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten iPSC-CMs wurden in unterschiedlichen Dichten (25.000, 50.000, 65.000, 75.000 und 100.000 Zellen pro Cover-Slip) ausplattiert. Für Einzelzellmessungen wurden vorwiegend 25.000 Zellen pro Cover-Slip verwendet. Dies entsprach der Dichte, die auch Jara-Avaca et al. (2017) verwendeten (25.000 Zellen pro cm^2). Für Aktionspotentialmessungen wurden die Zellen in einer Dichte von 75.000 bis 100.000 Zellen pro Cover-Slip ausgesät. Als Folge bildeten sie z. T. Zell-Zell-Verbindungen und damit ein funktionelles Synzytium aus. Es ist bekannt, dass iPSC-CMs in der 2D-Kultur ein funktionelles Synzytium bilden können (Ivashchenko et al. 2013). Da die AP-Messungen einen Überblick über die zelluläre Elektrophysiologie geben sollten, war

dies nicht relevant. Auch von Sheng et al. (2012) wurden AP-Messungen an einem funktionellen Synzytium von zwei bis fünf Zellen durchgeführt. Dies hatte in den Augen der Autoren den Vorteil, dass die Tendenz der Zellen, ein irreguläres Schlagen zu entwickeln, reduziert war.

Die Morphologie der in der vorliegenden Arbeit verwendeten iPSC-CMs (vgl. Abschnitt 3.2) entsprach der Literatur: Die Zellen waren relativ klein und hatten eine runde oder längliche Form. Einige schlugen spontan, andere nicht (Bett et al. 2013; Meijer van Putten et al. 2015).

4.3 Zellgröße

Die Bestimmung der Zellgröße erfolgte durch Messung der Membrankapazität, da diese direkt proportional zur Zelloberfläche ist (Gentet et al. 2000). Im Durchschnitt waren Ctl- und TOF-Zellen gleich groß (57,69 ± 9,00 pF, n = 105 vs. 51,38 ± 7,82 pF, n = 64; p = 0,6294) (vgl. Abschnitt 3.3). Mit einer durchschnittlichen Membrankapazität von ca. 50 – 60 pF waren die iPSC-CMs jedoch deutlich kleiner als humane adulte CMs (C_M = ca. 150 pF) (Yang et al. 2014). Direkt nach dem Auftauen der Zellen, wurde die Zellgröße zudem mithilfe des Casytons bestimmt. Auch hier war kein Unterschied zwischen TOF- und Ctl-Gruppe festzustellen (vgl. Abschnitt 3.1).

In der Literatur variieren die Angaben über die C_M bei iPSC-CMs: Bei Zhang et al. (2013) lag sie zwischen 25 pF und 51 pF, bei Ma et al. (2011) dagegen bei 88,7 ± 5,0 pF. Somit befand sich die in dieser Arbeit gemessene C_M in etwa in der Mitte – ähnlich wie bei Davis et al. (2012) (36,0 ± 3,3 pF), Horváth et al. (2018) (30,8 ± 1,5 pF in der eigenen Zellreihe bzw. 41,4 ± 3,7 pF in der kommerziellen Zelllinie) und Vaidyanathan et al. (2016) (44,3 ± 12,0 pF).

Allerdings fiel in der vorliegenden Arbeit eine starke Abhängigkeit der C_M von der Zelldichte auf (vgl. Abschnitt 3.3). Diese Beobachtung könnte folgendermaßen erklärbar sein: Je dichter die Zellen ausplattiert waren, desto eher bildeten sie Zell-Zell-Verbindungen aus. Da bei einem funktionellen Synzytium die Membrankapazität aller gekoppelten Zellen gemessen wird, ist diese folglich höher.

Allgemein ist zu diskutieren, ob die Membrankapazität eine gute Möglichkeit zur Abschätzung der Zellgröße ist, da die gemessene Zelle häufig für das Experiment bereits vorselektiert wurde (z. B. eher kleinere Zellen für Voltage-Clamp-Experimente, um die Spannungskontrolle zu verbessern). Somit könnte eine Verzerrung der tatsächlichen durchschnittlichen Zellgröße vorliegen (Pelzmann et al. 1998).

Unsere Kooperationspartner in Berlin bestimmten bei derselben Zellreihe optisch die Zellgröße und stellten fest, dass die jungen TOF-iPSC-CMs (d30) im Vergleich zu den alten TOF-iPSC-CMs (d60) deutlich hypertroph waren. Auch im Vergleich zu den jungen

Ctl-Zellen (d30) waren die TOF-Zellen hypertroph. Dieser Unterschied konnte von ihnen bei älteren Zellen (d60) jedoch nicht mehr nachgewiesen werden[2].

In nativen humane CMs des rechten Ventrikels von Kindern mit Fallot'scher Tetralogie wurde ebenfalls eine leicht erhöhte Zellgröße im Vergleich zu CMs von Kindern mit VSD beschrieben (Wu et al. 2012).

4.4 Messungen zur Calciumhomöostase

4.4.1 Diskussion der Methodik

Kontroll- und TOF-Zellen wurden bzgl. des L-Typ-Ca^{2+}-Stroms und der getriggerten systolischen CaTs mittels Whole-Cell-Patch-Clamp-Technik im Voltage-Clamp-Modus und mithilfe von Epifluoreszenz (Fluo-3) charakterisiert und verglichen (vgl. Abschnitt 2.2 und Abschnitt 2.7). Da diese Methoden bereits in der Literatur etabliert sind (Trafford et al. 1999; Voigt et al. 2012; 2014) wird hier auf eine ausführliche Diskussion verzichtet. Die Identität des depolarisierenden Einwärtsstroms wurde durch Nifedipin bestätigt.

Fluo-3 ist ein häufig verwendeter Ca^{2+}-Indikator mit hoher Affinität für freie Ca^{2+}-Ionen. Er zählt zu den Single-Wave-Length-Indikatoren. Damit ist Fluo-3 dafür geeignet, zytosolische Ca^{2+}-Konzentrationen zu bestimmen. Seine Vorteile liegen in der guten zeitlichen Auflösung und dem sehr guten Signal-Rausch-Verhältnis. Allerdings können Probleme wie z. B. eine ungleichmäßige Beladung der Zelle oder Photobleaching auftreten. Um dies zu vermeiden, sind Messungen mit einem ratiometrischen Ca^{2+}-Indikator besser geeignet. Des Weiteren ist zu beachten, dass chemische Ca^{2+}-Indikatoren als Ca^{2+}-Puffer wirken und somit einen Einfluss auf die Ca^{2+}-Konzentration und -Kinetik haben. Hier gilt es dann, zwischen der Signalstärke und dem Puffereffekt abzuwägen. Die Probleme, die durch Ca^{2+}-Pufferung entstehen, sind bei Fluo-3 jedoch gering (Paredes et al. 2008).

Der Ca^{2+}-Gehalts des sarkoplasmatischen Retikulums wurde durch Applikation von 10 mM Koffein bestimmt. Die SERCA2a-Aktivität wurde aus den Abklingkonstanten der systolischen und koffeininduzierten CaTs berechnet (vgl. Abschnitt 2.3 und Abschnitt 2.7). Auch dies sind etablierte Methoden (Diaz et al. 2004; Eisner 2014; Trafford et al. 1999; Varro et al. 1993), weshalb hier auf eine ausführliche Diskussion verzichtet wird.

Der integrierte NCX-Strom ist ein akzeptiertes Maß für die Ca^{2+}-Beladung des SRs. Das Integral spiegelt die totale transportierte Ladung wider und erlaubt so eine genaue Abschätzung des aus der Zelle heraus transportieren Ca^{2+} nach der Applikation von Koffein. Komplikationen, die sich durch die Sättigung eines Indikators oder der Quantifizierung von nicht-ratiometrischen Ca^{2+}-Indikatoren ergeben, werden so vermieden

[2] Diese Information verdanke ich dem Manuskript „Studying heart development in patients with Tetralogy of Fallot using induced pluripotent stem cells" von S. Appelt et al. (2018). Die Daten wurden bisher nicht publiziert.

(Zhang et al. 2013). Zu beachten ist lediglich, dass ggf. auch andere Mechanismen außerhalb des NCX bei der Entfernung von Ca^{2+} aus dem Zytoplasma beteiligt sein könnten (z. B. die Plasmamembran-Ca^{2+}-ATPase, PMCA) (Trafford et al. 1997; 1999).

4.4.2 Zeitabhängigkeit des L-Typ-Calciumstroms

Bei der Analyse der Daten fiel auf, dass der L-Typ-Ca^{2+}-Strom der Ctl-iPSC-CMs in Abhängigkeit vom Messtag variierte: Ältere Zellen (d47 – 96) hatten einen signifikant größeren $I_{Ca,L}$ im Vergleich zu jüngeren Zellen (d29 – 42) (-26,11 ± 3,03 pA/pF, n = 31 vs. -9,88 ± 1,07 pA/pF, n = 20; p = 0,0001) (vgl. Abschnitt 3.4.1).

Es ist bekannt, dass die Langzeitkultur von iPSC-CMs zu deren Reifung führt. Hiervon sind auch der $I_{Ca,L}$ und die Ca^{2+}-Homöostase der Zellen betroffen (Ivashchenko et al. 2013; Lundy et al. 2013; Yang et al. 2014).

Zhao et al. (2018) wiesen mit zunehmendem Zellalter eine Upregulation der meisten Ionenkanäle auf genetischer Ebene nach. Jedoch konnten sie dies in Patch-Clamp-Experimenten funktionell nicht bei jedem Kanal bestätigen. Der Unterschied im $I_{Ca,L}$ zwischen Tag 30 – 40 und Tag 50 – 60 der Differenzierung war bei ihnen nicht signifikant (-9,7 ± 1,1 pA/pF vs. -13,2 ± 3,8 pA/pF). Allerdings führten sie ihre Messungen bei Raumtemperatur durch und es ist bekannt, dass spannungsabhängige Ionenströme stark temperaturabhängig sind (Pelzmann et al. 1998). Nichtsdestotrotz decken sich die Durchschnittswerte der jungen iPSC-CMs mit denen der vorliegenden Arbeit (-9,7 ± 1,1 pA/pF bei Zhao et al. bzw. -9,88 ± 1,07 pA/pF in der vorliegenden Arbeit).

Auch bei Sheng et al. (2012) zeigte sich eine Tendenz zu größeren L-Typ-Ca^{2+}-Strömen mit zunehmendem Zellalter. Hier betrug die Größe des Stroms der jungen Zellen (d20) ebenfalls ca. -10 pA/pF. An Tag 60 der Differenzierung war der $I_{Ca,L}$ mit nur -15 pA/pF allerdings deutlich kleiner als der $I_{Ca,L}$ der alten Zellen (d47 – 96) in der vorliegenden Arbeit (ca. -26 pA/pF).

Ivashchenko et al. (2013) wiederum berichteten von einem signifikant größeren $I_{Ca,L}$ und einer erhöhten Expression von Cav1.2 (einer Untereinheit des L-Typ-Ca^{2+}-Kanals) in älteren iPSC-CMs. Ihre Graphik zur Abhängigkeit des $I_{Ca,L}$ vom Messtag ähnelt derjenigen dieser Arbeit mit den größten Durchschnittswerten des $I_{Ca,L}$ um Tag 50 der Differenzierung (vgl. Abbildung 19.A).

Zhang et al. (2013) maßen eine Stromdichte von ca. -8,5 pA/pF bei Raumtemperatur, wobei sich eine große Varianz zwischen den einzelnen Zellen zeigte (von ca. -3 pA/pF bis ca. -20 pA/pF). Eine Veränderung mit zunehmendem Zellalter wurde nicht festgestellt. Allerdings beschränkte sich der Messzeitraum auf Tag 33 bis 46 der Differenzierung. Dieser Zeitraum ist vermutlich zu kurz, um eine signifikante Abhängigkeit vom Messtag feststellen zu können.

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit war der $I_{Ca,L}$ in iPSC-CMs an Tag 30 bis 32 der Differenzierung bei Ma et al. (2011) mit -17,1 ± 1,7 pA/pF deutlich größer. Jedoch wurden die Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt. Zudem enthielt die extrazelluläre Lösung deutlich mehr Ca^{2+} (5 mmol/l vs. 2 mmol/l in der vorliegenden Arbeit), weshalb ein direkter Vergleich der Werte schwierig ist.

Allgemein gilt, dass Vergleiche zwischen einzelnen Arbeiten nur eingeschränkt möglich sind, da sich die experimentellen Bedingungen und damit auch die gemessen Werte z. T. stark unterscheiden (Hoekstra et al. 2012).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die zunehmende Größe des $I_{Ca,L}$ für eine Reifung der iPSC-CMs spricht.

Aufgrund der Beobachtungen, dass der $I_{Ca,L}$ mit zunehmendem Zellalter stärker variierte und durchschnittlich an Größe zunahm sowie ferner die Gigaseal-Bildung in älteren Zellen erschwert war, wurde beschlossen, für die Messungen zur Ca^{2+}-Homöostase nur Ctl- bzw. TOF-Zellen im Zeitraum von Tag 27 bis 42 der Differenzierung zu verwenden. Dies deckt sich mit den Angaben zum Messzeitpunkt von iPSC-CMs in der Literatur, welche häufig zwischen Tag 25 und Tag 46 der Differenzierung elektrophysiologisch untersucht wurden (Abilez et al. 2018; Horváth et al. 2018; Ma et al. 2011; Spencer et al. 2014; Zhang et al. 2013; Zhao et al. 2018).

4.4.3 Zeitabhängigkeit der getriggerten Calciumtransienten

Der höhere $I_{Ca,L}$ in den alten Ctl-iPSC-CMs triggerte einen ebenfalls höheren CaT. Die systolische $[Ca^{2+}]_i$ und damit auch die Amplitude des CaT waren in den alten Ctl-Zellen (d47 – 66) im Vergleich zu den jungen Ctl-Zellen (d29 – 42) signifikant erhöht. Dagegen war die Zeit bis zum Peak des CaT in den alten Zellen verkürzt (vgl. Abschnitt 3.4.1). Die kürzere Zeit bis zum Peak in älteren iPSC-CMs wurde auch von Lundy et al. (2013) in hESC-CMs beobachtet. Jedoch war hier die Amplitude des CaT unverändert.

Die schnellere Ca^{2+}-Freisetzung spricht für ein besser entwickeltes SR in den älteren Zellen (Lundy et al. 2013), was auch mit der von Ivashchenko et al. (2013) beschriebenen erhöhten Expression von SERCA2a und RyR2 mit zunehmender Kulturzeit im Einklang steht.

4.4.4 Der L-Typ-Calciumstrom

Auf depolarisierende Spannungssprünge zeigten sowohl die Ctl- als auch die TOF-iPSC-CMs L-Typ-Ca^{2+}-Ströme mit einer typischen glockenförmigen Strom-Spannungs-Beziehung. Die Form der IV-Kurve war zwischen Ctl- und TOF-Gruppe vergleichbar. Die Mittelwerte des $I_{Ca,L}$ waren dagegen in den TOF-Zellen signifikant größer (vgl. Abschnitt 3.4.2).

Die glockenförmige IV-Kurve ist ein Hauptmerkmal des $I_{Ca,L}$ (Bøkenes et al. 2005). Somit wurde bestätigt, dass sowohl Ctl- als auch TOF-iPSC-CMs einen L-Typ-Ca^{2+}-Strom exprimieren. Die Form der IV-Kurve mit Aktivierung des $I_{Ca,L}$ bei ca. -30 mV, einem Peak zwischen -10 mV und +10 mV und einem Umkehrpotential von etwa +60 mV wurde so bereits für iPSC-CMs beschrieben (Ma et al. 2011; Zhang et al. 2013). Auch für TOF-Zellen ist die Expression einer glockenförmigen IV-Kurve mit den oben genannten Werten bzgl. Aktivierung, Peak und Umkehrpotential bekannt, allerdings bisher nur in humanen CMs (Pelzmann et al. 1998).

Die Amplitude des $I_{Ca,L}$ war in den TOF-Zellen im Vergleich zu den Ctl-Zellen signifikant erhöht (-19,43 ± 2,56 pA/pF, n = 23 vs. -9,88 ± 1,07 pA/pF, n = 20; p = 0,0022) (vgl. Abschnitt 3.4.2).

Pelzmann et al. (1998) untersuchten die Eigenschaften des $I_{Ca,L}$ in humanen CMs, die aus OP-Präparaten von Kindern mit Fallot'scher Tetralogie stammten. Dabei maßen sie eine Stromdichte von ca. -5,8 pA/pF (bei gleicher Temperatur und Ca^{2+}-Konzentration wie in der vorliegenden Arbeit). Folglich war der $I_{Ca,L}$ in den nativen TOF-Zellen im Vergleich zu den Ctl-iPSC-CMs der vorliegenden Arbeit kleiner. Leider hatten Pelzmann et al. selbst keine direkten Vergleichszellen, da Kardiomyozyten von gesunden Kindern nicht verfügbar sind. Sie verglichen ihre Ergebnisse deshalb mit adulten, zumeist kranken Kardiomyozyten. Dennoch mutmaßten sie, dass die elektrophysiologischen Eigenschaften des $I_{Ca,L}$ durch die Fallot'sche Tetralogie wenig beeinflusst würden. Damit ergibt sich eine Diskrepanz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Diese könnte dadurch zustande kommen, dass iPSC-CMs eher fetalen als adulten CMs ähneln (Karakikes et al. 2015; Yang et al. 2014) und Unterschiede zwischen gesunden und kranken Zellen postnatal ggf. nicht mehr nachweisbar sind. Des Weiteren bleibt zu hinterfragen, inwiefern Kardiomyozten von Kindern wiederum mit adulten Zellen vergleichbar sind.

Im Tiermodell für konotrunkale Herzfehler (zu welchen auch die Fallot'sche Tetralogie gehört) wurde ein verminderter $I_{Ca,L}$ in Tierembryonen nachgewiesen (Nichols und Creazzo 2005). Die Angaben, ob im Tiermodell für postnatal korrigierte Fallot'sche Tetralogie die Expression von L-Typ-Ca^{2+}-Kanälen downreguliert ist oder nicht, sind in der Literatur widersprüchlich (Benoist et al. 2017; Chiu et al. 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein *In-vitro*-iPS-Zell-Modell für die Fallot'sche Tetralogie untersucht, weshalb Vergleiche mit anderen Arbeiten erschwert sind. Es stellt sich die Frage, ob Ergebnisse aus Tiermodellen mit denen von iPSC-CMs vergleichbar sind. Zudem bleibt unklar, ob sich die Elektrophysiologie bei Fallot'scher Tetralogie postnatal verändert und somit Ergebnisse aus TOF-Zellen bei langjährigem Herzversagen mit Ergebnissen aus iPSC-CMs verglichen werden können.

4.4.5 Größe des getriggerten systolischen Calciumtransienten

Veränderungen des CaT entstehen durch ein Ungleichgewicht des Ein- und Ausstroms von Ca^{2+}. In der Folge kommt es auch zu Veränderungen der Kontraktilität. Eine Veränderung des Ca^{2+}-Einstroms wird durch eine Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ ausgeglichen (Eisner et al. 2017). Ein erhöhter Ca^{2+}-Einstroms triggert eine größere Ca^{2+}-Freisetzung aus dem SR und führt so zu einer größeren Amplitude des systolischen CaT (Eisner 2014). Dieser Effekt war auch in der vorliegenden Arbeit zu beobachten: Der höhere $I_{Ca,L}$ in den TOF-Zellen triggerte einen ebenfalls höheren CaT. Die systolische $[Ca^{2+}]_i$ und folglich auch die Amplitude des CaT war in den TOF-Zellen erhöht (vgl. Abschnitt 3.4.2).

Für iPSC-CMs wurden unsynchronisierte CaTs mit größeren Amplituden und schnellerem Anstieg des CaT in der Zellperipherie im Vergleich zur zentralen Zellregion beschrieben. Die uneinheitlichen Ca^{2+}-Dynamiken werden auf die Varibilität im Reifungsgrad der iPSC-CMs zurückgeführt. Ebenso scheinen die fehlenden T-Tubuli und damit eine schwache Kopplung zwischen Ca^{2+}-Einstrom durch L-Typ-Ca^{2+}-Kanäle und getriggerter Ca^{2+}-Freisetzung über RyR2s aus dem SR eine Rolle zu spielen (Hoekstra et al. 2012; Yang et al. 2014). Der Verlust von T-Tubuli und damit eine Reduktion der Synchronizität des CaT wurden außer bei iPSC-CMs auch bei Herzversagen gefunden (Eisner et al. 2017).

4.4.6 Die diastolische Calciumkonzentration

Es wird angenommen, dass Störungen in der Ca^{2+}-Homöostase und eine intrazelluläre Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration zentrale Mechanismen auf zellulärem Level für die Entwicklung von Erkrankungen sind (Matsa et al. 2014). Interessanterweise war in der vorliegenden Arbeit die diastolische $[Ca^{2+}]_i$ in den TOF-iPSC-CMs im Vergleich zu den Ctl-iPSC-CMs erhöht (vgl. Abschnitt 3.4.2). Die diastolische $[Ca^{2+}]_i$ wird durch eine Kombination aus sarkolemmalen Ca^{2+}-Flüssen und SR-Ca^{2+}-Flüssen bestimmt. Bei schnellerer Stimulation der Zelle steigt die diastolische $[Ca^{2+}]_i$, da aufgrund der höheren Stimulationsrate der vorherige CaT noch nicht ganz abgefallen ist (Eisner et al. 2017). Ein solcher Effekt ist als Erklärung für die erhöhte diastolische $[Ca^{2+}]_i$ in den TOF-Zellen jedoch unwahrscheinlich, da Ctl- und TOF-iPSC-CMs mit der gleichen Frequenz stimuliert wurden.

Für die Funktion des Herzens ist eine niedrige diastolische $[Ca^{2+}]_i$ notwendig (Eisner et al. 2017). Eine erhöhte diastolische $[Ca^{2+}]_i$ kann zur Entwicklung von Arrhythmien in Form von DADs führen (Matsa et al. 2014; Venetucci et al. 2008) (vgl. Abschnitt 4.5.4). Zudem kann sie die Hypertrophie von Herzmuskelzellen mitbedingen (Molkentin et al. 1998). Rechtsventrikuläre Hypertrophie ist ein Hauptmerkmal der Fallot'schen Tetralogie (Herold 2016). Hier könnte also ein pathogenetischer Zusammenhang liegen.

Die in den TOF-Zellen erhöhte diastolische $[Ca^{2+}]_i$ könnte auf ein erhöhtes SR-Ca^{2+}-Leck hindeuten, welches durch eine Dysfunktion von RyR2s verursacht sein könnte (Eisner 2014). Viele Studien legen nahe, dass die Öffnung von RyR2s bei Herzversagen erhöht ist

(Eisner et al. 2017). Um die Ursache der erhöhten diastolischen $[Ca^{2+}]_i$ in den TOF-iPSC-CMs genauer zu untersuchen, könnten in einer weiteren Arbeit Ca^{2+}-Spark-Messungen mittels konfokaler Mikroskopie durchgeführt werden. Ein erhöhter Ca^{2+}-Einstrom und eine erhöhte diastolische $[Ca^{2+}]_i$ können über eine Erhöhung der Ca^{2+}-Spark-Frequenz zur Ausbildung von Ca^{2+}-Waves und damit zu Arrhythmien führen (Eisner 2014; Venetucci et al. 2008).

4.4.7 Nifedipinsensitivität des L-Typ-Calciumstroms

Bei Aufzeichnen der Strom-Spannungs-Kurve unter 1 μM und 10 μM Nifedipin zeigte sich, dass der $I_{Ca,L}$ sowohl in den Ctl-iPSC-CMs (d29 – 34 und d52 – 66) als auch in den TOF-iPSC-CMs (d30) durch Nifedipin fast vollständig supprimierbar war. Die Supprimierung des $I_{Ca,L}$ durch Nifedipin führte zudem zu kleineren getriggerten CaT (vgl. Abschnitt 3.4.3). Die Effekte von Nifedipin waren, wie in der Literatur beschrieben (Sheng et al. 2012), vollständig reversibel (Daten nicht gezeigt).

Da Nifedipin ein selektiver L-Typ-Ca^{2+}-Kanalblocker ist, bestätigte dieses Experiment zusammen mit der typischen glockenförmigen Strom-Spannungs-Kurve, dass der gemessene Einwärtsstrom, tatsächlich ein L-Typ-Ca^{2+}-Strom war.

Dass iPSC-CMs einen nifedipinabhängigen $I_{Ca,L}$ exprimieren, wurde bereits in der Literatur beschrieben (Ivashchenko et al. 2013; Ma et al. 2011). Auch dass Nifedipin zu kleineren CaTs führt, ist bekannt (Bøkenes et al. 2005; Ivashchenko et al. 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde der $I_{Ca,L}$ durch 10 μM Nifedipin nicht vollständig blockiert. Ein Reststrom von ca. -2,5 pA/pF war sowohl bei den Ctl- als auch bei den TOF-Zellen zu verzeichnen. Dies steht im Gegensatz zur Arbeit von Sheng et al. (2012), welche bei einer Nifedipin-Konzentration von 10 μM eine komplette Blockierung der Aktionspotentiale nachweisen konnten. Bei Zhao et al. (2018) blieb dagegen ebenfalls ein Reststrom bestehen, welcher mit -3,2 ± 0,6 pA/pF (d30 – 40) bzw. -4,4 ± 1,2 pA/pF (d50 – 60) sogar noch etwas größer war als in der vorliegenden Arbeit. Allerdings ist hier nicht eindeutig erkennbar, ob der $I_{Ca,L}$ durch Nifedipin oder Diltiazem blockiert wurde und in welcher Konzentration der Blocker verwendet wurde. Zudem wurden die Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt.

Einhergehend mit einem Reststrom des $I_{Ca,L}$ wurden auch die CaTs in der vorliegenden Arbeit durch Nifedipin nicht vollständig supprimiert. Diese Beobachtung machten auch von Bøkenes et al. (2005).

Somit stellt sich die Frage, ob der verbleibende Reststrom nicht nifedipinsensitiv war und damit z. B. auf T-Typ-Ca^{2+}-Kanälen beruhte oder ob eine Konzentration von 10 μM Nifedipin nicht ausreichend war, um den $I_{Ca,L}$ vollständig zu blockieren. Ob iPSC-CMs T-Typ-Ca^{2+}-Kanäle exprimieren, ist noch nicht abschließend geklärt (Ma et al. 2011). Dieser Frage könnte in weiteren Arbeiten nachgegangen werden.

4.4.8 Der Calciumgehalt des sarkoplasmatischen Retikulums

Da Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ zu Veränderungen des SR-Ca^{2+}-Gehalts führen (Venetucci et al. 2008), wurde die sarkoplasmatische Ca^{2+}-Konzentration gemessen. Der Ca^{2+}-Gehalt des SRs gilt als Hauptfaktor zur Kontrolle des freigesetzten Ca^{2+} und bestimmt damit maßgeblich die Amplitude des systolischen CaT. Der SR-Ca^{2+}-Gehalt an sich wird wiederum durch die Balance zwischen Ca^{2+}-Aufnahme über die SERCA2a und den Ca^{2+}-Ausstrom über RyR2s kontrolliert. Zusätzlich spielt die Ca^{2+}-Konzentration im Zytoplasma und im SR selbst eine Rolle. Der SR-Ca^{2+}-Gehalt passt sich so an, dass in der Zelle ein Flussgleichgewicht zwischen Ca^{2+}-Einstrom und Ca^{2+}-Ausstrom entsteht. Veränderungen von Proteinen der Ca^{2+}-Homöostase können zu Veränderungen des Ca^{2+}-Gehalts des SRs führen (Eisner et al. 2017).

Interessanterweise wurde bzgl. des SR-Ca^{2+}-Gehalts kein Unterschied zwischen Ctl- und TOF-Zellen gefunden: Sowohl die Amplitude des koffeininduzierten CaT als auch die Ladung, welche über den NCX transportiert wurde, waren vergleichbar (vgl. Abschnitt 3.4.4).

In Tiermodellen sog. konotrunkaler Herzfehlern, zu welchen auch die Fallot'sche Tetralogie zählt, zeigte sich eine Beeinträchtigung der SR-Funktion (Vittorini et al. 2007). Dass in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied zwischen TOF- und Ctl-iPSC-CMs gefunden wurde, könnte daran liegen, dass eine Erhöhung des $I_{Ca,L}$ wenig Auswirkungen auf den SR-Ca^{2+}-Gehalt hat. Eine erhöhte Amplitude des systolischen CaT und eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ (wie hier in den TOF-Zellen beobachtet) müssen, um das Flussgleichgewicht der Zelle zu erhalten, in irgendeiner Form kompensiert werden. Dies kann entweder durch einen erhöhten Ausstrom von Ca^{2+} über den NCX geschehen oder durch eine stärkere Aktivierung der SERCA2a (vgl. Abschnitt 4.4.10) (Eisner 2014; Eisner et al. 2017).

4.4.9 Der NCX-Strom

Der NCX-Strom gilt als Hauptgegenspieler, um den Ca^{2+}-Einstrom durch L-Typ-Ca^{2+}-Kanäle zu balancieren. Die Amplitude des I_{NCX} ist abhängig vom Membranpotential sowie der intrazellulären Na^+- und Ca^{2+}-Konzentration. Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ können somit über Veränderungen des I_{NCX} zu spontanen Arrhythmien führen (Hoekstra et al. 2012).

Interessanterweise war trotz veränderter diastolischer $[Ca^{2+}]_i$ kein signifikanter Unterschied des I_{NCX} zwischen TOF- und Ctl-iPSC-CMs festzustellen. Tendenziell war der I_{NCX} in den TOF-Zellen etwas kleiner als in den Ctl-Zellen ($-0{,}91 \pm 0{,}09$ pA/pF, $n = 10$ vs. $-1{,}39 \pm 0{,}48$ pA/pF, $n = 14$; $p = 0{,}3948$ im Mann-Whitney-Test) (vgl. Abschnitt 3.4.4). Allerdings gestaltete sich die Messung des I_{NCX} technisch schwierig, da aufgrund des sehr kleinen Stroms, dieser oft schwer vom Hintergrundrauschen zu differenzieren war.

Der tendenziell kleinere NCX-Strom deckt sich mit der Beobachtung, dass in adulten CMs aus OP-Präparaten von Patienten mit Fallot'scher Tetralogie eine Downregulation des NCX auf mRNA- und Proteinlevel beschrieben wurde. Die Ursache wird hier jedoch eher in der chronische Hypoxie gesehen (Ghorbel et al. 2010). Inwiefern die funktionellen Eigenschaften des NCX-Stroms in iPSC-CMs also mit adulten humanen CMs vergleichbar sind, ist noch nicht abschließend geklärt (Karakikes et al. 2015).

Aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnene Kardiomyozyten reagieren auf die Applikation von Koffein mit einem großen CaT und der Aktivierung von NCX (Zhang et al. 2013). Dies war auch in der vorliegenden Arbeit zu beobachten. Die genaue Größe des I_{NCX} variiert in der Literatur: Zhao et al. (2018) haben Werte von ca. -6 pA/pF für den I_{NCX} gemessen (an Tag 30 bis 40 der Differenzierung). Allerdings führten sie ihre Messungen bei Raumtemperatur durch. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werte (-1,39 ± 0,48 pA/pF bei den Ctl-Zellen an Tag 29 – 42) (vgl. Abschnitt 3.4.5) decken sich eher mit denen von Zhang et al. (2013) (-2,13 ± 0,27 pA/pF). Die Autoren berichten zudem von einer großen Variabilität zwischen den einzelnen Zellen in der Größe der koffeingetriggerten Ca^{2+}-Freisetzung.

Mit zunehmender Zellreifung war in der vorliegenden Arbeit eine Tendenz zu einem größeren I_{NCX} hin zu erkennen (vgl. Abschnitt 3.4.5). Dass der I_{NCX} im Verlauf der Zellreifung zunimmt, wurde auch von Hoekstra et al. (2012) beschrieben.

4.4.10 Die Aktivität der SERCA2a

Aus den Abklingkonstanten des systolischen und koffeingetriggerten CaT wurde die Aktivität der SERCA2a berechnet. Im Herzen gilt die SERCA2a als Hauptregulator des zytosolischen Ca^{2+} (Vittorini et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit war ihre Aktivität in den TOF-Zellen im Vergleich zu den Ctl-Zellen erhöht (vgl. Abschnitt 3.4.4).

Eine Erhöhung der SERCA2a-Aktivität, z. B. durch Phosphorylierung von PLN, führt zu einem erhöhten Ca^{2+}-Gehalt des SRs (Eisner 2014). Dieser Effekt war in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht zu beobachten (vgl. Abschnitt 4.4.8). Der Grund hierfür könnte in der erhöhten Amplitude des systolischen CaT der TOF-Zellen liegen: Um das Flussgleichgewicht der Zelle (d. h. Ca^{2+}-Einstrom = Ca^{2+}-Ausstrom) zu erhalten, wird eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch eine Beschleunigung der SERCA2a und damit einem schnelleren Abfall des CaT ausgeglichen. Andernfalls würde der größere CaT zu einem größeren Ca^{2+}-Ausstrom führen (Eisner et al. 2017). Ferner kann eine erhöhte Ca^{2+}-Aufnahme in das SR mit der Dysregulation von RyR2 verbunden sein. Dies wiederum kann zu einem SR-Ca^{2+}-Leck und damit in der Folge zu späten Nachdepolarisation führen (Voigt et al. 2014) (vgl. Abschnitt 4.4.6, Abschnitt 4.5.4 und Abschnitt 4.7).

Des Weiteren kann die erhöhte SERCA2a-Aktivität den Zeitverlauf von Ca^{2+}-Sparks modulieren und zu einem schnelleren Abfall derselben führen. Damit wird die Ausbildung und Ausbreitung einer Ca^{2+}-Wave und folglich die Entstehung von Arrhythmien erschwert

(Eisner et al. 2017; Venetucci et al. 2008). Anderseits erleichtert eine erhöhte SERCA2a-Aktivität über die Erhöhung des SR-Ca^{2+}-Gehalts die Entstehung von Ca^{2+}-Waves (Venetucci et al. 2008). Um die Auswirkungen der erhöhten SERCA2a-Aktivität in den TOF-Zellen auf die Entstehung von Ca^{2+}-Sparks- und -Waves genauer zu untersuchen, wären Messungen mittels konfokaler Mikroskopie eine gute Möglichkeit.

Im Tiermodell von korrigierter Fallot'scher Tetralogie zeigte sich eine tendenzielle Downregulation von SERCA2a auf mRNA-Level (Charron et al. 2015). Diese Reduktion der SERCA2a auf mRNA-Level fanden auch Wu et al. (2012) in humanen CMs von Kindern mit Fallot'scher Tetralogie. Die Proteinmenge von SERCA2a war dagegen unverändert. Die Reduktion auf mRNA-Level wird hier als Biomarker für einen pathologischen Prozess im frühen Stadium zyanotischer angeborener Herzfehler mit hypertrophem rechtem Ventrikel gesehen. Im Gegensatz dazu war bei Vittorini et al. (2007) die die Expression von SERCA2a auf mRNA-Level in humanen CMs von Kindern mit Fallot'scher Tetralogie unverändert. Dies deuteten die Autoren als Teil eines komplexen Mechanismus, um die intrazelluläre Ca^{2+}-Reserve bei TOF zu verbessern oder alternativ als intrinsischen Teil des kongenitalen Defekts. Für diese beiden Hypothesen sprechen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Die erhöhte SERCA2a-Aktivität könnte als Mechanismus zur Kompensation der gestörten Ca^{2+}-Homöostase in den TOF-Zellen gesehen werden.

Bei Vergleich der jungen Ctl-Zellen mit den alten Ctl-Zellen zeigte sich eine höhere SERCA2a-Aktivität in den älteren Zellen (vgl. Abschnitt 3.4.5). In der Literatur wurde ebenfalls eine erhöhte Expression von SERCA2a in iPSC-CMs ab Tag 45 der Differenzierung beschrieben (Ivashchenko et al. 2013).

4.5 Aktionspotentialmessungen

4.5.1 Diskussion der Methodik

4.5.1.1 Allgemeines

Aktionspotentiale wurden im Current-Clamp-Modus mittels Perforated-Patch-Clamp-Technik gemessen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden zur AP-Messung angewandt: Einerseits die „klassische" Version mit Stimulation über die Patchpipette und anderseits eine in unserer Arbeitsgruppe neu etablierten Methode, bei welcher die Zelle über ein elektrisches Feld stimuliert wurde (vgl. Abschnitt 2.8). Bei beiden Verfahren wurden die Zellen vor Messbeginn feldstimuliert und es wurden nur unter Stimulation schlagende Zellen gepatcht, um sicher zu gehen, dass auch nicht-spontan schlagende Zellen in der Lage waren, ein Aktionspotential auszubilden (Bett et al. 2013; Davis et al. 2012).

Um das RMP auf physiologischere Werte zu klemmen, wurde ggf. ein hyperpolarisierender Strom injiziert (Jara-Avaca et al. 2017). Hierbei war die Menge des injiziierten Stroms in Ctl- und TOF-Gruppe und bei beiden Messmethoden vergleichbar. Für die Analyse wurden nur Aktionspotentiale eingeschlossen, welche ein RMP von unter -60 mV und einen Peak von über 0 mV hatten. Damit sollte eine bessere Vergleichbarkeit der Messungen untereinander und eine physiologischere AP-Form erreicht werden.

4.5.1.2 Der Perforated-Patch

Der Vorteil von Perforated-Patch-Clamp-Experimenten gegenüber der Whole-Cell-Konfiguration liegt darin, dass ein Verlust intrazellulärer Substanzen vermieden wird bzw. nur sehr wenige Ionen zwischen Pipette und Zytoplasma ausgetauscht werden. Zelldialyse wird so minimiert, es kommt weniger zum sog. Rundown von Kanälen und das Aktionspotential wird stabilisiert. Insgesamt ähneln die experimentellen Bedingungen somit eher physiologischen Bedingungen (Hoekstra et al. 2012; Ma et al. 2011; Numberger und Draguhn 1996).

4.5.1.3 Die beiden Messmethoden

Bei klassischen Aktionspotentialmessungen im Current-Clamp-Modus wird ein kleiner Strom (ca. 400 – 600 pA) über die Patchpipette in die Zelle injiziert. Dieser löst ein Aktionspotential aus, welches wiederum zur Kontraktion der Zelle führt (Bøkenes et al. 2005; Meijer van Putten et al. 2015).

Die Stimulation von Kardiomyozyten über ein elektrisches Feld ist ebenfalls eine etablierte Methode, um durch die Depolarisation der Zellmembran ein Aktionspotential auszulösen. Allerdings führt diese Methode zur räumlich unterschiedlichen Polarisation der Membran, je nach Ausrichtung der Zelle im elektrischen Feld. Damit kommt es zu einem nicht einheitlichen Ionenfluss. Auf der anderen Seite reduziert eine externe Stimulation der Zellen die Variabiltät der elektrischen Aktivität (Bett et al. 2013; Bøkenes et al. 2005; Cheng et al. 1999; de Boer et al. 2010).

In Hinblick auf den direkten Vergleich der beiden Messmethoden existiert bisher nur sehr wenig Literatur. Deshalb wurden einige TOF-iPSC-CMs doppelt gemessen – erst „klassisch“, dann mittels Feldstimulation. Es konnten keine Unterschiede im RMP, in der APA und in der APD festgestellt werden (vgl. Abschnitt 3.5.1). Folglich wurden alle AP-Messungen gesammelt ausgewertet.

Bøkenes et al. (2005) untersuchten den Kontraktionsmechanismus bei Feldstimulation im Vergleich zur Stimulation über die Patchpipette. Dabei fanden sie ebenfalls ein vergleichbares diastolisches Membranpotential. Allerdings war der Peak des APs bei den feldstimulierten Zellen verspätet und niedriger, woraus die Autoren schlossen, dass bei Stimulation über ein elektrisches Feld die Depolarisation der Zelle nicht durch Öffnung von Na^+-Kanälen, sondern durch eine direkte Aktivierung von L-Typ-Ca^{2+}-Kanälen oder

durch den NCX-Strom im rückwärtsgerichteten Modus erfolgt. Die Kontraktionscharakteristika sind somit abhängig von der Stimulationsmethode und ggf. unterscheidet sich der relative Beitrag der involvierten Ionenströme. Leider finden sich in dieser Studie keine Angaben zur APD. Der erniedrigte Peak widerspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in welcher kein Unterschied in der Ampliutde des APs festgestellt wurde. Zu beachten ist, dass Bøkenes et al. Kardiomyozyten von Ratten mithilfe von Impalement-Messungen untersucht haben. Somit ist fraglich, inwiefern sich ihre Ergebnisse mit denen der vorliegenden Arbeit (iPSC-CMs und Perforated-Patch-Clamp-Experimente) überhaupt vergleichen lassen.

4.5.1.4 Probleme bei Aktionspotentialmessungen in aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnenen Kardiomyozyten

Ein bekanntes Problem bei AP-Messungen in iPSC-CMs ist der fehlende oder stark reduzierte I_{K1}. Dadurch haben iPSC-CMs ein relativ positives RMP und ein größeres arrhythmogenes Potential. Die AP-Konfiguration von iPSC-CMs unterscheidet sich von der humaner nativen CMs und hat eine hohe interzelluläre Variabilität. Diesem Problem kann durch dynamische Patch-Clamp-Experimente mittels Injektion von I_{K1} oder durch Überexpression von Untereinheiten des I_{K1} begegnet werden (Bett et al. 2013; Meijer van Putten et al. 2015; Vaidyanathan et al. 2016; Verkerk et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit wurde keine Anpassung des I_{K1} vorgenommen. Dadurch kam es zu einer hohen Variabilität der AP-Parameter, weshalb Unterschiede zwischen Ctl- und TOF-Gruppe nicht sicher auf das Krankheitsbild der Fallot'schen Tetralogie zurückzuführen sind, sondern ggf. auch durch die Methodik bedingt sein könnten.

Des Weiteren ist zu bedenken, dass iPSC-CMs aufgrund ihrer geringen Größe eine kleine Membrankapazität haben und damit die Bestimmung des Membranpotentials mit methodischen Problemen assoziiert ist. Die Verlässlichkeit von Patch-Clamp-Experimenten ist abhängig vom Abdichtungswiderstand, denn Leckströme reduzieren die tatsächliche Membranspannung. Dieses Problem wird durch die kleine Zellgröße von iPSC-CMs verstärkt. Damit stellt sich die Frage, ob AP-Messungen an isolierten Zellen mithilfe der Patch-Clamp-Technik nicht per se einen systematischen Fehler nach sich ziehen. Verlässlichere Daten können mit scharfen Mikroelektroden an intaktem Gewebe erzielt werden (Horváth et al. 2018).

4.5.2 Aktionspotentialparameter der Kontrollzellen

4.5.2.1 Das Ruhemembranpotential

Das RMP lag sowohl bei den jungen (d30 – 42) als auch bei den alten (d72 – 73) Ctl-iPSC-CMs bei durchschnittlich ca. -72 mV (vgl. Abschnitt 3.5.2). In der Literatur wird für iPSC-CMs ein im Vergleich zu humanen adulten CMs depolarisiertes RMP beschrieben. Allerdings besteht eine sehr große Variabilität der Werte – von ca. -40 mV bis ca. -75 mV.

In den meisten Arbeiten liegt das RMP um die -64 mV (Abilez et al. 2018; Bett et al. 2013; Davis et al. 2012; Hoekstra et al. 2012; Horváth et al. 2018; Jara-Avaca et al. 2017; Ma et al. 2011; Meijer van Putten et al. 2015; Karakikes et al. 2015; Priori et al. 2013; Spencer et al. 2014; Vaidyanathan et al. 2016; Verkerk et al. 2017).

Zu beachten ist, dass in der vorliegenden Arbeit ein hyperpolarisierender Strom über die Patch-Pipette injiziert wurde, um das RMP auf physiologischere Werte von unter -60 mV zu klemmen. Damit ist ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit Arbeiten, in denen das RMP nicht angepasst wurde, schwierig. Die Menge des injiziierten Stroms war bei jungen und alten Ctl-Zellen gleich (ca. -0,2 nA/pF) (vgl. Abschnitt 3.5.23.5).

Vor der Injektion des hyperpolarisierenden Stroms lag das RMP der Ctl-iPSC-CMs (d30 – 73) bei ca. -46 mV (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise war das RMP in nicht-spontan schlagenden Zellen tendenziell etwas negativer als in spontan-schlagenden iPSC-CMs (ca. -51 mV vs. ca. -43 mV; $p = 0{,}1297$; Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung wurde auch von Hoekestra et al. (2012) gemacht.

Ein Unterschied im RMP von jungen und alten Ctl-iPSC-CMs vor der Injektion eines hyperpolarisierenden Stroms bestand nicht (Daten nicht gezeigt). Somit ergab sich keine Zeitabhängigkeit des RMPs. In der Literatur existieren unterschiedliche Angaben darüber, ob das RMP mit zunehmender Zellreife negativer wird oder nicht (Ben-Ari et al. 2016; Lundy et al. 2013; Yang et al. 2014).

Es ist bekannt, dass Patch-Clamp-Experimente bei iPSC-CMs das wahre RMP unterschätzen. Um eine verlässlichere Aussage über das RMP zu erhalten, sind Messungen mithilfe scharfer Mikroelektroden besser geeignet (Horváth et al. 2018).

4.5.2.2 Die Aktionspotentialamplitude

Die APA war zwischen jungen (d30 – 42) und alten (d72 – 73) Ctl-iPSC-CMs vergleichbar (ca. +100 mV bzw. ca. +114 mV) (vgl. Abschnitt 3.5.2). Die Größe der APA deckt sich mit den in der Literatur für Aktionspotentiale von iPSC-CMs beschriebenen Werten (Ben-Ari et al. 2016; Davis et al. 2012; Hoekstra et al. 2012; Lundy et al. 2013; Ma et al. 2011; Verkerk et al. 2017). Jedoch ist auch hier eine gewisse Heterogenität der Messwerte zu beobachten (Priori et al. 2013). Andere Arbeitsgruppen wiederum fanden eine kleinere APA von ca. +73 – +90 mV (Bett et al. 2013; Meijer van Putten et al. 2015; Hoekstra et al. 2012).

Der Unterschied in der APA der jungen Ctl-Zellen im Vergleich zu den alten Ctl-Zellen (ca. +100 mV vs. ca. +114 mV) war in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant. Ob sich die APA mit zunehmender Reifung der Zelle verändert, wird in der Literatur kontrovers diskutiert: Zhao et al. (2018) stellten keine Zeitabhängigkeit der AP-Parameter fest. Dagegen ergaben die Untersuchungen anderer Autoren, dass die APA mit zunehmendem Alter der Zelle größer wird (Ben-Ari et al. 2016; Lundy et al. 2013; Yang et al. 2014). Eine

minimale Tendenz, dass die APA mit der Zellreife zunimmt, war auch in der vorliegenden Arbeit zu sehen.

4.5.2.3 Die Aktionspotentialdauer

Die APD war in den alten (d72 - 73) Ctl-iPSC-CMs signifikant kürzer als in den jungen Ctl-iPSC-CMs (d30 – 42) (APD_{20}: 19,07 ± 5,44 ms, n = 6 vs. 67,43 ± 11,86 ms, n = 12; p = 0,0305 im Mann-Whitney-Test; APD_{50}: 43,93 ± 8,69 ms, n = 6 vs. 113,78 ± 16,90 ms, n = 12; p = 0,0320 im Mann-Whitney-Test; APD_{90}: 120,30 ± 16,08 ms, n = 6 vs. 299,74 ± 43,76 ms, n = 12; p = 0,0135 im Mann-Whitney-Test) (vgl. Abschnitt 3.5.3.1). In der Literatur findet sich eine sehr große Streubreite der APD in iPSC-CMs: Für die APD_{20} werden Werte von ca. 50 – 90 ms beschrieben, für die APD_{50} von 89 – 181 ms und für die APD_{90} von 119 – 967 ms (Bett et al. 2013; Davis et al. 2012; Horváth et al. 2018; Lundy et al. 2013; Meijer van Putten et al. 2015; Spencer et al. 2014; Vaidyanathan et al. 2016; Verkerk et al. 2017). Leider ist nicht immer eindeutig dokumentiert, an welchem Tag der Differenzierung die Messungen durchgeführt wurden.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei den Ctl-iPSC-CMs eine Zeitabhängigkeit der APD festgestellt werden. Dies widerspricht der Literatur, wo diese Zeitabhängigkeit nicht beschrieben ist (Lundy et al. 2013; Zhao et al. 2018). Die kürzere APD in den älteren Ctl-Zellen, verglichen mit den jüngeren Ctl-Zellen, steht zudem im Widerspruch zu dem größeren $I_{Ca,L}$ der alten Ctl-iPSC-CMs im Vergleich zu den jungen Ctl-iPSC-CMs (vgl. Abschnitt 3.4.1). Eventuell liegt hier eine Verfälschung der Ergebnisse der APD aufgrund der kleinen n-Zahl der alten Ctl-Zellen (n = 6) vor. Insbesondere, da in den TOF-Zellen, für welche höhere n-Zahlen verfügbar waren, keine Zeitabhängigkeit der APD beobachtet wurde. Des Weiteren zeigte die Berechnung der Repolarisationsfraktion keinen Unterschied zwischen jungen und alten Ctl-iPSC-CMs. Mit ca. 0,6 ist die RF in der vorliegenden Arbeit jedoch höher als die von Horváth et al. (2018) berechnete RF für iPSC-CMs. Doch auch hier beschrieben die Autoren eine große Überlappung der RF in iPSC-CMs.

Nichtsdestotrotz fanden Ben-Ari et al. (2016) eine starke Variation der APD im Verlauf der Zeit: An Tag 57 – 70 der Differenzierung nahm die APD im Vergleich zu Tag 25 – 56 ab. Ab Tag 71 stieg sie dann wieder. Ob in der vorliegenden Arbeit also eine Verfälschung der Ergebnisse oder ein tatsächlich signifikanter Effekt vorlag, müsste in weiteren Experimenten genauer untersucht werden.

4.5.2.4 Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die AP-Parameter für iPSC-CMs in der Literatur sehr stark variieren, insbesondere die APD. Diese wird durch viele Faktoren beeinflusst, wie z. B. Differenzierungsprotokolle, Kulturbedingungen, Zelldichte, Zeitpunkt der Messungen bzw. Zellreife sowie experimentelle Bedingungen (Messtemperatur, Perforated- vs. Whole-cell-Patch-Clamp-Technik, spontanschlagende vs. getriggerte Zellen,

Stimulationsfrequenz, etc.) (Hoekstra et al. 2012; Itzhaki et al. 2011; Jara-Avaca et al. 2017; Karakikes et al. 2015; Sheng et al. 2012; Vaidyanathan et al. 2016; Verkerk et al. 2017). Folglich ist die quantitative Analyse der Aktionspotentiale von iPSC-CMs limitiert, da v. a. die spontane Aktivität der Zellen zu Variabilität und potentiell anormalem Verhalten der AP-Parameter führt (Bett et al. 2013). Zudem stellt sich die Frage, inwiefern Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen miteinander vergleichbar sind (Priori et al. 2013).

4.5.3 Unterschiede zwischen Kontroll- und TOF-Zellen

Das RMP war in den jungen TOF-iPSC-CMs (d33 – 36) etwas negativer als in den jungen Ctl-iPSC-CMs (d30 – 42), wobei auch etwas mehr hyperpolarisierender Strom in die TOF-Zellen injiziert wurde. Bei den älteren Zellen zeigte sich kein Unterschied im RMP zwischen Ctl- und TOF-Zellen (vgl. Abschnitt 3.5.2). Letzteres deckt sich mit Ergebnissen aus dem Tiermodell (Lambert et al. 2010).

Die APA war sowohl bei den jungen (d30 – 42) als auch bei den alten (d63 – 76) iPSC-CMs zwischen TOF- und Ctl-Gruppe vergleichbar (vgl. Abschnitt 3.5.2). Im Schweinemodell für korrigierte Fallot'sche Tetralogie fand sich dagegen eine größere APA in der rTOF-Gruppe im Vergleich zur Ctl-Gruppe (Lambert et al. 2010). Die APA in der vorliegenden Arbeit (durchschnittlich ca. +107 mV) entspricht in etwa den Werten aus Kardiomyozyten von Kindern mit Fallot'scher Tetralogie (ca. +113 mV bzw. +110 mV) (Pelzmann et al. 1998; Schaffer et al. 1999).

Bei Vergleich der jungen TOF-iPSC-CMs (d33 –36) mit den jungen Ctl-iPSC-CMs (d30 – 42) zeigte sich eine kürzere APD in den TOF-Zellen. Dagegen war bei Vergleich der alten TOF-Zellen (d63 – 76) mit den alten Ctl-Zellen (d72 – 73) die APD in der TOF-Gruppe tendenziell länger als in der Ctl-Gruppe (vgl. Abschnitt 3.5.2). Ob dieser Unterschied zwischen jungen und alten Zellen durch eine veränderte Zellreifung in den TOF-Zellen im Vergleich zu den Ctl-Zellen oder durch einen methodischen Messfehler (vgl. Abschnitt 4.5.1 und Abschnitt 4.5.2) zustande kam, kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden.

In der Literatur finden sich ebenfalls unterschiedliche Aussagen, inwiefern die APD bei Fallot'scher Tetralogie verändert ist: Benoist et al. (2017) erhoben im Schweinemodell für korrigierte Fallot'sche Tetralogie sowohl verlängerte als auch verkürzte APDs, abhängig von der Lokalisation der gemessenen Zelle (Epikard vs. Endokard). Insgesamt zeigte sich eine Heterogenität der APD. In einem anderen rTOF-Schweinemodell fand sich ebenfalls eine verlängerte sowie heterogene APD_{90} (Lambert et al. 2010).

Über Veränderungen der APD in humanen adulten TOF-CMs ist wenig bekannt: Die APD_{90} war in CMs von Kindern mit Fallot'scher Tetralogie deutlich länger (ca. 850 ms bzw. 790 ms) als in der vorliegenden Arbeit (ca. 170 – 180 ms). Leider fehlte in den entsprechenden Arbeiten eine direkte Kontrollgruppe (Pelzmann et al. 1998; Schaffer et al.

1999). Zudem stellt sich die Frage, ob Ergebnisse von humanen CMs überhaupt mit denen von iPSC-CMs vergleichbar sind.

Interessanterweise war sowohl bei den jungen als auch bei den alten iPSC-CMs die RF in der TOF-Gruppe signifikant (junge Zellen) bzw. tendenziell (alte Zellen) kürzer. Bei Auftragung der RF gegen das RMP war jedoch weder bei den jungen noch bei den alten Zellen eine Unterscheidung in Ctl- und TOF-iPSC-CMs möglich (vgl. Abschnitt 3.5.2). Deshalb sind die Ergebnisse der Aktionspotentialmessungen in Hinblick auf die APD nicht eindeutig und sollten sehr vorsichtig interpretiert werden.

4.5.4 Späte Nachdepolarisationen bzw. spontane elektrische Aktivität

Insgesamt 55 % der TOF-iPSC-CMs waren anfällig für DADs bzw. SEA. In den Ctl-iPSC-CMs zeigte keine der gemessenen Zellen solche Auffälligkeiten (vgl. Abschnitt 3.5.4).

Es ist bekannt, dass TOF-Patienten im Langzeitverlauf häufig unter der Entwicklung von Herzrhythmusstörungen leiden (Gatzoulis et al. 2000). Auch im Tiermodell von korrigierter Fallot'scher Tetralogie zeigten die Zellen arrhythmische Ereignisse (ventrikuläre Tachykardien, Kammerflimmern, plötzlicher Herztod). Als Ursache nannten die Autoren ein proarrhyhtmogenes Remodelling des rechten und linken Ventrikels (Benoist et al. 2017; Chiu et al. 2015; Dubes et al. 2018). In humanen CMs von Kindern mit Fallot'scher Tetralogie fanden sich in 16 – 33 % der Zellen frühe Nachdepolarisationen, welche auf eine verlängerte APD und einen über einen breiten Spannungsumfang hinweg aktiven $I_{Ca,L}$ (sog. *calcium window current*) zurückführen waren (Pelzmann et al. 1998; Schaffer et al. 1999).

Die Beobachtung, dass TOF-iPSC-CMs ebenfalls ein arrhythmogenes Potential besitzen, spricht dafür, dass die Arrhythmogenese bei Fallot'scher Tetralogie nicht nur durch strukturelle Veränderungen des Herzens wie z. B. OP-Narben (Bouzas et al. 2005; Blum et al. 2016; Chiu et al. 2015) bedingt ist, sondern zusätzlich intrinsisch gesteuert wird. Es ist bekannt, dass arrhythmogene Substrate auch genetische Ursachen haben können (Thomas et al. 2019) und dass OP-unabhängige Faktoren eine Rolle beim Remodelling und der Arrhythmogenese spielen können (Benoist et al. 2017).

Dennoch ist zu beachten, dass eine abnormale Automatizität auch durch ein instabiles RMP zustande kommen kann (Thomas et al. 2019). Der reduzierte I_{K1} bzw. der prominente I_f in iPSC-CMs (Vaidyanathan et al. 2016) stellen somit an sich ein Risiko für arrhythmische Ereignisse dar (Schaffer et al. 1999). Allerdings fällt auf, dass DADs bzw. SEAs in der vorliegenden Arbeit nur in der TOF-Gruppe auftraten. Nichtsdestotrotz sind aufgrund des nicht-physiologischen Aktionspotentials der iPSC-CMs Vorhersagen bzgl. des arrhythmischen Verhaltens der Zellen schwierig (Bett et al. 2013).

4.6 Limitationen der vorliegenden Arbeit

Die Hauptlimitation der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass nur iPSC-CMs eines einzigen TOF-Patienten und dessen gesunden Vaters als Kontrolle untersucht wurden. Um eine definitive Aussage treffen zu können, ob die Ergebnisse dieser Arbeit für die Fallot'sche Tetralogie im Allgemeinen gelten oder nur spezifisch für den untersuchten Patienten, müsste ein größeres Patientenkollektiv untersucht werden. Auch eine größere Ctl-Gruppe würde die Validität der Ergebnisse erhöhen.

Zudem ist bekannt, dass unterschiedliche Zelllinien, Kulturbedingungen, Messprotokolle, usw. die elektrophysiologischen Eigenschaften von iPSC-CMs beeinflussen. Folglich wird der Vergleich mit Studien anderer Arbeitsgruppen erschwert.

Außerdem stellt sich die Frage, ob Ergebnisse eines *In-vitro*-iPS-Zell-Modells in adulten humanen CMs reproduzierbar sind. Dies könnte aufgrund der Unreife der iPSC-CMs und der Komplexität des menschlichen Herzens schwierig sein. Folglich ist nicht eindeutig zu sagen, ob die beobachteten elektrophysiologischen Veränderungen Folgen der Fallot'schen Tetralogie sind, die lebenslang bestehen bleiben oder nur vorübergehend zu einem gewissen Zeitpunkt der Entwicklung der Kardiomyozyten auftreten (vgl. Schaffer et al. 1999).

4.7 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein iPS-Zell-Modell genutzt, um die Fallot'sche Tetralogie *in vitro* zu modellieren. Es konnte eine veränderte zelluläre Elektrophysiologie und veränderte Ca^{2+}-Homöostase in aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnenen Kardiomyozyten von einem Patienten mit Fallot'scher Tetralogie gezeigt werden. Eine gestörte Ca^{2+}-Homöostase gilt als die Hauptursache für elektrophysiologisches Remodelling, welches wiederum zu Arrhythmien führen kann (Eisner 2014).

Der L-Typ-Ca^{2+}-Strom war in den TOF-iPSC-CMs im Vergleich zu den Ctl-iPSC-CMs signifikant erhöht. Damit triggerte er einen ebenfalls größeren systolischen CaT. Zudem könnte der veränderte $I_{Ca,L}$ zu einer Veränderung der APD in den TOF-Zellen beitragen. Wenn der Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle erhöht ist, wird dies durch einen erhöhten Ca^{2+}-Ausstrom während des systolischen CaT und einer zusätzlichen Ca^{2+}-Freisetzung während später Nachdepolarisation ausgeglichen (Venetucci et al. 2008). Solche DADs bzw. spontane elektrische Aktivität waren in ca. 55 % der TOF-iPSC-CMs zu beobachten.

Die erhöhte diastolische Ca^{2+}-Freisetzung in den TOF-iPSC-CMs könnte auf ein erhöhtes SR-Ca^{2+}-Leck zurückzuführen sein. Es wird davon ausgegangen, dass das überschüssige Ca^{2+} durch den NCX aus dem Zytosol entfernt wird. Der NCX transportiert im Austausch für ein Ca^{2+}-Ion drei Na^{+}-Ionen in die Zelle. Dieser elektrogene Prozess kann zur Ausbildung eines depolarisierenden Einwärtsstroms führen. Solche zellulären späten

Nachdepolarisationen können, wenn sie einen gewissen Schwellenwert überschreiten, zur Ausbildung von Aktionspotentialen führen. Damit können sie zu ektoper Aktivität und der Entwicklung von Arrhythmien bei Patienten mit Fallot'scher Tetralogie beitragen (Eisner 2014; Eisner et al. 2017; Thomas et al. 2019; Venetucci et al. 2008).

Der sarkoplasmatische Ca^{2+}-Gehalt war in den TOF-iPSC-CMs im Vergleich zu den Ctl-iPSC-CMs interessanterweise nicht verändert. Dies könnte an der erhöhten Aktivität der SERCA2a in den TOF-iPSC-CMs liegen, welche ggf. Teil eines komplexen Kompensationsmechanismus ist, um das Flussgleichgewicht der Ca^{2+}-Ströme in den TOF-Zellen zu erhalten (Eisner et al. 2017; Venetucci et al. 2008).

Im Allgemeinen trägt die vorliegende Arbeit zur elektrophysiologischen Charakterisierung von iPSC-CMs bei.

4.8 Ausblick

Für die vorliegende Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe Molekulare Pharmakologie des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universistätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. med. N. Voigt neue Methoden etabliert, um iPSC-CMs elektrophysiologisch mittels Patch-Clamp-Technik zu untersuchen (parallele Messung des $I_{Ca,L}$ und der korrespondierenden CaT, Aktionspotentialmessungen mithilfe elektrischer Feldstimulation). Diese Methoden können auch in Zukunft von Mitarbeiter*innen und Doktorand*innen unserer Arbeitsgruppe genutzt werden.

Die vorliegende Arbeit konnte eine veränderte zelluläre Elektrophysiologie und eine gestörte Ca^{2+}-Homöostase mit Ausbildung von DADs bzw. spontaner elektrische Aktivität in iPSC-CMs eines TOF-Patienten zeigen. Um die Ursache der erhöhten diastolischen Ca^{2+}-Konzentration und den Beitrag von Ca^{2+}-Sparks und -Waves an der Entstehung der DADs genauer zu untersuchen, könnten in einem Folgeprojekt Messungen mittels konfokaler Mikroskopie durchgeführt werden.

Die Untersuchung von iPSC-CMs weiterer Patienten mit Fallot'scher Tetralogie und gesunder Ctl-Individuen ist sicherlich notwendig, um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu validieren.

Des Weiteren wäre es interessant, ein 3D-Modell für iPSC-CMs von Patienten mit Fallot'scher Tetralogie zu entwickeln. Im 3D-Modell kultivierte iPSC-CMs sind reifer und würden damit den Phänotyp der Erkrankung noch besser rekapitulieren. Zudem wären Aktionspotentialmessungen mittels scharfer Mikroelektroden am 3D-Modell möglich, was die Aussagekraft der AP-Messungen erhöhen würde (Horváth et al. 2018).

Außerdem ist zu beachten, dass postnatal in TOF-Patienten Zyanose und Hypertrophie die Genexpression von Proteinen der Ca^{2+}-Homöostase beeinflussen (Schaffer et al. 1999; Vittorini et al. 2007). Neue Wege zu finden, diese Faktoren *in vitro* zu modellieren, stellen weitere spannende Projekte dar.

Letztendlich trägt ein besseres Verständnis von Pathomechanismen, welche der Fallot'schen Tetralogie unterliegen, dazu bei, neue spezifische und personalisierte Therapien entwickeln zu können (Thomas et al. 2019). Die grundlegende Charakterisierung von iPSC-CMs ist dabei ein erster wichtiger Schritt.

5 Zusammenfassung

Die Fallot'sche Tetralogie (*Tetralogy of Fallot*, TOF) ist der häufigste kongenitale zyanotische Herzfehler und viele Patienten entwickeln im Verlauf Herzrhythmusstörungen. Um zelluläre elektrophysiologische Mechanismen und Veränderungen der Ca^{2+}-Homöostase, die zur Arrhythmogenese beitragen könnten, zu identifizieren, wurden aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnene Kardiomyozyten (*induced-pluripotent stem cell derived cardiomyocytes,* iPSC-CMs) eines Patienten mit Fallot'scher Tetralogie untersucht. Als Kontrollgruppe dienten iPSC-CMs des gesunden Vaters des Patienten.

Messungen des L-Typ-Ca^{2+}-Stroms ($I_{Ca,L}$) wurden mittels Whole-Cell-Patch-Clamp-Technik im Voltage-Clamp-Modus durchgeführt. Simultan wurde der korrespondierende Ca^{2+}-Transient mittels Epifluoreszenz (Fluo-3 als Ca^{2+}-Indikator) aufgezeichnet. Des Weiteren wurde die Strom-Spannungs-Kurve des $I_{Ca,L}$ und seine Supprimierbarkeit durch Nifedipin (1 μM und 10 μM) untersucht.

Der Ca^{2+}-Gehalt des sarkoplasmatischen Retikulums wurde mithilfe von 10 mM Koffein bestimmt. Außerdem wurde die Aktivität der Ca^{2+}-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (*sacroplasmic reticulum calcium ATPase,* SERCA2a, Isoform des Herzens) berechnet.

Ferner wurden Aktionspotentialmessungen mittels Perforated-Patch-Clamp-Technik im Current-Clamp-Modus durchgeführt. Hierfür erfolgte vor der Messung die Stimulation über ein elektrisches Feld. Nur schlagende Zellen wurden untersucht.

Alle Experimente wurden bei 37 °C durchgeführt.

Sowohl die Kontroll- als auch die TOF-iPSC-CMs zeigten einen Nifedipin-sensitiven $I_{Ca,L}$ mit typischer glockenförmiger Strom-Spannungs-Beziehung. Die Spannungsabhängigkeit des Einwärtsstroms war in beiden Gruppen vergleichbar.

In den Kontrollzellen fiel eine Zeitabhängigkeit des $I_{Ca,L}$ auf: Ältere Zellen (Tag 47 – 66 der Differenzierung) exprimierten im Vergleich zu jüngeren Zellen (Tag 29 – 42) einen größeren Strom mit einer höheren Varianz der Stromdichte. Deshalb wurden für weitere Experimente nur junge Zellen (Tag 27 – 42) verwendet.

Die Amplitude des $I_{Ca,L}$ war in den TOF-iPSC-CMs im Vergleich zu den Kontroll-iPSC-CMs signifikant erhöht. Der größere $I_{Ca,L}$ triggerte einen ebenfalls größeren systolischen Ca^{2+}-Transienten. Auch die diastolische Ca^{2+}-Konzentration war in den TOF-Zellen signifikant höher.

Überraschenderweise war der Ca^{2+}-Gehalt des sarkoplasmatischen Retikulums in den TOF-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht verändert. Auch die Abklingphase des koffeingetriggerten Ca^{2+}-Transienten, welche v. a. auf den Na^{+}-Ca^{2+}-Austauscher

zurückzuführen ist, war in beiden Gruppen vergleichbar. Dagegen war die Aktivität der SERCA2a in den TOF-iPSC-CMs im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht.

In den jungen TOF-Zellen (Tag 33 – 36) war die Aktionspotentialdauer im Vergleich zu den jungen Kontrollzellen (Tag 30 – 42) verkürzt. Im Gegensatz dazu war die Aktionspotentialdauer bei den älteren Zellen (Tag 63 – 76) in der TOF-Gruppe tendenziell länger. Das Ruhemembranpotential und die Aktionspotentialamplitude waren in jungen und alten Zellen vergleichbar. Bei der Berechnung der Repolarisationsfraktion und Betrachtung ihrer Abhängigkeit vom Ruhemembranpotential konnten Ctl- und TOF-Gruppe nicht eindeutig voneinander unterschieden werden. Interessanterweise zeigten ca. 55 % der TOF-Zellen spontane Membrandepolarisationen, wohingegen solche Ereignisse in den Kontrollzellen nicht auftraten.

Zu beachten ist, dass iPSC-CMs unreife Zellen sind und ihre elektrophysiologischen Eigenschaften stark von Kultur- und Messbedingungen abhängen. Die Zeitabhängigkeit des $I_{Ca,L}$ in den Kontrollzellen mit größeren Stromdichten in älteren Zellen ist höchstwahrscheinlich auf eine fortgeschrittene Zellreifung zurückzuführen.

Der in den TOF-iPSC-CMs im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte $I_{Ca,L}$ triggerte einen größeren systolischen Ca^{2+}-Transienten. Die erhöhte diastolische Ca^{2+}-Konzentration könnte auf ein Ca^{2+}-Leck der Ryanodinrezeptoren zurückzuführen sein und zu Membrandepolarisationen führen, wenn das überschüssige Ca^{2+} durch den Na^{+}-Ca^{2+}-Austauscher aus der Zelle transportiert wird. Die größere Anfälligkeit der TOF-Zellen für spontane Membrandepolarisationen kann zur Entwicklung ektoper Aktivität und kardialer Arrhythmien in Patienten mit Fallot'scher Tetralogie beitragen.

Die erhöhte Aktivität der SERCA2a in den TOF-iPSC-CMs könnte Teil eines Mechanismus zur Kompensation der höheren diastolische Ca^{2+}-Konzentration sein, sodass das Ca^{2+}-Flussgleichgewicht der Zelle bestehen bleibt und die gestörte Ca^{2+}-Homöostase in den TOF-Zellen teilweise korrigiert wird.

Aktionspotentialmessungen in isolierten iPSC-CMs mittels Perforated-Patch-Clamp-Technik sind potentiell anfällig für methodische Fehler. Deshalb sollten die Ergebnisse der Aktionspotentialmessungen mit Vorsicht interpretiert werden.

Insgesamt trägt die vorliegende Arbeit zur allgemeinen elektrophysiologischen Charakterisierung von iPSC-CMs bei.

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

Allen DG, Blinks JR (1978): Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. Nature 273, 509–513

Apitz C, Webb GD, Redington AN (2009): Tetralogy of Fallot. The Lancet 374, 1462–1471

Apitz J: Fallot-Tetralogie. In: Apitz J (Hrsg.): Pädiatrische Kardiologie: Erkrankungen des Herzens bei Neugeborenen, Säuglingen, Kindern und Heranwachsenden. Steinkopff Verlag, Darmstadt 1998, 304–315

Ben-Ari M, Naor S, Zeevi-Levin N, Schick R, Ben Jehuda R, Reiter I, Raveh A, Grijnevitch I, Barak O, Rosen MR et al. (2016): Developmental changes in electrophysiological characteristics of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Heart Rhythm 13, 2379–2387

Benoist D, Dubes V, Roubertie F, Gilbert SH, Charron S, Constantin M, Elbes D, Vieillot D, Quesson B, Cochet H et al. (2017): Proarrhythmic remodelling of the right ventricle in a porcine model of repaired Tetralogy of Fallot. Heart 103, 347–354

Bernier PL, Stefanescu A, Samoukovic G, Tchervenkov CI (2010): The challenge of congenital heart disease worldwide: Epidemiologic and demographic facts. Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu 13, 26–34

Bernstein J: Elektrobiologie: Die Lehre von den elektrischen Vorgängen im Organismus auf moderner Grundlage dargestellt. Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden 1912

Bers D: Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. 2. Auflage; Springer, Dordrecht 2001

Bett GCL, Kaplan AD, Lis A, Cimato TR, Tzanakakis ES, Zhou Q, Morales MJ, Rasmusson RL (2013): Electronic "expression" of the inward rectifier in cardiocytes derived from human induced pluripotent stem cells. Heart Rhythm 10, 1903–1910

Blum U, Meyer H, Beerbaum P: Kompendium angeborene Herzfehler bei Kindern: Diagnose und Behandlung. Springer-Verlag, Berlin 2016

Bøkenes J, Sjaastad I, Sejersted OM (2005): Artifactual contractions triggered by field stimulation of cardiomyocytes. J Appl Physiol 98, 1712–1719

Bouzas B, Kilner PJ, Gatzoulis MA (2005): Pulmonary regurgitation: Not a benign lesion. Eur Heart J 26, 433–439

Broberg CS, Aboulhosn J, Mongeon FP, Kay J, Valente AM, Khairy P, Earing MG, Opotowsky AR, Lui G, Gersony DR et al. (2011): Prevalence of left ventricular systolic dysfunction in adults with repaired Tetralogy of Fallot. Am J Cardiol 107, 1215–1220

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 and small molecule-based generation of human cardiomyocytes. Nat Methods 11, 855–860

Charron S, Roubertie F, Benoist D, Dubes V, Gilbert SH, Constantin M, Vieillot D, Elbes D, Quesson B, Bordachar P et al. (2015): Identification of region-specific myocardial gene expression patterns in a chronic swine model of repaired Tetralogy of Fallot. PLoS ONE 10, e0134146

Cheng DKL, Tung L, Sobie EA (1999): Nonuniform responses of transmembrane potential during electric field stimulation of single cardiac cells. Am J Physiol 277, H351–H362

Chiu S, Tsai C, Lin L, Huang S, Chen Y, Wang J, Wu M, Lai L, Lin J (2015): Repolarization alternans and ventricular arrhythmia in a repaired Tetralogy of Fallot animal model. J Am Heart Assoc 4, e002173

Cole KS (1979): Mostly membranes. Annu Rev Physiol 41, 1–24

Cuypers JAAE, Menting ME, Konings EEM, Opić P, Utens EMWJ, Helbing WA, Witsenburg M, van den Bosch AE, Ouhlous M, van Domburg RT et al. (2014): Unnatural history of Tetralogy of Fallot: Prospective follow-up of 40 years after surgical correction. Circulation 130, 1944–1953

Davis RP, Casini S, van den Berg CW, Hoekstra M, Remme CA, Dambrot C, Salvatori D, Oostwaard DW, Wilde AAM, Bezzina CR et al. (2012): Cardiomyocytes derived from pluripotent stem cells recapitulate electrophysiological characteristics of an overlap syndrome of cardiac sodium channel disease. Circulation 125, 3079–3091

de Boer TP, van Veen TAB, Jonsson MKB, Kok BGJM, Metz CHG, Sluijter JPG, Doevendans PA, de Bakker JMT, Goumans MJ, van der Heyden MAG (2010): Human cardiomyocyte progenitor cell-derived cardiomyocytes display a maturated electrical phenotype. J Moll Cell Cardiol 48, 254–260

Dennis M, Moore B, Kotchetkova I, Pressley L, Cordina R, Celermajer DS (2017): Adults with repaired Tetralogy: Low mortality but high morbidity up to middle age. Open Heart 4, e000564

Di Felice V, Zummo G (2009): Tetralogy of Fallot as a model to study cardiac progenitor cell migration and differentiation during heart development. Trends Cardiovasc Med 19, 130–135

Diaz M, Graham HK, Trafford AW (2004): Enhanced sarcolemmal Ca2+ efflux reduces sarcoplasmic reticulum Ca2+ content and systolic Ca2+ in cardiac hypertrophy. Cardiovasc Res 62, 538–547

Doyle MJ, Lohr JL, Chapman CS, Koyano-Nakagawa N, Garry MG, Garry DJ (2015): Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a model for heart development and congenital heart disease. Stem Cell Rev Rep 11, 710–727

Dubes V, Benoist D, Roubertie F, Gilbert SH, Constantin M, Charron S, Elbes D, Vieillot D, Quesson B, Cochet H et al. (2018): Arrhythmogenic remodeling of the left ventricle in a porcine model of repaired Tetralogy of Fallot. Circ Arrhythm Electrophysiol 11, e006059

Eisner D (2014): Calcium in the heart: from physiology to disease. Exp Physiol 99, 1273–1282

Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW (2017): Calcium and excitation-contraction coupling in the heart. Circ Res 121, 181–195

Eldadah ZA, Hamosh A, Biery NJ, Montgomery RA, Duke M, Elkins R, Dietz HC (2001): Familial Tetralogy of Fallot caused by mutation in the jagged1 gene. Hum Mol Genet 10, 163–169

Gatzoulis MA, Balaji S, Webber SA, Siu SC, Hokanson JS, Poile C, Rosenthal M, Nakazawa M, Moller JH, Gillette PC et al. (2000): Risk factors for arrhythmia and sudden cardiac death late after repair of Tetralogy of Fallot: a multicentre study. Lancet 356, 975–981

Gentet LJ, Stuart GJ, Clements JD (2000): Direct measurement of specific membrane capacitance in neurons. Biophys J 79, 314–320

Ghorbel MT, Cherif M, Jenkins E, Mokhtari A, Kenny D, Angelini GD, Caputo M (2010): Transcriptomic analysis of patients with Tetralogy of Fallot reveals the effect of chronic hypoxia on myocardial gene expression. J Thorac Cardiovasc Surg 140, 337-345.e26

Grunert M, Dorn C, Schueler M, Dunkel I, Schlesinger J, Mebus S, Alexi-Meskishvili V, Perrot A, Wassilew K, Timmermann B et al. (2014): Rare and private variations in neural crest, apoptosis and sarcomere genes define the polygenic background of isolated Tetralogy of Fallot. Hum Mol Genet 23, 3115–3128

Hall JE: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 13. Auflage; Saunders, Philadelphia 2016

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. Pflugers Arch 391, 85–100

Hartman RJ, Rasmussen SA, Botto LD, Riehle-Colarusso T, Martin CL, Cragan JD, Shin M, Correa A (2011): The contribution of chromosomal abnormalities to congenital heart defects: A population-based study. Pediatr Cardiol 32, 1147–1157

Haverkamp W, Breithardt G: Moderne Herzrhythmustherapie. 1. Auflage; Thieme, Stuttgart 2003

Heijman J, Voigt N, Nattel S, Dobrev D (2014): Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. Circ Res 114, 1483–1499

Herold G: Innere Medizin 2016. Herold, Gerd, Köln 2016

Hickey EJ, Veldtman G, Bradley TJ, Gengsakul A, Manlhiot C, Williams WG, Webb GD, McCrindle BW (2009): Late risk of outcomes for adults with repaired Tetralogy of Fallot from an inception cohort spanning four decades. Eur J Cardiothorac Surg 35, 156–164

Hodgkin AL (1976): Chance and design in electrophysiology: An informal account of certain experiments on nerve carried out between 1934 and 1952. J Physiol 263, 1–21

Hoekstra M, Mummery CL, Wilde AAM, Bezzina CR, Verkerk AO (2012): Induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes as models for cardiac arrhythmias. Front Physiol 3, 346

Hoffman JIE, Kaplan S (2002): The incidence of congenital heart disease. J Am Coll Cardiol 39, 1890–1900

Horváth A, Lemoine MD, Löser A, Mannhardt I, Flenner F, Uzun AU, Neuber C, Breckwoldt K, Hansen A, Girdauskas E et al. (2018): Low resting membrane potential and low inward rectifier potassium currents are not inherent features of hiPSC-derived cardiomyocytes. Stem Cell Reports 10, 822–833

Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Zwi-Dantsis L, Caspi O, Winterstern A, Feldman O, Gepstein A, Arbel G, Hammerman H et al. (2011): Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. Nature 471, 225–229

Ivashchenko CY, Pipes GC, Lozinskaya IM, Lin Z, Xiaoping X, Needle S, Grygielko ET, Hu E, Toomey JR, Lepore JJ, Willette RN (2013): Human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes exhibit temporal changes in phenotype. Am J Physiol Heart Circ Physiol 305, H913–H922

Jaenisch R, Young R (2008): Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. Cell 132, 567–582

Jara-Avaca M, Kempf H, Rückert M, Robles-Diaz D, Franke A, de la Roche J, Fischer M, Malan D, Sasse P, Solodenko W et al. (2017): EBIO does not induce cardiomyogenesis in human pluripotent stem cells but modulates cardiac subtype enrichment by lineage-selective survival. Stem Cell Reports 8, 305–317

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

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

Khairy P, Aboulhosn J, Gurvitz MZ, Opotowsky AR, Mongeon FP, Kay J, Valente AM, Earing MG, Lui G, Gersony DR et al. (2010): Arrhythmia burden in adults with surgically repaired Tetralogy of Fallot: A multi-institutional study. Circulation 122, 868–875

Lahm H, Schön P, Doppler S, Dreßen M, Cleuziou J, Deutsch MA, Ewert P, Lange R, Krane M (2015): Tetralogy of Fallot and hypoplastic left heart syndrome: Complex clinical phenotypes meet complex genetic networks. Curr Genomics 16, 141–158

Lambert V, Capderou A, Le Bret E, Rücker-Martin C, Deroubaix E, Gouadon E, Raymond N, Stos B, Serraf A, Renaud JF (2010): Right ventricular failure secondary to chronic overload in congenital heart disease: An experimental model for therapeutic innovation. J Thorac Cardiovasc Surg 139, 1197-1204.e1

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

Lindinger A, Schwedler G, Hense HW (2010): Prevalence of congenital heart defects in newborns in Germany: Results of the first registration year of the PAN study (July 2006 to June 2007). Klinische Pädiatrie 222, 321–326

Loomba RS, Buelow MW, Aggarwal S, Arora RR, Kovach J, Ginde S (2017): Arrhythmias in adults with congenital heart disease: What are risk factors for specific arrhythmias? Pacing Clin Electrophysiol 40, 353–361

Lundy SD, Zhu WZ, Regnier M, Laflamme MA (2013): Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. Stem Cells Dev 22, 1991–2002

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

Matsa E, Burridge PW, Wu JC (2014): Human stem cells for modeling heart disease and for drug discovery. Sci Transl Med 6, 239ps6

Meijer van Putten RME, Mengarelli I, Guan K, Zegers JG, van Ginneken ACG, Verkerk AO, Wilders R (2015): Ion channelopathies in human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes: A dynamic clamp study with virtual IK1. Front Physiol 6, 7

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN (1998): A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. Cell 93, 215–228

Molleman A: Patch clamping: An introductory guide to patch clamp electrophysiology. 1. Auflage; John Wiley & Sons, New York 2003

Neher E (1992): Ionenkanäle für die inter- und intrazelluläre Kommunikation. (Nobel-Vortrag). Angew Chem 104, 837–843

Nichols CA, Creazzo TL (2005): L-type Ca2+ channel function in the avian embryonic heart after cardiac neural crest ablation. Am J Physiol Heart Circ Physiol 288, H1173–H1178

Nollert G, Fischlein T, Bouterwek S, Böhmer C, Klinner W, Reichart B (1997): Long-term survival in patients with repair of Tetralogy of Fallot: 36-year follow-up of 490 survivors of the first year after surgical repair. J Am Coll Cardiol 30, 1374–1383

Numberger M, Draguhn A: Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1996

Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD (2008): Chemical calcium indicators. Methods 46, 143–151

Pelzmann B, Schaffer P, Bernhart E, Lang P, Mächler H, Rigler B, Koidl B (1998): L-type calcium current in human ventricular myocytes at a physiological temperature from children with Tetralogy of Fallot. Cardiovasc Res 38, 424–432

Priori SG, Napolitano C, Di Pasquale E, Condorelli G (2013): Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in studies of inherited arrhythmias. J Clin Invest 123, 84–91

Rae J, Cooper K, Gates P, Watsky M (1991): Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. J Neurosci Methods 37, 15–26

Rao C, Prodromakis T, Kolker L, Chaudhry UAR, Trantidou T, Sridhar A, Weekes C, Camelliti P, Harding SE, Darzi A et al. (2013): The effect of microgrooved culture substrates on calcium

cycling of cardiac myocytes derived from human induced pluripotent stem cells. Biomaterials 34, 2399–2411

Rickert-Sperling S, Kelly RG, Driscoll DJ (Hrsg.): Congenital heart diseases: The broken heart: clinical features, human genetics and molecular pathways. 1. Auflage; Springer Verlag GmbH, Wien 2016

Roos-Hesselink J, Perlroth MG, McGhie J, Spitaels S (1995): Atrial arrhythmias in adults after repair of Tetralogy of Fallot : Correlations with clinical, exercise, and echocardiographic findings. Circulation 91, 2214–2219

Schaffer P, Pelzmann B, Bernhart E, Lang P, Mächler H, Rigler B, Koidl B (1999): Repolarizing currents in ventricular myocytes from young patients with Tetralogy of Fallot. Cardiovasc Res 43, 332–343

Schrader J, Gödecke A, Kelm M: Das Herz: Elektrophysiologische Grundlagen und elektromechanische Kopplung. In: Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S (Hrsg.): Physiologie. 7. Auflage; Thieme, Stuttgart 2014, 191–196

Seibertz F: Functional characterisation of human atrial and ventricular iPSC-derived cardiomyocytes in 2D monolayers and in 3D engineered human myocardium. Masterarbeit Cardiovascular Science Göttingen 2019 (unveröffentlicht)

Sheng X, Reppel M, Nguemo F, Mohammad FI, Kuzmenkin A, Hescheler J, Pfannkuche K (2012): Human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Response to TTX and lidocain reveals strong cell to cell variability. PLoS ONE 7, e45963

Spencer CI, Baba S, Nakamura K, Hua EA, Sears MAF, Fu C, Zhang J, Balijepalli S, Tomoda K, Hayashi Y et al. (2014): Calcium transients closely reflect prolonged action potentials in iPSC models of inherited cardiac arrhythmia. Stem Cell Reports 3, 269–281

Streckfuss-Bömeke K, Wolf F, Azizian A, Stauske M, Tiburcy M, Wagner S, Hübscher D, Dressel R, Chen S, Jende J et al. (2013): Comparative study of human-induced pluripotent stem cells derived from bone marrow cells, hair keratinocytes, and skin fibroblasts. Eur Heart J 34, 2618–2629

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

Thomas D, Christ T, Fabritz L, Goette A, Hammwöhner M, Heijman J, Kockskämper 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

Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y et al. (2013): Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Cell Stem Cell 12, 127–137

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

Vaidyanathan R, Markandeya YS, Kamp TJ, Makielski JC, January CT, Eckhardt LL (2016): IK1-enhanced human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: An improved cardiomyocyte model to investigate inherited arrhythmia syndromes. Am J Physiol Heart Circ Physiol 310, H1611–H1621

van der Linde D, Konings EEM, Slager MA, Witsenburg M, Helbing WA, Takkenberg JJM, Roos-Hesselink JW (2011): Birth prevalence of congenital heart disease worldwide. J Am Coll Cardiol 58, 2241–2247

Varro A, Negretti N, Hester SB, Eisner DA (1993): An estimate of the calcium content of the sarcoplasmic reticulum in rat ventricular myocytes. Pflugers Arch 423, 158–160

Venetucci LA, Trafford AW, O'Neill SC, Eisner DA (2008): The sarcoplasmic reticulum and arrhythmogenic calcium release. Cardiovasc Res 77, 285–292

Verkerk AO, Veerman CC, Zegers JG, Mengarelli I, Bezzina CR, Wilders R (2017): Patch-clamp recording from human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Improving action potential characteristics through dynamic clamp. Int J Mol Sci 18, 1873

Vittorini S, Storti S, Parri MS, Cerillo AG, Clerico A (2007): SERCA2a, phospholamban, sarcolipin, and ryanodine receptors gene expression in children with congenital heart defects. Mol Med 13, 105–111

Voigt N: Phosphorylierungsabhängige Regulation der einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle an Vorhofmyozyten von Patienten mit Vorhofflimmern. Med. Diss. Dresden 2006

Voigt N, Dobrev D (2011): Ion channel remodelling in atrial fibrillation. Eur Cardiol 7, 97–103

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

Voigt N, Mason F, Thomas D (2018): Report on the Ion Channel Symposium: organized by the German Cardiac Society Working Group on Cellular Electrophysiology (AG 18). Herzschrittmacherth Elektrophysiol 29, 4–13

Wakili R, Voigt N, Kääb S, Dobrev D, Nattel S (2011): Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. J Clin Invest 121, 2955–2968

Wamstad JA, Alexander JM, Truty RM, Shrikumar A, Li F, Eilertson KE, Ding H, Wylie JN, Pico AR, Capra JA et al. (2012): Dynamic and coordinated epigenetic regulation of developmental transitions in the cardiac lineage. Cell 151, 206–220

Wang G, McCain ML, Yang L, He A, Pasqualini FS, Agarwal A, Yuan H, Jiang D, Zhang D, Zangi L et al. (2014): Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies. Nat Med 20, 616–623

Wu Y, Feng W, Zhang H, Li S, Wang D, Pan X, Hu S (2012): Ca2+-regulatory proteins in cardiomyocytes from the right ventricle in children with congenital heart disease. J Transl Med 10, 67

Yamanaka S (2007): Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 1, 39–49

Yang X, Pabon L, Murry CE (2014): Engineering adolescence: Maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Circ Res 114, 511–523

Zhang X-H, Haviland S, Wei H, Šarić T, Fatima A, Hescheler J, Cleemann L, Morad M (2013): Ca2+ signaling in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iPS-CM) from normal and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT)-afflicted subjects. Cell Calcium 54, 57–70

Zhao Z, Lan H, El-Battrawy I, Li X, Buljubasic F, Sattler K, Yücel G, Lang S, Tiburcy M, Zimmermann WH et al. (2018): Ion channel expression and characterization in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Stem Cells Int 2018, 6067096

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zuallererst herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. N. Voigt bedanken unter dessen exzellenter Betreuung ich diese Arbeit anfertigen durfte. Er stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite – vom Aufbau des Setups, über die Datenanalyse bis hin zur Korrektur der Arbeit.

Ich möchte nicht versäumen, auch Herrn Prof. Dr. med. W.-H. Zimmermann meinen Dank für die Gelegenheit, die Arbeit in seinem Institut anfertigen zu dürfen, auszusprechen. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. K. Toischer für die Zweitbetreuung.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau Dr. M.-L. Chang Liao (PhD), Frau Dr. rer. nat. C. Molina, Frau Dr. F. Mason (PhD) und Herrn Dr. F. Fakuade (PhD), die mich tatkräftig bei allen praktischen und theoretischen Fragen unterstützt und mir das Patch-Clampen beigebracht haben. Insbesondere Frau Dr. F. Mason (PhD) möchte ich für den wissenschaftlichen Austausch und die Einarbeitung in mein Thema danken.

Allgemein verdient die angenehme und freundschaftliche Atmosphäre, die große Hilfsbereitschaft und die gute Kommunikation in der Arbeitsgruppe Molekulare Pharmakologie des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsmedizin Götttingen ein großes Dankeschön.

Ferner geht mein Dank an Frau D. Reher (Technische Assistentin), die mir das Auftauen, Ausplattieren und Kultivieren der iPSC-CMs gezeigt hat und mich tatkräftig bei allen Belangen betreffend der Zellkultur unterstützt hat.

Ebenso danke ich den Mitarbeiter*innen der Stem Cell Unit Göttingen unter der Leitung von Dr. rer. nat L. Cyganek für die hilfreichen Tipps zur Kultur von iPSC-CMs.

Auch unseren Kooperationspartern im Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin der Charité Berlin, insbesondere Frau Prof. Dr. med. S. Rickert-Sperling und Herrn Dr. M. Grunert (PhD) möchte ich an dieser Stelle für das zur Verfügung stellen der iPSC-CMs und den wissenschaftlichen Ausstausch danken.

Ein besonderes Privileg in meiner Zeit als Doktorandin war die Möglichkeit, Teil der *International Research Training Group 1816 (IRTG 1816)* zu sein. Vielen Dank für die theoretische, praktische und finanzielle Unterstützung und für die Möglichkeit, meine Daten auf der 84. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) im Februar 2018 vorstellen zu dürfen. Stellvertretend danke ich an dieser Stelle Frau Prof. D. M. Katschinski als Sprecherin des *IRTG 1816*.

Ein großes Dankeschön gilt meinem Bruder David, der mir sehr beim Verständnis der elektrotechnischen Hintergründe eines Patch-Clamp-Verstärkers geholfen hat.

Außerdem danke ich meinem Mann Julian für die Anregungen, die kleinen Tipps und die große Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit. Dank ihm wurde die Anzahl der Kommafehler in dieser Arbeit signifikant reduziert.

Zu guter Letzt danke ich meiner Freundin Uta, die mir die Arbeitsgruppe Molekulare Pharmakologie empfohlen hat – diese Wahl habe ich nicht bereut.