

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
PROF. DR. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE BEDEUTUNG VON PLAKOPHILIN-2 FÜR DIE FUNKTION DES
SPANNUNGSGESTEUERTEN NATRIUMKANALS $Na_v1.5$ IM RAHMEN DER
ARRHYTHMOGENEN RECHTSVENTRIKULÄREN KARDIOMYOPATHIE**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lena Albersdörfer

2020

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN II
PROF. DR. LARS MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE BEDEUTUNG VON PLAKOPHILIN-2 FÜR DIE FUNKTION DES
SPANNUNGSGESTEUERTEN NATRIUMKANALS $Na_v1.5$ IM RAHMEN DER
ARRHYTHMOGENEN RECHTSVENTRIKULÄREN KARDIOMYOPATHIE**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lena Albersdörfer

2020

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Wagner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Daniele Camboni
Tag der mündlichen Prüfung:	17. September 2020

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Einführung: Die Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie.....	1
1.1.1 Hintergründe und klinisches Bild	1
1.1.2 Grenzen von Diagnostik und Therapie	2
1.2 Grundlagen der kardialen Erregbarkeit	4
1.2.1 Ruhemembranpotential	4
1.2.2 Das kardiale Aktionspotential	5
1.2.3 Der spannungsabhängige Natriumkanal $\text{Na}_v1.5$	10
1.3 Mechanismen der Arrhythmogenese	13
1.3.1 Kreisende Erregungen	14
1.3.2 Getriggerte elektrische Aktivität und abnorme Automatie	15
1.3.3 Rolle des $\text{Na}_v1.5$ in der Entstehung kardialer Arrhythmien	16
1.4 Molekulare Grundlagen der Glanzstreifenarchitektur	18
1.4.1 Elektrochemische Zell-Zell-Kommunikation: Gap Junctions (Nexus)	20
1.4.2 Mechanische Zell-Zell-Verbindungen: Desmosomen und <i>Fasciae adhaerentes</i>	21
1.5 Pathophysiologische Mechanismen der ARVC	22
1.5.1 Genetische Grundlagen der ARVC	22
1.5.2 Molekulare Mechanismen der Arrhythmogenese: Stand der Forschung... ..	23
1.6 Fragestellungen und Zielsetzungen	27
1.6.1 Einfluss von PKP2 auf die Expression relevanter Glanzstreifen-Proteine ..	28
1.6.2 Auswirkungen der <i>PKP2</i> -Mutation auf das kardiale Aktionspotential	29
1.6.3 Zusammenhang zwischen PKP2 und dem spannungsabhängigen Natriumstrom	29
1.6.4 Vergleich einer ARVC-Patientin mit einer asymptomatischen Mutationsträgerin	30
2 Material und Methoden.....	31
2.1 Patientenrekrutierung und klinische Patientendaten.....	31
2.2 Humane induzierte pluripotente Stammzellen	32
2.2.1 Hintergründe und Methodik	32
2.2.2 Kardiomyozyten aus hiPSCs als <i>in-vitro</i> -Modell für die ARVC	34
2.2.3 Generation patientenspezifischer induzierter pluripotenter Stammzellen..	35

2.3 Kultur der induzierten pluripotenten Stammzellen	35
2.4 Differenzierung der hiPSCs zu Kardiomyozyten	37
2.4.1 Lösungen und Chemikalien.....	39
2.4.2 Durchflusszytometrie zum Nachweis von cTnT.....	41
2.5 Immunofluoreszenzanalysen	41
2.6 Patch Clamp-Messungen.....	43
2.6.1 Aktionspotential-Messungen	44
2.6.2 Natriumstrom-Messungen.....	45
2.6.3 Datenauswertung und Statistik.....	51
3 Ergebnisse	53
3.1 Verteilung relevanter Glanzstreifenproteine	53
3.1.1 Nachweis von cTnT als Kardiomyozyten-spezifischer Marker	53
3.1.2 Reduktion der PKP2-Expression in Zellen der ARVC-Patientin	53
3.1.3 Deutlicher Expressionsverlust von AnkG in Zellen der ARVC-Patientin....	54
3.1.4 Unveränderte Lokalisation von Na _v 1.5.....	55
3.2 Veränderungen des kardialen Aktionspotentials	56
3.2.1 Charakteristische Verteilung der Aktionspotential-Typen.....	56
3.2.2 Erhöhte Frequenz spontaner Aktionspotentiale bei Mutationsträgerinnen	58
3.2.3 Depolarisiertes Ruhemembranpotential bei ARVC-Patientin	59
3.2.4 Verlängerte Dauer des Aktionspotentials bei ARVC-Patientin	60
3.2.5 Verringerte Amplitude und Aufstrichgeschwindigkeit bei ARVC-Patientin.	63
3.2.6 Überblick: Aktionspotentials-Analysen	66
3.3 Auswirkungen der <i>PKP2</i>-Mutation auf den spannungsgesteuerten Natriumstrom.....	67
3.3.1 Reduktion des Spitzennatriumstroms bei ARVC-Patientin, Steigerung bei asymptomatischer Mutationsträgerin	67
3.3.2 Rechtsverschiebung der Steady-State-(In-)Aktivierung bei Indexpatientin	69
3.3.3 Keine Veränderungen in Erholung nach Inaktivierung und intermediärer Inaktivierung.....	72
3.3.4 Verringerter später Natriumstrom nur in Zellen der ARVC-Patientin.....	75
4 Diskussion	77
4.1 Veränderungen der Funktion des Na_v1.5	77
4.1.1 Reduzierter Spitzennatriumstrom durch verzögerte Steady-State-Aktivierung	78

4.1.2 Vergrößerter Spitzennatriumstrom - ein Kompensationsmechanismus? ..	80
4.1.3 Untergeordnete Rolle des späten Natriumstroms in der Pathogenese der ARVC	82
4.2 Proarrhythmogene Veränderungen der Aktionspotentials-Kinetik	84
4.2.1 Elektrische Instabilität durch erhöhtes Ruhemembranpotential.....	84
4.2.2 APD-Verlängerung als Risikofaktor für die Entstehung von Nachdepolarisationen	87
4.2.3 Rolle des spannungsabhängigen Natriumstroms.....	90
4.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse der beiden Mutationsträgerinnen	90
4.3.1 Unterschiede zwischen den Mutationsträgerinnen: Zusammenfassung ...	91
4.3.2 Ursachen des unterschiedlich ausgeprägten Phänotyps	92
4.4 Kardiomyozyten aus hiPSCs als patientenspezifisches Zellmodell	94
4.4.1 hiPSC-induzierte Kardiomyozyten zur Risikostratifizierung von Mutationsträgern	94
4.4.2 Fortgeschrittene Reife der gewonnenen Kardiomyozyten.....	94
4.5 Limitationen der vorliegenden Arbeit	96
4.5.1 Methodische Einschränkungen des hiPSC-Modells.....	96
4.5.2 Immunofluoreszenzfärbungen.....	97
4.5.3 Patch-Clamp-Messungen.....	97
4.5.4 Patientenrekrutierung.....	98
5 Zusammenfassung	100
6 Anhang	103
6.1 Charakterisierung der induzierten pluripotenten Stammzellen	103
6.1.1 Karyotypisierung	103
6.1.2 Nachweis embryonaler Marker.....	103
6.1.3 Bestätigung der Pluripotenz	106
6.2 Abkürzungsverzeichnis	107
6.3 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	110
7 Literaturverzeichnis	112
8 Eidesstattliche Erklärung.....	132
9 Danksagung	133

Einleitung

1.1 Einführung: Die Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie

1.1.1 Hintergründe und klinisches Bild

Die Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ist eine genetisch bedingte Kardiomyopathie, welche mit 11 - 22% für einen beträchtlichen Anteil der Fälle von plötzlichem Herztod in der jungen, sportlichen Bevölkerung verantwortlich ist (1–3). Die Erkrankung zählt zu den primären Kardiomyopathien und wird in 30 - 50% der Fälle – mit variabler Penetranz und Expressivität – autosomal-dominant vererbt (3–5). Männer sind mit einer Verteilung von 3:1 häufiger von der ARVC betroffen als Frauen (6). Die Prävalenz der Erkrankung wird auf 1:2000 bis 1:5000 geschätzt (6, 7), wobei von einer hohen Dunkelziffer auszugehen ist, da der plötzliche Herztod in mindestens 20 – 50% der Fälle das erste – und meist letzte – „Symptom“ der Krankheit ist (8).

Das klinische Bild der ARVC umfasst zwei Hauptprobleme, die namensgebend für die Erkrankung waren: Zum einen präsentiert sich die Erkrankung mit zunehmenden strukturellen Veränderungen, die sich oft (aber nicht nur) im Bereich des rechten Ventrikels finden (9). Zum anderen leiden die Patienten an unterschiedlich stark ausgeprägten Herzrhythmusstörungen, die in vielen Fällen lebensbedrohlich sind (10, 11). Zu den genannten histopathologischen Veränderungen gehören unter anderem ein diffuser fibrolipomatöser Umbau des Myokards mit Myokardatrophie und dünnen Kammerwänden sowie aneurysmatische Veränderungen der Ventrikel (1, 3, 12). Die Erkrankung verläuft progredient, d.h. es kommt im Verlauf der Erkrankung zur zunehmenden kontraktilen Dysfunktion bis hin zur Globalherzinsuffizienz (9). Aufgrund der nicht unbeträchtlichen Zahl an ARVC-Patienten, bei denen sich eine begleitende oder sogar isolierte Beteiligung des linken Ventrikels zeigt (13–17), wird in der neueren wissenschaftlichen Literatur zunehmend der Begriff „Arrhythmogene Kardiomyopathie“ verwendet (18, 19). Da in der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie jedoch noch der im klinischen Alltag gebräuchlichere Begriff „ARVC“ verwendet wird (20), soll die Erkrankung auch in der vorliegenden Arbeit so bezeichnet werden.

Neben den beschriebenen strukturellen Veränderungen ist das Auftreten lebensbedrohlicher Arrhythmien das zweite grundlegende Charakteristikum der ARVC. In ihrer klassischen Form präsentiert sich die Erkrankung mit anhaltenden bzw. nicht-anhaltenden ventrikulären Tachykardien, deren Linksschenkelblock-Morphologie auf den Ursprung aus dem rechten Ventrikel hinweist (21). Diese Herzrhythmusstörungen treten gehäuft unter starker körperlicher Belastung auf (1, 13, 14, 22, 23) und betreffen oft junge, scheinbar herzgesunde Patienten (23, 24). Darüber hinaus weist ein Großteil der Patienten weitere EKG-Veränderungen auf (25), wie eine T-Negativierung in den rechtspräkordialen Ableitungen oder das für die ARVC charakteristische Epsilon-Potential, ein niedrigamplitudiges Potential am Ende des QRS-Komplexes, möglicherweise als Ausdruck einer verzögerten intraventrikulären Erregungsweiterleitung (10, 21).

1.1.2 Grenzen von Diagnostik und Therapie

Trotz ihrer klinischen Relevanz als eine der häufigsten Ursachen von plötzlichem Herztod bei jungen Sportlern ist die Pathogenese der ARVC bisher nur unzureichend verstanden. Insbesondere die Mechanismen der Arrhythmogenese sind bis heute nicht abschließend geklärt. Es fällt auf, dass der Großteil der mit der ARVC assoziierten Mutationen in Genen vorkommt, die für desmosomale Proteine, wie z.B. Plakophilin-2, kodieren (26, 27). Dies hat zur aktuell vertretenen Annahme geführt, dass es sich bei der ARVC um eine genetisch determinierte Erkrankung der Glanzstreifen, also der speziellen kardialen Zell-Zell-Kontakte, handelt. Die genaueren molekularen Pathomechanismen, die zur Manifestation dieser Erkrankung führen, sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

Aus diesem Grund sind die therapeutischen, diagnostischen und prognostischen Möglichkeiten für ARVC-Patienten derzeit noch stark limitiert. Bereits die **Diagnosestellung** gestaltet sich oftmals schwierig. Es gibt keine einzelne Untersuchungsmethode, die eine sichere Diagnose der ARVC erlaubt. Stattdessen werden nach den modifizierten *Task-Force*-Kriterien sechs Kategorien von Major- und Minor-Kriterien getestet, anhand derer die Patienten in die Gruppen sichere (*definite*), wahrscheinliche (*borderline*) bzw. mögliche (*possible*) Diagnose ARVC eingeteilt werden können (21). Zu den genannten Kriterien zählen der Nachweis struktureller Veränderungen mittels Echokardiographie oder MRT, eine auffällige Histologie der Myokardbiopsie, charakteristische EKG-Veränderungen,

Rhythmusereignisse in der Patientenvorgeschichte oder eine positive Familienanamnese für die ARVC. Trotz dieser aufwändigen Diagnosestellung ist es oftmals nicht möglich, die Diagnose ARVC rechtzeitig, d.h. vor dem Auftreten lebensbedrohlicher Herzrhythmusstörungen, zu stellen.

Die Erkrankung wurde ursprünglich in drei klinische Phasen unterteilt (28): Sie beginnt mit einer subklinischen Phase, in der noch keine strukturellen Veränderungen nachweisbar sind, es jedoch schon zu lebensbedrohlichen Arrhythmien kommen kann. Gefolgt wird diese Phase vom klassischen Bild der ARVC mit Erfüllung der diagnostischen Kriterien und klinischer Symptomatik. Anschließend kann die Erkrankung mit fortschreitendem Verlauf und zunehmender systolischer Dysfunktion in das Endstadium übergehen, in dem die Erkrankung einer dilatativen Kardiomyopathie ähnelt. Problematisch ist vor allem das Initialstadium, also die subklinische Phase, in der eine Diagnose der Erkrankung sehr schwierig bis unmöglich ist, in der aber das Risiko, einen plötzlichen Herztod zu erleiden, bereits deutlich erhöht ist.

Ist die Erkrankung einmal diagnostiziert, sind aufgrund des mangelnden Verständnisses der Pathogenese die **therapeutischen Möglichkeiten** weiterhin limitiert. Sie beschränken sich hauptsächlich auf prophylaktische Maßnahmen wie die Implantation eines Kardioverter-Defibrillators (ICD) für Hochrisikopatienten, regelmäßige Verlaufskontrollen und Sportkarenz (29, 30). Für eine gezielte pharmakologische Therapie gibt es momentan noch keine wissenschaftlich fundierte Grundlage; der Einsatz von antiarrhythmischen Medikamenten wie Betablockern oder Amiodaron begründet sich bisher auf rein empirischen Daten (7, 8, 19, 31). Die Entwicklung kurativer Behandlungsmöglichkeiten hängt entscheidend vom näheren Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung ab.

Zu guter Letzt stellt die **Risikostratifizierung** von ARVC-Patienten bzw. von Trägern einer mit der ARVC assoziierten Mutation ein wichtiges klinisches Problem dar. Das breite Spektrum klinischer Phänotypen reicht von asymptomatischen Mutationsträgern über das gelegentliche Auftreten von Palpitationen bis hin zum plötzlichen Herztod (29, 32, 33). Aus diesem Grund gibt es nach wie vor keine einheitlichen Empfehlungen für das therapeutische Vorgehen. Während bei Patienten nach überlebtem plötzlichen Herztod die klare Indikation zur ICD-Implantation besteht (20, 34, 35), beruht das therapeutische Vorgehen für Patienten mit milderer klinischen Erscheinungen weiterhin auf Einzelfallentscheidungen;

dasselbe gilt für enge Familienangehörige bzw. asymptotische Träger einer mit der ARVC assoziierten Mutation (8, 29, 34, 35).

Aus den genannten Gründen ist ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge, insbesondere auf zellulärer Ebene, essenziell zur Weiterentwicklung der aktuell noch deutlich eingeschränkten diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten für ARVC-Patienten. Darüber hinaus sind diese Kenntnisse entscheidend für eine verbesserte Aussage über Prognose und Krankheitsverlauf dieser klinisch so heterogenen Patientengruppe. Die vorliegende Forschungsarbeit soll zu diesem Verständnis beitragen, indem sie die Auswirkungen einer erstmalig beschriebenen Mutation im *PKP2*-Gen auf die elektrischen Eigenschaften von Herzmuskelzellen aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen einer ARVC-Patientin untersucht. Die Ergebnisse werden in den direkten Vergleich zu denen ihrer asymptotischen Schwester, Trägerin der gleichen Mutation, gestellt.

Im Folgenden werde ich zunächst auf die elektrophysiologischen Grundlagen der kardialen Erregbarkeit, grundlegende Mechanismen der Arrhythmogenese sowie den Aufbau der Glanzstreifen eingehen. Auf diesem Wissen aufbauend soll anschließend die Pathogenese der ARVC, insbesondere die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, nach dem aktuellen Forschungsstand näher beleuchtet werden.

1.2 Grundlagen der kardialen Erregbarkeit

1.2.1 Ruhemembranpotential

Zellmembranen können durch ihre Eigenschaft der selektiven Permeabilität elektrochemische Konzentrationsgradienten zwischen dem Intra- und dem Extrazellulärraum aufbauen. Dies spielt insbesondere bei erregbaren Zellen, also Nerven- und Muskelzellen, eine entscheidende Rolle, deren elektrische Eigenschaften durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Ionenflüsse reguliert werden. Der über verschiedene Ionenkanäle und Transportproteine gesteuerte Ionenfluss folgt dabei einer chemischen und einer elektrischen Triebkraft (36). Die chemische Triebkraft umfasst die Diffusion von Molekülen entlang ihres Konzentrationsgradienten. Als elektrische Triebkraft hingegen bezeichnet man die Energiedifferenz, die durch Potentialunterschiede innerhalb und außerhalb der Zellmembran entsteht. Wenn die chemische Triebkraft für ein Teilchen genauso groß

ist wie seine elektrische Triebkraft, die beiden Kräfte aber in entgegengesetzte Richtungen wirken, heben sich die beiden Kräfte gegenseitig auf und es stellt sich ein elektrochemisches Gleichgewicht ein. In diesem Zustand findet kein Nettofluss über die Zellmembran statt. Für jedes Ion gibt es zu einem festgelegten Konzentrationsgradienten genau ein elektrisches Potential, an dem das elektrochemische Gleichgewicht erreicht ist. Das Gleichgewichtspotential (E_X) eines bestimmten Ions X lässt sich mit der (vereinfachten) Nernst-Gleichung berechnen:

$$E_X = - \frac{61}{z_X} \cdot \log \frac{[X]_i}{[X]_a} \quad [mV]$$

z_X = Wertigkeit des betrachteten Ions X; $[X]_i$ bzw. $[X]_a$ = intra- bzw. extrazelluläre Konzentration von X; Voraussetzung: physiologische Körpertemperatur von 37°C

Die elektrische Triebkraft für ein Ion ergibt sich dann aus der Abweichung des Gleichgewichtspotentials des jeweiligen Ions vom vorherrschenden Membranpotential ($E_M - E_X$). Das Membranpotential einer Zelle in Ruhe, das sog. Ruhemembranpotential (RMP), wird bestimmt durch die Ionenverteilung im Intra- und Extrazellulärraum. Wie stark die Gleichgewichtspotentiale der jeweiligen Ionen zur Zusammensetzung des Ruhemembranpotentials beitragen, hängt von der elektrischen Leitfähigkeit, der sog. relativen Permeabilität (P) der Membran für diese Ionen ab. Das RMP (E_{RMP}) lässt sich deshalb mit der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung folgendermaßen beschreiben:

$$E_{RMP} = -61mV \cdot \log \frac{P_{K^+} \cdot [K^+]_i + P_{Na^+} \cdot [Na^+]_i + P_{Cl^-} \cdot [Cl^-]_a}{P_{K^+} \cdot [K^+]_a + P_{Na^+} \cdot [Na^+]_a + P_{Cl^-} \cdot [Cl^-]_i}$$

P = Permeabilität; i = Ionenkonzentration intrazellulär; a = Ionenkonzentration extrazellulär

Da in den meisten Zellen, so auch in Herzmuskelzellen, die Leitfähigkeit der Zellmembran besonders hoch für Kaliumionen ist, liegt das Ruhemembranpotential nahe dem Gleichgewichtspotential für Kaliumionen ($E_K \approx -90 \text{ mV}$). Steigt durch Öffnung von Ionenkanälen die Leitfähigkeit für ein Ion, so nähert sich das RMP dem Gleichgewichtspotential des jeweiligen Ions an. Dies geschieht unter anderem beim Ablauf eines Aktionspotentials.

1.2.2 Das kardiale Aktionspotential

Aktionspotentiale (APs) sind impulsartige, stereotyp ablaufende Änderungen des Membranpotentials, die durch die schnelle Änderung der Membranleitfähigkeit für

verschiedene Ionen und die dadurch möglichen Ionenströme entstehen. Der Zusammenhang zwischen Membranpotential (E_M) und jeweils beteiligtem Ionenstrom (I_{Ion}) lässt sich folgendermaßen beschreiben (37):

$$\frac{\Delta E_M}{\Delta t} = - \frac{1}{C_M} \times I_{Ion}$$

Δt = zeitliches Intervall; C_M = Membrankapazität

Änderungen im Membranpotential entstehen also durch Ladungsverschiebungen über eine Zellmembran mit gegebener Membrankapazität (C_M), abhängig vom Öffnungsverhalten der beteiligten Ionenkanäle und Transportproteine. Ein negativer I_{Ion} , d.h. ein Einstrom positiv geladener Teilchen in den Intrazellulärraum, bewirkt nach oben stehender Formel eine Verschiebung des Membranpotentials in positivere Bereiche; diesen Vorgang nennt man Depolarisation. Umgekehrt führt ein Kationenausstrom, also ein negativer I_{Ion} , zur Repolarisation (37).

Aktionspotentiale dienen der Erregungsweiterleitung innerhalb des Herzens und sind die Grundlage für die elektromechanische Kopplung, also die Umsetzung elektrischer Impulse in Muskelkontraktionen (38). Die initiale Depolarisation geht von spezialisierten Schrittmacherzellen mit autonomer Aktivität aus, welche sich in hoher Dichte in bestimmten Regionen des Herzens befinden. In der Regel beginnt die elektrische Aktivität am Sinusknoten, der im Bereich des rechten Vorhofs lokalisiert ist, und breitet sich zunächst über die Vorhöfe aus. Anschließend wird die Erregung über den AV-Knoten und das His-Bündel in die Herzkammern übergeleitet und erreicht über die Tawara-Schenkel und die nachfolgenden Purkinje-Fasern die Zellen des Arbeitsmyokards. Die Erregung des Myokards folgt somit immer dem gleichen automatisierten Ablauf und ist Voraussetzung für eine regelrechte Kontraktion des Herzens. Die Weiterleitung von Aktionspotentialen erfolgt in der Regel durch eine „passive“ Erregungsausbreitung von bereits erregten Nachbarzellen über Gap Junctions (s. Kap. 1.4.1) oder erregende synaptische Potentiale (39, 40). Da die Expression bzw. die Eigenschaften von Ionenkanälen in den verschiedenen Bereichen des Herzens variieren, finden sich in den jeweiligen Zelltypen unterschiedliche Formen von Aktionspotentialen (41) (s. Abb. 1). Diese Verteilung ist insofern wichtig, da dadurch eine unidirektionale Ausbreitung der Erregung gewährleistet ist (42). Die für jeden Zelltyp charakteristische AP-Kurve setzt sich aus dem Verhältnis einwärts- (Na^+ und Ca^{2+}) und auswärtsströmender (K^+) Ionenflüsse

zusammen. Wird dieses feine Zusammenspiel im Rahmen angeborener oder erworbener Herzerkrankungen gestört, kann es zur Entstehung lebensbedrohlicher Herzrhythmusstörungen kommen. Bereits kleine Veränderungen im Öffnungsverhalten von Ionenkanälen können folgenschwere Auswirkungen auf die Aktionspotential-Kinetik und das elektrophysiologische Gleichgewicht der Zelle haben (43, 44).

Im Folgenden werden die Phasen des kardialen Aktionspotentials mit den beteiligten Ionenflüssen genauer erläutert. Es wird zunächst der Ablauf für Arbeitsmyokardzellen beschrieben; anschließend sollen Unterschiede der AP-Morphologie in den verschiedenen kardialen Zelltypen herausgestellt werden. Die Phaseneinteilung orientiert sich an den Arbeiten von Bers (36) bzw. Nerbonne et al. (42).

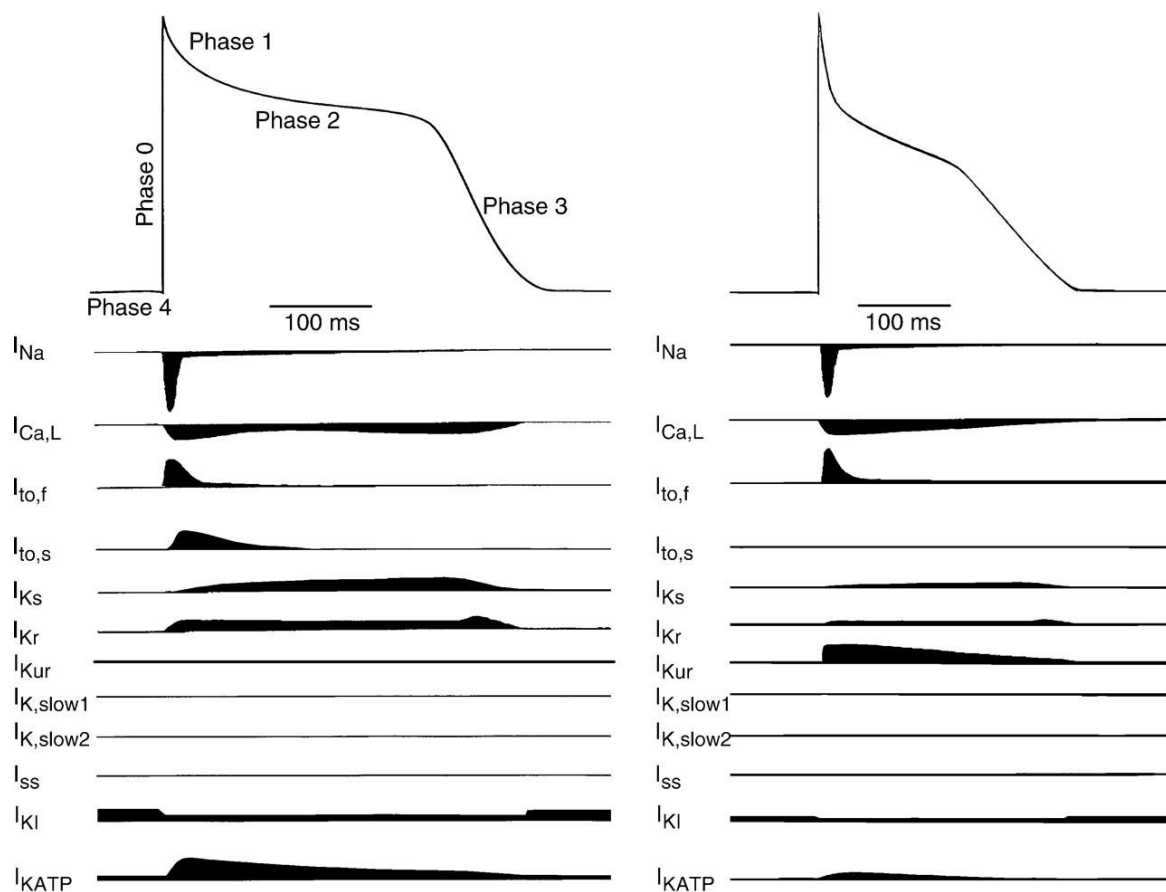


Abb. 1 Das kardiale Aktionspotential. Schematischer Ablauf eines Aktionspotentials (AP) mit den zugrundeliegenden Ionenströmen in einer humanen ventrikulären (links) bzw. atrialen (rechts) Herzmuskelzelle. Die in der raschen Aufstrichphase (Phase 0) stattfindende Depolarisation erfolgt hauptsächlich durch den Natriumeinstrom über spannungsgesteuerte Natriumkanäle (I_{Na}). Durch die Depolarisation werden wiederum spannungsabhängige Kaliumkanäle aktiviert, deren transienter Kaliumausstrom (I_{to}) die Repolarisation einleitet (Phase 1). In der anschließenden Plateau-Phase (Phase 2), die in ventrikulären Kardiomyozyten besonders prominent ist, halten sich depolarisierende ($I_{Ca,L}$) und repolarisierende Ströme (I_{Ks} , I_{Kr} , I_{Kur}) die Waage; die Zelle befindet sich in der sog. Refraktärphase, in der kein erneutes AP ausgelöst werden kann. Mit zunehmender Inaktivierung von L-Typ-Kalziumkanälen steigt die Triebkraft für den repolarisierenden Kaliumausstrom (Phase 3) und das Membranpotential kehrt auf das Niveau des Ruhemembranpotentials (Phase 4) zurück; dieses wird hauptsächlich durch den kontinuierlichen Kaliumstrom via I_{K1} aufrechterhalten (Abb. aus Nerbonne et al. (42)).

Phase 0: Rasche Aufstrichphase

Erreicht ein depolarisierender Impuls die Zellmembran einer Herzmuskelzelle, kommt es – in Vorhof- und Ventrikelmuskardzellen – zur Öffnung spannungsabhängiger Natriumkanäle und zum Einstrom von Natriumionen in den Intrazellulärraum, entlang ihres elektrochemischen Gradienten. Durch diese zusätzliche Depolarisation werden weitere Natriumkanäle rekrutiert, sodass es ab einem Schwellenpotential von ca. -65 mV zum schnellen Natriumeinstrom kommt. Das Aktionspotential folgt dabei der „Alles-oder-nichts“-Regel, d.h. durch die gleichzeitige Öffnung aller Natriumkanäle folgt die Potentialänderung stets dem gleichen automatisierten Ablauf. Durch die erhöhte Membranleitfähigkeit für Natriumionen verschiebt sich das Membranpotential in extrem kurzer Zeit weiter in positivere Bereiche, in Richtung des Gleichgewichtspotentials für Na^+ -Ionen ($E_{\text{Na}} \approx +70 \text{ mV}$). Diese Vorzeichenänderung des Membranpotentials wird auch als „Over-shoot“ bezeichnet. Aufgrund der raschen Inaktivierung der Natriumkanäle sowie der zunehmend größeren Triebkraft für den Ausstrom von K^+ -Ionen ($E_{\text{M}} - E_{\text{K}}$) wird E_{Na} jedoch nie erreicht; die maximale Depolarisation liegt somit in der Regel zwischen +35 und +50 mV.

Während Zellen des Ventrikel- und Vorhofmyokards aufgrund ihrer hohen Dichte an spannungsabhängigen Natriumkanälen einen steilen Aufstrich des AP aufweisen, wird diese Initialphase in Schrittmacherzellen bzw. nodalen Zellen hauptsächlich durch den langsameren Einstrom von Kalziumionen über L-Typ- bzw. T-Typ-Kalziumkanäle verursacht (42, 45). Aus diesem Grund haben nodale Zellen eine deutlich langsamere Aufstrichgeschwindigkeit im Vergleich zu ventrikulären bzw. atrialen Zellen (~ 5 vs. 200 V/s (36)).

Phase 1: Frühe Repolarisation

Durch die Depolarisation werden spannungsabhängige Kaliumkanäle aktiviert und es kommt zum transienten Auswärtsstrom von K^+ -Ionen (I_{to}), hauptsächlich über die K^+ -Kanäle $\text{K}_{\text{V}1.4}$, $\text{K}_{\text{V}2.1}$ und $\text{K}_{\text{V}4.2}$. Das Membranpotential nähert sich dadurch wieder dem Gleichgewichtspotential für K^+ -Ionen an (E_{K}). Diese vorübergehende Repolarisation wird auch als „Notch“ bezeichnet und ist in ventrikulären und Purkinje-Zellen besonders stark ausgeprägt. Da die schnell öffnenden K_{V} -Kanäle jedoch auch rasch wieder schließen und die Membranleitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen zunimmt, stellt sich nach kurzer Zeit die Plateau-Phase ein (Phase 2).

Atriale Kardiomyozyten besitzen im Vergleich zu ventrikulären Zellen eine deutlich höhere I_{to} -Dichte (41). Außerdem ist an ihrem repolarisierenden Kaliumstrom auch der sehr rasch aktivierende I_{Kur} beteiligt, sodass das AP dieser Zellen ein weniger ausgeprägtes Plateau aufweist und das Membranpotential schneller wieder zum RMP zurückkehrt (46).

Phase 2: Plateau-Phase und Refraktärzeit

Die Plateau-Phase ist charakterisiert durch eine geringe Membranleitfähigkeit und ein sich kaum veränderndes Membranpotential, da sich einwärts- (= depolarisierende) und auswärtsgerichtete (= repolarisierende) Ionenströme die Waage halten. Die Dauer dieser Phase variiert stark zwischen den verschiedenen Typen von Kardiomyozyten; Arbeitsmyokardzellen haben typischerweise ein prominentes Plateau von ca. 300 ms Dauer, während dieses bei Vorhof- oder Schrittmacherzellen deutlich kürzer ausfällt. Der einwärts gerichtete Strom besteht hauptsächlich aus Kalziumstrom über L-Typ-Kalziumkanäle ($I_{Ca,L}$), welche ab einem depolarisierten Membranpotential von ca. -20 mV aktiviert werden und nur langsam wieder schließen. Der lange Einstrom an Kalziumionen löst eine Kalzium-getriggerte Kalziumfreisetzung aus den Speichern des Sarkoplasmatischen Retikulums aus und ist somit das entscheidende Bindeglied der elektromechanischen Kopplung (36). Dem entgegengesetzt sorgen verzögert gleichrichtende Kaliumkanäle für einen kontinuierlichen auswärts gerichteten Strom (I_{Kur} , I_{Kr} , I_{Ks}). Aufgrund des hohen Membranwiderstands während der Phase 2 des Aktionspotentials sind bereits kleine Veränderungen in den beteiligten Strömen ausreichend, die Dauer des APs (APD) zu beeinflussen und Arrhythmien auszulösen (42, 47).

Während der Plateauphase bleiben spannungsabhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle inaktiviert und es kann kein erneutes Aktionspotential ausgelöst werden. Dieser Zustand wird auch als Refraktärphase bezeichnet. Man unterscheidet die absolute von der relativen Refraktärphase: In der absoluten Refraktärphase ist das Auslösen eines erneuten Aktionspotentials nicht möglich. In der relativen Refraktärphase hingegen ist bereits wieder ein Teil der Natriumkanäle aktivierbar, die Schwelle zur Auslösung eines neuen Aktionspotentials liegt jedoch höher und es wird auch nicht die maximal mögliche AP-Amplitude erreicht. Die Refraktärzeit dient zum einen dazu, die AP-Frequenz zu begrenzen, damit keine Dauererregung stattfinden kann; dieser Mechanismus ist wichtig für die Relaxation des Herzmuskels und somit die Füllung

der Ventrikel. Zum anderen wird durch die lange Aktionspotentialsdauer (APD) die Richtung der Erregungsausbreitung vorgegeben, da gerade erregte Bereiche nicht sofort wieder erregt werden können. Dies dient als Schutzmechanismus vor kreisenden Erregungen (s. Kap. 1.3.1) (36).

Phase 3: Späte Repolarisation

Während die L-Typ-Kalziumkanäle zunehmend in den inaktiven Zustand übergehen, steigt die Triebkraft für den Kalium-Auswärtsstrom und es kommt mehr und mehr zur Repolarisation des Membranpotentials, zunächst über die steigende Aktivität der verzögert gleichrichtenden K^+ -Kanäle $K_{V7.1}$ bzw. hERG (I_{Kr} bzw. I_{Ks}). Mit stetig negativerem Membranpotential nimmt auch der Beitrag des I_{K1} immer weiter zu, sodass die Geschwindigkeit der Repolarisation nochmals verstärkt wird (36), bis schließlich das Ruhemembranpotential erreicht ist.

Phase 4: Ruhemembranpotential

Zur Aufrechterhaltung des negativen RMPs in ventrikulären und atrialen Kardiomyozyten ist neben der Na^+ - K^+ -ATPase hauptsächlich der einwärts-gleichrichtende Kaliumkanal $K_{ir2.1}$ (I_{K1}) verantwortlich (48); das RMP bei diesen Zellen liegt bei ca. -80 mV, also nahe am Gleichgewichtspotential für K^+ -Ionen (E_K). Im Vergleich dazu findet sich in Schrittmacherzellen eine kaum messbare I_{K1} -Dichte (49, 50), weshalb das RMP in diesen Zellen deutlich depolarisierter ist. Dazu trägt, neben verschiedenen anderen Mechanismen (38, 50), auch ein in Schrittmacherzellen besonders ausgeprägter unselektiver Kationenstrom (I_f) bei, der durch Hyperpolarisations-abhängige Aktivierung von HCN-Kanälen (*Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channels*) entsteht (51, 52). Kaum kehrt das RMP nach einer Depolarisation zum Ausgangs-RMP zurück, werden diese Kanäle aktiviert und es kommt zum stetig zunehmenden Einstrom von Kationen und dadurch zur erneuten Depolarisation. Das RMP dieser Zellen ist somit deutlich instabiler als z.B. in Ventrikelzellen, sodass es leichter zur Auslösung spontaner Aktionspotentiale kommt.

1.2.3 Der spannungsabhängige Natriumkanal $Na_V1.5$

Vor mehr als einem halben Jahrhundert haben die späteren Nobelpreisträger Hodgkin und Huxley durch ihre Untersuchungen an neuronalen Axonen ein Modell zur Beschreibung des Aktionspotentials entwickelt und das Verhalten

spannungsgesteuerter Ionenkanäle untersucht (53). Die Offenwahrscheinlichkeit dieser Kanäle ist abhängig vom vorherrschenden Membranpotential; demnach werden sie durch Änderungen im Membranpotential, also durch De- und Hyperpolarisation, aktiviert bzw. inaktiviert. Spannungsabhängige Natriumkanäle (Na_V1 -Kanäle) sind ubiquitär in erregbaren Zellen verbreitet und sorgen durch ihren raschen Einstrom von Natriumionen für die schnelle Aufstrichphase des Aktionspotentials in ventrikulären und atrialen Kardiomyozyten (54). Außerdem sind sie maßgeblich an der Weiterleitung elektrischer Impulse beteiligt (55). Bei Na_V1 -Kanälen handelt sich um große glykosylierte Transmembranproteine, die aus einer einzelnen porenbildenden α -Untereinheit und einer oder mehrerer regulatorischer β -Untereinheiten bestehen (56). Für die α -Untereinheit kodieren mindestens zehn verschiedene Gene; bekannt sind bis jetzt die Gene *SCN1A* – *SCN11A* (57, 58). Je nach zugrundeliegendem Gen lassen sich die spannungsabhängigen Natriumkanäle in verschiedene Gruppen einteilen; die im Herzen am häufigsten vorkommende Isoform ist $\text{Na}_V1.5$, kodiert vom Gen *SCN5A* (59, 60). Mutationen im *SCN5A*-Gen sind mit zahlreichen Herzerkrankungen assoziiert, darunter die bekannten Vertreter Brugada- und Long-QT-Syndrom, aber auch mit dem Sick-Sinus-Syndrom, Formen des Vorhofflimmerns sowie einigen Formen der dilatativen Kardiomyopathie (59, 61–64). Diesen Erkrankungen ist gemeinsam, dass sie mit Veränderungen im Öffnungsverhalten des $\text{Na}_V1.5$ einhergehen, welche das elektrophysiologische Gleichgewicht der Herzmuskelzellen stören.

Öffnungsverhalten des $\text{Na}_V1.5$

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle sind durch folgende Hauptmerkmale gekennzeichnet: Ihre spannungsabhängige Aktivierung, ihre rasche Inaktivierung und ihre hohe selektive Leitfähigkeit für Na^+ -Ionen (53). Sie weisen ein charakteristisches Öffnungsverhalten auf und können in drei verschiedenen Funktionszuständen vorliegen. Bei einem physiologischen Ruhemembranpotential von ca. -85 mV sind die Kanäle geschlossen, aber aktivierbar. Eine Depolarisierung der Zellmembran, ausgelöst durch ein eintreffendes Aktionspotential einer Nachbarzelle oder ein instabiles RMP, führt zur Öffnung der Kanalporen. Entlang des elektrochemischen Konzentrationsgradienten kommt es dadurch zum raschen Einstrom von Natriumionen in den Intrazellulärraum (I_{Na}). Dieser kurze, aber große Natriumeinstrom hat sein Maximum bei ca. -55 mV und wird auch als

Spitzenstrom (I_{Na,max}) bezeichnet. Mit zunehmender Depolarisation schließen die meisten Kanäle rasch wieder und der Natriumstrom nimmt ab. Während dieses geschlossenen Zustands können die Kanäle vorübergehend nicht aktiviert werden. Die Kinetik dieser schnellen Inaktivierung wird Steady-State-Inaktivierung genannt. Bei einem kleinen Teil der Natriumkanäle kann dem gegenüber eine verzögerte, sog. intermediäre Form der Inaktivierung beobachtet werden (I_{IM}); diese Kanäle wechseln erst einige 100 ms nach den Kanälen der raschen Inaktivierung in den inaktivierbaren Zustand (65). Während des geschlossenen, inaktiven Zustands kann kein neues Aktionspotential ausgelöst werden und die Zelle befindet sich in der Refraktärphase. Mit zunehmender Repolarisation gehen schließlich immer mehr Natriumkanäle wieder in den noch geschlossenen, aber wieder aktivierbaren Zustand über. Diese Erholung nach Inaktivierung ist abhängig von den beiden Faktoren Zeit und Ausmaß der Repolarisation (42). Anschließend sind die Natriumkanäle wieder für ein neues Aktionspotential aktivierbar. Legt man die Kurven für die Kinetik der Aktivierung bzw. Inaktivierung der Natriumkanäle übereinander, sieht man, dass zunächst fast alle Kanäle inaktiviert sein müssen, bevor ein erneut ausgelöster Natriumstrom messbar ist. Bei einem Membranpotential von ca. -52 mV gibt es jedoch ein kleines Fenster, in dem sich die beiden Graphen überschneiden, da ein geringer Prozentsatz der Kanäle trotz unvollständiger Repolarisation bereits wieder aktivierbar ist. Dieser sog. *window current* (66) beträgt zwar nur ca. 0,1% des maximalen Natriumstroms, kann aber aufgrund der insgesamt hohen Dichte an Natriumstrom schon bei kleinen Veränderungen im Öffnungsverhalten des Natriumkanals eine relevante Steigerung der intrazellulären Natriumkonzentration bedeuten (36). Einen ähnlichen Effekt hat eine kleine Fraktion an Natriumkanälen, die auch während der Plateauphase geöffnet bleibt bzw. zwischen dem Offen- und Geschlossen-Zustand hin und her wechselt. Der dadurch erzeugte kleine, aber kontinuierliche Einwärtsstrom an Natriumionen wird als persistierender oder später Natriumstrom (I_{Na,L}) bezeichnet (65). Durch seine lange zeitliche Aktivität (ca. 300 – 400 ms) trägt er wesentlich zur Aufrechterhaltung des AP-Plateaus bei (67). Obwohl die Höhe des späten Natriumstroms nur ca. 0,5 % des gesamten Natriumstroms ausmacht, hat er aufgrund seiner langen Dauer einen deutlich größeren Einfluss auf die intrazelluläre Natriumkonzentration als der kurze Spitzenstrom (36, 68).

Lokalisation und assoziierte Partnerproteine

Die Lokalisation des spannungsabhängigen Natriumkanals $\text{Na}_V1.5$ in Herzmuskelzellen ist noch nicht vollständig geklärt. Eine hohe $\text{Na}_V1.5$ -Dichte findet sich zunächst an den Glanzstreifen (69, 70), außerdem wird eine zweite Lokalisation an der lateralen Membran und den T-Tubuli diskutiert (69, 71–73). Inzwischen geht man davon aus, dass Ionenkanäle nicht isoliert in der Zellmembran vorliegen, sondern in großen makromolekularen Komplexen mit anderen Strukturen organisiert sind (74, 75). Im Bereich der Glanzstreifen befindet sich der spannungsabhängige Natriumkanal in einem gemeinsamen Proteinkomplex mit dem Adaptorprotein Ankyrin G (AnkG), dem zytoskelettalen Protein β_4 -Spectrin und der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII) (76). Innerhalb dieses Proteinnetzwerks scheint β_4 -Spectrin für den Transport von $\text{Na}_V1.5$, CaMKII und AnkG an deren Zielort verantwortlich zu sein. AnkG wiederum reguliert, möglicherweise über eine Bindungsstelle an der β -Untereinheit, die korrekte Lokalisation des $\text{Na}_V1.5$ und dessen Verankerung an der Zellmembran (77–80). Darüber hinaus sind zahlreiche Wechselwirkungen mit benachbarten Proteinen beschrieben, die in Kap. 1.5.2 ausführlicher dargestellt werden. Änderungen in der Expression und Lokalisation des $\text{Na}_V1.5$ führen zu Funktionsstörungen des Kanals und erhöhen somit das Risiko für die Entstehung von Arrhythmien.

1.3 Mechanismen der Arrhythmogenese

Als kardiale Arrhythmie bzw. Herzrhythmusstörung werden im Allgemeinen ein unregelmäßiger Herzrhythmus und/oder eine pathologische Herzfrequenz bezeichnet. Unter den Begriff fallen harmlose Rhythmusereignisse wie vereinzelte Extrasystolen, aber auch schwere Tachyarrhythmien, welche die häufigste Ursache für den plötzlichen Herztod darstellen. Der plötzliche Herztod ist definiert als plötzlicher, unerwarteter Kreislaufstillstand kardialer Genese und gilt weiterhin als eine der weltweit führenden Todesursachen (81). Als auslösendes Rhythmusereignis liegt meist eine ventrikuläre Tachykardie bzw. Kammerflimmern zugrunde (82, 83). Die zugrundeliegenden Mechanismen der Arrhythmogenese sind vielfältig und noch nicht abschließend geklärt. Ganz allgemein gesprochen entstehen Arrhythmien meist auf dem Boden eines geschädigten bzw. strukturell veränderten Myokardabschnitts, in Verbindung mit einem (pathologischen) elektrischen Trigger sowie modulierenden

Faktoren wie Medikamenten oder sportlicher Aktivität (37, 84, 85). Einige Grundprinzipien für die Entstehung von Herzrhythmusstörungen sollen im Folgenden erklärt werden; dabei soll ein besonderes Augenmerk auf der Rolle des spannungsabhängigen Natriumstroms liegen.

1.3.1 Kreisende Erregungen

Der häufigste Mechanismus für die Entstehung von Herzrhythmusstörungen ist das Auftreten von kreisenden Erregungen, sog. Reentry-Arrhythmien (37, 82). Ihnen liegt eine gestörte oder regional inhomogene Weiterleitung elektrischer Impulse zugrunde. Als Entstehungsort dient oft ein anatomisches bzw. funktionelles Hindernis, z.B. eine (elektrisch nicht leitende) Infarktnarbe, welche von einer ankommenden Erregung umgangen werden muss. Treffen die elektrischen Signale hinter der Narbe wieder aufeinander, heben sie sich gegenseitig auf, da das dahinter liegende Gewebe refraktär ist. Voraussetzung dafür ist, dass die Impulse gleich schnell um das Hindernis herum geleitet werden. Kommt es auf einer Seite jedoch zu einer Verlangsamung oder gar Blockade der Erregungsleitung, kann die Erregung immer weiter um das Hindernis „kreisen“ und auf das umliegende Myokard übergreifen (38, 82). Diese kreisenden Erregungen können auch als stabile bzw. wandernde spiralförmige Wellen auftreten (86); letztere führen dabei zu polymorphen ventrikulären Tachykardien bis hin zum Kammerflimmern (82). Diese komplexen Erregungsstörungen sind wahrscheinlicher, wenn neben den anatomisch-strukturellen Veränderungen ein elektrisches Remodeling auf zellulärer Ebene vorliegt, das mit herabgesetzter Leitungsgeschwindigkeit und/oder elektrischer Instabilität einhergeht (87). Dabei spielt die Expression und Verteilung von Gap Junctions als Hauptmechanismus der elektrischen Zell-Zell-Kommunikation eine wichtige Rolle (s. Kap. 1.4.1). Auch eine reduzierte Dichte an spannungsabhängigen Natriumkanälen, wie sie u.a. in der Grenzregion eines Myokardinfarktes oder bei angeborenen Ionenkanalerkrankungen beobachtet werden kann, führt zu Verzögerungen der Erregungsweiterleitung (55, 88). Ein weiterer Mechanismus für die Entstehung von Reentry-Arrhythmien sind regional unterschiedliche bzw. unregelmäßige Repolarisationszeiten (89, 90). Folgen letztere einem regelmäßigen Rhythmus (kurz-lang-kurz-lang), spricht man von APD- oder Repolarisations-Alternans, welches auch in gesunden Herzmuskelzellen bei hochfrequenter Stimulation vorkommen kann (90). Im Rahmen verschiedener kardialer Pathologien

tritt es hingegen bereits bei einer normalen Herzfrequenz auf und begünstigt die Entstehung lebensbedrohlicher Herzrhythmusstörungen (85, 91).

1.3.2 Getriggerte elektrische Aktivität und abnorme Automatie

Neben kreisenden Erregungen sind fokale, ektope Erregungen ein weiterer zentraler Mechanismus für die Entstehung kardialer Arrhythmien. Diese kommen zustande, wenn in einer Gruppe von Zellen mit elektrischer Instabilität spontane Depolarisationen bzw. Aktionspotentiale ausgelöst werden (85). Für die Entstehung relevanter ektope ausgelöster Arrhythmien werden normalerweise mehrere tausend Zellen benötigt; bei gestörter Gap-Junction-Funktion bzw. strukturell vorgeschädigtem Myokard reichen hierfür jedoch deutlich weniger Zellen aus (92). Die drei Hauptmechanismen, die zu dieser gestörten elektrischen Aktivität führen, sind frühe und späte Nachdepolarisationen, auch als getriggerte elektrische Aktivität bezeichnet, sowie eine abnorme elektrische Automatie.

Als **frühe Nachdepolarisationen** (*early after-depolarizations* = EADs) werden depolarisierende Membranpotentialveränderungen bezeichnet, die bereits während der Plateau- bzw. der Repolarisationsphase entstehen. Als prädisponierender Faktor liegt in der Regel eine Verlängerung der Aktionspotentialsdauer (APD) vor (93), welche durch ein Missverhältnis auswärts- und einwärtsgerichteter Ströme zustandekommt. Aus einem vergrößerten Einwärtsstrom (hauptsächlich $I_{Na,L}$ und $I_{Ca,L}$) bzw. reduzierten Auswärtsstrom (I_{Kr} und I_{Ks}) während der Plateauphase resultiert eine Verlängerung, bei umgekehrten Verhältnissen eine Verkürzung der APD (38). Ist die Dauer der Plateauphase verlängert, werden Ca^{2+} -Kanäle reaktiviert, deren depolarisierender Ca^{2+} -Einstrom zu EADs und bei ausreichender Depolarisation zur Auslösung eines erneuten (vorgezogenen) Aktionspotentials führt (94).

Im Gegensatz zu EADs treten **späte Nachdepolarisationen** (*delayed after-depolarizations* = DADs) erst nach vollständiger Repolarisation auf, d.h. nach Rückkehr des Membranpotentials zum Ausgangs-RMP. Sie entstehen auf dem Boden einer pathologisch erhöhten Ca^{2+} -Konzentration im Intrazellulärraum ($[Ca^{2+}]_i$) bzw. im Sarkoplasmatischen Retikulum ($[Ca^{2+}]_{SR}$) (38). Dadurch kommt es vermehrt zu abnormen spontanen Ca^{2+} -Freisetzungen aus dem SR, den sog. Ca^{2+} -Sparks, wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung noch verstärkt wird (95). Die Zelle versucht, der erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ mit einer verstärkten Aktivität des Na^+ - Ca^{2+} -

Austauschers (NCX) entgegenzuwirken (38). Aufgrund der Stöchiometrie dieses Transporters, der 3 Na^{2+} -Ionen im Austausch für 1 Ca^{2+} -Ion über die Zellmembran bewegt, führt ein vermehrter Ca^{2+} -Abtransport zu einem positiven Na^{+} -Einstrom, welcher das Membranpotential in Form von DADs depolarisiert und somit destabilisiert. Diese unter dem Begriff getriggerte elektrische Aktivität zusammengefassten pathologischen Nachdepolarisationen stellen insgesamt den häufigsten Mechanismus für die Entstehung von Arrhythmien bei Patienten ohne strukturelle Herzerkrankung dar (96, 97).

Daneben kann auch eine abnorme autonome Aktivität von Herzmuskelzellen zur elektrischen Instabilität beitragen. Unter **abnormer Automatie** versteht man fokale Erregungen in Kardiomyozyten, welche eigentlich unter physiologischen Bedingungen keine bzw. nur äußerst niedrigfrequente spontane elektrische Aktivität zeigen, wie z.B. Purkinje- oder Kammermyokardzellen (85). Geben mehrere benachbarte Zellen synchron elektrische Impulse ab, spricht man auch von einem ektopen Schrittmacherzentrum. Die Grundlage der spontanen elektrischen Entladungen ist häufig ein depolarisiertes und somit elektrisch labiles RMP. Verschiebt sich das RMP in positivere Bereiche und somit näher an das Schwellenpotential für die Aktivierung der schnellen Natriumkanäle, reicht bereits eine geringe Depolarisation aus, um ein Aktionspotential auszulösen. Diese Verschiebung des RMP kann z.B. durch eine verringerte Aktivität des einwärts-gerichteten K^{+} -Kanals (I_{K1}) entstehen (98), wie es auch bei Patienten mit Herzinsuffizienz beobachtet wird (99, 100).

1.3.3 Rolle des $\text{Na}_v1.5$ in der Entstehung kardialer Arrhythmien

Veränderungen in der Aktivität und Kinetik des spannungsabhängigen Natriumkanals $\text{Na}_v1.5$ sind mit verschiedenen kardialen Erkrankungen assoziiert und präsentieren sich mit einem breiten Spektrum an klinischen Phänotypen (101, 102). Zwei zentrale Mechanismen der Arrhythmogenese stehen bei Veränderungen des spannungsgesteuerten Natriumstroms (I_{Na}) im Vordergrund: Zum einen bestimmt der I_{Na} durch seinen engen Zusammenhang mit der schnellen Aufstrichphase des Aktionspotentials die Weiterleitung elektrische Signale. Eine reduzierte Aktivität des $\text{Na}_v1.5$ führt somit zu einer Verzögerung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit, was wiederum die Entstehung kreisender Erregungen begünstigt (85, 102). Zum anderen können Veränderungen im Öffnungsverhalten des Kanals zum Anstieg des späten

Natriumstroms ($I_{Na,L}$) führen, wodurch sich die AP-Plateauphase verlängert und die intrazelluläre Natriumkonzentration ansteigt (103–105). Dadurch steigt das Risiko für das Auftreten spontaner Nachdepolarisationen mit der Gefahr ektooper Erregungsbildung.

SCN5A-Mutationen im Rahmen angeborener Herzrhythmusstörungen

Entscheidende Erkenntnisse über die Folgen einer Dysfunktion des spannungsabhängigen Natriumkanals lieferten Untersuchungen von hereditären Ionenkanalerkrankungen. *Loss-of-Function*-Mutationen im SCN5A-Gen, wie sie beispielsweise im Rahmen des Brugada-Syndroms vorkommen, verändern das Öffnungsverhalten des $Na_v1.5$, unter anderem – aber nicht nur – durch Veränderungen seiner Lokalisation (106). Der durch vermehrte intermediäre Inaktivierung reduzierte Spitzennatriumstrom führt zu einer verlangsamten AP-Aufstrichgeschwindigkeit und dadurch zu Verzögerungen der Erregungsweiterleitung, was sich klinisch durch Bradykardie, AV-Block und kreisende Erregungen bis hin zum Kammerflimmern äußert (55, 107–110). Dem gegenüber gibt es auch Erkrankungen, die mit einer gesteigerten Aktivität des $Na_v1.5$ einhergehen, wie das Long-QT-Syndrom Typ 3, dem verschiedene *Gain-of-Function*-Mutationen im SCN5A-Gen zugrundeliegen (61, 62). Obwohl diese Mutationen nicht zwangsläufig mit relevanten Veränderungen des Spitzennatriumstroms einhergehen, konnte ein vergrößerter später Natriumstrom, ausgelöst durch verzögerte Inaktivierung der Natriumkanäle, als proarrhythmogener Faktor identifiziert werden (111). Der gesteigerte späte Natriumstrom führt zur Verlängerung der Aktionspotentialdauer (APD) sowie zum Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration, was wiederum das Auftreten von Nachdepolarisationen begünstigt (s. Kapitel 1.3.2). Klinisch präsentieren sich diese Patienten mit der namensgebenden QT-Zeit-Verlängerung und einem erhöhten Risiko für die Entstehung von polymorphen ventrikulären Tachykardien wie der Torsade-de-Pointes-Tachykardie. Darüber hinaus gibt es jedoch ein breites Spektrum an weiteren klinischen Phänotypen als Folge von SCN5A-Mutationen, die weder einen klaren $Na_v1.5$ -Funktionsverlust zeigen noch eine reine Aktivitätssteigerung des Kanals. Bei diesen Formen handelt es sich vielmehr um Mischbilder, die durch Störungen der Erregungsleitung und gleichzeitig einem Anstieg an getriggelter elektrischer Aktivität gekennzeichnet sind (112).

Störungen der Natriumstrom-Homöostase im Rahmen der Herzinsuffizienz

Auch für die Arrhythmogenese bei Patienten mit Herzinsuffizienz spielt der spannungsgesteuerte Natriumstrom eine entscheidende Rolle. Von besonderem Interesse ist der späte Natriumstrom, der bei diesen Patienten aufgrund einer pathologisch gesteigerten Aktivität der Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) vergrößert ist (105, 113, 114). Der CaMKII, einer Serin/Threonin-Kinase, kommt durch die Phosphorylierung wichtiger kardialer Proteine wie dem Ryanodinrezeptor, Phospholamban sowie L-Typ-Kalziumkanälen eine bedeutende Rolle für die Regulation der elektromechanischen Kopplung zu (115). Darüber hinaus interagiert sie über eine Phosphorylierungsstelle an der α -Untereinheit aber auch mit dem $\text{Na}_v1.5$ (116). Bei erhöhter CaMKII-Expression im Rahmen der Herzinsuffizienz kommt es zu Veränderungen im Öffnungsverhalten des Natriumkanals mit Linksverschiebung der Steady-State-Inaktivierung, verstärkter intermediärer Inaktivierung sowie verzögerter Erholung nach Inaktivierung (116). Dies führt zu einem deutlich vergrößerten späten Natriumstrom ($I_{\text{Na,L}}$) mit Verlängerung der Repolarisationsphase und proarrhythmogenem Potential (116). Bereits eine kleine Steigerung des $I_{\text{Na,L}}$ kann die intrazelluläre Natriumkonzentration deutlich erhöhen und dadurch zur NCX-vermittelten intrazellulären Kalzium-Überladung führen (117). Ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ begünstigt über oben genannten Mechanismus die Entstehung von DADs, während die lange APD gleichzeitig das Risiko für EADs erhöht (118–120). Insgesamt ist bei vergrößertem persistierenden Natriumstrom also das Risiko für das Auftreten spontaner Nachdepolarisationen deutlich erhöht, was zur Destabilisierung des Membranpotentials führt. Dem $I_{\text{Na,L}}$ kommt somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung kardialer Arrhythmien zu, auch wenn sein genauer Beitrag zur Entstehung von Herzrhythmusstörungen aktuell noch diskutiert wird (67, 102–104).

1.4 Molekulare Grundlagen der Glanzstreifenarchitektur

Für eine reibungslose Erregungsweiterleitung sowie eine physiologisch ablaufende Kontraktion des Herzmuskels sind besondere Zell-Zell-Kontakte nötig, welche die enge Zusammenarbeit der Herzmuskelzellen als funktionelle Einheit ermöglichen. Diese speziellen End-zu-End-Zellkontakte zwischen benachbarten Herzmuskelzellen werden als Glanzstreifen oder *Disci intercalares* bezeichnet. Sie dienen zum einen

der mechanischen Verbindung benachbarter Zellen, zum anderen spielen sie eine wichtige Rolle für die Signaltransduktion und Erregungsausbreitung. Nach der klassischen (und inzwischen veralteten) Definition setzen sich die Glanzstreifen aus drei separaten Hauptbestandteilen zusammen: Auf der einen Seite aus den Gap Junctions, die für die elektrochemische Kommunikation zwischen den Zellen sorgen, auf der anderen aus den Desmosomen sowie den *Fasciae adhaerentes*, die eine mechanische Verbindung der Zellen herstellen (121). Darüber hinaus sind an den Glanzstreifen noch viele weitere wichtige Proteine lokalisiert, wie z.B. Ionenkanäle (70, 122) oder multifunktionale Ankerproteine (123). Eine schematische Darstellung der molekularen Glanzstreifen-Architektur zeigt Abb. 2.

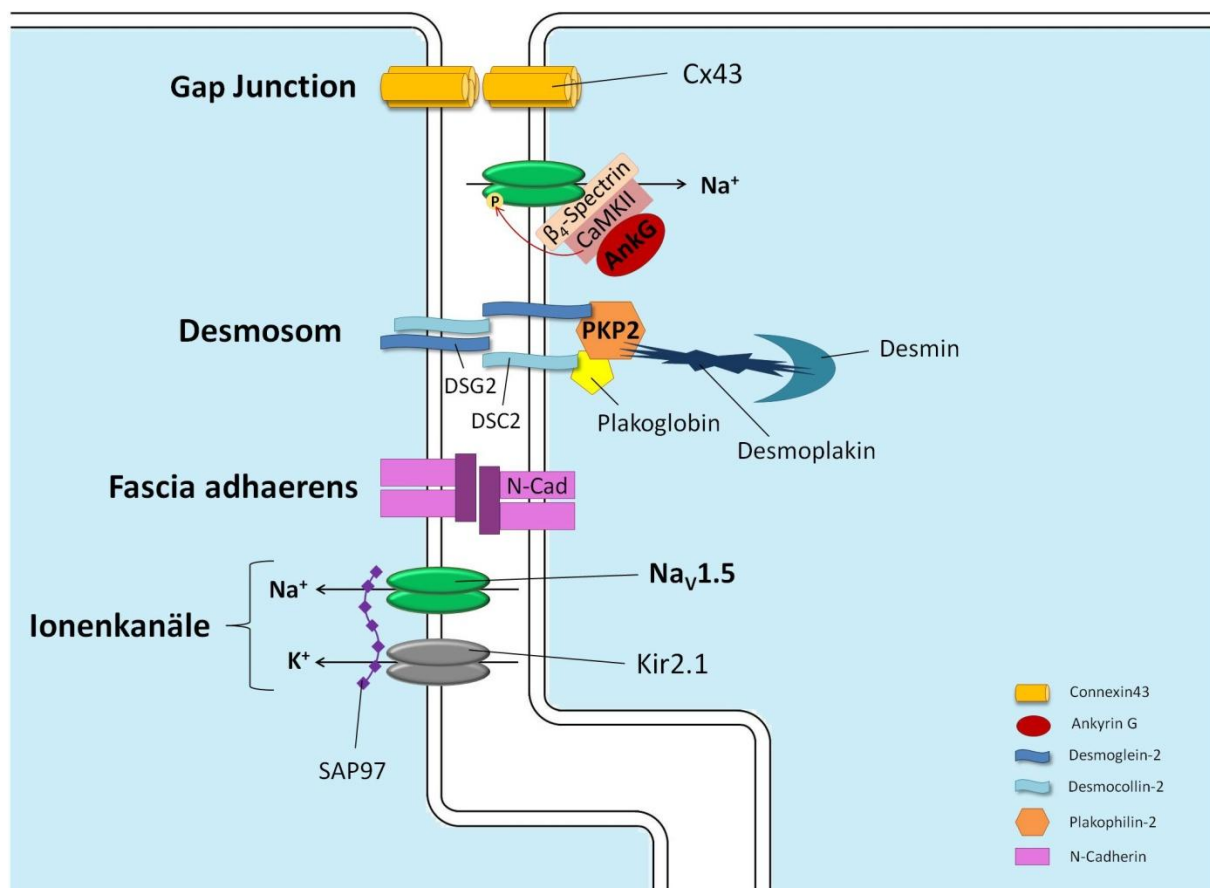


Abb. 2 Schematische Darstellung der molekularen Glanzstreifen-Architektur zwischen zwei benachbarten Kardiomyozyten. Als Glanzstreifen werden die speziellen End-zu-End-Zellkontakte von Herzmuskelzellen mit ihren charakteristischen Komponenten bezeichnet. Gap Junctions dienen vor allem der elektrochemischen Kommunikation zwischen angrenzenden Kardiomyozyten; Desmosomen und *Fasciae adhaerentes*, die innerhalb der *Area composita* organisiert sind, dienen der mechanischen Zell-Zell-Verbindung. Neben diesen klassischen Glanzstreifen-Komponenten finden sich auch Ionenkanäle, darunter Na_v1.5, bevorzugt an den Glanzstreifen.

Inzwischen geht man davon aus, dass die einzelnen Glanzstreifen-Komponenten eine funktionelle Einheit darstellen und sich in einem engen Zusammenspiel gegenseitig in ihrer Funktion und Lokalisation beeinflussen (124–126). Zunächst sollen jetzt die einzelnen Bestandteile der *Disci intercalares* kurz vorgestellt werden.

Im Hinblick auf die pathophysiologischen Mechanismen der ARVC werden anschließend komplexere Zusammenhänge dieser teilweise als eigenständige „Organelle“ (124) bezeichneten Struktur näher beleuchtet (s. Kap. 1.5.2). Ein besonderer Fokus soll dabei auf der Rolle von Plakophilin-2 innerhalb dieses Zusammenspiels und vor allem dessen Einfluss auf den ebenfalls bevorzugt an den Glanzstreifen lokalisierten spannungsabhängigen Natriumkanal $\text{Na}_v1.5$ liegen.

1.4.1 Elektrochemische Zell-Zell-Kommunikation: Gap Junctions (Nexus)

Die auch als Nexus bezeichneten Gap Junctions sind aus Membranproteinen geformte Kanäle zur Überbrückung des ca. 63 nm breiten Interzellulärspaces. Über die 2,8 nm großen Poren ist ein Austausch von Ionen und kleineren Molekülen bis zu 1 kDa zwischen benachbarten Zellen möglich (127). Eine Gap Junction setzt sich aus zwei hexameren Hemikanälen zusammen, den sog. Connexonen, die jeweils aus sechs Connexinen aufgebaut sind. Von diesen Membranproteinen sind bisher 21 gewebsspezifische Typen bekannt (127); Connexin43 (Cx43) ist dabei die am häufigsten im Herzen vorkommende Isoform (128). Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass Cx43 jedoch nicht nur als Bestandteil von Gap Junctions vorkommt, sondern auch außerhalb der Nexus zu finden ist, wo es womöglich eine Rolle für die Kommunikation mit anderen Glanzstreifen-Molekülen spielt (129, 130).

Gap Junctions sind im Arbeitsmyokard hauptsächlich an den Glanzstreifen lokalisiert (127), wo sie eine Vielzahl an physiologischen Funktionen erfüllen. Sie sind unter anderem verantwortlich für die elektrische Kopplung benachbarter Zellen, da über sie (hauptsächlich) die Weiterleitung von Aktionspotentialen erfolgt. Durch die entstehende funktionelle Aufhebung der Zell-Zell-Grenzen ist eine Synchronisation der kontraktilen Aktivität angrenzender Kardiomyozyten möglich, sodass die Herzmuskelzellen letztendlich als funktionelles Synzytium fungieren (127, 131). Eine veränderte Connexin-Expression mit Störung der Gap-Junction-Struktur ist mit verschiedenen kardialen Krankheitsbildern assoziiert (132–134). Die damit verbundene verzögerte Reizweiterleitung wird mit für die Entstehung von (Reentrant-)Arrhythmien bis hin zum plötzlichen Herztod verantwortlich gemacht (37, 135). Eine intakte Gap-Junction-Funktion ist demnach Voraussetzung für eine physiologische Signaltransduktion, Erregungsausbreitung und Synchronisation benachbarter Herzmuskelzellen.

1.4.2 Mechanische Zell-Zell-Verbindungen: Desmosomen und Fasciae adhaerentes

Zur mechanischen Verbindung benachbarter Kardiomyozyten bilden **Fasciae adhaerentes** einen geschlossenen gürtelförmigen Zellkontakt zwischen den Zellen. Liegen sie punktförmig vor, werden sie als fokale Kontakte bezeichnet. Die kardialen *Fasciae adhaerentes* sind aus N-Cadherin-Homodimeren aufgebaut, die einen extrazellulären Anteil zur Verbindung mit der benachbarten Zelle und eine intrazelluläre Domäne zur Verbindung mit dem eigenen Aktin-Zytoskelett besitzen. Über ihre Funktion der mechanischen Zell-Zell-Verbindung hinaus spielen die *Fasciae adhaerentes* auch eine wichtige Rolle in der Mechanotransduktion, also der Wahrnehmung von zytoskelettalen Spannungskräften und deren Umsetzung in Veränderungen der Zellmorphologie (136, 137).

Neben den *Fasciae adhaerentes* sind auch **Desmosomen** zuständig für den mechanischen Zusammenhalt benachbarter Zellen. Sie stellen eine Verbindung her zwischen dem jeweils eigenen Zytoskelett und dem der angrenzenden Zelle. Im interzellulären Spalt binden die Brückenproteine Desmoglein-2 und Desmocollin-2 zweier benachbarter Herzmuskelzellen aneinander. Diese Transmembranproteine, die zur Familie der Cadherine gehören, sind durch sog. Plaques an der Innenseite der Plasmamembran verankert. Die Plaque-Proteine Plakoglobin und Plakophilin-2, Mitglieder der Armadillo-Familie, sind wiederum mit Desmoplakin assoziiert, das letztendlich über den C-Terminus die Verbindung zu den Desmin-Filamenten des Zytoskeletts herstellt. Plakophiline sind aus zehn sich wiederholenden DNA-Sequenzen aus jeweils 42 Aminosäuren aufgebaut und finden sich neben ihrer Lokalisation als Bestandteil der Desmosomen auch im Zellkern, wo ihre regulatorische Funktion im Rahmen der Transkription diskutiert wird (138).

Desmosomen finden sich in Geweben, die besonderem mechanischem Stress ausgesetzt sind, darunter Epithelzellen der Haut und Herzmuskelzellen (139, 140). Störungen der desmosomalen Integrität durch Mutationen in einem der beteiligten Proteine finden sich beispielsweise bei blasenbildenden Hauterkrankungen wie dem Pemphigus vulgaris (141). Ob die dadurch gestörten mechanischen Zell-Zell-Verbindungen eine direkte Folge der desmosomalen Dysfunktion sind oder ob die Veränderung weiterer Signaltransduktionswege ursächlich ist, ist noch nicht abschließend geklärt (139). Desmosomen bzw. deren Bestandteile sind nämlich neben ihrer Funktion als mechanische Verbindung angrenzender Zellen auch an

einer Vielzahl an Interaktionen mit benachbarten Glanzstreifen-Proteinen beteiligt (s. Kap. 1.5.2).

Die strikte Trennung der mechanischen Zell-Zell-Verbindungen in *Fasciae adhaerentes* und Desmosomen ist in adulten humanen Kardiomyozyten nicht möglich. Im Laufe der embryonalen Herzentwicklung vereinigen sich diese beiden Glanzstreifen-Komponenten zu einer gemeinsamen Struktur, die gleichzeitig eine Verbindung zum Aktin- wie auch zum Desmin-Zytoskelett darstellt: der *Area composita* (142, 143). Die Glanzstreifen bestehen zu über 90 % aus Bereichen der *Area composita*, dazwischen finden sich Gap Junctions, einzelne separate Desmosomen sowie kleine Abschnitte ohne Zell-Zell-Verbindung (143).

1.5 Pathophysiologische Mechanismen der ARVC

1.5.1 Genetische Grundlagen der ARVC

Obwohl die Erkrankung bereits 1736 erstmals in der Literatur beschrieben wurde (144), waren die der ARVC zugrundeliegenden Pathomechanismen lange unbekannt. Bis vor wenigen Jahrzehnten ging man von einer kongenitalen Entwicklungsstörung des rechten Ventrikels aus, weshalb die Erkrankung auch lange als Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Dysplasie (ARVD) bezeichnet wurde (32, 145, 146). Den entscheidenden Durchbruch erbrachten Untersuchungen an Patienten, die an autosomal-rezessiv vererbten kardiokutanen Syndromen wie dem Naxos- oder Carvajal-Syndrom litten. Im Jahr 2000 wurde die ursächliche Mutation der Naxos-Krankheit identifiziert: eine homozygote Basenpaardeletion im *JUP2*-Gen, welches für das desmosomale Protein Plakoglobin kodiert (147, 148). Zur Symptomtrias dieser Erkrankung zählen neben wollenem Haar und palmoplantarer Keratose auch Merkmale der ARVC. Diese Entdeckung war ein erster Hinweis darauf, dass es sich bei der ARVC um eine genetisch determinierte Erkrankung der Desmosomen handeln könnte. Etwa zur gleichen Zeit wurde dann auch die erste mit der autosomal-dominant vererbten Hauptform der ARVC assoziierte Mutation identifiziert: In einer großen norditalienischen Familie zeigte sich ein gehäuftes Auftreten einer Mutation im Desmoplakin-Gen (*DSP*), also erneut in einem desmosomalen Bestandteil (149, 150). Mittlerweile sind 12 mit der ARVC assoziierte Gene identifiziert worden (151). Davon stellen die Gene, welche für die desmosomalen Proteine Plakophilin-2 (*PKP2*), Desmoplakin (*DSP*), Desmocollin-2 (*DSC2*),

Desmoglein-2 (*DSG2*) und Plakoglobin (*JUP*) kodieren, mit insgesamt 50 – 70% die größte Gruppe dar (152). Hinzu kommen Mutationen in Genen für den Ryanodinrezeptor 2 (*RyR2*), den Wachstumsfaktor TGFβ3 (*TGFβ3*), das Transmembranprotein TMEM43 (*TMEM43*), Desmin (*DES*), Titin (*TTN*), Lamin A/C (*LMNA*) sowie Phospholamban (*PLN*) (26, 27). Die zunehmende Identifikation nicht-desmosomaler Proteine, die mit der ARVC assoziiert sind, führte zur aktuell vertretenen Annahme, dass bei der Erkrankung allgemein eine Störung der Glanzstreifen-Architektur, also nicht nur der Desmosomen, zugrundeliegt (124). Anhand der unterschiedlichen Mutationen, die zur Manifestation der ARVC führen, lässt sich die Erkrankung in 12 Typen unterteilen. Typ 9, welcher durch über 25 verschiedene Mutationen (vor allem Basenpaardeletionen) im *PKP2*-Gen gekennzeichnet ist (27), stellt mit bis zu 43% die häufigste Form dar (153). Darüber hinaus machen *PKP2*-Mutationen auch die deutliche Mehrheit der Gendefekte bei familiär gehäuften Auftreten der ARVC aus (154). Diese Patienten zeigen im Durchschnitt circa zehn Jahre früher erste Symptome der Erkrankung, außerdem treten bei ihnen deutlich früher Rhythmusereignisse auf als bei ARVC-Patienten ohne *PKP2*-Mutation (11).

1.5.2 Molekulare Mechanismen der Arrhythmogenese: Stand der Forschung

Die der Arrhythmogenese zugrundeliegenden Mechanismen sind bis heute nicht abschließend erklärt. Als eine Ursache für die Entstehung von Arrhythmien bei ARVC-Patienten wurden zunächst die bereits erwähnten strukturellen Veränderungen im Bereich des rechten bzw. oft auch linken Ventrikels diskutiert. Die fettig-fibrotischen Umbauzonen des Ventrikelmuskels stellen anatomische Hindernisse und somit Prädispositionsstellen für das Auftreten von kreisenden Erregungen dar (23, 155–157). Da es bei einem nicht unerheblichen Teil der Patienten jedoch schon vor dem Auftreten struktureller Veränderungen zur Entwicklung schwerer Herzrhythmusstörungen bis hin zum plötzlichen Herztod kommt (8), müssen noch andere Pathomechanismen eine Rolle spielen. Aus diesem Grund hat sich der wissenschaftliche Fokus in den vergangenen Jahren zunehmend auf molekulare Mechanismen gerichtet. Mit stetig wachsendem Verständnis der hochkomplexen Glanzstreifenarchitektur sind verschiedene Protein-Interaktionen in den Vordergrund getreten, die an der Störung des elektrophysiologischen Gleichgewichts und somit an der Arrhythmogenese beteiligt sein könnten. Für das bevorzugt an den Glanzstreifen vorkommende Armadillo-Protein Plakophilin-2 sind

zahlreiche Wechselwirkungen mit benachbarten Strukturen beschrieben (125, 158). Über welche Mechanismen eine Mutation im *PKP2*-Gen jedoch genau zur Arrhythmie-Entstehung bei ARVC-Patienten beiträgt, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Die bisher bekannten pathophysiologischen Zusammenhänge sollen im Folgenden näher beleuchtet werden.

Gap-Junction-Remodeling durch PKP2-Defizit

Bei ARVC-Patienten mit Mutationen in desmosomalen Proteinen wurden verminderte Expressionslevel an Connexinen, den Bestandteilen der Gap Junctions, beobachtet (134, 159). Zwischen den beiden ursprünglich separat betrachteten Zell-Zell-Kontakten Desmosomen und Gap Junctions ist inzwischen ein enges Zusammenspiel bekannt. Die beiden Strukturen sind gemeinsam an den Glanzstreifen lokalisiert (160) und beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Verteilung. Eine verminderte Expression desmosomaler Bestandteile führt sowohl zu einer reduzierten Zahl an Gap Junctions insgesamt als auch zu Veränderungen in deren Lokalisation (134, 159, 161, 162). Es konnte zudem gezeigt werden, dass sich das desmosomale Plaque-Protein PKP2 in einem gemeinsamen makromolekularen Komplex mit (nicht in Gap Junctions organisiertem) Connexin 43 befindet und dessen Expression bzw. Lokalisation moduliert (161–163). Eine verminderte PKP2-Expression führt demnach nicht nur zum Gap-Junction-Remodeling, sondern auch zu einer insgesamt verminderten Connexin-Expression und zu dessen Umverteilung von den Glanzstreifen ins Zytoplasma (159, 162). Aufgrund dieser engen räumlichen und funktionellen Beziehung der beiden Komponenten wird dieser Proteinkomplex auch als „Connexom“ bezeichnet (126, 164). Cx43 interagiert darüber hinaus auch mit benachbarten Ionenkanälen wie dem Kaliumkanal Kir2.1 (165, 166) und dem spannungsabhängigen Natriumkanal Na_v1.5 (130, 167). Bei einem Cx43-Verlust wurden signifikant niedrigere Natriumspitzenströme beobachtet, außerdem kam es zur verminderten Lokalisation des Na_v1.5 an den Glanzstreifen (125, 168, 169). Es wäre also denkbar, dass eine Mutation im *PKP2*-Gen mit verminderter PKP2-Expression über ein verändertes Connexin-Muster zu Störungen der interzellulären Erregungsweiterleitung und elektrischer Instabilität führt. Diese PKP2-abhängigen Veränderungen in den Gap Junctions könnten ein wichtiger Baustein der Arrhythmogenese bei ARVC-Patienten sein.

Einfluss von PKP2 auf den spannungsabhängigen Natriumkanal Na_v1.5

Wie bereits in Kap. 1.4 beschrieben, finden sich an den kardialen Glanzstreifen auch Ionenkanäle, deren Rolle in der Arrhythmogenese der ARVC zunehmend diskutiert wird. Mit fortschreitender Identifikation der Interaktionen von PKP2 mit seinen benachbarten Strukturen ist sein Zusammenhang mit dem bevorzugt an den Glanzstreifen vorkommenden spannungsabhängigen Natriumkanal Na_v1.5 ins wissenschaftliche Interesse gerückt. PKP2 scheint einen direkten Einfluss auf die Expression, Lokalisation und Funktion des Na_v1.5 zu haben. Entscheidende Ergebnisse kamen aus dem Labor unter Prof. Mario Delmar, *NYU School of Medicine*. Die Arbeitsgruppe hat zum ersten Mal eine Koloalisation von PKP2 und Na_v1.5 an den Glanzstreifen beschrieben (125, 170). Außerdem konnte ein direkter funktioneller Zusammenhang zwischen der Expression von PKP2 und der Aktivität des spannungsabhängigen Natriumkanals gezeigt werden. In Ratten-Ventrikelkardiomyozyten zeigte sich nach *PKP2*-Knockdown eine Verringerung des Spitzennatriumstroms. Des Weiteren kam es zu Veränderungen im Öffnungsverhalten des Na_v1.5 mit Linksverschiebung der Steady-State-Inaktivierung sowie verzögerter Erholung nach Inaktivierung. Als mögliche Folge dessen wurden eine Verlangsamung der interzellulären Erregungsausbreitung, ein frequenzabhängiges Versagen der Aktivierung sowie vermehrt arrhythmogenes Verhalten beobachtet (170). In heterozygoten *PKP2*^{+/-}-Mäusen konnte die reduzierte Natriumstromdichte bestätigt werden, jedoch ohne nachweisbare Veränderungen in der Lokalisation des Na_v1.5 (171). Einen starken Hinweis auf den direkten kausalen Zusammenhang zwischen der Expression von PKP2 und der Funktion des spannungsabhängigen Natriumkanals lieferte eine Folgearbeit derselben Arbeitsgruppe: In Kardiomyozyten aus HL1-KD-Mäusen bzw. induzierten pluripotenten Stammzellen eines ARVC-Patienten mit Mutation im *PKP2*-Gen wurde eine verringerte Natriumstromdichte an den Glanzstreifen gemessen, die nach Austausch der Mutation mit Wildtyp-*PKP2* wieder korrigiert werden konnte (172). Diese Ergebnisse weisen auf ein enges Zusammenspiel zwischen PKP2 und Na_v1.5 hin und führten zur Hypothese, dass PKP2-bedingte Veränderungen im spannungsabhängigen Natriumstrom eine wichtige Rolle in der Arrhythmogenese von ARVC-Patienten spielen könnten (170, 173). Über welche Mechanismen Plakophilin-2 den spannungsabhängigen Natriumkanal genau beeinflusst, ist jedoch noch nicht endgültig geklärt.

Rolle von Ankyrin G als „Organisationszentrum“ der Glanzstreifen-Architektur

Eine Rolle in dieser Kausalkette spielt möglicherweise das multifunktionale Regulatorprotein Ankyrin G (AnkG), welches als eine Art „Organisationszentrum“ der Glanzstreifen-Architektur verstanden wird und unter anderem dafür zuständig ist, die Verankerung wichtiger Glanzstreifenproteine an der Plasmamembran zu regulieren (123, 174). Seine ursprünglich zugeschriebene Funktion als reines Ankerprotein ist mittlerweile überholt: Zum einen ist eine korrekte Lokalisation und Funktion von AnkG notwendig für eine intakte mechanische Zell-Zell-Verbindung (125). Zum anderen interagiert AnkG mit zahlreichen benachbarten Proteinen, darunter auch PKP2. Ein Verlust von PKP2 führt zur verminderten Expression von AnkG, umgekehrt hat ein AnkG-Verlust die fehlerhafte Lokalisation von PKP2 zur Folge (125). Des Weiteren verursacht eine reduzierte AnkG-Expression, ähnlich wie ein Verlust von PKP2, eine verringerte Cx43-Expression und daraus folgend eine reduzierte elektrische Kommunikation zwischen benachbarten Kardiomyozyten (125). Außerdem reguliert AnkG, wie bereits im Kapitel 1.2.3 besprochen, die korrekte Lokalisation und Funktion des spannungsabhängigen Natriumkanals (71, 79); ein AnkG-Verlust führt in der Folge zur reduzierten $\text{Na}_v1.5$ -Expression, einem verminderten Spitzennatriumstrom sowie zu einer verlangsamten Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials (79, 125, 175). Denkbar wäre also auf der einen Seite, dass eine Mutation im *PKP2*-Gen über den Mechanismus einer verringerten AnkG-Expression zu Veränderungen in der Lokalisation und Funktion des spannungsabhängigen Natriumkanals $\text{Na}_v1.5$ führt. Auf der anderen Seite kommt auch eine direkte Interaktion zwischen PKP2 und $\text{Na}_v1.5$ in Frage.

Glanzstreifen als „funktionelle Organelle“

Insgesamt führen all diese Erkenntnisse zu dem Schluss, dass man die einzelnen kardialen Glanzstreifen-Proteine nicht mehr isoliert voneinander betrachten kann. Stattdessen muss man davon ausgehen, dass die Glanzstreifenarchitektur ein komplexes Konstrukt ist und ein feines Zusammenspiel der einzelnen Glanzstreifen-Proteine notwendig ist für eine funktionierende Zell-Zell-Kommunikation (124, 125, 170, 175). Veränderungen in der Expression eines oder mehrerer Glanzstreifenproteine können das Gleichgewicht dieses zusammenhängenden Proteinnetzwerkes ins Wanken bringen und schwerwiegende Folgen für die Elektrophysiologie der Herzmuskelzelle mit sich bringen.

Mutationen im desmosomalen Plaque-Protein Plakophilin-2 führen zu vielfältigen Störungen der allgemeinen Glanzstreifenstruktur. Neben einer Dysfunktion der Desmosomen, also der mechanischen Zell-Zell-Verbindungen, kommt es zum Gap-Junction-Remodeling mit möglicher elektrischer Instabilität. Darüber hinaus scheint ein direkter Zusammenhang zwischen PKP2 und dem spannungsabhängigen Natriumkanal $\text{Na}_v1.5$ zu bestehen: Für Mutationen im *PKP2*-Gen sind eine Verringerung des Spitzennatriumstroms sowie Veränderungen im Öffnungsverhalten des $\text{Na}_v1.5$ beschrieben. Welche genauen Auswirkungen eine *Loss-of-Function*-Mutation im *PKP2*-Gen auf die Eigenschaften des Natriumkanals und auf die damit verbundene Kinetik des kardialen Aktionspotentials hat, soll in der vorliegenden Arbeit weiter konkretisiert werden.

1.6 Fragestellungen und Zielsetzungen

Die ARVC stellt weiterhin eine häufige Ursache für den plötzlichen Herztod bei jungen, sportlichen Patienten dar. Als Voraussetzung für eine Weiterentwicklung der bisher noch eingeschränkten diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten ist ein gesteigertes Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung nötig. Insbesondere die Mechanismen für die Entstehung der lebensbedrohlichen Arrhythmien, die häufig schon vor dem Auftreten struktureller Veränderungen entstehen, sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Mutationen im *PKP2*-Gen stellen den Großteil der mit der ARVC assoziierten Mutationen dar. Auf welche Weise *PKP2*-Mutationen jedoch das elektrophysiologische Gleichgewicht von Herzmuskelzellen beeinflussen, ist noch nicht abschließend geklärt.

In der vorliegenden Forschungsarbeit sollten die Auswirkungen der erstmals in der Literatur beschriebenen *Loss-of-function*-Mutation *c.1664delT* im *PKP2*-Gen, die in einer Patientin mit überlebtem plötzlichen Herztod gefunden wurde, auf das elektrophysiologische Verhalten von Kardiomyozyten untersucht werden. Die 20-jährige Patientin mit diagnostisch gesicherter ARVC stammt aus einer großen „ARVC-Familie“ mit hereditärer *PKP2*-Mutation. Die betroffenen Familienmitglieder weisen unterschiedlich ausgeprägte klinische Merkmale auf, von vollkommener Symptombefreiheit über EKG- und/oder echokardiographische Veränderungen bis hin zu rezidivierenden Synkopen und ventrikulären Tachykardien.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die elektrophysiologischen Auswirkungen der genannten *PKP2*-Mutation auf Einzelzellebene untersucht werden. Dafür wurden funktionelle Experimente an Herzmuskelzellen zweier Mutationsträgerinnen – der o.g. ARVC-Patientin sowie ihrer etwa gleichaltrigen, bisher klinisch asymptomatischen Schwester – durchgeführt und mit Zellen einer gesunden Probandin verglichen. Der direkte Vergleich von klinisch kranker und bisher asymptomatischer Mutationsträgerin war von besonderem Interesse, da die Risikostratifizierung von Trägern einer mit der ARVC assoziierten Mutation nach wie vor eines der Hauptprobleme im klinischen Management der Erkrankung darstellt.

Als Zellmaterial dienten Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC-CMs); hierfür wurden patienteneigene mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut isoliert, zu pluripotenten Stammzellen reprogrammiert und anschließend zu Herzmuskelzellen ausdifferenziert¹. Vor Beginn der funktionellen Experimente musste zunächst die Kultur von induzierten pluripotenten Stammzellen sowie deren Differenzierung zu Kardiomyozyten erlernt und etabliert werden. Im Anschluss an die vierwöchige Differenzierung wurde außerdem eine Reifungszeit von drei Monaten eingehalten, bevor mit den Messungen an den hiPSC-CMs begonnen werden konnte.

1.6.1 Einfluss von PKP2 auf die Expression relevanter Glanzstreifen-Proteine

Mutationen im *PKP2*-Gen gehen in der Regel mit Veränderungen in der Expression von Plakophilin-2 einher. Außerdem scheint PKP2 über zahlreiche Interaktionen die Expression bzw. Lokalisation benachbarter Glanzstreifenproteine zu beeinflussen (124, 134, 176). Im Zusammenhang mit PKP2-bedingten Veränderungen im spannungsabhängigen Natriumstrom sind die assoziierten Proteine Ankyrin G und Na_v1.5 von besonderer Relevanz (125, 170, 175). Aus diesem Grund sollten mittels Immunofluoreszenzfärbungen an hiPSC-CMs folgende Fragen beantwortet werden:

- Welche Auswirkungen hat die o.g. Mutation im *PKP2*-Gen auf die Expression der miteinander assoziierten Glanzstreifen-Proteine PKP2, AnkG und Na_v1.5?
- Welche Hinweise ergeben sich daraus auf mögliche Mechanismen der Arrhythmogenese?

¹ Eine genauere Einführung in die Methode liefert Kap. 2.2.

1.6.2 Auswirkungen der PKP2-Mutation auf das kardiale Aktionspotential

Um den Ursachen der Arrhythmie-Entstehung weiter auf den Grund zu gehen, wurde mittels *Whole-Cell-Patch-Clamp-Technik* die Morphologie des kardialen Aktionspotentials näher untersucht. Dabei wurden mit verschiedenen Frequenzen stimulierte Aktionspotentiale ventrikulärer hiPSC-induzierter Kardiomyozyten im Hinblick auf folgende Fragestellungen untersucht:

- Welche Auswirkungen hat die o.g. Mutation auf die Aktionspotential-Parameter Aufstrichgeschwindigkeit, Amplitude, AP-Dauer sowie auf das Ruhemembranpotential?
- Stehen die gefundenen Veränderungen in Zusammenhang mit den Veränderungen des spannungsgesteuerten Natriumstroms?

1.6.3 Zusammenhang zwischen PKP2 und dem spannungsabhängigen Natriumstrom

Als möglicher Mechanismus für die Entstehung von Arrhythmien bei ARVC-Patienten wird eine gestörte Funktion des spannungsabhängigen Natriumkanals $Na_v1.5$ diskutiert (173). $Na_v1.5$ befindet sich in einem gemeinsamen makromolekularen Komplex mit PKP2 und wird in seiner Expression und Funktion von diesem beeinflusst. In Tiermodellen sowie vereinzelt in Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen wurde ein verringerter Spitzennatriumstrom als Folge von *PKP2*-Mutationen beschrieben (170–172). Eine detaillierte Untersuchung des Öffnungsverhaltens des spannungsabhängigen Natriumkanals sowie des späten Natriumstroms an hiPSC-CMs hat bisher jedoch noch nicht stattgefunden. Mittels Patch Clamp sollten neben Spitzennatriumstrom ($I_{Na,max}$) und spätem Natriumstrom ($I_{Na,L}$) die Parameter Steady-State-Aktivierung bzw. -Inaktivierung, Erholung nach Inaktivierung sowie intermediäre Inaktivierung untersucht werden. Folgende Fragen sollten dabei geklärt werden:

- Kann die bereits beschriebene Verringerung des Natriumspitzenstroms auch als Folge der hier untersuchten *PKP2*-Mutation in Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen beobachtet werden?
- Welche Veränderungen ergeben sich in Bezug auf die Kinetik des spannungsgesteuerten Natriumstroms?

- Welche Rolle spielt der späte Natriumstrom ($I_{Na,L}$) in der Arrhythmogenese bei ARVC-Patienten?

1.6.4 Vergleich einer ARVC-Patientin mit einer asymptomatischen Mutationsträgerin

Die Risikostratifizierung von Trägern einer mit der ARVC assoziierten Mutation stellt weiterhin ein großes klinisches Problem dar. Aufgrund der heterogenen Ausprägung des klinischen Phänotyps ist eine Prognose über den Krankheitsverlauf schwierig. Hinzu kommt, dass viele Mutationsträger nie Symptome entwickeln – aber mit der Ungewissheit leben müssen, nicht doch eines Tages ein schweres Rhythmusereignis zu erleiden. Von großem Interesse wäre daher ein besseres Verständnis über die pathophysiologischen bzw. kompensatorischen Mechanismen, die dazu führen, dass ein Mutationsträger schließlich an der ARVC erkrankt oder lebenslang asymptomatisch bleibt. Dazu soll die vorliegende Arbeit einen entscheidenden Beitrag leisten, indem sie die soeben genannten Auswirkungen einer *Loss-of-Function*-Mutation im *PKP2*-Gen zwischen einer Patientin mit der klinischen Diagnose ARVC und ihrer asymptomatischen Schwester, Trägerin der gleichen Mutation, untersucht. Dabei sind folgende Fragen von Interesse:

- Gibt es Unterschiede auf zellulärer Ebene, die mit den abweichenden klinischen Verläufen korrelieren?
- Welche Aussagen ergeben sich dadurch für die Prognose und Risikostratifizierung von ARVC-Patienten?

Material und Methoden

2.1 Patientenrekrutierung und klinische Patientendaten

Im klinischen Alltag konnte eine 20-jährige Patientin mit der Diagnose ARVC, Typ 9, identifiziert werden. Nach einem Kreislaufstillstand während intensiver sportlicher Betätigung (Kickbox-Training) und erfolgreicher Reanimation wurde diese Patientin eingehend klinisch untersucht. Bereits im Vorfeld litt sie an rezidivierenden Palpitationen und Präsynkopen. Im Rahmen der stationären Diagnostik fand sich ein auffälliges 12-Kanal-EKG mit T-Negativierungen in den rechtspräkordialen Ableitungen V_1 - V_3 sowie dem charakteristischen Epsilon-Potential in V_1 (s. Abb. 3.A). Echokardiographisch zeigte sich initial eine mittelgradig eingeschränkte linksventrikuläre Pumpfunktion bei paradoxer Septumbewegung und septal-apikalen Hypokinesien, welche sich im Verlauf jedoch wieder normalisierte. Außerdem wurde eine deutliche Vergrößerung des rechten Ventrikels (RVEDD 4,9 cm) mit Trabekelhypertrophie sowie vermehrter interstitieller Fibrose ohne Lipomatose festgestellt. Diese funktionell-morphologischen Veränderungen blieben auch im weiteren Verlauf bestehen und konnten im Kardio-MRT (s. Abb. 3.B) bestätigt werden. Hier fanden sich außerdem eine umschriebene aneurysmatische Aussackung im Bereich des rechtsventrikulären Ausflusstraktes sowie eine Dyskinesie der Vorderwand des rechten Ventrikels. In der Myokardbiopsie zeigten sich endomyokardial fibrotische Veränderungen.

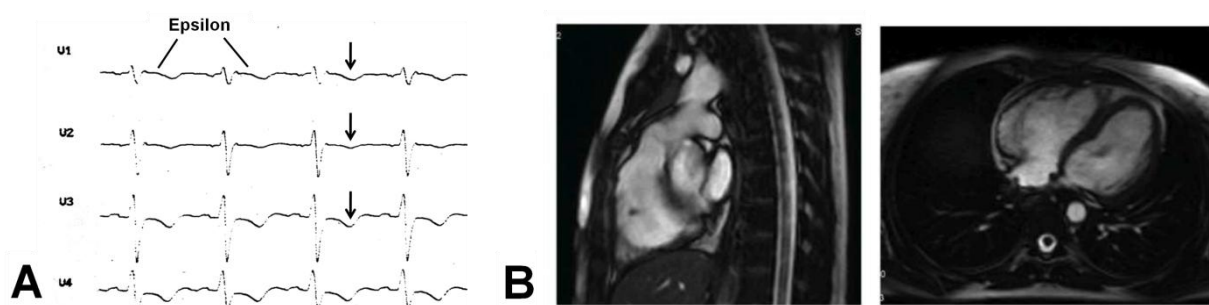


Abb. 3 Kardiologische Diagnostik der 20-jährigen ARVC-Patientin nach erfolgreicher Reanimation. **A.** Ruhe-EKG: rechtspräkordiale T-Negativierungen (Pfeile) und Epsilon-Welle. **B.** Kardio-MRT: deutliche Vergrößerung des rechten Ventrikels, aneurysmatische Veränderung des rechtsventrikulären Ausstromtraktes.

Neben diesen für die ARVC typischen klinischen Befunden konnte bei der Patientin eine erstmals in der Literatur beschriebene Basenpaardeletion im *PKP2*-Gen (c.1664delT; p.Phe555SerfsX8, Exon 7) nachgewiesen und somit die Diagnose ARVC gestellt werden. Beim genetischen Screening wurden weitere 11 von 19 untersuchten Familienmitgliedern als Träger der gleichen Mutation identifiziert. Im Stammbaum der Familie lässt sich ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster erkennen (s. Abb. 4). Während sich beim Großteil der betroffenen Verwandten (n = 10) unterschiedlich ausgeprägte strukturelle Veränderungen des rechten Ventrikels zeigten, blieb eine Mutationsträgerin bis zum heutigen Tag klinisch unauffällig (mit Stern markiert).

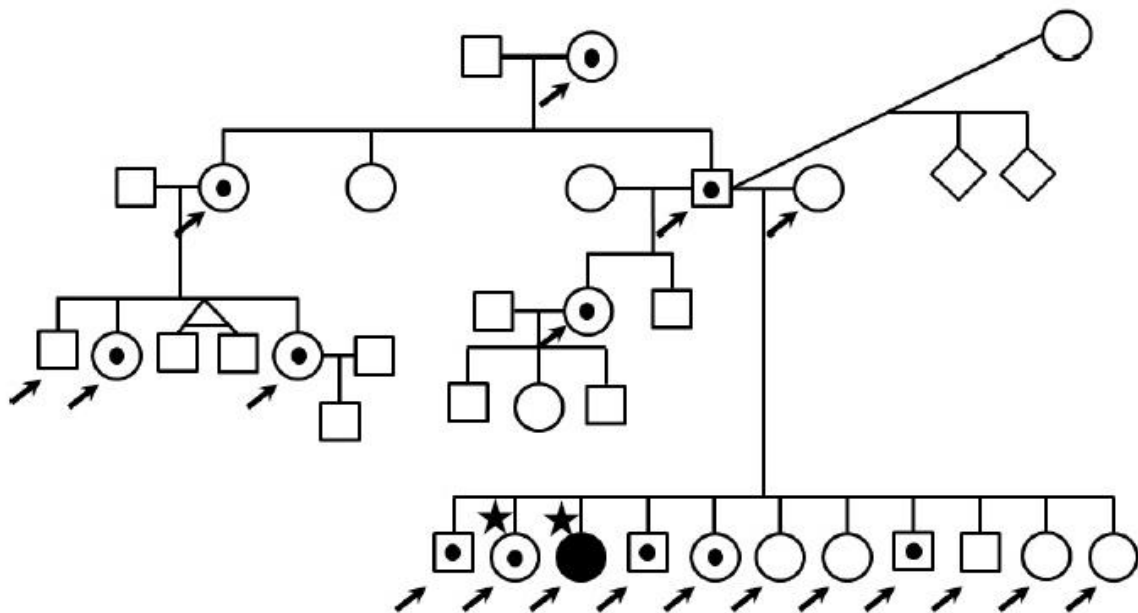


Abb. 4 Stammbaum der Familie der Indexpatientin (●). 12 von 19 getesteten (◊) Familienmitgliedern tragen die gleiche Mutation im *PKP2*-Gen (↗). Es ist ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster erkennbar. Von den mit ★ markierten Mutationsträgern wurden Blutproben für die in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Messungen entnommen (abgewandelt aus Fuerstenau-Sharp et al. (181)).

2.2 Humane induzierte pluripotente Stammzellen

2.2.1 Hintergründe und Methodik

Gerade bei Experimenten an Kardiomyozyten stellt die Materialgewinnung stets eine große Herausforderung dar. Meist werden Messungen am Tiermodell durchgeführt; hier besteht aber das Problem der eingeschränkten Übertragbarkeit auf den Menschen. Die Arbeit an patienteneigenen Herzmuskelzellen ist jedoch bei nicht-operierten Patienten, geschweige denn bei gesunden Menschen in der Regel nicht

möglich. Eine neue, vielversprechende Methode zur Erstellung von patientenspezifischen *in-vitro*-Modellen bietet deshalb die Forschung mit humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs). Die Grundlage dieser Methode ist es, ausdifferenzierte somatische Zellen, z.B. mittels retroviraler Transfektion, wieder zurück zu pluripotenten Stammzellen – den hiPSCs – zu programmieren. Diese hiPSCs können wiederum zu Zellen aller drei Keimblätter differenziert werden. Die Erstbeschreiber dieser Methode um den Nobelpreisträger Yamanaka und seinen Kollegen Takahashi veröffentlichten im Jahr 2006 ein Protokoll, das es möglich gemacht hatte, Maus-Fibroblasten mithilfe der retroviralen Vektoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC zurück zu pluripotenten Stammzellen zu programmieren (177). Im Jahr darauf erschienen dann die ersten Ergebnisse zur erfolgreichen Reprogrammierung von humanen Zellen zu hiPSCs (178, 179). Die Pluripotenz der erhaltenen Zellen konnte eindrücklich *in vivo* demonstriert werden: Bei der Injektion von hiPSCs in immunsupprimierte SCID-Mäuse kam es zur Entstehung von Teratomen, polymorphen Tumoren, die Zellen aller drei Keimblätter enthalten (179). Als Ausgangszellmaterial für die Programmierung zu hiPSCs kann eine Vielzahl an somatischen Zelltypen verwendet werden. In der Regel wird mit Zellen gearbeitet, die mit wenig Aufwand und vor allem möglichst geringem Risiko für den Patienten gewonnen werden können, so z.B. dermalen Fibroblasten (179), Zellen der Mundschleimhaut (180) oder peripheren Blutzellen (181). Die nach Reprogrammierung erhaltenen hiPSCs können dann theoretisch für unbegrenzte Dauer in Kultur gehalten oder kryokonserviert werden.

Zhang et al. gelang 2009 zum ersten Mal die Differenzierung von induzierten pluripotenten Stammzellen zu Herzmuskelzellen (hiPSC-CMs) sowie die Durchführung erster Aktionspotentialmessungen mittels Patch Clamp an den gewonnenen Kardiomyozyten (182). Inzwischen sind hiPSC-CMs ein beliebtes *in-vitro*-Modell, insbesondere zur Untersuchung monogenetischer Erkrankungen, wie z.B. dem Long-QT-Syndrom (183). Im Februar 2015 veröffentlichte unsere Arbeitsgruppe ein neues Protokoll zur Gewinnung Patienten-spezifischer hiPSC-CMs aus T-Lymphozyten (181). Außerdem konnte durch eine im Anschluss an die Differenzierung stattfindende mehrtägige metabolische Selektion, also eine Behandlung der gewonnenen Kardiomyozyten mit einem Glucose-freien Laktat-Medium, die Aufreinigung der erhaltenen Kardiomyozyten nochmals verbessert werden. Diese Methode macht sich zu Nutze, dass Herzmuskelzellen – im

Gegensatz zu anderen somatischen Zellen – komplett auf Glucose als Nährstoff verzichten und ihren Energiebedarf allein über die Verstoffwechselung von Laktat decken können. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass mit dieser Methode Kardiomyozyten-Reinheiten von >90% erreicht werden können (181). Erste funktionelle Experimente zeigten, dass die hiPSC-induzierten Kardiomyozyten auch auf hohe Stimulationsfrequenzen bis zu 3 Hz reagieren und eine physiologische Beschleunigung der Repolarisation bei steigender Frequenz zeigen. Das Ansprechen auf hohe Stimulationsfrequenzen ist insofern bedeutsam, da diese besonders geeignet sind, Störungen der Natriumkanal-Funktion, z.B. in Form eines *Conduction-Velocity*-Alternans, aufzudecken. Moreau et al. konnten nachweisen, dass sich in hiPSC-CMs eine mit adulten humanen Kardiomyozyten vergleichbare Expression von spannungsabhängigen Natriumkanälen, insbesondere $\text{Na}_v1.5$, findet und sich dieses Zellmodell somit gut zur Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften von Natriumkanälen eignet (184).

2.2.2 Kardiomyozyten aus hiPSCs als *in-vitro*-Modell für die ARVC

2012 gelang es der Arbeitsgruppe um Ma et al. zum ersten Mal, Herzmuskelzellen aus induzierten pluripotenten Stammzellen eines ARVC-Patienten herzustellen; als Ausgangsmaterial dazu dienten dermale Fibroblasten (185). Es konnte gezeigt werden, dass die gewonnenen hiPSC-CMs typische Eigenschaften der ARVC aufweisen, z.B. fibrolipomatöse Veränderungen, eine verringerte Expression desmosomaler Proteine sowie ein verändertes Connexin-Muster, und somit ein brauchbares Modell für *in-vitro*-Untersuchungen darstellen. Im selben Jahr erfolgten die ersten funktionellen Messungen an hiPSC-CMs eines Patienten mit der klinischen Diagnose ARVC und einer homozygoten *Loss-of-Function*-Mutation im *PKP2*-Gen in der Gruppe um Cerrone et al. Es zeigte sich ein reduzierter Spitzennatriumstrom in den hiPSC-CMs des ARVC-Patienten, der nach lentiviralem Austausch der Mutation durch Wildtyp-*PKP2* wieder erhöht werden konnte (172). Weitergehende Untersuchungen, insbesondere des Öffnungsverhaltens des spannungsabhängigen Natriumkanals $\text{Na}_v1.5$, haben bisher jedoch an hiPSC-CMs von ARVC-Patienten mit Mutationen im *PKP2*-Gen nicht stattgefunden.

2.2.3 Generation patientenspezifischer induzierter pluripotenter Stammzellen

Für die nachfolgenden experimentellen Arbeiten wurden Blutproben von zwei Mutationsträgerinnen gewonnen: von der initial rekrutierten ARVC-Patientin sowie von ihrer bis zum Abschluss dieser Arbeit klinisch asymptomatischen Schwester, welche die gleiche Mutation im *PKP2*-Gen trägt (beide Probandinnen sind in Abb. 4 mit Stern markiert). Als Vergleichsmaterial diente die Blutprobe einer gesunden weiblichen, kaukasischen Kontrollperson. Alle drei Spenderinnen willigten schriftlich in die Durchführung der Experimente ein. Der von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Regensburg genehmigte Ethikantrag für die Versuche dieser Arbeit liegt vor.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe um Maya Fürstenau-Sharp und Martina E. Zimmermann (181) wurden aus den genannten Blutproben periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) isoliert und für die T-Zell-Proliferation kultiviert. Anschließend konnten die gewonnenen T-Lymphozyten mittels retroviraler pMX-basierter Vektoren mit humanem OCT3/4, SOX2, KLF4 und c-MYC zu induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) reprogrammiert werden; zur Reprogrammierung wurde das ursprünglich von Takahashi et al. entwickelte Protokoll verwendet (179). Die gewonnenen hiPSCs wurden im Anschluss kryokonserviert und lieferten das Ausgangsmaterial für unsere weitere Arbeit.

2.3 Kultur der induzierten pluripotenten Stammzellen

Im Rahmen dieses Forschungsprojekts wurden die von der Vorgruppe gewonnenen hiPSCs der drei untersuchten Personen kultiviert und anschließend zu Kardiomyozyten differenziert. Die drei Zelllinien werden im nachfolgenden Text bzw. den dazugehörigen Abbildungen folgendermaßen benannt:

- Zellen der erkrankten Indexpatientin: *Index(-patientin)*
- Zellen der gesunden Mutationsträgerin: *Schwester*
- Zellen der gesunden Kontrollperson: *Kontrolle*

Zunächst wurden die kryokonservierten Zellen im Wasserbad (37°C) aufgetaut, in das hiPSC-Medium mTeSRTM1² überführt und für 5 Minuten bei 1200 Upm

² Zu *Lösungen und Chemikalien* s. Kapitel 2.4.1

zentrifugiert. Nach Resuspension des Zellpellets in mTeSRTM1 wurden pro Well 500µl Zellsuspension ausplattiert (s. Abb. 5.A). Die hiPSCs wurden auf MatrigelTM-beschichteten³ 6-well-Platten in Kultur gehalten. Als Medium wurden 2ml mTeSRTM1 pro Well verwendet. Die Brutschrankbedingungen umfassten eine Temperatur von 37°C, eine O₂-Konzentration von 20% sowie eine CO₂-Konzentration von 5%. Neben dem täglichen Mediumwechsel des hiPSC-Mediums mTeSRTM1 mussten die Zellen regelmäßig kontrolliert und manuell von spontan differenzierten Zellen (s. Abb. 5.B) befreit werden, um einer unkontrollierten Differenzierung der Stammzellen entgegenzuwirken. Dazu wurden die differenzierten Zellen unter Mikroskop-Einsicht mit einem Stempel farblich markiert und anschließend mit einer Glaspipette abgesaugt. Aufgrund der natürlichen Expansion der Zellen war jeweils nach 3-5 Tagen ein Split-Vorgang im Verhältnis 1:2 – 1:6 notwendig. Nach einem Waschschrift mit DMEM/F12 (GIBCO) wurden die Zellen hierfür zunächst mit 2mg/ml Dispase (GIBCO)⁴ für 5 Minuten im 37°C-Brutschrank angedaut. Anschließend wurde die Dispase-Lösung durch DMEM/F12 ausgetauscht und die zuvor markierten differenzierten Zellen bzw. Kolonien wurden abgesaugt. Danach wurden die Stammzellkolonien mittels eines Zellschabers gelöst und zusätzlich, unter ständiger Spülung mit mTeSRTM1, mit einer sterilen Glasstabpipette vom Plattenboden entfernt. Am Ende wurden die gelösten Zellen gepoolt und im gewünschten Verhältnis auf neue 6-well-Platten überführt. Der tägliche Mediumwechsel begann dann erst wieder am zweiten Tag nach dem Splitten.

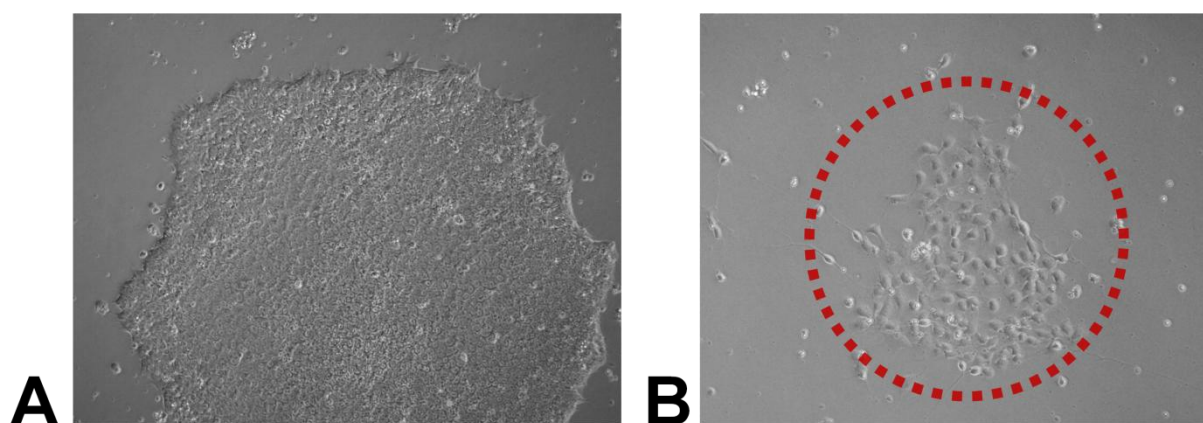


Abb. 5 Kultur induzierter pluripotenter Stammzellen. **A.** Repräsentative homogene hiPSC-Kolonie auf einer MatrigelTM-beschichteten 6-well-Platte. **B.** Spontan differenzierte Zellen wurden vor jedem Split-Vorgang unter Mikroskop-Einsicht markiert und mit einer Glasstabpipette entfernt (*eigene Aufnahmen*).

³ Arbeitskonzentration MatrigelTM (BD Bioscience): 1mg/ml, in DMEM/F12 gelöst

⁴ Dispase: gelöst in DMEM/F12

2.4 Differenzierung der hiPSCs zu Kardiomyozyten

Das Protokoll zur Differenzierung der hiPSCs zu Kardiomyozyten (hiPSC-CMs) umfasst einen Zeitraum von 24 Tagen und versucht die Genese von Herzmuskelzellen nachzuahmen. Der schematische Ablauf des Differenzierungsprotokolls ist in *Abb. 6* dargestellt. Bevor mit einer Differenzierung begonnen werden konnte, wurde stets versucht, eine Zellzahl von ca. $4\text{-}5 \times 10^6$ pro 6-well-Platte und davon einen möglichst geringen Anteil an differenzierten Zellen zu erreichen. Deshalb wurden die Zellen vor Beginn einer Differenzierung zunächst erneut gepickt (s.o.), bevor sie mit 1 ml Accutase (GIBCO A11105) pro well dissoziiert und anschließend bei 1200 Upm für 5 Minuten zentrifugiert wurden. Das entstandene Zellpellet wurde dann in 1 ml AFM-Medium resuspendiert und die Zellsuspension mittels eines $70\mu\text{m}$ -Filters filtriert. Zur anschließenden Differenzierung wurden die Zellen auf *ultra-low-attachement*-Zellkulturflaschen (BD Biosciences)⁵ überführt. Die Zellzahl in den T25-Flaschen betrug 5×10^6 Zellen in 5 ml AFM-Medium, in den T75-Flaschen 15×10^6 Zellen in 15 ml AFM-Medium. Das AFM-Medium induziert die Entstehung von Zellaggregaten, sog. *embryoid bodies* (s. *Abb. 7*). Zunächst wurden die Zellen dann für zwei Wochen unter Hypoxie-Bedingungen (37°C , 7% CO_2 , 5% O_2) kultiviert. Am ersten Tag nach Beginn der Differenzierung wurden 50% des Mediums abgesaugt, durch die äquivalente Menge ATM-Medium ausgetauscht und die Flaschen auf einem Orbitalshaker (15 Upm) weiter kultiviert. Am Folgetag wurden 85% des Mediums durch das Differenzierungsmedium CIM-50 ersetzt, die Zellaggregate mittels eines $200\mu\text{m}$ -Nylonfilters filtriert und die Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen überführt. An den Tagen 3-7 wurde täglich ein Mediumwechsel mit CIM-50-Medium + A6B10 (10 ml in den T25-Flaschen bzw. 30 ml in den T75-Flaschen) durchgeführt. Am 3. Tag wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 auf weitere Zellkulturflaschen aufgesplittet. An den Tagen 8-16 wurde im 2-Tages-Rhythmus ein Mediumwechsel mit CMM-Medium durchgeführt. In dieser Zeit traten in der Regel die ersten schlagenden Zellaggregate auf. Ab Tag 14 wurden die Brutschrank-Bedingungen auf 7% CO_2 und 20% O_2 umgestellt.

⁵ Corning®UltraLow Attachment Surface

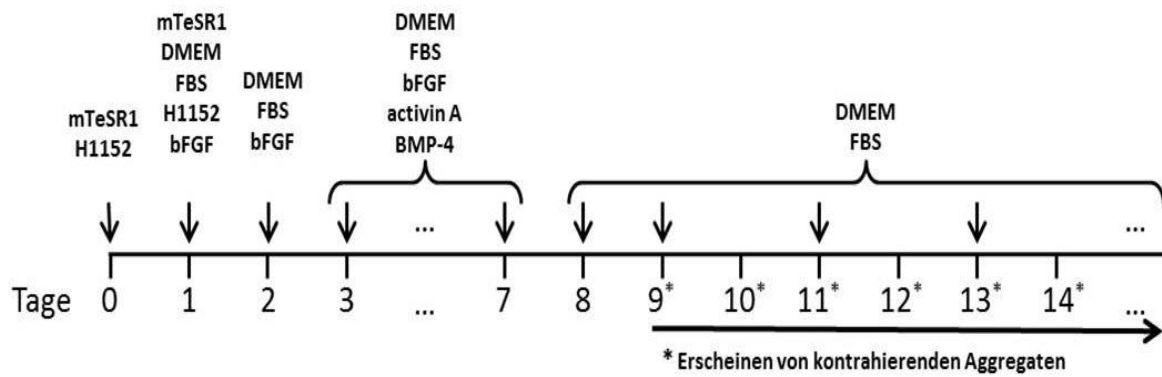


Abb. 6 Protokoll zur Differenzierung von hiPSCs zu Kardiomyozyten. Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll zur Differenzierung von hiPSCs zu Kardiomyozyten umfasste einen Zeitraum von 24 Tagen; Pfeile markieren den Rhythmus der Mediumwechsel. Ab Tag 9 nach Beginn der Differenzierung konnten erstmals spontan schlagende Zellaggregate beobachtet werden (abgewandelt aus Fuerstenau-Sharp et al. (181)).

Um eine möglichst hohe Ausbeute an Kardiomyozyten zu erzielen, erfolgte ab Tag 17 eine metabolische Selektion mit DL-Laktat. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass Herzmuskelzellen, im Gegensatz zu anderen somatischen Zellen, ihren Energiebedarf auch in Abwesenheit von Glukose durch die alleinige Verstoffwechselung von Laktat decken können. Für diese Aufreinigung der hiPSC-CMs wurde das Medium CMM + 1% DL-Laktat (*ohne Glucose*) verwendet. Am Tag 24 konnten die entstandenen Herzmuskelzellen dann auf Gelatine-beschichtete Plates bzw. Zellkulturflaschen ausplattiert werden. Dafür wurden die Zellaggregate zunächst für maximal 15 Minuten mit 1-3 ml 10-fach-konzentrierter Trypsinlösung (SIGMA T4174) im 35°C-Wasserbad inkubiert, um Einzelzellen zu erhalten. Anschließend wurde der fortschreitende Verdau mit dem gleichen Volumen an CMM-Medium abgestoppt. Die Zellen wurden dann für 3 Minuten bei 1000 Upm zentrifugiert, durch einen 100µm-Nylonfilter (Steriflip®, Millipore SCNY00100) filtriert und je nach Zellzahl auf die jeweiligen Plates ausplattiert. Nach darauffolgenden drei Tagen ohne Mediumwechsel konnten die Zellen nun für längere Zeit in Kultur gehalten werden (Inkubationsbedingungen weiterhin 7% CO₂, 20% O₂). Ein Mediumwechsel erfolgte alle 4 Tage. Je nach Zellstatus wurde CMM-Medium + 1% DL-Laktat zur weiteren Aufreinigung der Kardiomyozyten oder DS-CMM-Medium + 2,5% FBS (bei nicht mehr weiter proliferierenden Zellen) verwendet. Da hiPSC-induzierte Herzmuskelzellen einen im Vergleich zu humanen embryonalen Herzmuskelzellen verzögerten Reifungsprozess durchlaufen und sich beispielsweise die ultrastrukturelle Organisation und die Expression verschiedener Proteine noch verändern, wurde eine Reifungszeit von 3 Monaten ab dem Tag des Ausplattierens eingehalten, bevor funktionelle Messungen an den Zellen durchgeführt wurden.

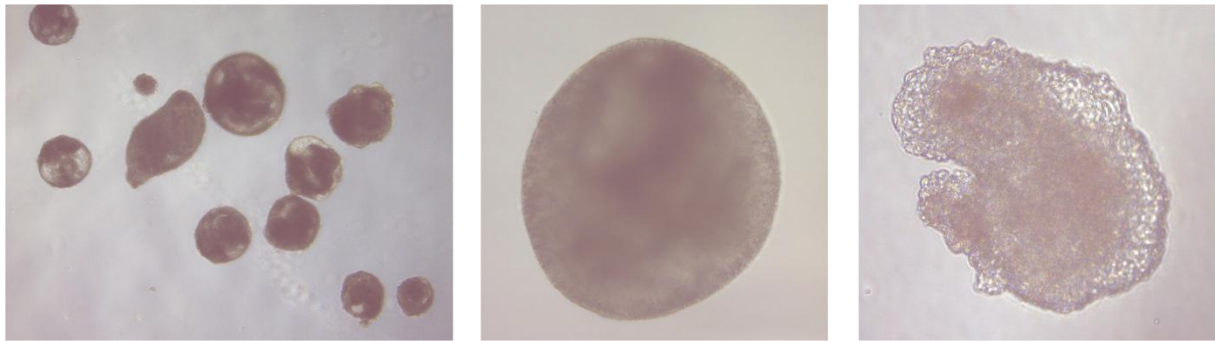


Abb. 7 Differenzierung der hiPSCs zu Kardiomyozyten. Im Laufe der Differenzierung der hiPSCs zu Kardiomyozyten formierten sich Zellaggregate, sog. *embryoid bodies*. Diese begannen ca. zwei Wochen nach Beginn der Differenzierung spontan zu kontrahieren (*eigene Aufnahmen*).

2.4.1 Lösungen und Chemikalien

Tab. 1 : AFM-Medium (*Aggregate Formation Medium*)

mTeSR™1-Medium	(s. unten)	50 ml
H1152 dihydrochloride	(Tocris, UK)	1 µM

Tab. 2 : ATM-Medium (*Aggregate Transition Medium*)

mTeSR™1-Medium	(s. unten)	25 ml
DMEM Low Glucose	(SIGMA Aldrich, USA)	22,5 ml
FBS	(Fisher Scientific, USA)	2,5 ml
H1152 dihydrochloride	(Tocris, UK)	1 µM
FGF	(Peprotech, USA)	50 ng/ml

Tab. 3 : CIM-50-Medium (*Cardiac Induction Medium*)

DMEM Low Glucose	(SIGMA Aldrich, USA)	45 ml
FBS	(Fisher Scientific, USA)	5 ml
Gentamycin*	(SIGMA Aldrich, USA)	25 µg/ml
FGF	(Peprotech, USA)	50 ng/ml

*Prophylaxe gegen bakterielle Verunreinigung

Tab. 4 : CIM-50-Medium + A6B10

DMEM Low Glucose	(SIGMA Aldrich, USA)	90 ml
FBS	(Fisher Scientific, USA)	10 ml
Gentamycin	(SIGMA Aldrich, USA)	25 µg/ml
FGF	(Peprotech, USA)	50 ng/ml
Acticin A	(Peprotech, USA)	6 ng/ml
BMP-4	(Peprotech, USA)	10 ng/ml

Tab. 5 : CMM-Medium (Cardiac Maintenance Medium)

DMEM Low Glucose	(SIGMA Aldrich, USA)	90 ml
FBS	(Fisher Scientific, USA)	10 ml
Gentamycin	(SIGMA Aldrich, USA)	25 µg/ml

Tab. 6 : CMM-Medium + 1% DL-Laktat (Selektionsmedium)

DMEM Low Glucose	(GIBCO, USA)	88,95 ml
FBS	(Fisher Scientific, USA)	10 ml
Gentamycin	(SIGMA Aldrich, USA)	25 µg/ml
DL-Laktat	(SIGMA Aldrich, USA)	4 mM

Tab. 7 : DS-CMM-Medium + 2,5% FBS

DMEM (No Glucose)	(GIBCO, USA)	47 ml
D-(+)-Galaktose	(SIGMA Aldrich, USA)	10 mM
Sodium Pyruvate 100 mM	(HyClone, USA)	0,5 ml
FBS (dialyzed)	(Thermo Scientific, USA)	1,25 ml
Gentamycin	(SIGMA Aldrich, USA)	25 µg/ml

Tab. 8 : mTeSR™1-Medium

Basalmedium mTeSR™1	(STEMCELL Technologies Inc., Kanada)	400 ml
5x Supplement mTeSR™1	(STEMCELL Technologies Inc., Kanada)	100 ml
Gentamycin	(SIGMA Aldrich, USA)	25 µg/ml

2.4.2 Durchflusszytometrie zum Nachweis von cTnT

Zur Beurteilung der erfolgreichen Differenzierung der hiPSCs zu Herzmuskelzellen wurden FACS-Analysen zur Detektion des Kardiomyozyten-spezifischen Markers Troponin T (cTnT) durchgeführt. Die Zellen wurden dafür zunächst mit Trypsin (Sigma Aldrich) aus ihren Zellkonglomeraten gelöst, mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend in PBS + 2% BSA resuspendiert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Kardiomyozyten mithilfe des Cytofix/Cytoperm™-Kits (BD Biosciences) wurde der Antikörper gegen cTnT (*mouse monoclonal anti-cTnT IgG1*, 1:500, abcam)⁶ dazugegeben und über Nacht bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Zu weiteren Details der durchflusszytometrischen Analysen s. Kap. 6.1.2. Der kardiale Marker cTnT wurde darüber hinaus auch mittels immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen.

2.5 Immunofluoreszenzanalysen

Zum Nachweis kardialer Marker und zur Untersuchung des Expressionsmusters verschiedener Glanzstreifen-Proteine bieten sich Immunofluoreszenzfärbungen an. Hierfür mussten die auf 4- bzw. 8-well-Chamber-Slides ausplattierten, gereiften Kardiomyozyten zunächst fixiert und die Zellmembran für die Antikörper durchgängig gemacht werden. Zur Fixierung und Permeabilisierung wurde bei den meisten Messungen das Cytofix/Cytoperm™-Kit (BD Biosciences) verwendet. Im Zuge der Färbungen mit Anti-PKP2 wurde stattdessen Ethanol (99,2%) eingesetzt. Nach einem ersten Waschschrift mit PBS (Dulbecco's Phosphate-buffered Saline; SIGMA Aldrich) wurden die Zellen für 20 Minuten bei RT (BD-Kit) bzw. -20°C (Ethanol) fixiert und permeabilisiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde erneut mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Permeabilisierungsvorgang mittels des 1:10-verdünnten⁷ Waschpuffers WashPerm® aus dem Cytofix/Cytoperm™-Kit (BD Biosciences) für 45 Minuten bei RT geblockt. Über Nacht erfolgte dann die Inkubation mit dem primären Antikörper (250-500µl/Kammer) bei 4°C. Zu den eingesetzten primären Antikörpern s. Tab. 8.

An Tag 2 wurde dann nach dreimaligem Waschen mit PBS (jeweils 1 min) der sekundäre Antikörper (250-500µl/Kammer) dazugegeben und anschließend für 2

⁶ 1:10 mit PBS-Puffer verdünnt

⁷ verdünnt mit PBS, 1:10

Stunden lichtgeschützt bei RT inkubiert. Zu den verwendeten sekundären Antikörpern s. *Tab. 10*. Abschließend wurden die Kammern mit dem Eindeckmedium VECTASHIELD HardSet Diamond (Axxora) bedeckt, unter einem Deckglas eingeschlossen und über Nacht lichtgeschützt bei RT aufbewahrt.

Am dritten Tag erfolgte dann, nach der luftdichten Versiegelung der Kammern mit Nagellack, die eigentliche Fluoreszenzmessung mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 700.

Neben Färbungen einzelner Oberflächenmoleküle wurden auch Doppelfärbungen mit zwei unterschiedlichen primären Antikörpern durchgeführt. Doppelfärbungen mit kardialem Troponin-T (cTnT) dienten dazu, Kardiomyozyten von anderen Zelltypen auf den Messkammern zu unterscheiden.

Alle Experimente wurden – nach der dreimonatigen Reifung der Kardiomyozyten – sowohl an isoliert liegenden Zellen als auch an Kardiomyozyten-Clustern durchgeführt. Die Färbungen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Biologisch-Technischen Assistentin Teresa Stauber.

Tab. 9 : Primäre Antikörper für Immunofluoreszenzfärbungen an hiPSC-CMs

Antikörper	Verdünnung ⁸	Firma
<i>Mouse monoclonal anti-Ankyrin G</i>	1:400	Santa Cruz Biotechnology, USA
<i>Rabbit polyclonal anti-cTnT</i>	1:400	abcam, UK
<i>Mouse polyclonal anti-cTnT</i>	1:400	ThermoFisher Scientific, USA
<i>Rabbit polyclonal anti-Pan Na_v</i>	1:200	Alomone Labs, Israel
<i>Rabbit polyclonal anti-PKP2</i>	1:150	abcam, UK

Tab. 10 : Sekundäre Antikörper für Immunofluoreszenzfärbungen an hiPSC-CMs

Antikörper	Verdünnung ⁸	Firma
<i>Alexa Fluor goat anti-mouse 488</i>	1:2000	Life Technologies, USA
<i>Alexa Fluor goat anti-mouse 555</i>	1:2000	Invitrogen™, USA / abcam, UK
<i>Alexa Fluor goat anti-rabbit 555</i>	1:2000	Life Technologies, USA
<i>Alexa Fluor goat anti-rabbit 568</i>	1:2000	Life Technologies, USA

⁸ mit 10-fach-verdünntem WashPerm®

2.6 Patch Clamp-Messungen

Die von Erwin Neher und Bert Sakmann 1976 entwickelte Patch-Clamp-Technik (186) ist eine Methode aus der Elektrophysiologie, die es erlaubt, Strom- und Spannungsänderungen an der Zellmembran aufzuzeichnen. Mit ihrer Hilfe können Aktionspotentiale oder die Aktivität ausgewählter Ionenkanäle an der Membran einer einzelnen Zelle untersucht werden. Den Zugang zur Zelle erhält man über eine sehr feine Glaspipette, die mit einer Pipettenlösung gefüllt ist und mithilfe eines Mikromanipulators bewegt werden kann. Über verschiedene Zusammensetzungen von Pipetten- und Badlösung lassen sich die Ionenverhältnisse auf beiden Seiten der Zellmembran beeinflussen; somit kann moduliert werden, welche Ströme letztendlich gemessen werden. Abb. 8 zeigt den schematischen Aufbau eines Messplatzes für Patch-Clamp-Messungen. Dieser umfasst ein inverses Mikroskop, das auf einem von einem Faraday'schen Käfig umgebenen, schwingungsgedämpften Tisch steht. Dies dient der Minimierung mechanischer und elektromagnetischer Störfaktoren. Außerdem gehören zum Versuchsaufbau der über einen Mikromanipulator steuerbare Pipettenhalter, mehrere Verstärker sowie ein Computer zur Datenanalyse.

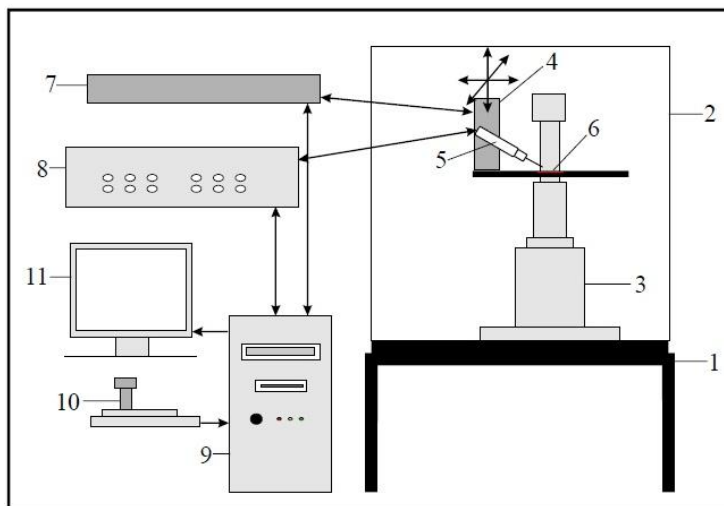


Abb. 8 Schematischer Aufbau einer Patch-Clamp-Messstation

1. Schwingungsgedämpfter Tisch;
2. Faraday'scher Käfig;
3. inverses Mikroskop;
4. Motoreinheit des Mikromanipulators;
5. Vorverstärker mit Pipettenhalter und Pipette;
6. Messkammer mit Kardiomyozyten;
7. Mikromanipulator (Steuereinheit);
8. Haupt- bzw. Nachverstärker mit AD/DA-Wandler;
9. Computer;
10. Joy-Stick und
11. Bildschirm

(Abb. von M. Kohlhaas freundlicherweise zur Verfügung gestellt)

Zunächst wird die auf dem Pipettenhalter eingespannte und mit Pipettenlösung gefüllte Glaspipette in die Badlösung der Messkammer eingetaucht. Damit in der Badlösung schwimmender Zellschrott die Pipettenspitze nicht verstopft, wird vor dem Kontakt der Pipette mit der Flüssigkeit ein leichter Überdruck auf die Pipette gegeben. Mittels des Mikromanipulators wird die Pipette nun vorsichtig an die Zellmembran herangefahren. Um eine möglichst enge Verbindung zwischen Pipette

und Zelle zu erzeugen und störende Leckströme so gering wie möglich zu halten, wird die Zellmembran mit einem leichten Unterdruck an die Pipette herangezogen. Im Idealfall entsteht dann ein Abdichtungswiderstand im GΩ-Bereich, das sogenannte *Gigaseal* (engl. *seal* = Dichtung). Aus der *Gigaseal*-Position heraus ergeben sich verschiedene Mess-Möglichkeiten, z.B. Einzelkanalmessungen in der *Cell-attached*-Konfiguration oder – in unserem Fall – Ganzzellableitungen über die sogenannte *Whole-Cell*-Konfiguration. Hierfür wird mit erneut auf die Pipette aufgebrachtem, ruckartigem Unterdruck die Zellmembran an der Stelle des unter der Pipette liegenden Membranstücks (dem sog. *Patch*) aufgebrochen und somit eine Verbindung zwischen Pipettenlumen und Intrazellulärraum geschaffen.

Im Falle der vorliegenden Arbeit erfolgte die Aufzeichnung elektrischer Signale mittels eines EPC10-Verstärkers (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland); die Signale wurden mit 2,9 kHz und 10 kHz Bessel-Filter gefiltert. Die Datenverarbeitung und Auswertung meiner Messungen erfolgten im Programm PATCH MASTER 2.0 (HEKA Elektronik). Liquid-Junction-Potentiale wurden vor Erreichen des Gigaseals korrigiert, außerdem wurde der Pipettenwiderstand in der Cell-Attached-Konfiguration erneut kompensiert. Nachdem ein Zugang zum Intrazellulärraum hergestellt worden war, erfolgte eine automatische Kompensation von Membrankapazität (C_M) und Serienwiderstand (R_S), um kapazitive Ströme zu minimieren. Hierfür wurden kleine negative Pulse verwendet; detektierte kapazitive Ströme wurden skaliert und vom Strom während des Testpulses abgezogen. Während der Messungen erfolgte eine kontinuierliche R_S -Kompensation (50%).

Zur Herstellung der Glaspipetten wurden dünnwandige Borosilikat-Glaskapillaren (3“, w/Fil, 1,5mm; Nr. TW150F-3) der Firma World Precision Instruments (Sarasota, USA) verwendet. Die Pipetten wurden mit dem DMZ Universal Puller (Zeitz-Instruments GmbH, Martinsried, Deutschland) hergestellt. Für jede Messung wurden frisch gezogene Pipetten verwendet. Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur.

2.6.1 Aktionspotential-Messungen

Für die Aufzeichnung von Aktionspotentialen (APs) wurde der soeben beschriebene Versuchsablauf bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurden hiPSC-induzierte Kardiomyozyten im Alter von ca. 3 Monaten, jeweils von den beiden Mutationsträgerinnen sowie der Kontrollperson, untersucht. Zur Zusammensetzung von Pipetten- bzw. Badlösung s. Tab. 11. Für die AP-Messungen wurden

Glaspipetten mit einem initialen Pipettenwiderstand von 3 - 6 M Ω verwendet. Nach dem Erreichen der *Whole-Cell*-Konfiguration wurde im sogenannten *Current-Clamp*-Modus der über die Zellmembran fließende Strom auf einen Wert zwischen 0 bis (max.) -100 pA festgesetzt und gewartet, bis sich das Ruhemembranpotential (RMP) auf einem stabilen Niveau eingestellt hatte. Bei spontan schlagenden Kardiomyozyten wurden zunächst, wenn detektierbar, unstimulierte Aktionspotentiale über eine Dauer von 16 s aufgezeichnet. Darüber hinaus wurden durch Stimulation ausgelöste Aktionspotentiale in vorgegebenen Frequenzen (0,25 Hz / 0,5 Hz / 1 Hz / 2 Hz / 3 Hz) gemessen. Die Dauer des Stimulus betrug zwischen 1,5 und 3 ms, die Stimulus-Stärke war festgesetzt bei 1000 pA. Insgesamt wurden jeweils 10 (0,25 Hz), 20 (0,5 Hz, 1 Hz), 30 (2 Hz) bzw. 40 (3 Hz) APs ausgelöst und aufgezeichnet.

Tab. 11 : Lösungen für Aktionspotential-Messungen bei RT

Pipettenlösung		Badlösung	
Substanz	[]	Substanz	[]
K-Aspartinsäure	122 mM	NaCl	140 mM
NaCl	10 mM	KCl	4 mM
KCl	8 mM	MgCl ₂	1 mM
MgCl ₂	1 mM	Glucose	10 mM
Mg-ATP	5 mM	CaCl ₂	1 mM
Li-GTP	0,3 mM	HEPES	5 mM
HEPES	10 mM		

gelöst in ddH₂O, pH 7,2 (RT) mit KOH

gelöst in ddH₂O, pH 7,4 (RT) mit NaOH

2.6.2 Natriumstrom-Messungen

Zusätzlich zu den Aktionspotential-Messungen wurden auch verschiedene Eigenschaften des spannungsabhängigen Natriumstroms (I_{Na}) untersucht, welcher in Kardiomyozyten ja, wie zuvor beschrieben, hauptsächlich von der Fraktion der Na_v1.5-Kanäle verursacht wird. Zur Aufzeichnung von Strömen wird auch in der *Whole-Cell*-Konfiguration gemessen, jedoch wird im sog. *Voltage-Clamp*-Modus eine definierte Spannung vorgegeben, um den über die Zellmembran fließenden Strom ableiten zu können. Für diese Messungen wurden Pipetten mit einem niedrigeren Zugangswiderstand von durchschnittlich 2-3 M Ω verwendet.

Zunächst soll auf die Messungen des **Spitzennatriumstroms** ($I_{Na,max}$) eingegangen werden. Zur Zusammensetzung von Bad- bzw. Pipettenlösung s. *Tab. 12*. Die in dieser Arbeit verwendeten hiPSCs-CMs wiesen eine unerwartet hohe Natriumstromdichte auf. Aus diesem Grund mussten wir für eine ausreichende Spannungskontrolle eine niedrige extrazelluläre Na^+ -Konzentration einsetzen, wie sie auch bei Messungen an adulten humanen Kardiomyozyten verwendet wird; sowohl Bad- als auch Pipettenlösung enthielten bei diesen Messungen eine Na^+ -Konzentration von 5 mM. Um die Strom-Spannungs-Beziehung zu erhalten, wurde zunächst ein Haltepotential von -120 mV vorgegeben, von dem aus eine zunehmende Potentialerhöhung erfolgte (s. *Abb. 9.A*). Mit jedem Stimulus wurde das Membranpotential in 10 mV-Schritten von -80 mV auf +60 mV erhöht. Die Dauer eines Stimulus betrug jeweils 40 ms, anschließend wurde wieder das Haltepotential von -120 mV eingestellt (gesamte Basis-Zykluslänge: 99 ms); der gemessene Natriumstrom wurden auf die Membrankapazität (C_M) normalisiert. Somit konnte die I_{Na} -Dichte in Abhängigkeit vom Membranpotential ermittelt werden. Die graphische Darstellung dieser Strom-Spannungs-Beziehung wird auch als I-V-Kurve bezeichnet.

Tab. 12 : Pipettenlösung für $I_{Na,max}$ -Messungen bei RT

Pipettenlösung		Badlösung	
Substanz	[]	Substanz	[]
CsCl	100 mM	NaCl	5 mM
Cs-Glutamat	40 mM	TMAC	135 mM
NaCl	5 mM	CsCl	4 mM
MgCl ₂	0,92 mM	MgCl ₂	2 mM
EGTA	1mM	Glucose	10 mM
Mg-ATP	5 mM	CaCl ₂	0,4 mM
Li-GTP	0,3 mM	HEPES	10 mM
CaCl ₂ (freies $[Ca^{2+}]_i$ 100nM)	0,36 mM		
Niflumic Acid	0,03 mM		
Nifedipin	0,02 mM		
Strophanthidin	0,004		
HEPES	5 mM		

gelöst in ddH₂O, pH 7,2 (RT) mit CsOH

gelöst in ddH₂O, pH 7,4 (RT) mit CsOH

Die **Steady-State-Aktivierung** ist ein Maß für die Leitfähigkeit (C) der Natriumkanäle in Abhängigkeit vom Membranpotential. Sie wird folgendermaßen berechnet:

$$C = \frac{I_{Na,max}}{E_M - E_{Rev}} \text{ [A/F]},$$

mit E_M als gegebenem Membranpotential und E_{Rev} als Umkehrpotential, also dem Punkt der maximalen Leitfähigkeit. Es wurde das für jede Zelle individuelle Umkehrpotential (E_{Rev}) ermittelt, an dem der gemessene Spitzennatriumstrom nach Aktivierung erneut 0 war (in der Regel zwischen -10 und 0 bzw. 0 und +10 mV). Anschließend wurden die E_M -Werte auf E_{Rev} normiert. Die Kinetik der spannungsabhängigen Aktivierung der Natriumkanäle kann mithilfe einer Boltzmann'schen Sigmoidalfunktion näherungsweise beschrieben werden: $Y(V) = 1/(1+\exp((V_{1/2}-V)/k_\infty))$, mit $V_{1/2}$ als Spannung der halbmaximalen Aktivierung, V dem jeweils gegebenen Membranpotential und k_∞ als Konstante der Anstiegskinetik der spannungsabhängigen Aktivierung.

Darüber hinaus sollten weitere Parameter des **Öffnungsverhaltens** des spannungsabhängigen Natriumkanals untersucht werden. Um die bei hiPSC-induzierten Kardiomyozyten relativ kleinen Veränderungen der Gatingparameter detektieren zu können, wurde hierfür eine Tyrode mit einer hohen Natriumkonzentration ($[Na^+]_o = 135 \text{ mM}$) verwendet. Zur Zusammensetzung der eingesetzten Lösungen s. *Tab. 13*. Folgende Parameter des Öffnungsverhaltens spannungsabhängiger Natriumkanäle wurden mithilfe spezieller Protokolle analysiert: die Steady-State-Inaktivierung, die sog. intermediäre Inaktivierung sowie die Erholung nach Inaktivierung.

Die **Steady-State-Inaktivierung** ist ein Maß für die Verfügbarkeit der spannungsabhängigen Natriumkanäle in Abhängigkeit des Membranpotentials. Mit zunehmend positiverem MP wechseln immer mehr Kanäle in den inaktivierbaren Zustand und sind somit nicht mehr verfügbar bei einer erneuten Depolarisation. Zur Untersuchung der Kinetik dieser Inaktivierung wurden die Zellen mehrmals hintereinander für 20ms auf ein Potential von -20 mV depolarisiert; das bei der anschließenden Repolarisation (500 ms) wieder erreichte MP wurde nach jedem Stimulus in 10 mV-Schritten, von anfangs -120 mV auf maximal -20 mV, erhöht (s. *Abb. 9.C*). Bei jedem erneuten Testpuls war somit ein immer größer werdender Anteil der Natriumkanäle geschlossen/inaktivierbar, sodass der gemessene Natriumstrom

zunehmend kleiner wurde. Mit dieser Methode kann man Rückschlüsse auf den Anteil der noch verfügbaren Natriumkanäle bzw. der schon inaktiven Kanäle mit steigendem MP ziehen. Auch die Kinetik der Steady-State-Inaktivierung kann mit einer Boltzmann'schen Sigmoidalfunktion beschrieben werden: $Y(V) = -1/(1+\exp((V_{1/2}-V)/k_{\infty}))$, mit $V_{1/2}$ als Spannung der halbmaximalen Aktivierung, V dem jeweils gegebenen Membranpotential und k_{∞} als Maß für die Abfallskinetik der spannungsabhängigen Inaktivierung.

Als **intermediäre Inaktivierung** (I_{IM}) bezeichnet man das Phänomen, dass ein kleiner Teil der Natriumkanäle auf depolarisierende Membranpotential-Veränderungen verzögert reagiert und erst einige 100 ms nach der Kanalfraktion der schnellen Inaktivierung (I_{fast}) in den geschlossenen, nicht aktivierbaren Zustand übergeht (65). Somit dauert es auch deutlich länger, bis diese verzögert-reagierenden Kanäle nach einer Depolarisation wieder aktivierbar sind. Zur Messung der intermediären Inaktivierung wurde die Zelle mehrmals für eine variable Dauer (P_1) auf -20 mV depolarisiert. Mit steigender Dauer von P_1 reagierten somit auch zunehmend mehr Kanäle der I_{IM} -Fraktion auf die Depolarisation, d.h. sie öffneten sich und gingen dann in den inaktivierbaren Zustand über. Anschließend erfolgte eine kurze Repolarisation (20 ms) auf -120 mV; in dieser Zeit können sich die Natriumkanäle der schnellen Inaktivierung (I_{fast}) wieder erholen, die Kanäle der intermediären Inaktivierung (I_{IM}) bleiben aber weiter inaktivierbar. Beim anschließenden erneuten depolarisierenden Testpuls (P_2) auf -20 mV (20 ms) setzt sich der gemessene Strom dann nur aus dem Teil der schnell inaktivierenden Kanäle zusammen. Durch Abzug vom maximalen Gesamtstrom kann somit der Anteil der intermediär inaktivierenden Kanäle, der mit zunehmender Dauer von P_1 größer wird, ermittelt werden. Zur schematischen Darstellung dieses Protokolls s. *Abb. 9.D*. Die Darstellung der I_{IM} -Kinetik erfolgte mittels einer einfachen Exponentialfunktion, die folgendermaßen beschrieben werden kann: $Y(t) = A \cdot \exp(-K_{IM} \cdot t) + \text{Plateau}$, mit A als Amplitude, K_{IM} der Abfallskonstante und t der Zeit in ms.

Außerdem sollte die **Erholung nach Inaktivierung** untersucht werden. Dieser Parameter beschreibt die Erholungszeit der spannungsabhängigen Natriumkanäle vom geschlossenen, inaktiven Zustand zum geschlossenen, aber wieder aktivierbaren Zustand. Hierfür wurde die Zelle jeweils für 1000 ms auf -20 mV depolarisiert, wodurch alle Natriumkanäle inaktiviert wurden. Die Dauer der

anschließenden Repolarisation zurück zu einem Haltepotential von -120 mV wurde bei jedem Stimulationszyklus von anfangs 1 ms auf maximal 165 ms verlängert (s. *Abb. 9.E*), sodass sich mehr und mehr Kanäle von der Inaktivierung „erholen“ konnten. Bei jedem erneuten Testpuls auf -20 mV (20 ms) war somit ein zunehmend größerer Anteil an Kanälen wieder verfügbar, sodass sich der gemessene Natriumstrom mit steigender Repolarisationszeit immer mehr dem Maximalstrom, gemessen nach dem initialen Testpuls, annäherte. Der Zusammenhang zwischen dem gemessenen Strom – als relativer Anteil am Maximalstrom – und der zunehmenden Repolarisationszeit wurde mittels Zwei-Phasen-Exponentialfunktion dargestellt: $Y(t) = A_{\text{fast}} \cdot (1 - \exp(-K_{\text{Fast}} \cdot t)) + A_{\text{Slow}} \cdot (1 - \exp(-K_{\text{Slow}} \cdot t))$, mit A_{fast} bzw. A_{Slow} als Amplitude, K_{fast} bzw. K_{Slow} als Steigungskonstante der beiden Phasen und t der Zeit.

Zu guter Letzt gelang es uns, den sog. **späten Natriumstrom** ($I_{\text{Na,L}}$) aufzuzeichnen. Wie bereits in Kapitel 1.2.3 ausführlich dargestellt, bleibt ein kleiner Anteil der spannungsabhängigen Natriumkanäle nach einer Depolarisation geöffnet bzw. wechselt kontinuierlich zwischen einem Offen- und Geschlossen-Zustand hin und her. Der dadurch entstehende kleine, aber aufgrund seiner langen Dauer funktionell relevante Natriumstrom trägt entscheidend zur elektrophysiologischen Homöostase von Kardiomyozyten bei. Für die $I_{\text{Na,L}}$ -Messungen wurde dieselbe Zusammensetzung von Bad- und Pipettenlösung verwendet wie bei den Messungen des Gatingverhaltens mit $[\text{Na}^+]_o = 135 \text{ mM}$ und $[\text{Na}^+]_i = 10 \text{ mM}$ (s. *Tab. 13*). Zur Messung der späten Komponente des spannungsabhängigen Natriumstroms wurde die Zelle für 1000 ms auf -20 mV depolarisiert (s. *Abb. 9.B*), sodass sich zunächst alle Natriumkanäle öffneten und anschließend der Großteil der Kanäle in den geschlossenen, inaktivierbaren Zustand überging. Der nach einer Depolarisationszeit von 50 – 500 ms noch messbare Strom wurde als späte Komponente des Natriumstroms definiert. Nach Abzug des Leckstroms, ermittelt als verbleibender Strom nach 980 ms Depolarisation, wurde das Integral zwischen 50 und 500 ms berechnet und auf die Membrankapazität bezogen.

Tab. 13 : Lösungen für Messungen des $I_{Na,L}$ sowie des Öffnungsverhaltens des $Na_v1.5$ bei RT

Pipettenlösung		Badlösung	
Substanz	[]	Substanz	[]
CsCl	95 mM	NaCl	135 mM
Cs-Glutamat	40 mM	TMAC	5 mM
NaCl	10 mM	CsCl	4 mM
MgCl ₂	0,92 mM	MgCl ₂	2 mM
EGTA	1 mM	Glucose	10 mM
Mg-ATP	5 mM	HEPES	10 mM
Li-GTP	0,3 mM		
CaCl ₂ (freies $[Ca^{2+}]_i$ 100nM)	0,36 mM		
Niflumic Acid	0,03 mM		
Nifedipin	0,02 mM		
Strophanthidin	0,004		
HEPES	5 mM		

gelöst in ddH₂O, pH 7,2 (RT) mit CsOH

gelöst in ddH₂O, pH 7,4 (RT) mit CsOH

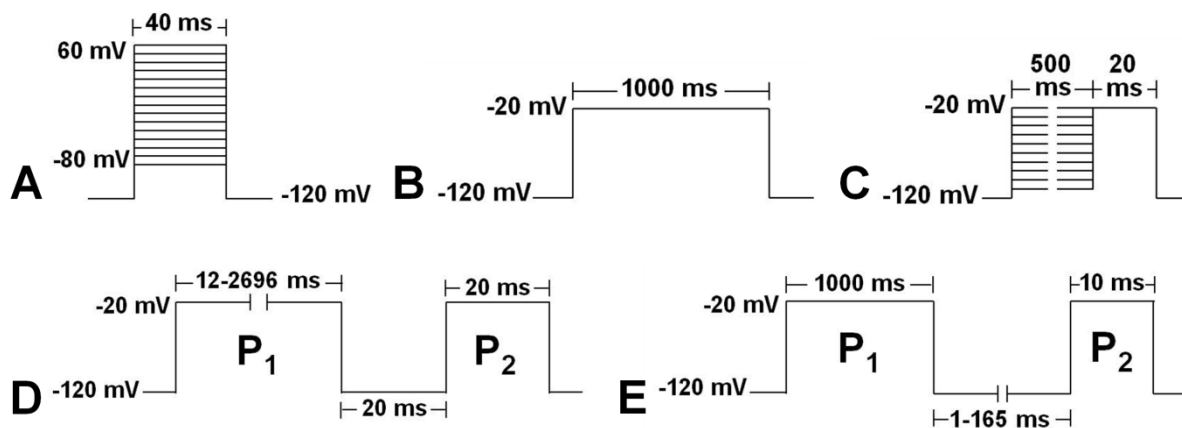


Abb. 9 Messprotokolle der I_{Na} -Messungen im Whole-Cell/Voltage-Clamp-Modus. Schematische Darstellung der Protokolle zur Messung des Spitzennatriumstroms ($I_{Na,max}$) (A), des späten Natriumstroms ($I_{Na,L}$) (B) sowie den Gatingparametern Steady-State-Inaktivierung (C), intermediäre Inaktivierung (I_{IM}) (D) und Erholung nach Inaktivierung (E).

2.6.3 Datenauswertung und Statistik

Zur Auswertung der gemessenen **Aktionspotentiale** wurden die aus dem Programm PATCH MASTER im ASC-Format exportierten Dateien in Textdateien (.txt) konvertiert und im Programm LabChart Pro 8 (ADInstruments) ausgewertet. Untersucht wurden folgende Parameter der Aktionspotentiale: das Ruhemembranpotential (RMP), die maximale Aufstrichgeschwindigkeit ($\text{Max } \Delta V / \Delta t$), die Amplitude des Aktionspotentials (APA) sowie die Aktionspotentialdauer bei 30, 50, 80 bzw. 90% Repolarisation (APD30, APD50, APD80, APD90). Für jeden Parameter wurde der arithmetische Mittelwert der einzelnen Aktionspotentiale berechnet; das erste Aktionspotential einer Stimulationsserie wurde dabei nicht berücksichtigt, sodass insgesamt max. 9 (Stimulationsfrequenz von 0,25 Hz), 19 (0,5 Hz sowie 1 Hz), 29 (2 Hz) bzw. 39 (3 Hz) Aktionspotentiale einer Zelle in die Berechnung mit eingingen. Aktionspotentiale wurden erst ab einer Peak-Höhe von ≥ 50 mV ausgewertet. Der Beginn eines Aktionspotentials (T_{Start}) war definiert als der erste Punkt über 5% der Höhe des RMPs, der Endpunkt (T_{End}) als erster Wert des wieder erreichten RMPs. Die Depolarisationszeit (T_{Rise}) bzw. Repolarisationszeit (T_{Fall}) waren jeweils die Zeit bis zum Erreichen von 10% bzw. 90% der maximalen Peak-Höhe. Zur Bestimmung der maximalen Aufstrichgeschwindigkeit wurde der größte Anstieg während des gesamten APs ermittelt.

Darüber hinaus wurden zwei Formen der AP-Variabilität untersucht. Zunächst wurde die sog. V_{max} -Variabilität näher betrachtet; darunter versteht man die Variabilität der AP-Aufstrichgeschwindigkeiten innerhalb einer Messung. Hierfür wurden die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der V_{max} -Einzelmessungen im Hinblick auf Unterschiede zwischen den drei Zelllinien untersucht. Da sich eine mögliche V_{max} -Variabilität oft erst bei höheren Frequenzen feststellen lässt, wurde dieser Parameter für die niedrigste sowie für die höchste hier verwendete Stimulationsfrequenz ausgewertet, also für $F = 0,25$ Hz bzw. 3 Hz.

Außerdem wurde die APD-Variabilität berechnet, also die Variabilität der Repolarisationszeiten innerhalb einer Serie von Aktionspotentialen. Man unterscheidet zwischen Short-Term- (STV) und Long-Term-Variabilität (LTV). Erstere bezeichnet die Variabilität der APD aufeinander folgender Aktionspotentiale. Unter LTV hingegen versteht man die durchschnittliche Abweichung der APD einer definierten Reihe von Aktionspotentialen vom APD-Mittelwert. Es wurden jeweils 20 Aktionspotentiale aller hiPSC-CMs vom ventrikulären Typ mit 1 Hz-Stimulation in die

Auswertung eingeschlossen. Die APD-Variabilität wurde nur für die Parameter APD50 und APD90 ausgewertet. Zur Berechnung der Short-Term- bzw. Long-Term-Variabilität wurden folgende Formeln verwendet:

$$\sum \frac{(|APDi+1-APDi|)}{n_{\text{Stimuli}} * \sqrt{2}} \text{ bzw. } \sum \frac{(|APDi+1+APDi-2*APD_{\text{mittl.}}|)}{n_{\text{Stimuli}} * \sqrt{2}} \quad [\text{ms}]$$

Die statistische Auswertung sowie graphische Darstellung der Daten erfolgte mithilfe des Programms Graphpad PrismTM (s.u.).

Die **Natriumstrom-Messungen** wurden mithilfe des Programms PATCH MASTER sowie des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel[®] ausgewertet. Der Spitzennatriumstrom sowie der späte Natriumstrom wurden auf die Membrankapazität (C_M) normalisiert. Die statistischen Analysen sowie die graphische Darstellung der Daten wurden mithilfe des Programms Graphpad PrismTM erstellt. Fits wurden mithilfe von F-Tests auf signifikante Unterschiede untersucht. Zur Varianzanalyse longitudinaler Daten wurden uni- bzw. bidirektionale ANOVAs durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Sofern nicht anders gekennzeichnet, zeigen in den Grafiken die Symbols * bzw. # einen statistisch signifikanten Unterschied an. Es wurden jeweils der arithmetische Mittelwert sowie der Standardfehler des Mittelwerts ($SEM = \text{Standard Error of the Mean}$) ermittelt. Der SEM berechnet sich folgendermaßen:

$$SEM: \sigma(\bar{X}) = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

σ = Standardabweichung einer einzelnen Messung, \bar{X} = Mittelwert, n = Anzahl an Einzelmessungen

Alle hier gezeigten Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. In den nachfolgenden Diagrammen sind die Mittelwerte sowie der jeweilige Standardfehler des Mittelwerts in Form von positiven bzw. negativen Balken dargestellt.

Ergebnisse

3.1 Verteilung relevanter Glanzstreifenproteine

3.1.1 Nachweis von cTnT als Kardiomyozyten-spezifischer Marker

Aus den aus PBMCs gewonnenen induzierten pluripotenten Stammzellen aller drei untersuchter Personen konnten hiPSC-induzierte Kardiomyozyten hergestellt werden. Der Erfolg der Differenzierung der hiPSCs zu Kardiomyozyten wurde durch den Nachweis des für Herzmuskelzellen spezifischen Proteins Troponin T (cTnT) bestätigt. cTnT ließ sich mittels Immunofluoreszenz und Durchflusszytometrie in hiPSC-CMs aller drei Zelllinien nachweisen (Abb. 10.B-D). Abb. 10.A zeigt exemplarisch eine mit Anti-cTnT gefärbte Zelle. Man sieht zum einen eine ubiquitäre, homogene Verteilung des kardialen Troponin T als Bestandteil der Myofilamente. Zum anderen lässt sich in dieser Abbildung sehr gut die für Herzmuskelzellen typische Querstreifung erkennen, welche durch die parallele Anordnung von Myofilamenten entsteht. Dies spricht für eine bereits hoch entwickelte Ultrastruktur der gewonnenen hiPSC-CMs, insbesondere nach der dreimonatigen Reifungszeit. Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der hiPSCs bzw. der daraus gewonnenen Kardiomyozyten sind im Anhang (Kap. 6) einzusehen.

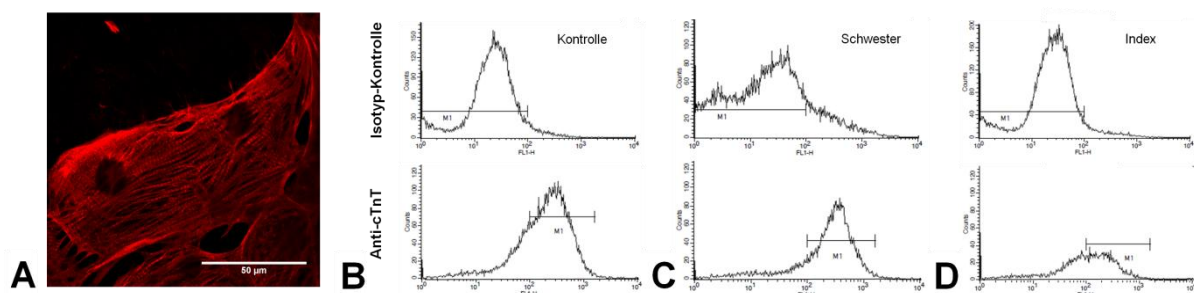


Abb. 10 Nachweis von cTnT in den gewonnenen hiPSC-CMs. Zur Bestätigung der erfolgreichen Differenzierung der hiPSCs zu Kardiomyozyten wurde der Kardiomyozyten-spezifische Marker Troponin T (cTnT) nachgewiesen. **A.** Immunofluoreszenzfärbung einer exemplarischen, mit Anti-cTnT gefärbten Zelle. **B-D.** Nachweis von cTnT mittels FACS in hiPSC-CMs aller drei Zelllinien.

3.1.2 Reduktion der PKP2-Expression in Zellen der ARVC-Patientin

Außerdem sollten mittels Immunofluoreszenzfärbungen die Expression und Verteilung verschiedener Glanzstreifen-Strukturen betrachtet werden, die im Zusammenhang mit den zu untersuchenden Pathomechanismen von Interesse

waren. Zunächst wurde die Expression des desmosomalen Proteins Plakophilin-2 untersucht. Die Ergebnisse dieser Immunofluoreszenz-Färbungen sind in *Abb. 11* anhand exemplarischer Abbildungen dargestellt. In den hiPSC-CMs der gesunden Kontrolle zeigten sich zwei Hauptlokalisationen von PKP2: in der direkten Umgebung des Zellkerns sowie an den Zell-Zell-Kontakten bzw. der Zellmembran allgemein. Die Kardiomyozyten der asymptomatischen Mutationsträgerin präsentierten sich trotz *PKP2*-Mutation ähnlich wie die der Kontrolle, mit einer bevorzugten Lokalisation von PKP2 an den interzellulären Verbindungen (s. Pfeile). Im Vergleich dazu wiesen die Zellen der ARVC-Patientin eine insgesamt reduzierte PKP2-Expressionsdichte auf sowie eine diffuse Verteilung im Zytoplasma. Zur Bestätigung, dass es sich bei den ausgewählten Zellen tatsächlich um Kardiomyozyten handelte, wurden diese zusätzlich mit dem kardialen Marker cTnT gefärbt.

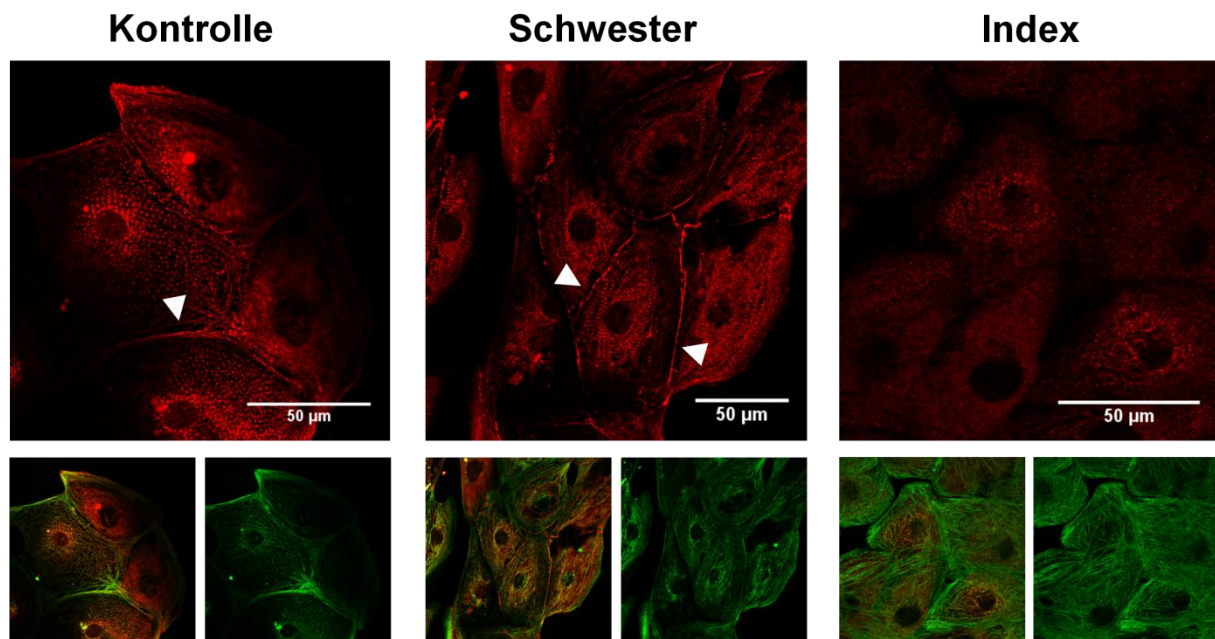


Abb. 11 Reduzierte PKP2-Expressionslevel nur in hiPSC-CMs der klinisch kranken Mutationsträgerin. Es zeigte sich eine deutlich reduzierte Expression des desmosomalen Proteins Plakophilin-2 (PKP2; rot) in den hiPSC-CMs der ARVC-Patientin mit Mutation im *PKP2*-Gen. Während PKP2 in diesen Zellen diffus im Zytoplasma verteilt ist, befindet es sich in den Kardiomyozyten der asymptomatischen Mutationsträgerin sowie der gesunden Kontrollperson bevorzugt an den Zell-Zell-Verbindungen (Pfeile). Zur Kontrolle, dass es sich bei den untersuchten Zellen um Kardiomyozyten handelte, erfolgte eine Doppelfärbung mit dem kardialen Marker cTnT (grün).

3.1.3 Deutlicher Expressionsverlust von AnkG in Zellen der ARVC-Patientin

Des Weiteren sollte die Expression des multifunktionellen Ankerproteins Ankyrin G näher betrachtet werden. AnkG befindet sich in enger Nachbarschaft zum desmosomalen Protein PKP2 und moduliert nicht nur dessen Verankerung an den Glanzstreifen, sondern hat darüber hinaus einen entscheidenden Einfluss auf die

korrekte Lokalisation und Funktion des spannungsabhängigen Natriumkanals $\text{Na}_V1.5$ (125, 175). In den Immunofluoreszenz-Färbungen mit Anti-AnkG zeigte sich eine deutliche Reduktion des AnkG-Signals in den hiPSC-CMs der Indexpatientin, wohingegen sich die Kardiomyozyten der asymptomatischen Schwester nicht von denen der gesunden Kontrolle unterschieden (s. Abb. 12). Zur Qualitätskontrolle wurden die Zellen erneut zusätzlich mit Anti-cTnT gefärbt.

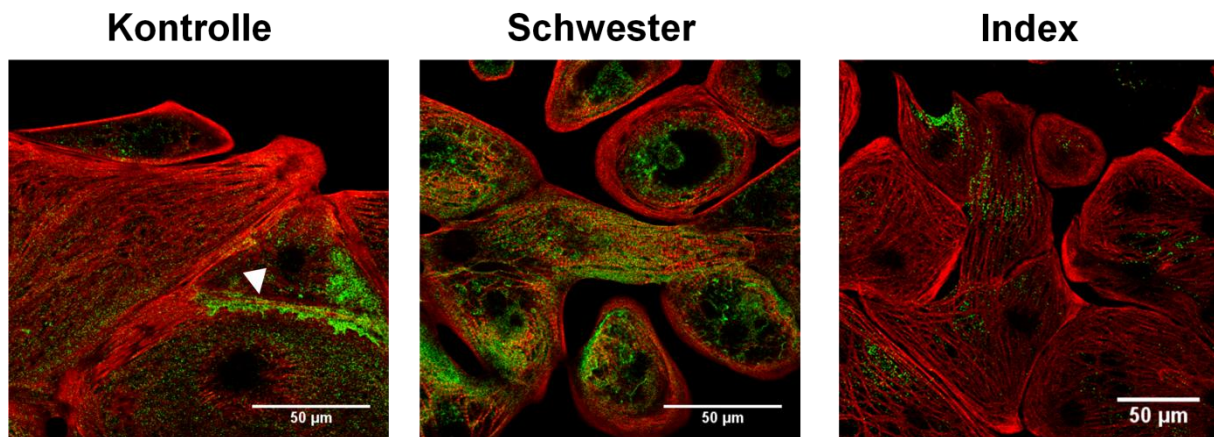


Abb. 12 Reduzierte Expression von Ankyrin G in hiPSC-CMs der Indexpatientin. In den Immunofluoreszenzfärbungen mit Anti-AnkG (grün) ließ sich ein deutlich reduziertes Signal in den hiPSC-induzierten Kardiomyozyten der ARVC-Indexpatientin feststellen. Die Zellen der asymptomatischen Schwester, Trägerin der gleichen Mutation im *PKP2*-Gen, unterschieden sich hingegen nicht von denen der Kontrolle. Im ausgewählten Bildausschnitt von hiPSC-CMs der Kontrollperson ist die Lokalisation von AnkG an Zell-Zell-Kontakten besonders deutlich zu sehen (Pfeil). Zur Bestätigung, dass es sich bei den untersuchten Zellen um Kardiomyozyten handelte, erfolgte eine Doppelfärbung mit dem kardialen Marker cTnT (rot).

3.1.4 Unveränderte Lokalisation von $\text{Na}_V1.5$

Darüber hinaus wurden Immunofluoreszenzmessungen zur Untersuchung der Expression des spannungsabhängigen Natriumkanals $\text{Na}_V1.5$ durchgeführt. Auch der $\text{Na}_V1.5$ befindet sich bevorzugt an den kardialen Zell-Zell-Kontakten, in enger Nachbarschaft und funktioneller Interaktion mit den beiden Glanzstreifen-Proteinen PKP2 und AnkG (125, 170, 175). In anderen Arbeiten hatte sich bereits eine Reduktion und/oder Umverteilung von $\text{Na}_V1.5$ als Folge von *PKP2*-Mutationen gezeigt (170, 176). In den hier durchgeführten Färbungen konnte nach dreimonatiger Kultur kein Unterschied der Signalintensität bzw. der Verteilung des spannungsabhängigen Natriumkanals festgestellt werden. $\text{Na}_V1.5$ zeigte sich insbesondere im Bereich der Zellmembran lokalisiert (s. Abb. 13). Eine Unterteilung der Zellmembran in Glanzstreifen bzw. laterale Membran war aufgrund der Morphologie der hiPSC-CMs nicht möglich. Aufgrund der inhomogenen Qualität der Aufnahmen sind vergleichende Aussagen mit Vorbehalt zu betrachten. Eine offensichtliche Expressionsminderung oder Verteilungsstörung des

spannungsgesteuerten Natriumkanals als Folge der *PKP2*-Mutation konnte jedoch nicht festgestellt werden.

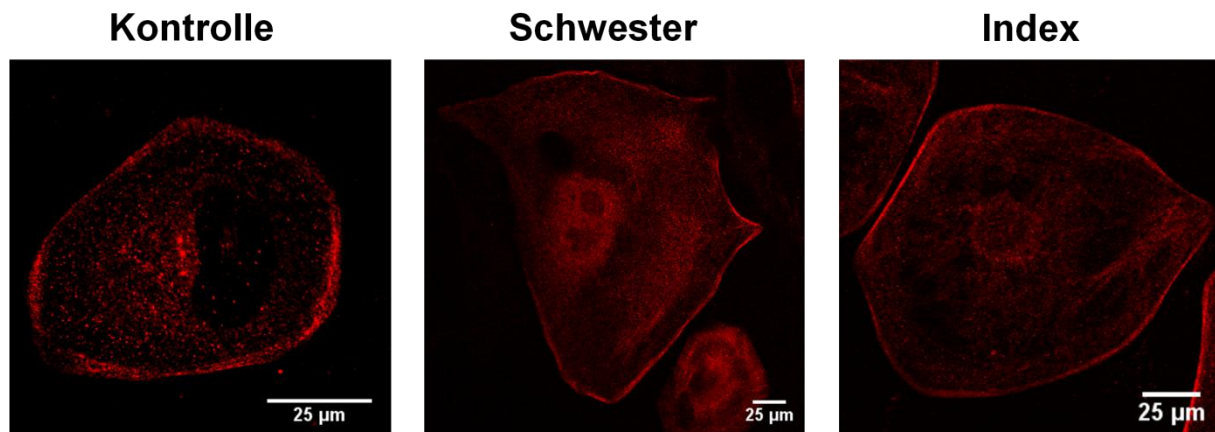


Abb. 13 Unveränderte Expression von Nav1.5 in hiPSC-CMs der Mutationsträgerinnen. Mittels Immunofluoreszenzfärbungen sollte der Einfluss der hier betrachteten *PKP2*-Mutation auf die Lokalisation und Expression des spannungsabhängigen Natriumkanals Nav1.5 untersucht werden. Nav1.5-Signal konnte vor allem im Bereich der Zellmembran detektiert werden. Es konnte keine veränderte Lokalisation oder Expressionsdichte des Nav1.5 beim Vergleich der drei Zelllinien festgestellt werden.

3.2 Veränderungen des kardialen Aktionspotentials

3.2.1 Charakteristische Verteilung der Aktionspotential-Typen

Bei Patch-Clamp-Untersuchungen an Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC-CMs) ergeben sich einige Besonderheiten im Vergleich zu Messungen an adulten Herzmuskelzellen. Zunächst einmal entwickeln sich die hiPSC-CMs während des Differenzierungsprozesses in verschiedene Typen von Kardiomyozyten (181, 187). So finden sich unter den gereiften Herzmuskelzellen Vorhof- und Kammermyokard-ähnliche Zellen sowie Zellen, deren elektrisches Verhalten dem von kardialen Schrittmacherzellen ähnelt; im Folgenden werden diese als Zellen vom ventrikulären, atrialen bzw. nodalen Typ bezeichnet. Aufgrund ihres unterschiedlichen Ionenkanalmusters (41) weisen diese Subtypen einen charakteristischen AP-Phänotyp auf, anhand dessen sich die gewonnenen Kardiomyozyten in drei Gruppen einteilen lassen. Zellen vom ventrikulären Typ wurden anhand ihres niedrigen RMPs, der schnellen AP-Aufstrichgeschwindigkeit sowie der langen Plateauphase definiert. Zellen vom atrialen Typ erkannte man am Fehlen eines ausgeprägten Plateaus, was zur Verkürzung der Aktionspotentialdauer (APD) führt, bei gleichzeitig steilem Aufstrich des Aktionspotentials. Zellen vom nodalen Typ waren charakterisiert durch ein depolarisiertes RMP und eine langsamere Aufstrichgeschwindigkeit (s. Abb. 14).

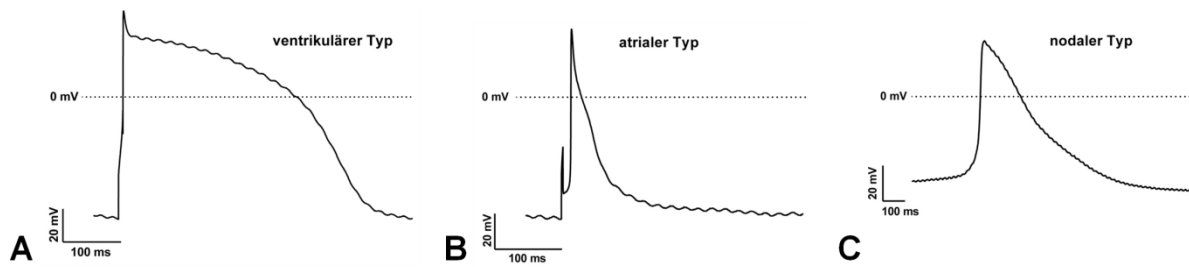


Abb. 14 Klassifizierung der Aktionspotential-Phänotypen. Originalregistrierungen von Aktionspotentialen exemplarischer hiPSC-CMs; anhand der jeweils charakteristischen Morphologie ihres Aktionspotentials konnten die Kardiomyozyten in Zellen vom ventrikulären (A), atrialen (B) bzw. nodalen Typ (C) eingeteilt werden.

In die Auswertung der verschiedenen AP-Parameter wurden nur Zellen vom ventrikulären Typ eingeschlossen. Aus diesem Grund war es von Bedeutung, die Anteile der verschiedenen Zellgruppen an der Gesamtzellpopulation zu kennen. *Abb. 15.A* zeigt die Verteilung der AP-Phänotypen aller gemessenen Zellen; in dieser Verteilung finden sich Zellen aller drei Zelllinien sowie sowohl spontane als auch stimulierte Aktionspotentiale. Von insgesamt 93 gemessenen Zellen bestand die Mehrzahl mit 71,0% aus Zellen vom ventrikulären Typ ($n = 66$). Zellen vom atrialen Typ machten 15,1% ($n = 14$), Zellen vom nodalen Typ 14,0% ($n = 13$) aus. Aufgrund des depolarisierten und somit instabilen RMPs nodaler Zellen ließen sich diese fast ausschließlich bei der Aufzeichnung spontaner Aktionspotentiale erfassen. Die deshalb etwas abweichende Verteilung der stimulierten und damit auch für die statistische Datenauswertung relevanten Aktionspotentiale ist in *Abb. 15.B* zu sehen. Abgesehen von zwei nodalen Zellen (3,0%), bei denen durch einen externen Stimulus ausgelöste Aktionspotentiale aufgezeichnet werden konnten, wiesen sogar 77,6% ($n = 52$) der stimulierten Aktionspotentiale einen ventrikulären Phänotyp auf, 19,4% ($n = 13$) wiederum ließen sich der atrialen Gruppe zuordnen.

Es konnte keine Korrelation zwischen der im Mikroskop sichtbaren Zellmorphologie und dem elektrophysiologischen Phänotyp der jeweiligen Zelle festgestellt werden. Dies ist insbesondere bei den Messungen des spannungsabhängigen Natriumstroms von Bedeutung, da sich das Expressionsmuster der Ionenkanäle und somit das elektrophysiologische Verhalten je nach Zelltyp – ventrikulär, atrial oder nodal – deutlich unterscheidet. Zum Nachweis, dass die Verteilung der Zelltypen in allen drei Messgruppen in etwa vergleichbar war, wurde diese in *Abb. 15.C-E* für jede einzelne Zelllinie aufgeführt. Man sieht, dass die Gruppe der Zellen vom ventrikulären Typ in allen drei Messgruppen die deutliche Mehrheit ausmacht. Die Zellen der Schwester bzw. der gesunden Kontrolle haben einen Anteil von 81 bzw. 80% ($n = 21$ bzw. 20)

an Zellen vom ventrikulären Typ, mit 69% (n = 11) ist dieser Anteil in den Zellen der Indexpatientin etwas niedriger. Somit ist gezeigt, dass es sich bei den vorliegenden Patch-Clamp-Messungen größtenteils um Messungen an ventrikulär-ähnlichen Zellen handelt. Außerdem sind die Anteile der Zelltypen in allen drei Messgruppen in etwa gleich verteilt, sodass eine potentielle Verzerrung der Ergebnisse durch Messungen an verschiedenen Zelltypen für alle drei Gruppen gleich (un-)wahrscheinlich ist.

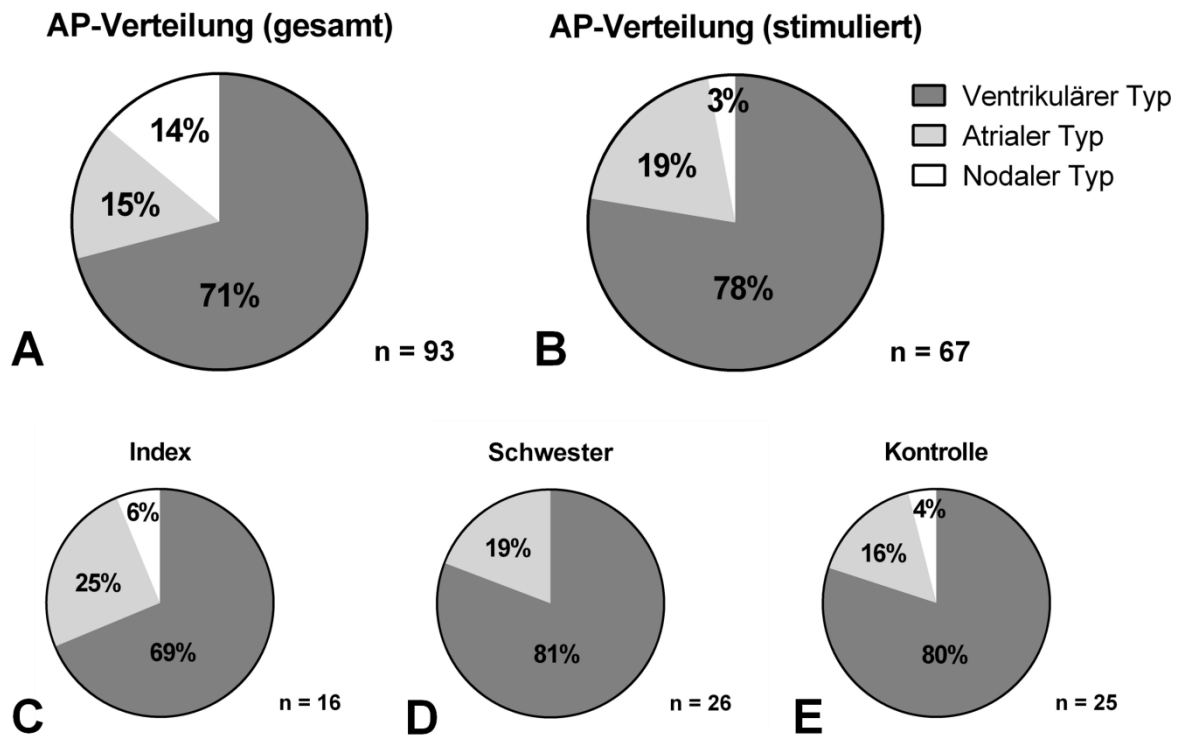


Abb. 15 Charakteristische Verteilung der AP-Phänotypen. Zellen mit einem Aktionspotential (AP) vom ventrikulären Typ stellten den Großteil der hiPSC-CMs dar, mit 71% der insgesamt gemessenen APs (A) bzw. 78% der stimulierten APs (B). Daneben fand sich ein kleinerer Anteil an Kardiomyozyten vom atrialen bzw. nodalen Typ. Eine vergleichbare Verteilung zeigte sich auch bei der Betrachtung jeder einzelnen Zelllinie (C-E).

3.2.2 Erhöhte Frequenz spontaner Aktionspotentiale bei Mutationsträgerinnen

Ein weiteres Charakteristikum der hiPSC-CMs ist ihre spontane elektrische Aktivität, also das Auslösen von Aktionspotentialen ohne externe Stimulation. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, spontane Aktionspotentiale abzuleiten; in Abb. 16.A sind exemplarisch die im *Current-Clamp*-Modus aufgezeichneten APs einer spontan schlagenden Zelle dargestellt. Bei spontan kontrahierenden Zellen wurde zunächst ihre mittlere Eigenfrequenz ermittelt. Mit einer durchschnittlichen Frequenz von 0,19 Hz schlugen die hiPSC-CMs insgesamt relativ langsam. In Abb. 16.B ist zu sehen, dass die Zellen der ARVC-Patientin schnellere intrinsische Frequenzen aufweisen ($\varnothing F_{\text{Index}} = 0,27 \text{ Hz}$; n = 24) als die Zellen der gesunden Kontrolle ($\varnothing F_{\text{Kontrolle}} = 0,13$

Hz). Die Zellen der Schwester der Indexpatientin liegen mit $\bar{\phi}_{\text{Schwester}} = 0,17 \text{ Hz}$ zwischen den anderen beiden Gruppen. Aufgrund der geringen Anzahl an Zellen in den Gruppen Kontrolle ($n = 2$) und Schwester ($n = 3$) lässt sich noch kein statistisch signifikanter Unterschied feststellen. Interessanterweise ließen sich nämlich bei den Zellen der Indexpatientin insgesamt deutlich mehr spontane Aktionspotentiale ableiten als bei den anderen beiden Zelllinien.

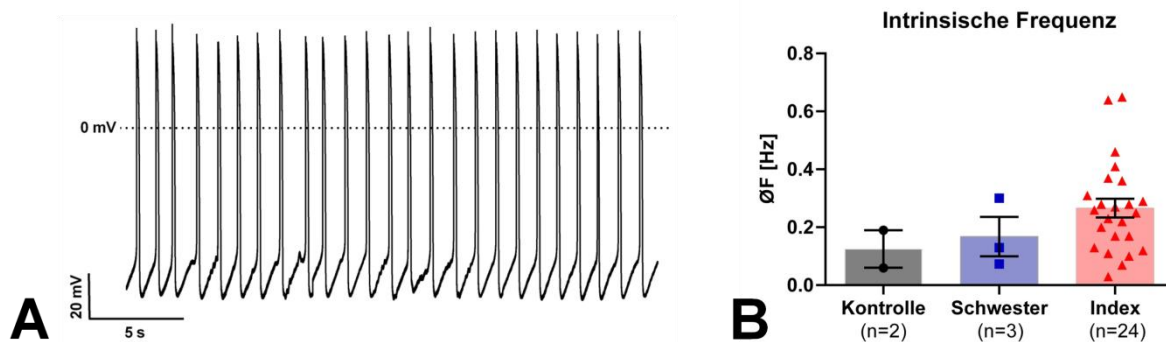


Abb. 16 Intrinsische AP-Frequenz der spontan kontrahierenden hiPSC-CMs. **A.** Originalregistrierung von spontanen Aktionspotentialen einer exemplarischen hiPSC-induzierten Herzmuskelzelle. **B.** Vergleich der Frequenzen dieser spontanen Aktionspotentiale, sog. intrinsische Frequenzen, zwischen den drei Zellgruppen: Es zeigt sich eine Tendenz zu höheren mittleren Eigenfrequenzen ($\bar{\phi}$) der spontanen Aktionspotentiale in den Zellen der Indexpatientin ($n=24$), aber auch bereits in den Zellen der Schwester mit der gleichen Mutation ($n=3$), im Vergleich zur Kontrolle ($n=2$); $p>0,05$.

Nach diesen deskriptiven Analysen soll im Folgenden nun auf die funktionellen AP-Messungen eingegangen werden. Wie oben bereits erwähnt, wurden in der Auswertung nur Zellen vom ventrikulären Typ berücksichtigt. Außerdem wurden für die funktionellen Analysen nur die stimulierten APs betrachtet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden im folgenden Fließtext jeweils nur die Ergebnisse und die absoluten Zellzahlen (n) der mit 1 Hz stimulierten APs aufgeführt. In Kap. 3.2.6 findet sich ein detaillierter Überblick über die Ergebnisse der AP-Analysen, unterteilt nach Zelllinie und Stimulationsfrequenz. Insgesamt wurden für die Analyse der AP-Kinetik die Aktionspotentiale von 53 ventrikulär-ähnlichen Zellen aus 5 Differenzierungsrunden ausgewertet.

3.2.3 Depolarisiertes Ruhemembranpotential bei ARVC-Patientin

Zunächst wurde das Ruhemembranpotential (RMP) der hiPSC-CMs betrachtet. In Abb. 17 ist zu erkennen, dass die Zellen der ARVC-Patientin über alle Stimulationsfrequenzen hinweg ein deutlich depolarisiertes RMP besitzen. Insbesondere für die Frequenzen 0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem deutlich ins Positive verschobenen RMP der Zellen der

Indexpatientin im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien; die Zellen der asymptomatischen Schwester unterschieden sich hingegen nicht von denen der Kontrolle. Bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz, was in etwa dem normofrequenten Grundrhythmus eines Erwachsenen entspricht, wiesen die Kardiomyozyten der Indexpatientin ($n = 11$) ein RMP von $-58,78 \pm 3,64$ mV auf. Im Vergleich dazu lag das RMP der Zellen der Schwester ($n = 21$) bzw. der Kontrolle ($n = 21$) bei $-71,88 \pm 1,25$ mV ($p = 0,0012$) bzw. $-71,00 \pm 1,93$ mV ($p = 0,0027$).

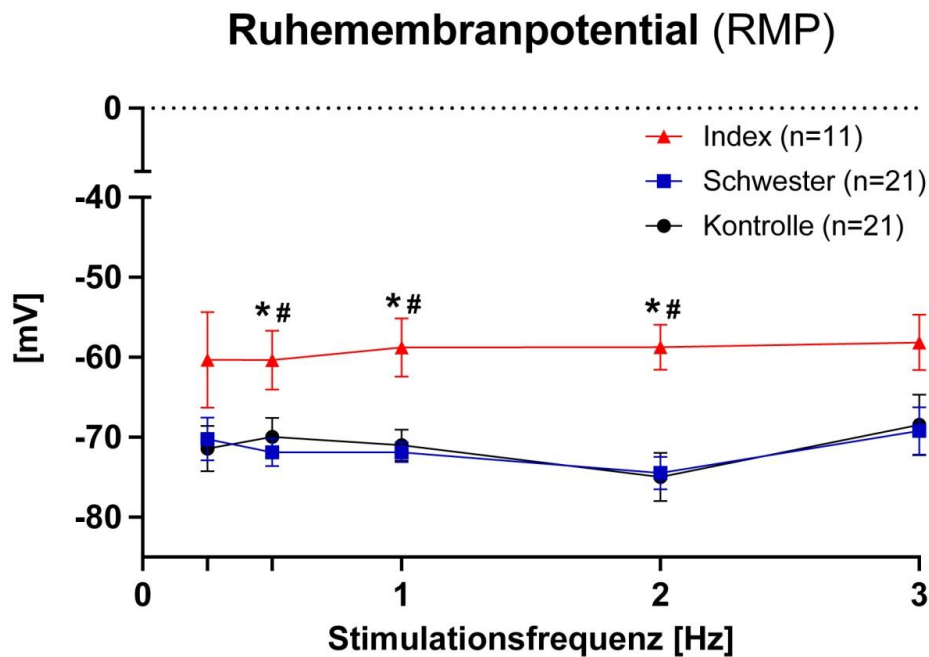


Abb. 17 Depolarisiertes Ruhemembranpotential in Kardiomyozyten der ARVC-Patientin. Das RMP zeigte sich deutlich erhöht in den hiPSC-CMs der Indexpatientin, nicht aber der asymptomatischen Mutationsträgerin im Vergleich zur gesunden Kontrolle. $RMP_{1Hz} = -58,78 \pm 3,64$ (Index; $n=11$) vs. $-71,88 \pm 1,25^{\#}$ (Schwester; $n=21$) vs. $-71,00 \pm 1,93mV^*$ (Kontrolle; $n=21$); $^{* \#} p < 0,05$.

3.2.4 Verlängerte Dauer des Aktionspotentials bei ARVC-Patientin

Ein weiterer Parameter, im Rahmen der Arrhythmogenese von großem Interesse, ist die Aktionspotentialdauer (APD), die in ventrikulären Kardiomyozyten hauptsächlich durch die lange Plateau-Phase bestimmt wird. Abb. 18 zeigt die Dauer der Aktionspotentiale bei 90% Repolarisation (APD90); die absoluten Werte der zusätzlich ausgewerteten APD30, APD50 sowie APD80 sind in Tab. 17 aufgeführt. Zunächst ist zu beobachten, dass die Dauer des Aktionspotentials in allen drei Zelllinien mit zunehmender Stimulationsfrequenz leicht abnimmt; man spricht von einer (physiologischen) frequenzabhängigen Verkürzung der Repolarisation, wie sie auch in adulten humanen Herzmuskelzellen vorkommt (188, 189). Darüber hinaus lässt sich in den Herzmuskelzellen der Indexpatientin interessanterweise eine

deutlich verlängerte Aktionspotentialdauer feststellen, welche in den Zellen der Schwester der Patientin, Trägerin der gleichen *PKP2*-Mutation, nicht zu sehen ist. Diese unterscheidet sich nämlich nicht signifikant von der gesunden Kontrolle, man könnte allenfalls eine leichte Tendenz zu einer verlängerten APD beschreiben. Bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz wiesen die hiPSC-CMs der Indexpatientin eine APD₉₀ von $370,33 \pm 23,85$ ms ($n = 11$) auf. Diese war damit signifikant verlängert im Vergleich zur Kontrolle mit $247,81 \pm 21,05$ ms ($n = 21$; $p = 0,0019$) sowie zur asymptomatischen Mutationsträgerin mit $287,60 \pm 23,08$ ms ($n = 21$; $p = 0,0396$).

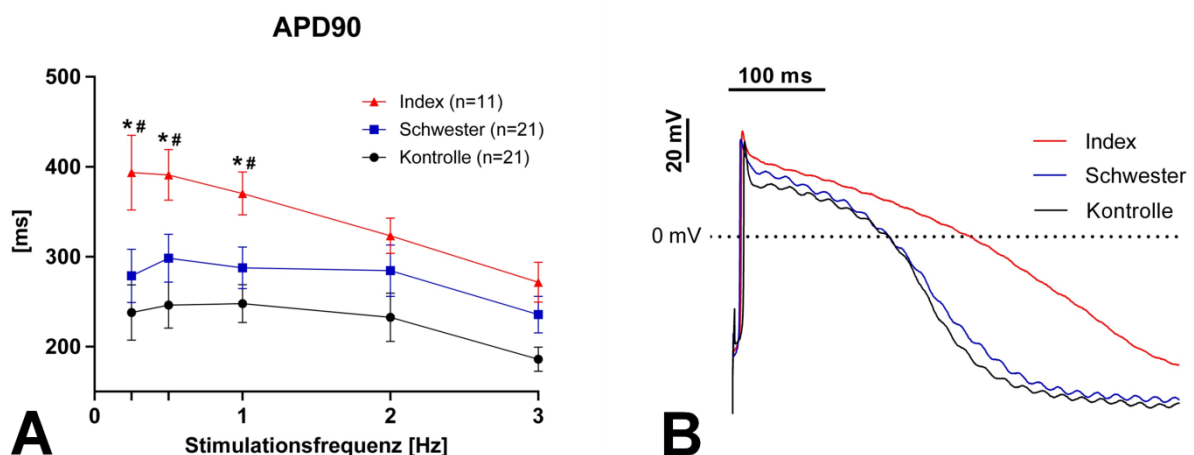


Abb. 18 Verlängerte Aktionspotentialdauer in Kardiomyozyten der ARVC-Patientin. **A.** Vergleich der Aktionspotentialdauer (APD) bei 90% Repolarisation (APD₉₀) zwischen den drei Zelllinien. **B.** Exemplarische Originalregistrierung von mit 1Hz stimulierten Aktionspotentialen. Interessanterweise war die APD in den Zellen der Indexpatientin signifikant verlängert. Die Schwester der Patientin, Trägerin der gleichen Mutation im *PKP2*-Gen, unterschied sich hingegen nicht von der Kontrolle. $APD_{90_{1Hz}} = 370,33 \pm 23,85$ (Index; $n=11$) vs. $287,60 \pm 23,08^{\#}$ (Schwester; $n=21$) vs. $247,81 \pm 21,05ms^*$ (Kontrolle; $n=21$); $^{*,\#}p < 0,05$.

Darüber hinaus wurde die **APD-Variabilität** untersucht, d.h. die Variabilität der Repolarisationsdauer innerhalb eines Stimuluszyklus. Mehr noch als die reine Verlängerung der APD ist die APD-Variabilität ein starker Hinweis auf ein erhöhtes Arrhythmie-Risiko (190, 191). Eine gesteigerte APD-Variabilität kann nämlich ein erster Hinweis auf ein vorliegendes APD-Alternans sein, einem Phänomen, dem, wie in Kap. 1.3.1 besprochen, ein entscheidendes proarrhythmogenes Potential zukommt (91). Für die Analyse der APD-Variabilität wurden nur Zellen ausgewertet, bei denen 20 aufeinanderfolgende Aktionspotentiale abgeleitet werden konnten. *Abb. 19* zeigt die *Short-* bzw. *Long-Term-Variabilität* der APD bei 50 bzw. 90% Repolarisation. Die *Short-Term-Variabilität* bei 50% Repolarisation (STV50) und einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz betrug in den hiPSC-CMs der Indexpatientin $16,38 \pm 2,12$ ms ($n = 10$) und war somit signifikant höher als in den Kardiomyozyten der gesunden Kontrolle ($p = 0,02$). Die asymptotische Schwester hingegen

unterschied sich mit einer STV50 von $12,84 \pm 1,13$ ms ($n = 21$) nicht von der Kontrolle ($10,53 \pm 1,13$ ms; $n = 19$). Dieser Trend setzte sich auch bei den Parametern LTV50, STV90 bzw. LTV90 fort, war jedoch nicht mehr statistisch signifikant. *Tab. 14* gibt einen Überblick über die Ergebnisse der APD-Variabilität.

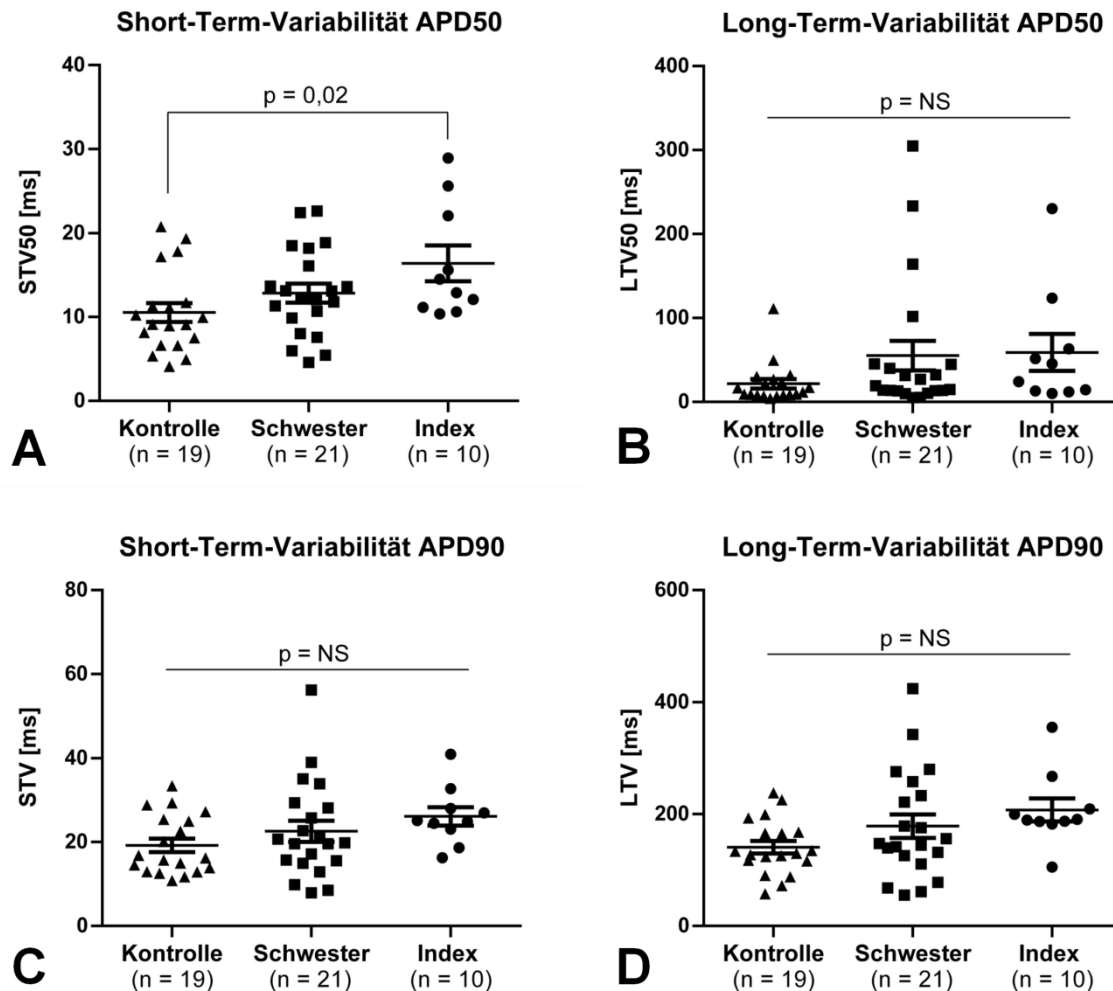


Abb. 19 APD-Variabilität: Gesteigerte STV50 in den hiPSC-CMs der ARVC-Patientin. Gezeigt sind die Ergebnisse der Short-Term- (STV) bzw. Long-Term-Variabilität (LTV) der APD bei 50 bzw. 90% Repolarisation; es wurden mit 1Hz stimulierte Aktionspotentiale ventrikulärer hiPSC-CMs ausgewertet. Es zeigt sich eine signifikant gesteigerte STV50 (**A**) sowie eine angedeutete Tendenz zur insgesamt erhöhten APD-Variabilität (**B-D**) in den Kardiomyozyten der Indexpatientin; die asymptotische Schwester der Patientin, Trägerin der gleichen *PKP2*-Mutation, befand sich zwischen den beiden anderen Zelllinien.

Tab. 14 : APD-Variabilität

	Kontrolle (n = 19)	Schwester (n = 21)	Index (n = 10)
STV50 [ms]	$10,53 \pm 1,13$	$12,84 \pm 1,13$	$16,38 \pm 2,12^*$
LTV50 [ms]	$21,71 \pm 5,65$	$55,16 \pm 17,67$	$58,89 \pm 22,03$
STV90 [ms]	$19,21 \pm 1,61$	$22,55 \pm 2,51$	$26,10 \pm 2,20$
LTV90 [ms]	$140,50 \pm 11,31$	$176,40 \pm 20,95$	$207,30 \pm 20,55$

Vergleich der Short-Term- bzw. Long-Term-Variabilität der Aktionspotentialdauer (APD) bei 50 bzw. 90% Repolarisation (STV bzw. LTV50 sowie STV bzw. LTV90).

3.2.5 Verringerte Amplitude und Aufstrichgeschwindigkeit bei ARVC-Patientin

Die Aufstrichgeschwindigkeit und Amplitude des Aktionspotentials bestimmen maßgeblich die Ausbreitungsgeschwindigkeit elektrischer Impulse. Da beide Parameter durch die Dichte des spannungsabhängigen Natriumstroms beeinflusst werden, waren sie von besonderem Interesse im Rahmen dieser Arbeit.

Die Auswertung der **Aktionspotentials-Amplitude** (APA) ergab eine verringerte APA in den hiPSC-CMs der ARVC-Patientin, die besonders bei höheren Frequenzen ausgeprägt war (s. Abb. 20). Die asymptotische Mutationsträgerin unterschied sich auch in Bezug auf diesen Parameter nicht von der Kontrolle. Bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz wiesen die hiPSC-CMs der Schwester sowie der gesunden Kontrolle eine APA von $114,27 \pm 2,95$ mV ($n = 21$) bzw. $113,62 \pm 3,30$ mV ($n = 21$) auf, wohingegen sie bei der Indexpatientin mit $100,73 \pm 5,25$ mV um ca. 10 mV reduziert war ($n = 11$; $p = 0,0417$ im Vergleich zur Schwester bzw. Kontrolle).

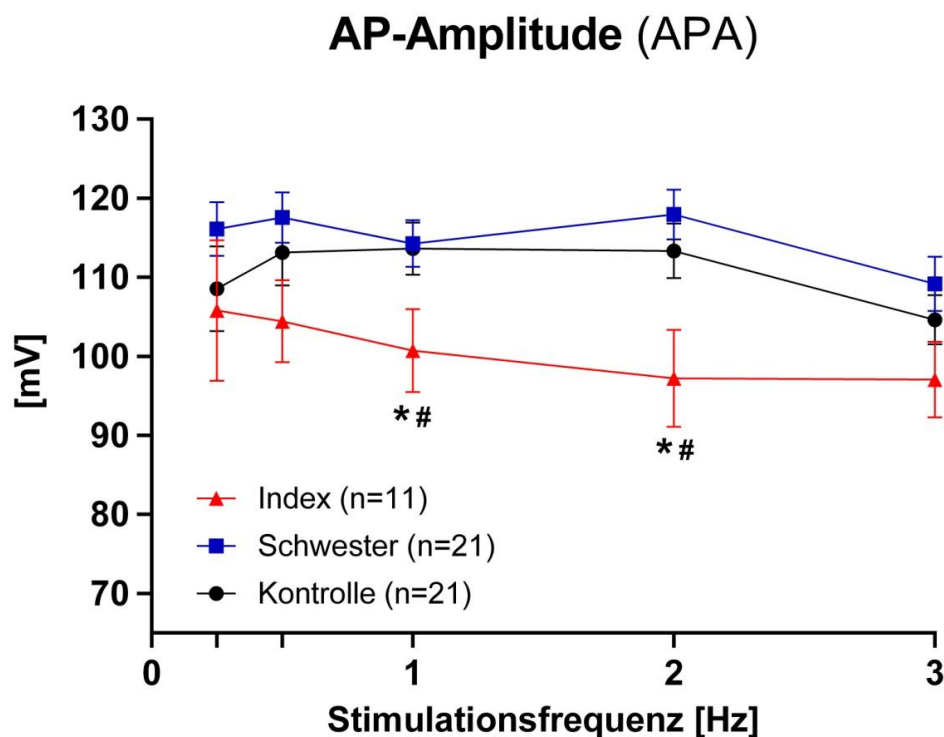


Abb. 20 Verringerte AP-Amplitude in den Kardiomyozyten der ARVC-Patientin. Die Aktionspotentials-Amplitude (APA) zeigte sich in den hiPSC-CMs der Indexpatientin um ca. 10mV reduziert; die Zellen der asymptotischen Mutationsträgerin unterschieden sich hingegen nicht von der Kontrolle. $APA_{1Hz} = 100,73 \pm 5,25$ (Index; $n=11$) vs. $114,27 \pm 2,95^{\#}$ (Schwester; $n=21$) vs. $113,62 \pm 3,30$ mV* (Kontrolle; $n=21$); * $^{\#}$ $p < 0,05$.

Des Weiteren wurde die **maximale Aufstrichgeschwindigkeit** ($\text{Max } \Delta V / \Delta t$) des Aktionspotentials bestimmt; hierfür wurde der größte Anstieg während des gesamten APs ermittelt. Abb. 21 zeigt die maximale Aufstrichgeschwindigkeit in Abhängigkeit

der Stimulationsfrequenz. Es zeichnete sich ein Trend zu langsameren Aufstrichgeschwindigkeiten in den hiPSC-CMs der Indexpatientin ab, der jedoch aufgrund der starken Streuung der Daten nicht statistisch signifikant war. Die Herzmuskelzellen der Schwester mit der gleichen *PKP2*-Mutation scheinen sich in Bezug auf die maximale Aufstrichgeschwindigkeit hingegen nicht von der Kontrolle zu unterscheiden. Bei einer Stimulationsfrequenz von 1 Hz lag die $\text{Max } \Delta V/\Delta t$ bei $61,67 \pm 9,42$ V/s (Index) im Vergleich zu $76,63 \pm 5,00$ V/s (Schwester) bzw. $77,24 \pm 5,62$ V/s (Kontrolle).

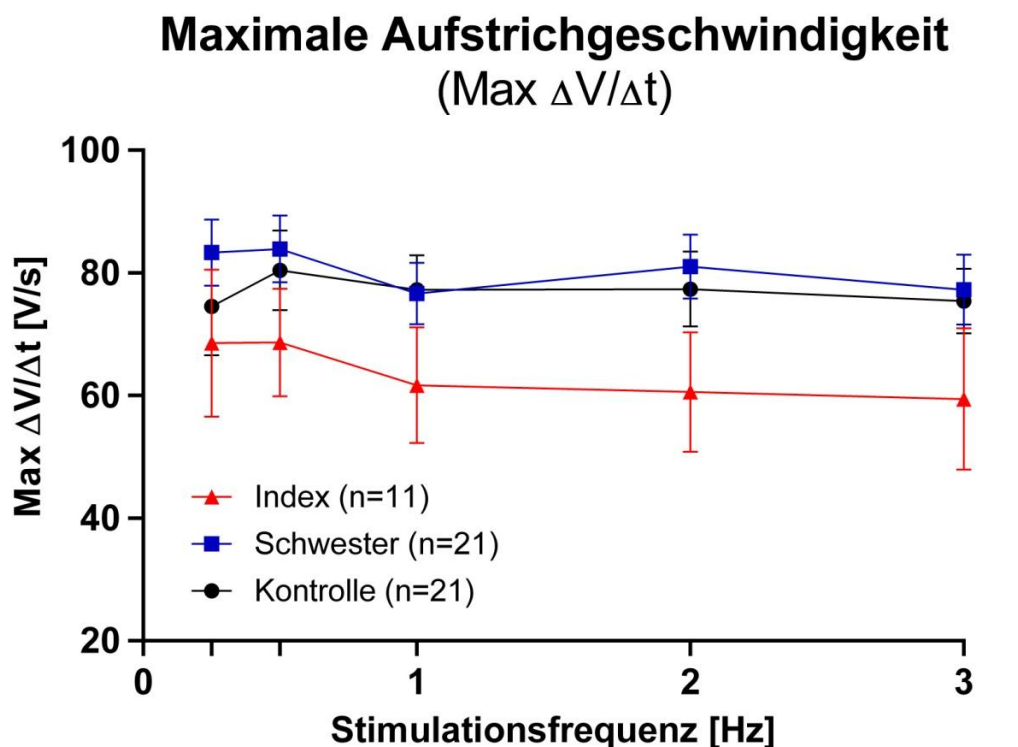


Abb. 21 Tendenz zu verringerter maximaler AP-Aufstrichgeschwindigkeit in Herzmuskelzellen der ARVC-Patientin. Es zeichnet sich ein Trend zu einer verlangsamten Aufstrichgeschwindigkeit ($\text{Max } \Delta V/\Delta t$) des Aktionspotentials in den hiPSC-CMs der Indexpatientin ab, der jedoch nicht statistisch signifikant war ($p > 0,05$). Die Zellen der Schwester scheinen sich nicht von der Kontrolle zu unterscheiden. $\text{Max } \Delta V/\Delta t_{1\text{Hz}} = 61,67 \pm 9,42$ (Index; $n=11$) vs. $76,63 \pm 5,00$ (Schwester; $n=21$) vs. $77,24 \pm 5,62$ V/s (Kontrolle; $n=21$).

Vergleichbar mit der Variabilität der APD existiert auch das Phänomen der **V_{max} -Variabilität**, also der variablen Aufstrichgeschwindigkeiten aufeinanderfolgender Aktionspotentiale als Risikofaktor für die Entstehung von V_{max} -Alternans. Unregelmäßigkeiten in der AP-Aufstrichgeschwindigkeit können wiederum zu regional inhomogener Erregungsausbreitung und somit zur Entstehung von Arrhythmien führen (s. Kapitel 1.3.1). Zur Untersuchung der V_{max} -Variabilität wurden die Standardfehler der $\text{Max } \Delta V/\Delta t$ -Mittelwerte zwischen den drei Zelllinien verglichen. Der Übersicht halber sind in Abb. 22 nur die Daten bei 0,25- bzw. 3 Hz-Stimulation

dargestellt, also der langsamsten sowie der schnellsten Stimulationsfrequenz. Da sich ein mögliches V_{\max} - bzw. Erregungsleitungs-Alternans oft erst bei höheren Frequenzen demaskiert, war insbesondere letztere von besonderem Interesse. In Tab. 15 sind die Ergebnisse der restlichen Stimulationsfrequenzen aufgeführt. Es zeigten sich über alle Frequenzen hinweg keine signifikanten Unterschiede bezüglich der V_{\max} -Variabilität zwischen den drei untersuchten Zelllinien. Eine Prädisposition zu gesteigerter Variabilität der Aufstrichgeschwindigkeiten aufgrund der hier untersuchten *PKP2*-Mutation konnte nicht festgestellt werden.

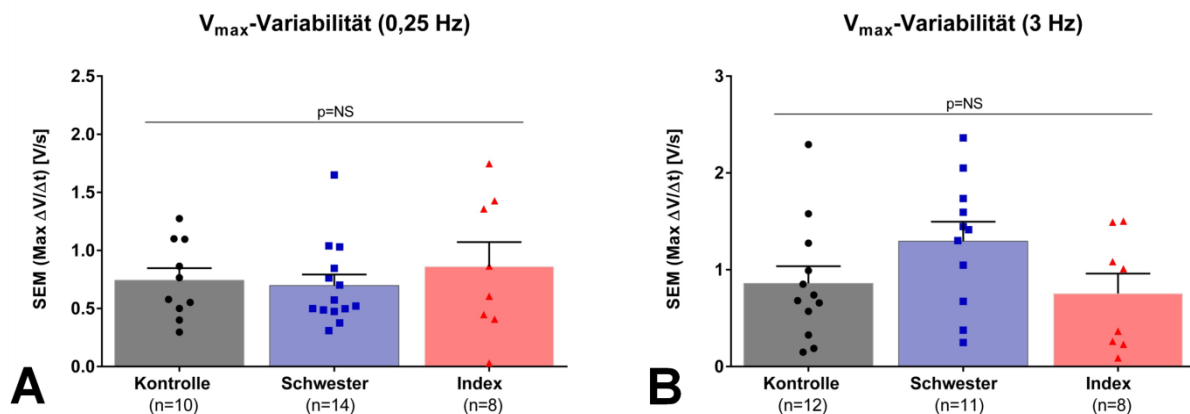


Abb. 22 Keine Unterschiede in der Variabilität der AP-Aufstrichgeschwindigkeit (V_{\max} -Variabilität). Zur Untersuchung der V_{\max} -Variabilität wurden die Standardfehler des Mittelwerts (SEM) der $\text{Max } \Delta V/\Delta t$ -Messungen für jede einzelne Zelle bzw. jeden einzelnen Stimulationszyklus ermittelt. Im Vergleich zwischen den drei Zelllinien zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Variabilität der AP-Aufstrichgeschwindigkeiten, auch nicht bei höheren Stimulationsfrequenzen. Dargestellt sind die V_{\max} -Variabilität bei 0,25Hz (**A**) bzw. 3Hz Stimulation (**B**). SEM($\text{Max } \Delta V/\Delta t$) betrug $0,74 \pm 0,10$ (Kontrolle; n=10) vs. $0,70 \pm 0,94$ (Schwester; n=14) vs. $0,86 \pm 0,21 \text{ V/s}$ (Index; n=8) bei 0,25Hz Stimulation, sowie $0,67 \pm 0,11$ (Kontrolle; n=12) vs. $0,76 \pm 0,19$ (Schwester; n=11) vs. $0,83 \pm 0,22 \text{ V/s}$ (Index; n=8) bei 3Hz Stimulation; $p > 0,05$.

Tab. 15 : V_{\max} -Variabilität

	Kontrolle	n	Schwester	n	Index	n
0,25 Hz: SEM(Max $\Delta V/\Delta t$) [V/s]	$0,74 \pm 0,10$	10	$0,70 \pm 0,94$	14	$0,86 \pm 0,21$	8
0,5 Hz: SEM(Max $\Delta V/\Delta t$) [V/s]	$0,59 \pm 0,11$	12	$0,72 \pm 0,16$	11	$0,88 \pm 0,25$	8
1 Hz: SEM(Max $\Delta V/\Delta t$) [V/s]	$0,69 \pm 0,12$	21	$0,55 \pm 0,83$	21	$0,85 \pm 0,18$	11
2 Hz: SEM(Max $\Delta V/\Delta t$) [V/s]	$0,67 \pm 0,11$	13	$0,76 \pm 0,19$	16	$0,83 \pm 0,22$	11
3 Hz: SEM(Max $\Delta V/\Delta t$) [V/s]	$0,86 \pm 0,18$	12	$1,30 \pm 0,20$	12	$0,75 \pm 0,21$	8

Variabilität der AP-Aufstrichgeschwindigkeit (V_{\max} -Variabilität): Übersicht über die Ergebnisse der V_{\max} -Variabilität der Aktionspotentiale ventrikulärer hiPSC-CMs nach externer Stimulation mit 0,25 / 0,5 / 1 / 2 / 3 Hz. Es wurden die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der $\text{Max } \Delta V/\Delta t$ -Analysen von Einzelzellen ermittelt; Voraussetzung für den Einschluss der Zellen war eine ausreichende Zahl aufeinanderfolgender Aktionspotentiale in einer Stimulationsreihe.

3.2.6 Überblick: Aktionspotentials-Analysen

Tab. 16 : AP-Analysen bei 0,25 Hz Stimulation

	Kontrolle (n = 11)	Schwester (n = 15)	Index (n = 7)
RMP [mV]	-71,43 ± 2,84	-70,23 ± 2,66	-60,33 ± 5,98
APA [mV]	108,54 ± 5,35	116,10 ± 3,40	105,80 ± 8,88
Max $\Delta V/\Delta t$ [V/s]	74,54 ± 7,98	83,31 ± 5,38	68,53 ± 12,00
APD30 [ms]	79,58 ± 17,12	103,13 ± 12,45	115,74 ± 26,15
APD50 [ms]	132,55 ± 23,55	155,79 ± 18,02	220,66 ± 26,52*
APD80 [ms]	193,55 ± 29,98	231,43 ± 26,54	341,91 ± 37,59*. [#]
APD90 [ms]	237,97 ± 30,70	278,64 ± 29,51	393,46 ± 41,59*. [#]

Tab. 17 : AP-Analysen bei 0,5 Hz Stimulation

	Kontrolle (n = 14)	Schwester (n = 15)	Index (n = 10)
RMP [mV]	-69,95 ± 2,37	-71,90 ± 1,71	-60,36 ± 3,67*. [#]
APA [mV]	113,12 ± 4,15	117,55 ± 3,17	104,44 ± 5,20
Max $\Delta V/\Delta t$ [V/s]	80,42 ± 6,49	83,90 ± 5,45	68,64 ± 8,76
APD30 [ms]	94,14 ± 14,29	127,67 ± 11,99	162,59 ± 24,97*
APD50 [ms]	142,28 ± 20,00	180,82 ± 17,26	253,55 ± 28,31*. [#]
APD80 [ms]	202,50 ± 29,98	253,03 ± 24,39	350,92 ± 37,59*. [#]
APD90 [ms]	246,25 ± 25,55	298,31 ± 26,51	390,90 ± 28,17*. [#]

Tab. 18 : AP-Analysen bei 1 Hz Stimulation

	Kontrolle (n = 21)	Schwester (n = 21)	Index (n = 11)
RMP [mV]	-71,00 ± 1,94	-71,88 ± 1,25	-58,78 ± 3,64*. [#]
APA [mV]	113,62 ± 3,30	114,27 ± 2,95	100,73 ± 5,25*. [#]
Max $\Delta V/\Delta t$ [V/s]	77,24 ± 5,62	76,63 ± 5,00	61,67 ± 9,42
APD30 [ms]	103,60 ± 12,23	137,01 ± 12,31	170,02 ± 22,33*
APD50 [ms]	150,02 ± 16,47	185,08 ± 16,23	256,26 ± 28,33*. [#]
APD80 [ms]	207,29 ± 20,27	248,53 ± 21,22	337,36 ± 27,30*. [#]
APD90 [ms]	247,81 ± 21,05	287,60 ± 23,08	370,33 ± 23,85*. [#]

Tab. 19 : AP-Analysen bei 2 Hz Stimulation

	Kontrolle (n = 13)	Schwester (n = 16)	Index (n = 9)
RMP [mV]	-74,99 ± 3,01	-74,48 ± 2,02	-58,75 ± 2,80
APA [mV]	113,33 ± 3,46	117,93 ± 3,16	97,22 ± 6,12*. [#]
Max $\Delta V/\Delta t$ [V/s]	77,36 ± 6,10	81,01 ± 5,21	60,58 ± 9,74
APD30 [ms]	104,42 ± 14,30	118,28 ± 11,98	172,72 ± 32,68*
APD50 [ms]	143,80 ± 20,08	167,87 ± 16,62	240,77 ± 32,84*. [#]
APD80 [ms]	196,85 ± 25,24	242,03 ± 25,46	299,07 ± 24,30*
APD90 [ms]	232,55 ± 26,81	284,40 ± 28,46	271,57 ± 19,56

Tab. 20 : AP-Analysen bei 3 Hz Stimulation

	Kontrolle (n = 12)	Schwester (n = 13)	Index (n = 6)
RMP [mV]	-68,47 ± 3,79	-69,22 ± 2,95	-58,16 ± 3,47
APA [mV]	104,62 ± 3,10	109,15 ± 3,43	97,01 ± 48
Max $\Delta V/\Delta t$ [V/s]	75,39 ± 5,26	77,27 ± 5,71	59,43 ± 11,51
APD30 [ms]	82,33 ± 8,3	93,84 ± 10,94	135,36 ± 31,00
APD50 [ms]	118,07 ± 11,19	140,66 ± 14,94	198,18 ± 30,03
APD80 [ms]	163,37 ± 14,21	203,70 ± 19,33	246,95 ± 20,98
APD90 [ms]	186,03 ± 13,42	235,56 ± 20,32	271,57 ± 22,16

Übersicht über die Ergebnisse der Aktionspotential-Messungen mittels *Whole Cell-Patch Clamp*. Messungen erfolgten an hiPSC-CMs der drei Zelllinien Kontrolle / Schwester / Index nach dreimonatiger Reifung. Aufzeichnung der Aktionspotentiale nach externer Stimulation mit 0,25 / 0,5 / 1 / 2 / 3 Hz; alle Messungen wurden bei RT durchgeführt. Es wurden die Parameter Ruhemembranpotential (RMP), Aktionspotentials-Amplitude (APA), maximale AP-Aufstichgeschwindigkeit (Max $\Delta V/\Delta t$) sowie Aktionspotentialdauer bei 30, 50, 80 bzw. 90% Repolarisation (APD30, -50, -80 bzw. -90) ausgewertet. * p<0,05 vs. Kontrolle; [#] p<0,05 vs. Schwester.

3.3 Auswirkungen der *PKP2*-Mutation auf den spannungsgesteuerten Natriumstrom

Um den Einfluss der in dieser Arbeit betrachteten *PKP2*-Mutation auf die Funktion des spannungsabhängigen Natriumkanals $\text{Na}_V1.5$ zu untersuchen, wurde in Patch-Clamp-Messungen der spannungsgesteuerte Natriumstrom (I_{Na}) näher betrachtet. Veränderungen in der Kinetik des spannungsgesteuerten Natriumstroms können zu folgenschweren Störungen des elektrophysiologischen Gleichgewichts führen. In Herzmuskelzellen wird er hauptsächlich von $\text{Na}_V1.5$ -Kanälen verursacht, die durch ihr charakteristisches Öffnungsverhalten den Ablauf des kardialen Aktionspotentials und die Erregungsweiterleitung beeinflussen.

3.3.1 Reduktion des Spitzennatriumstroms bei *ARVC*-Patientin, Steigerung bei asymptomatischer Mutationsträgerin

Der Spitzennatriumstrom ($I_{\text{Na,max}}$) ist, wie bereits erläutert, hauptsächlich für die schnelle Aufstrichphase des Aktionspotentials verantwortlich und gibt Aussage über die Quantität, also die Dichte des in der Zelle verfügbaren Natriumstroms – ohne jedoch Rückschlüsse zuzulassen über Lokalisation, Funktion oder Menge der vorhandenen Natriumkanäle. Zur Messung des Spitzennatriumstroms wurden die hiPSC-CMs ausgehend von einem Haltepotential von -120mV auf ein zunehmend positiveres Membranpotential depolarisiert und der jeweils messbare Natriumstrom abgeleitet. *Abb. 23.A* zeigt hierzu ausgewählte Originalregistrierungen; man erkennt die zunehmende $I_{\text{Na,max}}$ -Dichte mit steigendem Membranpotential. In der in *Abb. 23.B* abgebildeten sog. I-V-Kurve ist die $I_{\text{Na,max}}$ -Dichte in Abhängigkeit vom Membranpotential als Strom-Spannungs-Beziehung aufgetragen. Die $I_{\text{Na,max}}$ -Werte wurden jeweils auf die Membrankapazität der Einzelzellen normiert ([A/F]). In die Auswertung der $I_{\text{Na,max}}$ -Messungen gingen 10 (Kontrolle), 13 (Schwester) bzw. 8 (Indexpatientin) Zellen aus jeweils 5 Differenzierungsrunden ein. Alle drei Zellgruppen erreichten die maximale Natriumstromdichte bei -30 mV, was auch in etwa dem RMP entspricht, bei dem physiologischerweise der größte Teil der Natriumkanäle geöffnet ist (187, 192). Der Spitzennatriumstrom der Kontrollzellen erreichte an diesem Punkt einen Wert von durchschnittlich $-29,65 \pm 5,62$ A/F. Im Vergleich zur Kontrolle war der Spitzennatriumstrom in den Zellen der Indexpatientin somit um etwas weniger als die Hälfte reduziert, mit einem maximalen I_{Na} von $-17,01 \pm 2,40$ A/F ($p = 0,01$). Überraschenderweise zeigte sich der Spitzennatriumstrom der

asymptomatischen Schwester mit einem $I_{Na,max}$ von $-41,73 \pm 4,81$ A/F signifikant vergrößert im Vergleich nicht nur zur klinisch kranken Mutationsträgerin ($p < 0,0001$), sondern auch im Vergleich zur gesunden Kontrolle ($p = 0,01$).

Darüber hinaus fällt bei Betrachtung der I-V-Kurve auf, dass die spannungsabhängigen Natriumkanäle der hiPSC-CMs der Indexpatientin im Vergleich zu den Zellen der anderen beiden Messgruppen etwas verzögert aktiviert werden. Während der spannungsabhängige Natriumstrom in den Zellen der Schwester und der Kontrolle bereits zwischen -60 und -50 mV messbar ist, öffnen sich die Kanäle der Zellen der Indexpatientin erst bei einem ca. 10 mV positiveren RMP, nämlich zwischen -50 und -40mV.

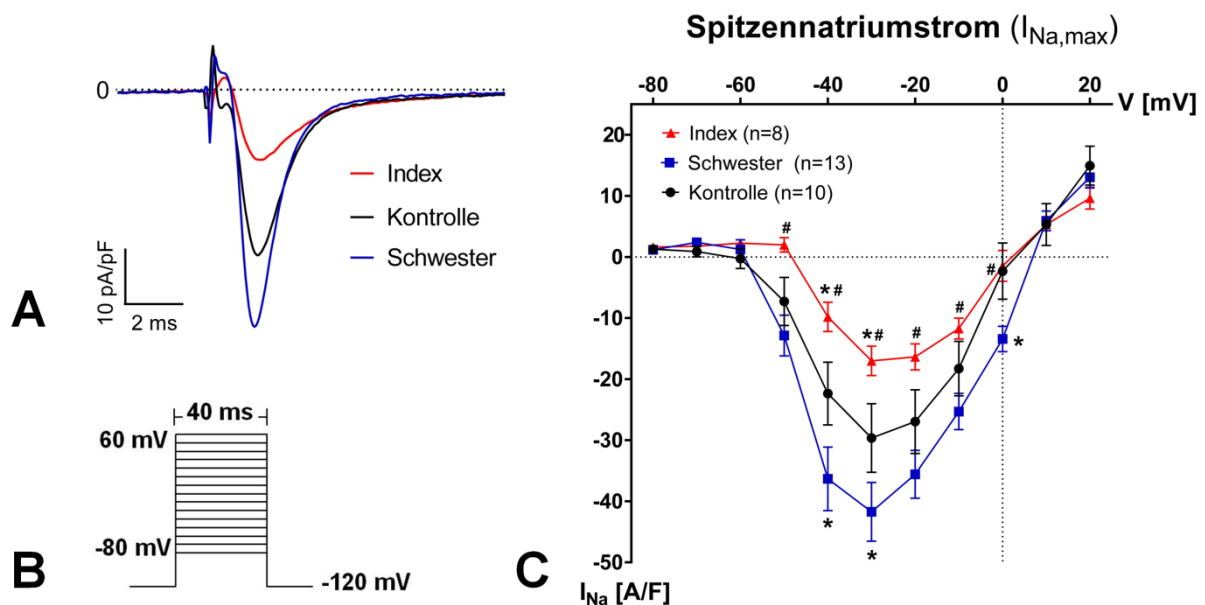


Abb. 23 Spitzennatriumstrom reduziert in Kardiomyozyten der ARVC-Patientin, vergrößert in denen der asymptomatischen Mutationsträgerin. **A.** Repräsentative $I_{Na,max}$ -Originalregistrierungen bei -30mV. **B.** Schematische Darstellung des Messprotokolls für $I_{Na,max}$ -Messungen. **C.** I-V-Kurve zur Darstellung des spannungsabhängigen Natriumstroms; der maximale Spitzennatriumstrom ($I_{Na,max}$) bei einem Membranpotential von -30mV zeigte sich in den hiPSC-CMs der ARVC-Indexpatientin mit $-17,01 \pm 2,40$ A/F vermindert, in denen der asymptomatischen Schwester mit der gleichen Mutation im *PKP2*-Gen hingegen sogar vergrößert mit $-41,73 \pm 4,81$ A/F; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle ($-29,65 \pm 5,62$ A/F); # $p < 0,05$ vs. Schwester.

Um eine Verzerrung der gemessenen $I_{Na,max}$ -Werte durch eine ungleichmäßige Verteilung der Zellgrößen zwischen den drei Zelllinien auszuschließen, wurden die durchschnittlichen Membrankapazitäten verglichen. Die Membrankapazität (C_M) ist ein Marker für die Zellgröße und wurde für jede einzelne Zelle bestimmt. Abb. 24 zeigt eine homogene Verteilung der Membrankapazitäten für alle drei Zelllinien; die Gruppen unterschieden sich hinsichtlich der Zellgröße nicht signifikant voneinander: $C_M = 38,01 \pm 5,26$ (Kontrolle), $43,44 \pm 4,86$ (Schwester) bzw. $37,75 \pm 5,36$ pF (Index).

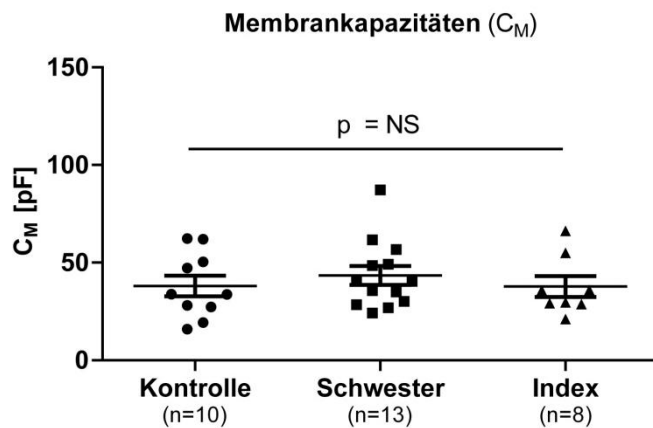


Abb. 24 Keine Unterschiede in der Verteilung der Membrankapazitäten. Zum Ausschluss einer Verzerrung der Ergebnisse der $I_{Na,max}$ -Messungen durch ungleiche Verteilung der Zellgrößen wurden die Membrankapazitäten (C_M) der untersuchten Zellen als Maß für die Zellgröße verglichen. Die für die Messung des Spitzennatriumstroms verwendeten hiPSC-CMs der drei Zelllinien unterschieden sich in Bezug auf die C_M nicht signifikant voneinander: $38,01 \pm 5,26$ (Kontrolle; $n=10$) vs. $43,44 \pm 4,86$ (Schwester; $n=13$) vs. $37,75 \pm 5,36$ pF (Index; $n=8$); $p > 0,05$.

3.3.2 Rechtsverschiebung der Steady-State-(In-)Aktivierung bei Indexpatientin

Neben der quantitativen Messung des maximalen Spitzennatriumstroms sollte das Öffnungsverhalten des spannungsabhängigen Natriumkanals untersucht werden. Eine Übersicht über die erhobenen Ergebnisse ist in *Tab. 24* zu finden.

Über die I-V-Kurve lassen sich zunächst nur Aussagen über die Quantität des verfügbaren Natriumstroms treffen; die I_{Na} -Dichte ist jedoch abhängig von der Aktivierung bzw. Inaktivierung der Natriumkanäle. *Abb. 25* zeigt die sich überschneidenden Kurven für die Steady-State-Aktivierung und -Inaktivierung; als beschreibende Funktion diente jeweils eine Boltzmann'sche Sigmoidalfunktion.

Die schnelle spannungsabhängige Aktivierung von Ionenkanälen, auch **Steady-State-Aktivierung** genannt, gilt als Maß für die I_{Na} -Leitfähigkeit des Kanals in Abhängigkeit vom Membranpotential. *Abb. 25* (rechte Seite) zeigt die I_{Na} -Aktivierungskurve als Funktion des steigenden Membranpotentials. Es zeigt sich die bereits bei der I-V-Kurve beschriebene, verzögerte Aktivierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle in den Zellen der Indexpatientin mit einer halbmaximalen Aktivierung von $V_{1/2} = -32,28 \pm 0,53$ mV ($n = 8$). Gleichzeitig war die Aktivierung in den hiPSC-CMs der asymptomatischen Mutationsträgerin mit $V_{1/2} = -36,98 \pm 0,82$ mV ($n = 13$) beschleunigt im Vergleich zur Kontrolle mit $V_{1/2} = -34,90 \pm 0,93$ mV. Diese Unterschiede waren statistisch signifikant ($p = 0,0002$). Auch der Wachstumsfaktor k_{∞} als Maß für die Aktivierungskinetik war in den hiPSC-CMs der Indexpatientin signifikant reduziert, während er sich in den Zellen der Schwester leicht vergrößert zeigte: $k_{\infty} = 6,00 \pm 0,47$ (Index) vs. $8,38 \pm 0,73$ (Schwester) vs. $8,16 \pm 0,85$ (Kontrolle); $p = 0,0331$.

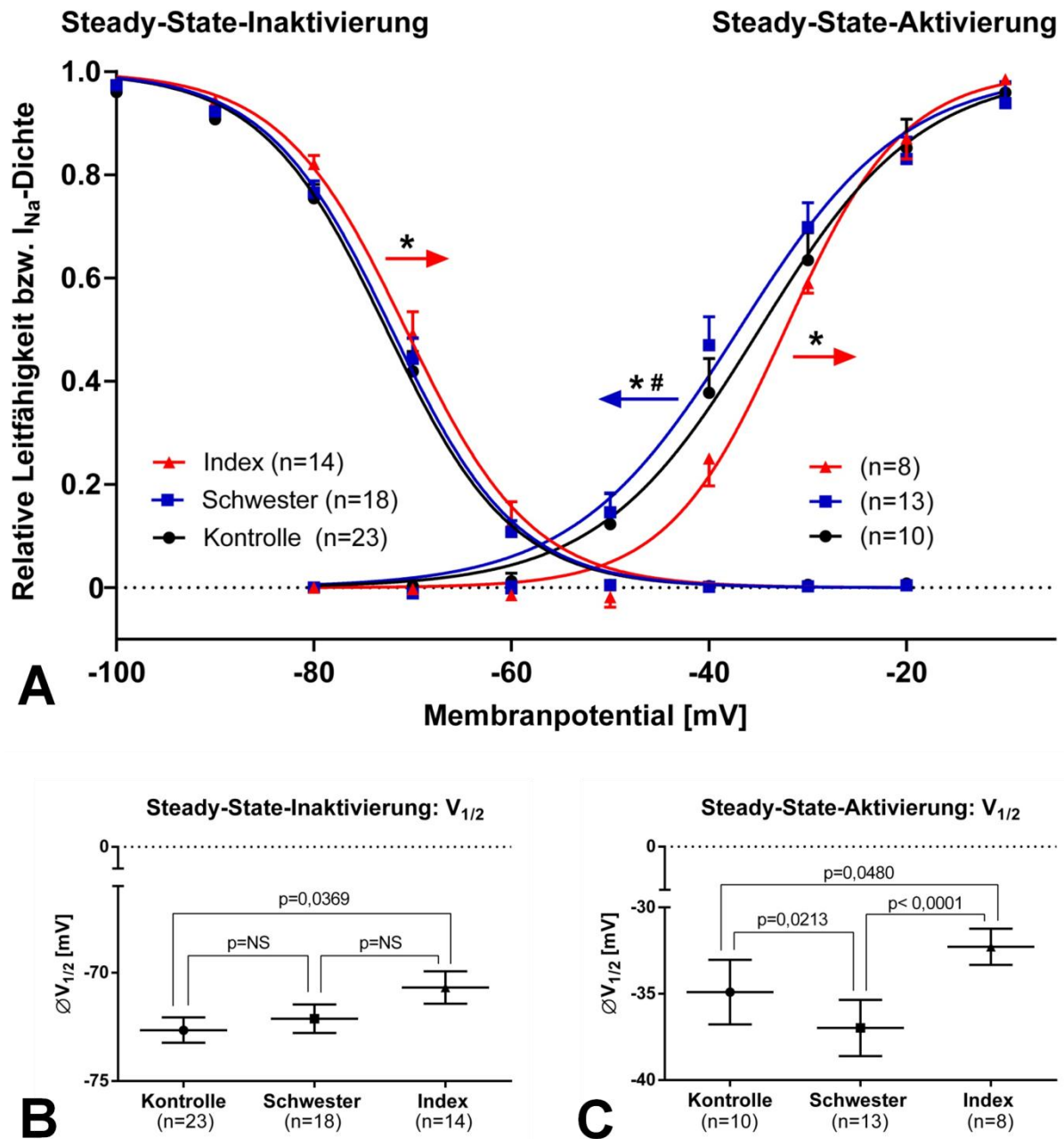


Abb. 25 Veränderte I_{Na} -Aktivierung bzw. -Inaktivierung in hiPSC-CMs der ARVC-Patientin. **A.** Es ist jeweils die Kinetik der Steady-State-Inaktivierung (links) bzw. -Aktivierung (rechts) in Form einer Boltzmann'schen Sigmoidalfunktion dargestellt. **B., C.** Mittelwerte der halbmaximalen (In-)Aktivierung ($V_{1/2}$) mit 95%-Konfidenzintervall. Es zeigt sich eine Rechtsverschiebung der **Steady-State-Inaktivierung** in den Herzmuskelzellen der Indexpatientin, also eine längere Verfügbarkeit der spannungsabhängigen Natriumkanäle mit steigendem Membranpotential; die Schwester der Patientin, Trägerin der gleichen *PKP2*-Mutation, unterschied sich nicht von der Kontrolle. $V_{1/2} = -71,90 \pm 0,38$ (Index; n=14) vs. $-73,63 \pm 0,30$ (Schwester; n=18) vs. $-72,94 \pm 0,34$ mV (Kontrolle; n=23); $k_{\infty} = 5,71$ für alle Zelllinien. Auch bei Betrachtung der **Steady-State-Aktivierung** als Maß für die I_{Na} -Leitfähigkeit zeigte sich eine signifikante Rechtsverschiebung im Sinne einer verzögerten Aktivierung der Natriumkanäle in den hiPSC-CMs der Indexpatientin. Im Gegensatz dazu war die I_{Na} -Aktivierung in den Kardiomyozyten der asymptotischen Mutationsträgerin beschleunigt. $V_{1/2} = -32,28 \pm 0,53$ (Index; n=8) vs. $-36,98 \pm 0,82$ (Schwester; n = 13) vs. $-34,90 \pm 0,93$ (Kontrolle; n = 10) und $k_{\infty} = 6,00 \pm 0,47$ vs. $8,38 \pm 0,73$ vs. $8,16 \pm 0,85$; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. Schwester.

Neben der Aktivierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle wurde auch die Kinetik der **Steady-State-Inaktivierung** näher betrachtet. Sie beschreibt die Verfügbarkeit der Natriumkanäle in Abhängigkeit vom Membranpotential. Zur

Messung der Steady-State-Inaktivierung wurden die hiPSC-CMs mehrmals ausgehend von einem zunehmend positiveren Membranpotential depolarisiert (zum Protokoll s. Abb. 26.A). Mit steigendem Ausgangsmembranpotential waren somit zunehmend weniger Kanäle für die Depolarisation verfügbar und der beim Testpuls gemessene Strom wurde zunehmend kleiner. Interessanterweise fand sich in den Herzmuskelzellen der ARVC-Patientin eine leichte Rechtsverschiebung, d.h. eine leicht verzögerte Steady-State-Inaktivierung im Vergleich zur Kontrolle und zur asymptotischen Schwester. Das Membranpotential der halbmaximalen Aktivierung betrug $V_{1/2} = -71,90 \pm 0,38$ (Index; $n = 14$) vs. $-73,63 \pm 0,30$ (Schwester; $n = 18$) vs. $-72,94 \pm 0,34$ mV (Kontrolle; $n = 23$); $p = 0,0002$. Die Konstante k_{∞} der Abfallskinetik wurde für diese Auswertung für alle drei Zelllinien auf $k_{\infty} = 5,71$ festgesetzt. Beim Vergleich der einzelnen Datenpunkte mittels 2-Wege-ANOVA konnte in den Zellen der Indexpatientin bei einem Membranpotential von -80 bzw. -70 mV eine um $6,6 \pm 2,5$ % bzw. $7,3 \pm 2,5$ % signifikant größere relative I_{Na} -Dichte gemessen werden als in den Kontrollzellen ($p = 0,022$ bzw. $0,010$). D.h. die spannungsabhängigen Natriumkanäle in den Kardiomyozyten der Indexpatienten gehen erst bei positiveren Membranpotential-Werten in den geschlossenen, inaktivierbaren Zustand über und sind somit etwas länger „verfügbar“ für eine erneute Depolarisation. Die hiPSC-CMs der asymptotischen Schwester zeigten hingegen keinen Unterschied im Vergleich zu den Zellen der gesunden Kontrolle.

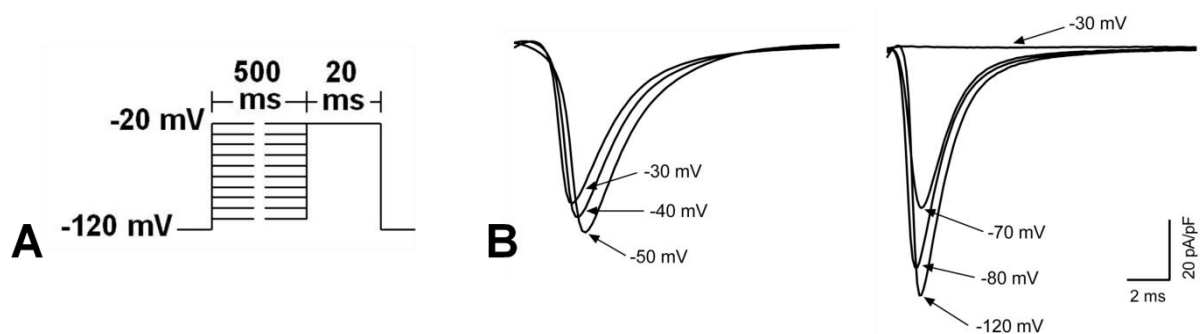


Abb. 26 Messung der I_{Na} -Steady-State-Inaktivierung. A. Schematisches Messprotokoll zur Messung der Steady-State-Inaktivierung: Ausgehend von einem zunehmend positiveren Membranpotential wurde die I_{Na} -Dichte nach einem kurzen depolarisierenden Testpuls ermittelt. Dadurch konnte die fortschreitende Inaktivierung der Natriumkanäle und somit die zunehmend geringere I_{Na} -Verfügbarkeit in Abhängigkeit vom Membranpotential ermittelt werden. B. Repräsentative I_{Na} -Originalregistrierung während Präpuls (links) bzw. Testpuls (rechts).

Wie bereits in Kap. 1.2.3 (Einleitung) ausführlicher beschrieben, gibt es bei einem Membranpotential zwischen -60 und -50 mV eine kurze Phase, in der sich die Mehrheit der spannungsabhängigen Natriumkanäle im inaktiven Zustand befindet, ein kleiner Teil jedoch bereits wieder aktivierbar ist. Diese Überlappung der Steady-

State-Inaktivierung und -Aktivierung, die bereits in Abb. 25 zu erkennen war, bildet den sog. *window current* ab, einen kleinen, aber bei geringer Vergrößerung relevanten Hintergrundstrom (36). In Abb. 27, die einen vergrößerten Ausschnitt dieser Überlappung zeigt, wurde der *window current* farblich hervorgehoben. Dieser zeigt sich verkleinert in den hiPSC-CMs der ARVC-Patientin, als Folge der verzögerten I_{Na} -Aktivierung. Im Gegensatz dazu findet sich in den Kardiomyozyten der asymptomatischen Mutationsträgerin ein leicht vergrößerter *window current*, hervorgerufen durch die Linksverschiebung der Steady-State-Aktivierung und passend zum insgesamt vergrößerten Natriumstrom.

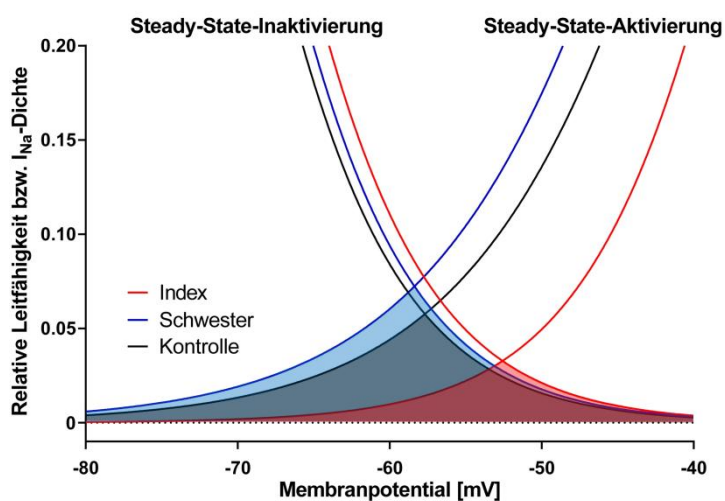


Abb. 27 Window current reduziert bei ARVC-Patientin, vergrößert bei asymptomatischer Mutationsträgerin. Gezeigt ist ein vergrößerter Ausschnitt der sich überlappenden Kurven der Kinetik der Steady-State-Inaktivierung bzw. -Aktivierung des spannungsabhängigen Natriumstroms (vgl. Abb. 25). Das durch die Überlappung der beiden Graphen entstehende Fenster beschreibt einen kleinen Hintergrundstrom, den sog. *window current*. Aufgrund der Rechtsverschiebung der Steady-State-Aktivierung findet sich in den hiPSC-CMs der Indexpatientin ein verringerter *window current*, wohingegen er in den Kardiomyozyten der asymptomatischen Schwester vergrößert ist.

3.3.3 Keine Veränderungen in Erholung nach Inaktivierung und intermediärer Inaktivierung

Ein weiterer Parameter des Öffnungsverhaltens spannungsabhängiger Natriumkanäle ist die sog. **intermediäre Inaktivierung** (I_{IM}). Wie in Kapitel 1.2.3 ausführlicher erläutert, zeichnet sich ein kleiner Teil der Kanäle durch einen langsameren Übergang in den geschlossenen, inaktivierbaren Zustand aus. D.h. diese Kanäle reagieren um einige 100 ms verzögert auf depolarisierende Membranpotential-Veränderungen und es dauert demnach auch länger, bis sie anschließend wieder aktivierbar sind. Zur Ermittlung des Anteils der intermediär inaktivierenden Natriumkanäle wurden die hiPSC-CMs mehrmals für eine zunehmend längere Zeit depolarisiert. Mit steigender Dauer dieses ersten Stimulus (P_1) reagierten zunehmend mehr Kanäle der intermediär inaktivierenden Fraktion auf die Depolarisation und waren anschließend beim zweiten Testpuls (P_2) nicht mehr aktivierbar. Der im Verhältnis zum initial gemessenen I_{Na} -Gesamtstrom ermittelte

Natriumstrom ($I_{Na,P2}$) ist somit ein indirektes Maß für den Anteil an intermediär inaktivierenden Natriumkanälen. Abb. 28.A zeigt, dass mit zunehmender Dauer der initialen Depolarisation (P_1) der Anteil der intermediär inaktivierenden Kanäle immer größer wurde, da die relative I_{Na} -Dichte des zweiten Testpulses (P_2) kontinuierlich abnahm. Bezüglich der Kinetik der intermediären Inaktivierung und dem Anteil der I_{IM} -Natriumkanäle konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Zelllinien festgestellt werden ($p > 0,05$). Die Amplitude A betrug $0,25 \pm 0,03$ (Index; $n = 9$) vs. $0,29 \pm 0,05$ (Schwester; $n = 7$) vs. $0,28 \pm 0,04$ (Kontrolle; $n = 18$); auch die Abfallskonstante K_{IM} unterschied sich mit $0,84 \pm 0,20$ vs. $0,77 \pm 0,27$ vs. $0,72 \pm 0,21 \text{ s}^{-1}$ nicht zwischen den drei Zelllinien.

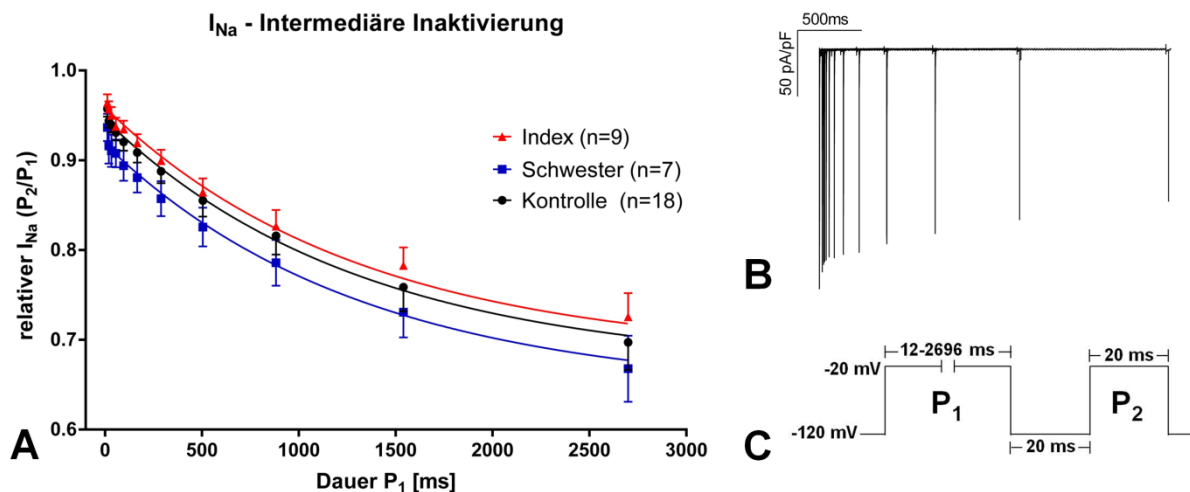


Abb. 28 Keine Unterschiede in der intermediären Inaktivierung. A. Durch zunehmende Verlängerung des initialen Testpulses (P_1) verringerte sich der beim zweiten Testpuls (P_2) gemessene relative I_{Na} , bedingt durch eine zunehmende Beteiligung von intermediär inaktivierenden Natriumkanälen. Die Kinetik der intermediären Inaktivierung (I_{IM}) und der Anteil der I_{IM} -Natriumkanäle unterschieden sich nicht signifikant zwischen den drei Zelllinien; $A = 0,25 \pm 0,03$ vs. $0,29 \pm 0,05$ vs. $0,28 \pm 0,04$; $K_{IM} = 0,84 \pm 0,20$ vs. $0,77 \pm 0,27$ vs. $0,72 \pm 0,21 \text{ s}^{-1}$ (Index ($n=9$) vs. Schwester ($n=7$) vs. Kontrolle ($n=18$)); $p > 0,05$. B. Repräsentative Originalregistrierung einer Messung der intermediären Inaktivierung. C. Schematisches Messprotokoll zur Bestimmung der intermediären Inaktivierung.

Die Inaktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle und deren Erholung nach Inaktivierung sind eng miteinander verknüpft. Als **Erholung nach Inaktivierung** wird die Erholungszeit der spannungsabhängigen Natriumkanäle vom geschlossenen, inaktiven Zustand bis zum Übergang in den geschlossenen, aber wieder aktivierbaren Zustand bezeichnet. Hierfür wurden die Zellen nach einer langen inaktivierenden Depolarisation (P_1) für eine zunehmend längere Zeitdauer repolarisiert, sodass zunehmend mehr Kanäle für eine erneute Depolarisation verfügbar waren (s. Abb. 29.C). Der beim anschließenden depolarisierenden Testpuls (P_2) gemessene Natriumstrom wurde demnach mit steigender

Repolarisationszeit immer größer. In Abb. 29.A ist der auf den Maximalstrom bezogene relative Natriumstrom, gemessen nach dem zweiten Testpuls (P_2), als Funktion der steigenden Repolarisationszeit aufgetragen. Man sieht, dass sich der I_{Na} mit zunehmender Repolarisationszeit immer mehr dem maximalen Gesamtstrom annähert, d.h. mit zunehmender Erholungszeit sind immer mehr Natriumkanäle wieder aktivierbar für eine erneute Depolarisation. Die Kinetik dieser zunehmenden Erholung wurde mittels Zwei-Phasen-Exponentialfunktion näherungsweise beschrieben; zu den Fitting-Parametern s. Tab. 21. Wie bereits bezüglich der intermediären Inaktivierung ergaben sich auch im Hinblick auf die Erholung nach Inaktivierung keine signifikanten Unterschiede zwischen der Indexpatientin ($n = 16$), der asymptotischen Mutationsträgerin ($n = 20$) und der gesunden Kontrolle ($n = 26$). Die Amplitude A sowie die Wachstumskonstanten K_{fast} bzw. K_{slow} unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$). Auch in der multiplen Varianzanalyse mittels 2-Wege-ANOVA konnte keine Verschiebung einzelner Datenpunkte festgestellt werden.

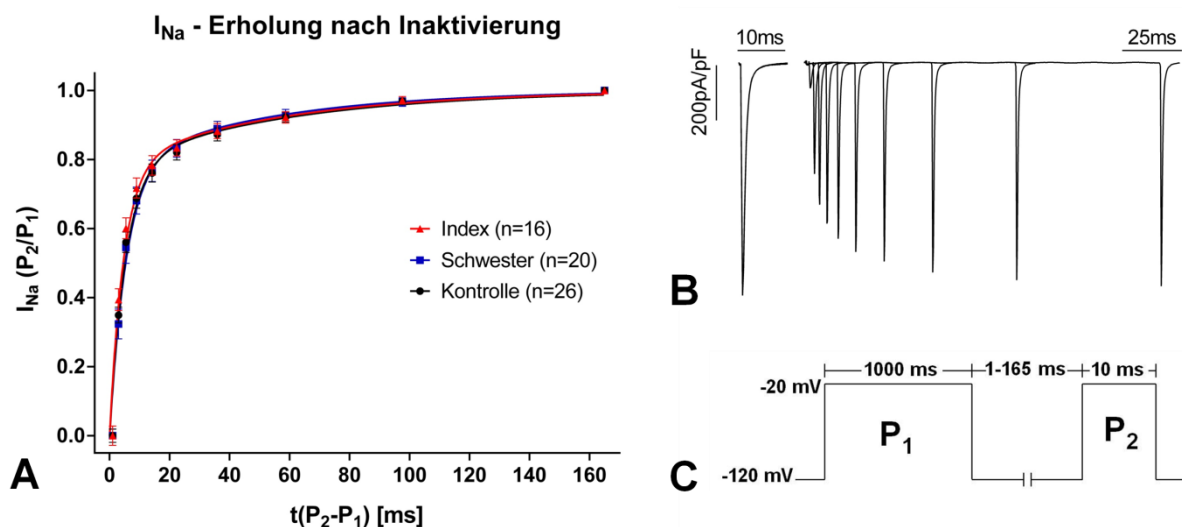


Abb. 29 Unveränderte Erholung nach Inaktivierung in hiPSC-CMs der Mutationsträgerinnen. Zur Messung der Erholung nach Inaktivierung wurden die Natriumkanäle durch eine lange initiale Depolarisation (P_1) inaktiviert (C); mit steigender Repolarisationszeit waren durch einen erneuten depolarisierenden Testpuls (P_2) immer mehr Kanäle wieder aktivierbar. Die Kinetik dieser zunehmenden Erholung wurde durch eine Zwei-Phasen-Exponentialfunktion beschrieben (A). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Erholung nach Inaktivierung zwischen den hiPSC-CMs der Mutationsträgerinnen und der gesunden Kontrolle (Index: $n=16$; Schwester: $n=20$; Kontrolle: $n=26$); $p>0,05$. B. Ausgewählte Originalregistrierung einer Patch-Clamp-Messung der I_{Na} -Erholung nach Inaktivierung.

Tab. 21 : Fitting-Parameter der I_{Na} -Aktivierung und -Inaktivierung

	Kontrolle	n	Schwester	n	Index	n
Steady-State-Aktivierung						
V _{1/2} [mV]	-34,90 ± 0,93	10	-36,98 ± 0,82	13	-32,28 ± 0,53	8
k _∞ [mV]	8,16 ± 0,85		8,38 ± 0,73		6,0 ± 0,47	
Steady-State-Inaktivierung						
V _{1/2} [mV]	-72,32 ± 1,02	23	-73,67 ± 1,59	18	-70,37 ± 1,07	14
k _∞ [mV]	5,41		5,41		5,41	
Erholung nach Inaktivierung						
A	0,77 ± 0,05	26	0,80 ± 0,07	20	0,79 ± 0,05	16
K _{fast} [ms]	0,29 ± 0,03		0,25 ± 0,03		0,34 ± 0,03	
K _{fast} [ms]	0,01 ± 0,003		0,01 ± 0,002		0,01 ± 0,002	
Intermediäre Inaktivierung						
A	0,28 ± 0,04	18	0,29 ± 0,05	7	0,25 ± 0,03	9
K _{IM} [s ⁻¹]	0,72 ± 0,21		0,77 ± 0,27		0,84 ± 0,20	
Plateau	0,66 ± 0,04		0,64 ± 0,05		0,70 ± 0,03	

Fitting-Parameter für die Analyse der I_{Na} -Aktivierung und -Inaktivierung in Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC-CMs). Zur Beschreibung der Steady-State-(In-)Aktivierung wurde eine Boltzmann'sche Sigmoidalfunktion verwendet: $Y(V) = (-)1/(1+\exp((V_{1/2}-V)/k_{\infty}))$. Die Erholung nach Inaktivierung wurde mittels einer Zwei-Phasen-Exponentialfunktion beschrieben: $Y(t) = A_{fast} \cdot (1-\exp(-K_{fast} \cdot t)) + A_{slow} \cdot (1-\exp(-K_{slow} \cdot t))$; hier dargestellt: A_{fast} ; $A_{slow} = 1 - A_{fast}$. Die Kinetik der intermediären Inaktivierung wurde mithilfe einer einfachen Exponentialfunktion nachempfunden: $Y(t) = A \cdot \exp(-K_{IM} \cdot t) + \text{Plateau}$. Messbedingungen (Aktivierung): $[Na]_o$ und $[Na]_i$ 5mM; Messbedingungen (Inaktivierung): $[Na]_o$ 135mM, $[Na]_i$ 10mM; Messung bei RT.

3.3.4 Verringerter später Natriumstrom nur in Zellen der ARVC-Patientin

Zu guter Letzt wurde die späte Komponente des spannungsabhängigen Natriumstroms ($I_{Na,L}$) untersucht. Ein vergrößerter später Natriumstrom birgt ein deutlich proarrhythmogenes Potential und spielt eine wichtige Rolle beispielsweise in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz (104, 105). Abb. 30.A zeigt die $I_{Na,L}$ -Originalregistrierungen dreier repräsentativer Zellen. Interessanterweise wurde in den Zellen der symptomatischen ARVC-Patientin ein signifikant verminderter später Natriumstrom im Vergleich zu den Zellen der Kontrolle gemessen ($p = 0,034$; s. Abb. 30.B). Zwischen Kontrolle und asymptomatischer Mutationsträgerin konnte hingegen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,75$). Die $I_{Na,L}$ -Integrale (50 - 500 ms) betrugen $-106,2 \pm 10,30$ (Kontrolle; $n = 16$) vs. $-95,55 \pm 11,88$ (Schwester; $n = 15$) vs. $-61,75 \pm 9,64 \text{ AmsF}^{-1}$ (Indexpatientin; $n = 9$). Zur Auswertung wurden die $I_{Na,L}$ -Integrale zwischen 50 und 500 ms, normiert auf die Membrankapazität, ermittelt. Um auch hier auszuschließen, dass die Unterschiede des späten Natriumstroms durch eine versehentlich ungleiche Verteilung der Zellgrößen innerhalb der drei Zelllinien bedingt sein könnten, wurden im Folgenden die Membrankapazitäten (C_M) der untersuchten Zellen als Maß für die Zellgröße aufgetragen. C_M betrug jeweils

35,80 ± 5,45 (Index; n = 9), 38,85 ± 5,76 (Schwester; n = 15) bzw. 34,47 ± 4,85 pF (Kontrolle; n = 16). Abb. 31.A zeigt eine homogene Verteilung der Zellgrößen zwischen den hiPSC-CMs der drei untersuchten Personen; ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Membrankapazitäten konnte nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$ beim Vergleich aller Zellgruppen). Mittels linearer Regression konnte bei $p = 0,73$ (Kontrolle), $p = 0,34$ (Schwester) bzw. $p = 0,47$ (Index) ein linearer Zusammenhang zwischen der Größe der untersuchten Zellen und der Höhe der gemessenen $I_{Na,L}$ -Werten ausgeschlossen werden (s. Abb. 31.B-D).

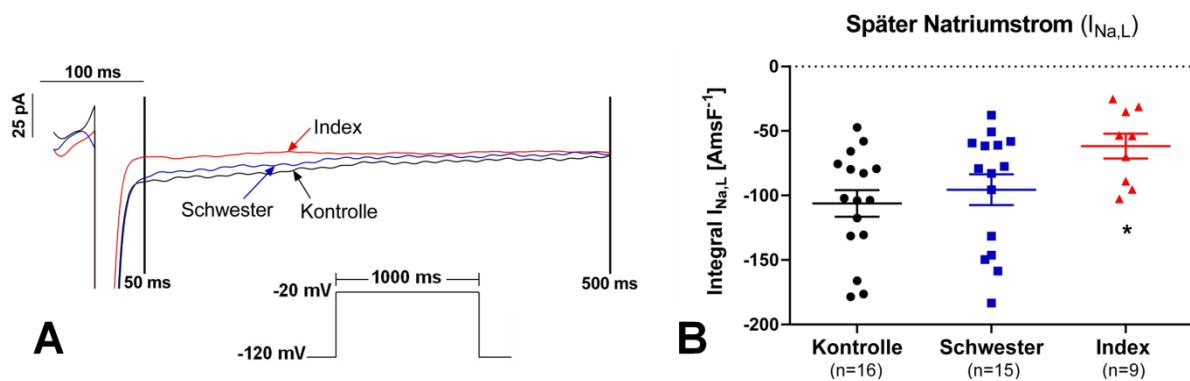


Abb. 30 Reduzierter später Natriumstrom ($I_{Na,L}$) in den hiPSC-CMs der Indexpatientin. A. $I_{Na,L}$ -Originalregistrierungen dreier exemplarischer Zellen aus den jeweiligen Zelllinien. B. $I_{Na,L}$ zeigte sich mit $-61,75 \pm 9,64 \text{ AmsF}^{-1}$ signifikant verringert in den Zellen der Indexpatientin (n=9), nicht jedoch der asymptomatischen Schwester mit $-95,55 \pm 11,88 \text{ AmsF}^{-1}$ (n=15); * $p=0,034$ vs. Kontrolle ($-106,2 \pm 10,30 \text{ AmsF}^{-1}$; n=16).

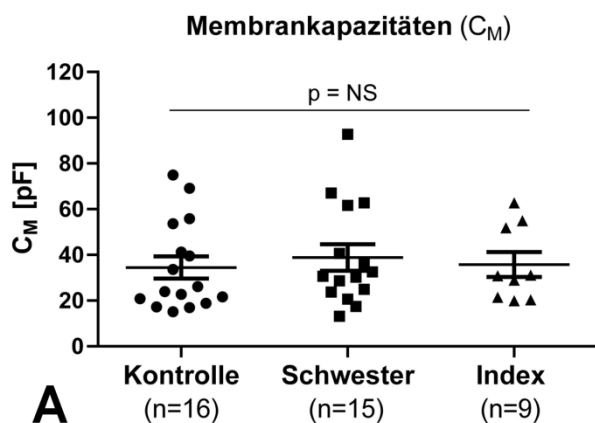
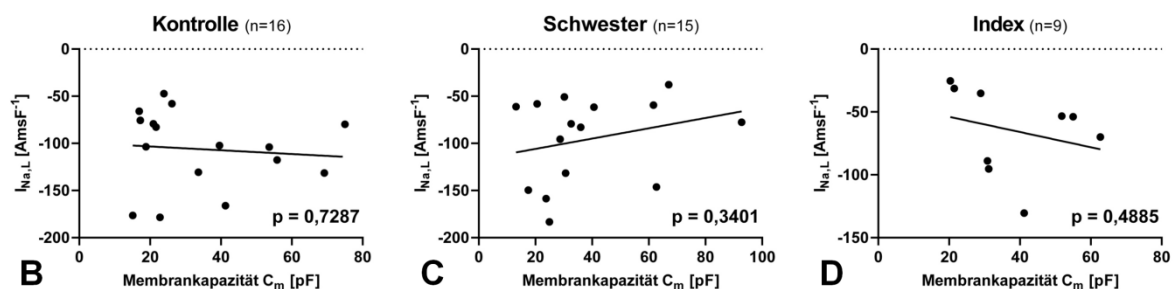


Abb. 31 Kein Zusammenhang zwischen $I_{Na,L}$ und Zellgröße. A. Die für die $I_{Na,L}$ -Messungen verwendeten hiPSC-CMs der drei Zelllinien unterschieden sich hinsichtlich der Membrankapazität (C_M) als Marker für die Zellgröße nicht signifikant voneinander; $C_M = 34,47 \pm 4,85$ (Kontrolle; n=16) vs. $38,85 \pm 5,76$ (Schwester; n=15) vs. $35,80 \pm 5,45 \text{ pF}$ (Index; n=9); $p > 0,05$. B-D. In der linearen Regression ergab sich für keine der drei Zelllinien ein signifikanter Zusammenhang zwischen Zellgröße und Höhe des gemessenen späten Natriumstroms.



Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der erstmals beschriebenen *Loss-of-Function*-Mutation *c.1664delT* im *PKP2*-Gen auf die Kinetik des kardialen Aktionspotentials sowie den spannungsabhängigen Natriumstrom untersucht. Als Zellmodell dienten Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC-CMs) einer ARVC-Patientin und ihrer bisher klinisch asymptomatischen Schwester, beide Trägerinnen der genannten Mutation, sowie einer gesunden weiblichen Kontrollperson. Es zeigten sich deutliche Veränderungen im elektrophysiologischen Verhalten der Zellen der ARVC-Patientin sowie relevante Unterschiede zwischen den beiden Mutationsträgerinnen. Die Erkenntnisse aus den Ergebnissen dieser Arbeit sind somit nicht nur ein wichtiger Schritt auf dem weiteren Weg hin zu einem gesteigerten Verständnis der Pathophysiologie der ARVC. Sie liefern darüber hinaus einen entscheidenden Beitrag zur Aufdeckung zellulärer Veränderungen, die festlegen, ob ein Mutationsträger klinische Symptome entwickelt oder nicht.

4.1 Veränderungen der Funktion des $\text{Na}_v1.5$

Es sind zahlreiche Wechselwirkungen zwischen dem desmosomalen Protein Plakophilin-2 und benachbarten Glanzstreifen-Proteinen beschrieben. Ins Zentrum des Interesses ist in den vergangenen Jahren die enge Kolo-kalisation mit dem spannungsabhängigen Natriumkanal $\text{Na}_v1.5$ gerückt (173). Veränderungen in der Funktion des $\text{Na}_v1.5$ sind mit zahlreichen kardialen Erkrankungen assoziiert und stellen die Grundlage verschiedener Herzrhythmusstörungen dar (63, 102). Im Rahmen der Pathogenese der ARVC gab es bereits wichtige Hinweise auf eine Beteiligung des $\text{Na}_v1.5$ (170–172). Insbesondere der häufigste Subtyp, ARVC Typ 9, scheint als Folge verschiedener Mutationen im *PKP2*-Gen mit Veränderungen im spannungsgesteuerten Natriumstrom einherzugehen. *PKP2* beeinflusst sowohl direkt als auch indirekt über Ankyrin G bzw. Connexin43 die Funktion und bisweilen Lokalisation des $\text{Na}_v1.5$ (s. Kap. 1.5.2). In dieser Arbeit sollte mittels *Whole-Cell*-Patch-Clamp-Technik zunächst der Einfluss der o.g. *PKP2*-Mutation auf den Spitzennatriumstrom ($I_{\text{Na},\text{max}}$) betrachtet werden. Außerdem wurde zum ersten Mal

das Öffnungsverhalten der spannungsabhängigen Natriumkanäle an hiPSC-CMs einer ARVC-Patientin untersucht.

4.1.1 Reduzierter Spitzennatriumstrom durch verzögerte Steady-State-Aktivierung

Bereits in mehreren Arbeiten wurde eine Verringerung des Spitzennatriumstroms ($I_{Na,max}$) als Folge von *PKP2*-Mutationen beschrieben. Durch eine Veränderung der Lokalisation des $Na_v1.5$ bzw. dessen korrekter Verankerung an den Glanzstreifen scheint eine gestörte *PKP2*-Expression zu einem Funktionsverlust des Natriumkanals mit insgesamt verringerter Aktivität zu führen (170–172). In der vorliegenden Arbeit konnte diese Reduktion des Spitzennatriumstroms als Folge eines *PKP2*-Verlusts bestätigt werden. In Immunofluoreszenzfärbungen mit Anti-*PKP2* konnte zunächst die insgesamt reduzierte *PKP2*-Expression in den hiPSC-induzierten Kardiomyozyten der klinisch kranken Mutationsträgerin festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte sich in Patch-Clamp-Messungen ein um knapp die Hälfte verringerter $I_{Na,max}$ in den Kardiomyozyten der ARVC-Patientin. Der Spitzennatriumstrom gibt Auskunft über die Gesamtdichte an Natriumstrom in der Zelle und ist somit ein Maß für die Anzahl funktionstüchtiger und korrekt lokalisierter Natriumkanäle (58). Eine Reduktion des Spitzennatriumstroms kann die Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials verzögern und in der Folge zu Störungen der Erregungsweiterleitung zwischen benachbarten Kardiomyozyten führen (55, 88). Als mögliche Folge des durch den *PKP2*-Verlust verringerten Spitzennatriumstroms konnte in neonatalen sowie adulten Ratten-Kardiomyozyten bereits eine verlangsamte Ausbreitungsgeschwindigkeit elektrischer Erregung beobachtet werden (170). Wie in Kap. 1.3.1 ausführlich erläutert, ist eine gestörte Erregungsleitung ein prädisponierender Faktor für die Entstehung kreisender Erregungen. Dies wäre also ein möglicher Mechanismus der Arrhythmogenese bei ARVC-Patienten.

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem zum – nach aktueller Kenntnis – ersten Mal das Öffnungsverhalten des spannungsabhängigen Natriumkanals an hiPSC-CMs einer ARVC-Patientin im Vergleich zu einer asymptomatischen Trägerin der gleichen *PKP2*-Mutation untersucht; es wurden dabei die Parameter Steady-State-Aktivierung und -Inaktivierung, intermediäre Inaktivierung sowie Erholung nach Inaktivierung betrachtet. Als wesentlicher Befund konnte eine verzögerte Aktivierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle in den hiPSC-CMs der ARVC-Patientin beobachtet werden; die Kanäle öffneten erst bei einem RMP von ca. -45 mV,

während die der asymptotischen Mutationsträgerin sowie der Kontrollperson schon bei durchschnittlich -55 mV aktiviert wurden. Dies kann – zumindest teilweise – die Verringerung des Gesamtnatriumstroms in den Kardiomyozyten der Indexpatientin erklären. Im Gegensatz dazu war die Steady-State-Inaktivierung kaum verändert. Die allenfalls leichte Rechtsverschiebung in den hiPSC-CMs der ARVC-Patientin ist möglicherweise Ausdruck einer versuchten Kompensation des reduzierten Natriumstroms. Da die Kinetik der Steady-State-Inaktivierung im Vergleich zur -Aktivierung nur leicht verändert ist, ergibt sich darüber hinaus ein insgesamt kleinerer *window current* in den hiPSC-CMs der ARVC-Patientin. Damit gerät dessen Rolle als potentiell arrhythmogenes Substrat (s. Kap. 1.2.3) in den Hintergrund. Bezüglich der intermediären Inaktivierung sowie der Erholung nach Inaktivierung konnten keine relevanten Veränderungen festgestellt werden. In den wenigen bisher stattgefundenen Untersuchungen des I_{Na} -Gatings als Folge von *PKP2*-Mutationen hatten sich im Tiermodell meist eine Linksverschiebung der Steady-State-Inaktivierung, eine verstärkte intermediäre Inaktivierung sowie eine verzögerte Erholung nach Inaktivierung gezeigt (170, 171). In anderen Arbeiten konnten wiederum, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, keine Veränderungen des Öffnungsverhaltens festgestellt werden (172). Der verringerte Spitzennatriumstrom in den Herzmuskelzellen der ARVC-Patientin mit *PKP2*-Mutation *c.1664delT* scheint somit am ehesten durch eine verzögerte Aktivierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle bedingt zu sein. Darüber hinaus kommt auch eine gestörte Expression bzw. Lokalisation der Kanäle als Ursache des reduzierten Natriumstroms in Frage. Passend dazu ließ sich in anderen Arbeiten bei ARVC-Patienten mit desmosomalen Mutationen eine verringerte Lokalisation des $Na_v1.5$ an den Glanzstreifen feststellen (170, 176). In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Immunofluoreszenzfärbungen konnte diese Expressionsminderung oder Umverteilung des $Na_v1.5$ nicht bestätigt werden. Auch die Arbeitsgruppe um Cerrone et al. fand keine Unterschiede in der $Na_v1.5$ -Expression als Folge einer Mutation im *PKP2*-Gen trotz reduzierter I_{Na} -Dichte (171, 172). Die Verringerung des Natriumspitzenstroms als Folge der hier untersuchten *PKP2*-Mutation scheint also weniger durch einen Expressionsverlust bzw. eine Verteilungsstörung der spannungsgesteuerten Natriumkanäle bedingt zu sein. Vielmehr könnte die Verzögerung der I_{Na} -Aktivierung für die Abnahme des Gesamtnatriumstroms verantwortlich sein. Eine Lokalisationsstörung des $Na_v1.5$, z.B. im Sinne einer

mangelnden Verankerung an den Glanzstreifen, kann aufgrund der methodischen Einschränkungen der hier durchgeführten Immunofluoreszenzfärbungen (s. Kap. 4.5.2) trotzdem nicht endgültig ausgeschlossen werden.

4.1.2 Vergrößerter Spitzennatriumstrom - ein Kompensationsmechanismus?

Von besonderem Interesse war die Gegenüberstellung der Ergebnisse der I_{Na} -Messungen zwischen klinisch kranker ARVC-Patientin und ihrer asymptomatischen Schwester, beide Trägerinnen der gleichen *PKP2*-Mutation. Überraschenderweise konnten in den Zellen der asymptomatischen Mutationsträgerin ein vergrößerter Spitzennatriumstrom sowie eine beschleunigte I_{Na} -Aktivierung gemessen werden, nicht nur im Vergleich zur Patientin selbst, sondern sogar zur gesunden Kontrolle. Dies ist der erste Nachweis einer gesteigerten I_{Na} -Dichte in Herzmuskelzellen einer *PKP2*-Mutationsträgerin. Da die Mutationsträgerin keine klinischen Symptome aufweist, scheint der vergrößerte Natriumstrom (bislang) keine pathogenen Effekte zu haben. Stattdessen dient er möglicherweise als Kompensationsmechanismus einer gestörten Gap-Junction-Kommunikation. In FRAP-Messungen (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), welche den (elektro-)chemischen Stoffaustausch benachbarter Kardiomyozyten untersuchen, konnte nämlich in den hiPSC-CMs beider Mutationsträgerinnen eine vergleichbare Reduktion der interzellulären Kommunikation nachgewiesen werden (s. Abb. 32).

Die Integrität der Gap-Junction-Struktur ist essenziell für eine physiologische Weiterleitung elektrischer Impulse zwischen benachbarten Kardiomyozyten. Mutationen im *PKP2*-Gen sind mit einem Verlust an Cx43, dem Hauptbestandteil der Gap Junctions, assoziiert und führen über Gap-Junction-Remodeling zu einer gestörten elektrischen Zell-Zell-Kommunikation (134, 159, 162, 169). Jüngere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die Störung der Erregungsausbreitung aufgrund einer verminderten Gap-Junction-Expression alleine meist nicht ausreicht, um zu gravierenden Veränderungen des elektrophysiologischen Gleichgewichts zu führen (135, 193). Stattdessen kann eine ausreichend große Dichte an spannungsgesteuertem Natriumstrom eine relevante Störung der Erregungsweiterleitung zunächst verhindern (194). Es wäre also denkbar, dass die Störung der Gap-Junction-Kommunikation in den hiPSC-CMs der Schwester als Folge des *PKP2*-Verlusts alleine noch nicht ausreicht, um Arrhythmien zu induzieren. Kommt jedoch noch ein reduzierter Spitzennatriumstrom hinzu, wie es bei der ARVC-

Patientin der Fall ist, führt dies möglicherweise zur ausschlaggebenden Verzögerung der Erregungsausbreitung und somit zum Auftreten von Herzrhythmusstörungen.

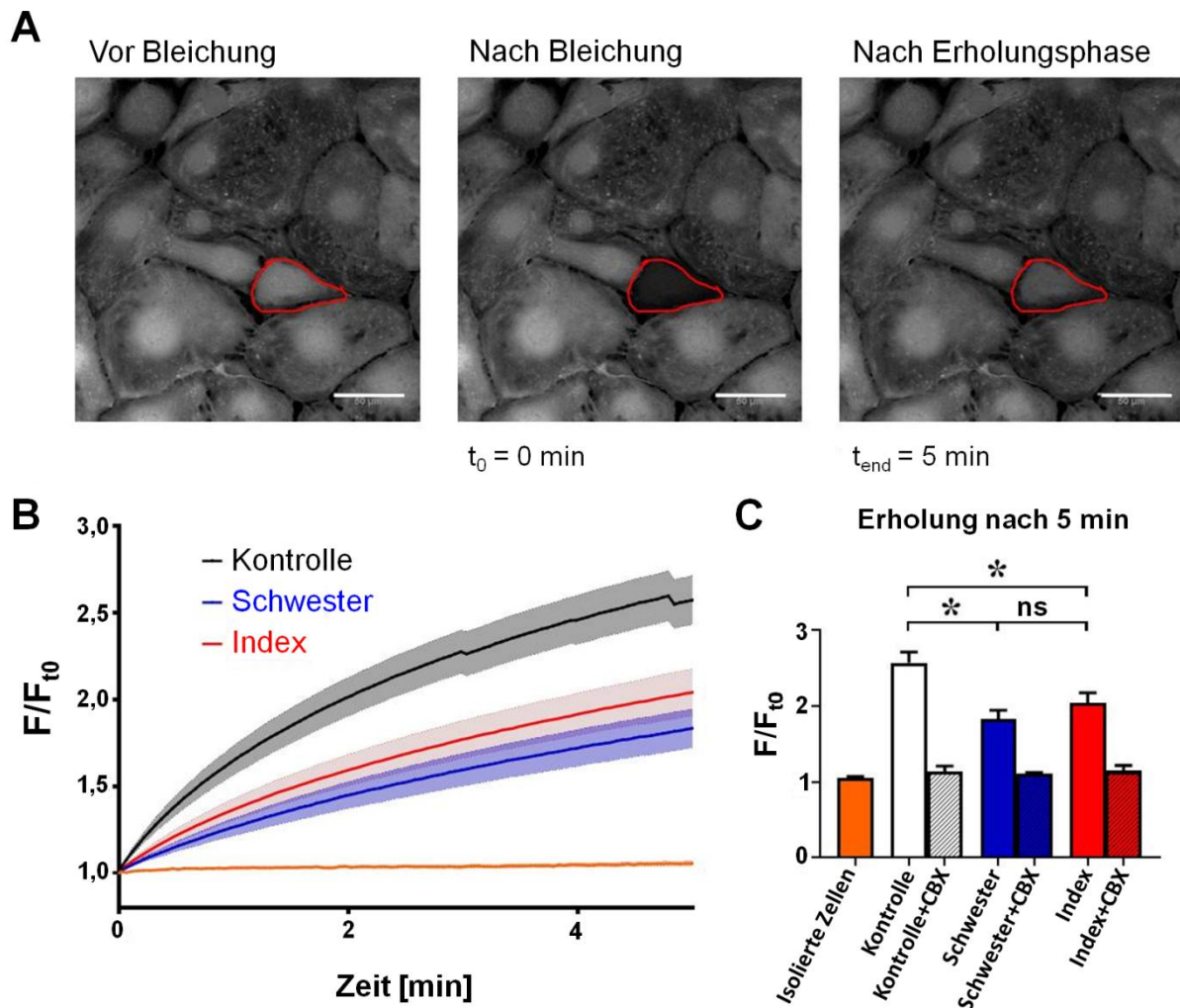


Abb. 32 Gestörte Gap-Junction-Kommunikation in hiPSC-CMs der Mutationsträgerinnen. In FRAP-Messungen zur Untersuchung der elektrochemischen Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions zeigte sich eine reduzierte Erholung des Fluoreszenz-Signals 5 Min. nach Bleichung in den hiPSC-induzierten Kardiomyozyten der beiden *PKP2*-Mutationsträgerinnen (Index und Schwester). Als Kontrolle, dass der Effekt tatsächlich Gap-Junction-vermittelt ist, wurden die Experimente mit dem Connexin-Inhibitor Carbenoxolon (CBX) wiederholt (Daten mit freundlicher Genehmigung von Karin P. Hammer).

Bestätigt sich dieser Unterschied in der Gesamtnatriumstromdichte bei weiteren Mutationsträgern, könnte dies möglicherweise zu diagnostischen Zwecken genutzt werden. Bei Patienten mit Brugada-Syndrom (BrS), bei denen ein verringerter Spitzennatriumstrom beobachtet wird, werden zur Demaskierung der Erkrankung Klasse-I-Antiarrhythmika eingesetzt, die den spannungsabhängigen Natriumkanal blockieren (195). Durch die dadurch ausgelöste zusätzliche Verringerung des Natriumstroms kommt es zur Störung der Erregungsleitung und zu charakteristischen EKG-Veränderungen. Eine ähnliche pharmakologische Provokation wäre auch bei

Trägern einer mit der ARVC assoziierten Mutation denkbar. Im *PKP2*-heterozygoten Mausmodell wurde ein verstärkter Effekt des Natriumkanalblockers Flecainid mit Verzögerung der Erregungsleitung und Auslösung von Herzrhythmusstörungen beobachtet (171). Man könnte also spekulieren, dass Mutationsträger mit reduzierter I_{Na} -Dichte ähnlich wie BrS-Patienten auf die Gabe von Natriumkanalblockern mit (verstärkten) EKG-Veränderungen bzw. Arrhythmien reagieren, während ein protektiv vergrößerter Spitzennatriumstrom diese verhindern könnte. Dieser Test wäre somit eine Möglichkeit zur Risikostratifizierung von Mutationsträgern. Die wenigen Beschreibungen über den Einsatz von intravenösen Natriumkanalblockern bei ARVC-Patienten warnen jedoch vor einem hohen Risiko für z.T. lebensbedrohliche Rhythmusereignisse (196). Außerdem beeinflussen Natriumkanalblocker wie Flecainid auch andere Ionenkanäle wie den einwärtsgerichtenden Kaliumkanal Kir2.1 (197), der aufgrund seiner Lokalisation an den Glanzstreifen eine mögliche Rolle in der Pathogenese der ARVC spielen könnte (s. unten). Aus diesem Grund bleibt abzuwarten, ob ein diagnostischer Einsatz von Natriumkanalblockern in Zukunft für den klinischen Alltag relevant werden könnte.

4.1.3 Untergeordnete Rolle des späten Natriumstroms in der Pathogenese der ARVC

Die späte Komponente des Natriumstroms ($I_{Na,L}$) ist Teil der depolarisierenden Einwärtsströme während der Plateauphase des kardialen Aktionspotentials und trägt über den langen, kontinuierlichen Einstrom von Natriumionen mehr zur intrazellulären Natriumkonzentration bei als der kurze Spitzennatriumstrom (65). Ein vergrößerter $I_{Na,L}$, dem ein entscheidendes proarrhythmogenes Potential zukommt, findet sich beispielsweise als Folge von hereditären *SCN5A*-Mutationen oder im Rahmen der Herzinsuffizienz. Bei letzterer liegt dem gesteigerten persistierenden Natriumstrom eine vermehrte Phosphorylierung des $Na_v1.5$ durch die CaMKII mit nachfolgender verstärkter intermediärer Inaktivierung zugrunde (116).

Entgegen der pathophysiologischen Mechanismen der Herzinsuffizienz fand sich in den hiPSC-CMs der ARVC-Patientin ein reduzierter später Natriumstrom, passend zum insgesamt verringerten Natriumstrom. In den Zellen der asymptomatischen Mutationsträgerin zeigten sich hingegen keine Veränderungen im Vergleich zur gesunden Kontrolle. Dies ist das erste Mal, dass eine Abnahme des $I_{Na,L}$ in Kardiomyozyten einer ARVC-Patientin beobachtet wurde. Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen des persistierenden Natriumstroms in dieser Patientengruppe,

sodass vergleichende Aussagen schwierig sind. Insbesondere an hiPSC-CMs wurde der $I_{Na,L}$ mittels Patch-Clamp-Technik kaum untersucht. In einer Arbeit von El-Battrawy zeigte sich in hiPSC-induzierten Kardiomyozyten eines ARVC-Patienten mit Mutation im *DSG2*-Gen neben einem reduzierten Spitzennatriumstrom ein unveränderter später Natriumstrom (198). Eine vermehrte Aktivität der CaMKII im Rahmen der Pathogenese der ARVC, wie sie zuletzt von Van Opbergen et al. (199) zur Diskussion gestellt wurde, kann demnach – zumindest in unserem Zellmodell – bislang nicht bestätigt werden. Dafür spricht neben dem verringerten späten Natriumstrom auch die unveränderte intermediäre Inaktivierung in den hiPSC-CMs der Mutationsträgerinnen. Stattdessen wäre eher eine verminderte Interaktion zwischen CaMKII und $Na_v1.5$ bei ARVC-Patienten zu diskutieren. Ursächlich könnte ein gestörter Transport der beiden Glanzstreifen-Proteine durch Veränderung der AnkG-Expression sein. Dem multifunktionalen Ankerprotein Ankyrin G wird eine wichtige Rolle für die Störung der Glanzstreifenarchitektur im Rahmen der ARVC zugeschrieben (s. Kap. 1.5.2). Im Mausmodell wurde bei Verlust von PKP2 eine reduzierte Expression von AnkG beobachtet (125). Ein AnkG-Verlust führte wiederum zu einem fehlerhaften Transport verschiedener Glanzstreifenproteine, darunter der CaMKII, an ihren Zielort (76, 175). In der Folge zeigte sich eine Abnahme der CaMKII-abhängigen Phosphorylierung des $Na_v1.5$ mit verringertem Spitzen- und unverändertem späten Natriumstrom (175). Nach Stimulation mit Isoproterenol konnte im Gegensatz zum Wildtyp keine $I_{Na,L}$ -Steigerung ausgelöst werden, was für den verringerten regulatorischen Einfluss der CaMKII spricht (175). Wurde der Signalweg durch eine Mutation im Gen für $\beta 4$ -Spectrin, einem wichtigem Modulator von Ionenkanal-Aggregationen und Proteinkomplexen, gestört, zeigte sich bereits initial eine reduzierte $I_{Na,L}$ -Dichte (76). Man könnte also spekulieren, dass eine gestörte AnkG-Aktivität als Folge der hier untersuchten *PKP2*-Mutation zu einer verringerten Phosphorylierung des $Na_v1.5$ durch die CaMKII führt und dadurch die Dichte des persistierenden Natriumstroms abnimmt. Diese Hypothese gilt es durch weitere Untersuchungen zu überprüfen. Während der Beitrag eines vergrößerten $I_{Na,L}$ zur kardialen Arrhythmogenese wissenschaftlich belegt ist, sind die Auswirkungen eines reduzierten späten Natriumstroms noch nicht abschließend geklärt (s. (67)). Insgesamt lässt sich aber sagen, dass der späten Komponente des spannungsabhängigen Natriumstroms im Rahmen der Arrhythmogenese bei ARVC-Patienten höchstwahrscheinlich eine weniger entscheidende Rolle zukommt.

4.2 Proarrhythmogene Veränderungen der Aktionspotentials-Kinetik

Neben den beschriebenen Veränderungen im spannungsgesteuerten Natriumstrom konnten auch in Bezug auf das kardiale Aktionspotential wesentliche Unterschiede in den hiPSC-induzierten Kardiomyozyten der ARVC-Patientin festgestellt werden. Diese lassen sich nur teilweise durch die verringerte I_{Na} -Dichte erklären, sodass noch weitere Mechanismen eine Rolle für die Arrhythmogenese spielen müssen.

4.2.1 Elektrische Instabilität durch erhöhtes Ruhemembranpotential

Ein Mechanismus für die Entstehung kardialer Arrhythmien ist die gesteigerte spontane elektrische Aktivität ventrikulärer Kardiomyozyten (s. Kap. 1.3.2). Diese entsteht unter anderem durch ein depolarisiertes bzw. instabiles Ruhemembranpotential (RMP) (38). Die Besonderheit, die sich bei der Arbeit an Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC-CMs) ergibt, ist deren bekannt depolarisiertes RMP sowie ihre spontane elektrische Aktivität. Dies liegt darin begründet, dass hiPSC-CMs auch nach längerer Reifung ein etwas anderes Ionenkanalmuster aufweisen als adulte humane Herzmuskelzellen. Unter anderem findet sich bei Kardiomyozyten, die aus Stammzellen gewonnen wurden, eine sehr geringe Expression des einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanals Kir2.1 (I_{K1}) (187), welcher wesentlich für die Aufrechterhaltung eines stabilen RMP verantwortlich ist. Eine weitere Ursache für die elektrische Instabilität von hiPSC-CMs ist das erhöhte Expressionslevel von HCN-Kanälen (200, 201). Diese nichtselektiven Kationenkanäle, auch *funny channels* genannt, führen durch ihren unselektiven Kationeneinstrom u.a. in adulten Schrittmacherzellen zu spontanen Depolarisationen und tragen somit zu deren elektrischer Automatie bei (51). Aufgrund der langen Reifungszeit von drei Monaten zeigten unsere aus hiPSCs gewonnenen Kardiomyozyten ein erstaunlich adultes elektrophysiologisches Verhalten. Mit einer mittleren Eigenfrequenz von 0,19 Hz war die Rate an spontanen Aktionspotentialen sehr gering, außerdem wurden insgesamt wenig spontan schlagende Zellen beobachtet. Insbesondere in den Kardiomyozyten der asymptomatischen Mutationsträgerin sowie der gesunden Kontrollperson konnten kaum spontane Aktionspotentiale aufgezeichnet werden (8 % bzw. 11,5 % der jeweils untersuchten Zellen). Dies ist u.a. durch das negative RMP begründet: Die Kardiomyozyten der beiden genannten Probandinnen wiesen nämlich ein RMP von ca. -70 mV auf, was

nicht allzu weit vom physiologischen RMP adulter ventrikulärer Kardiomyozyten entfernt liegt. Im Gegensatz dazu war das RMP der ARVC-Patientin mit durchschnittlich -60 mV deutlich depolarisierter. Eine Verschiebung ins Positive bringt das RMP näher an das Schwellenpotential für die Öffnung spannungsabhängiger Natriumkanäle und somit für die Auslösung eines Aktionspotentials. Die dadurch begünstigte spontane elektrische Aktivität spiegelte sich auch in der erhöhten Frequenz an spontanen Aktionspotentialen in den Zellen der ARVC-Patientin wider. Interessanterweise zeigten bereits die Kardiomyozyten der Schwester der Patientin eine gesteigerte intrinsische Frequenz im Vergleich zur Kontrolle, obwohl sich deren RMP nicht von dem der Kontrolle unterschied. Aufgrund der geringen Zahl spontan schlagender Zellen der Schwester sind diese Daten unter Vorbehalt zu betrachten; in Messungen spontaner Ca^{2+} -Transienten in unserer Arbeitsgruppe zeigte sich jedoch ein ähnliches Bild mit signifikant gesteigerter Ruhefrequenz in den Zellen der ARVC-Patientin sowie ihrer asymptomatischen Schwester, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei der Indexpatientin selbst (s. Abb. 33).

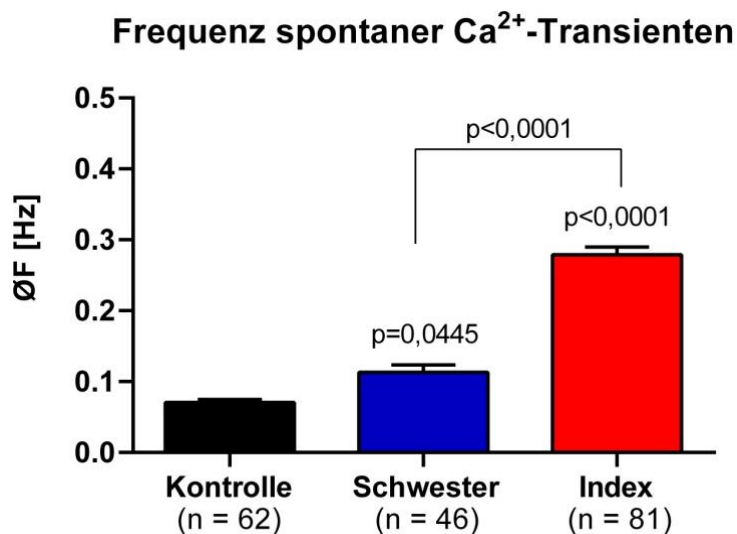


Abb. 33 Erhöhte Frequenz spontaner Ca^{2+} -Transienten in hiPSC-CMs der Mutationsträgerinnen. Bei der Messung spontaner zytosolischer Ca^{2+} -Transienten mittels Konfokal-mikroskop zeigte sich eine deutlich gesteigerte Ruhefrequenz in den hiPSC-CMs der ARVC-Patientin. Aber auch in den Kardiomyozyten ihrer asymptomatischen Schwester, Trägerin der gleichen *PKP2*-Mutation, war bereits eine signifikant höhere Frequenz spontaner Ca^{2+} -Entladungen zu beobachten. $\text{ØF} = 0,07 \pm 0,004$ (Kontrolle; $n=62$) vs. $0,11 \pm 0,01$ (Schwester; $n=46$) vs. $0,28 \pm 0,01 \text{ Hz}$ (Index; $n=81$); $p < 0,0001$ (Index vs. Schwester/Kontrolle) bzw. $p = 0,0445$ (Schwester vs. Kontrolle) (Daten freundlicherweise von Maria Giglberger zur Verfügung gestellt).

Für die Depolarisierung des RMP in den hiPSC-CMs der Indexpatientin kommen verschiedene Ursachen infrage. Der Hauptstabilisator des RMP in adulten humanen Kammermyokardzellen ist der einwärts-gleichrichtende Kaliumkanal $\text{Kir}2.1$. Er ist hauptsächlich für den repolarisierenden Kaliumausstrom (I_{K1}) in der späten Repolarisationsphase verantwortlich. Eine verringerte I_{K1} -Dichte wird z.B. bei Patienten mit Herzinsuffizienz beobachtet (99). Die daraus entstehende Verschiebung des Membranpotentials in positivere Bereiche begünstigt spontane

Nachdepolarisationen (DADs), hauptsächlich über einen NCX-gesteuerten Na^+ -Einstrom (100). Im Rahmen der Pathogenese der ARVC wurde der Kir2.1 bisher nicht diskutiert. Aufgrund der engen Nachbarschaft zu weiteren relevanten Glanzstreifenproteinen wäre ein genauerer Blick auf mögliche Veränderungen des Kaliumstroms aber sicherlich lohnend. Es konnte gezeigt werden, dass $\text{Na}_v1.5$ bereits zu einem frühen Zeitpunkt seines Transports zur Plasmamembran einen Proteinkomplex mit Kir2.1 bildet und die beiden Ionenkanäle sich wechselseitig in ihrer Lokalisation und Funktion beeinflussen (202). Ein gestörter $\text{Na}_v1.5$ -Transport geht mit einer veränderten Lokalisation des Kir2.1 einher (202, 203). Umgekehrt führt ein Kir2.1-Verlust zu einem reduzierten Spitzennatriumstrom (202). Eine *Loss-of-Function*-Mutation im *PKP2*-Gen könnte also, möglicherweise über Veränderungen im $\text{Na}_v1.5$, zu Störungen in der Kir2.1-Funktion führen und über eine reduzierte I_{K1} -Dichte das RMP beeinflussen. In Western Blots, durchgeführt in unserer Arbeitsgruppe, zeigte sich das Kir2.1-Expressionslevel in den hiPSC-CMs der Indexpatientin unverändert im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien. Diese rein quantitativen Ergebnisse erlauben jedoch keine Aussage über die Lokalisation und Funktion der Kaliumkanäle. Zur weiteren Klärung wären elektrophysiologische Messungen des I_{K1} nötig.

Ein Problem, das sich jedoch bei der Arbeit an Kardiomyozyten aus hiPSCs ergibt, ist die beschriebene geringe Dichte an einwärts-gleichrichtendem Kaliumstrom (187, 204), weshalb Untersuchungen des I_{K1} an hiPSC-CMs mit Vorbehalt zu betrachten sind. Es gibt zwar Hinweise, dass sich die Expression des dafür hauptsächlich verantwortlichen Kaliumkanals Kir2.1 mit zunehmender Reifungszeit der hiPSC-CMs stetig steigert und ab Tag 80 nach Abschluss der Differenzierung ähnliche Expressionslevel wie in adulten humanen Kardiomyozyten erreicht werden (205). In einer Arbeit von Doss et al. wird jedoch von einer vernachlässigbar geringen I_{K1} -Dichte auch nach 120-tägiger Reifung berichtet (204); stattdessen wird postuliert, dass das RMP in hiPSC-CMs hauptsächlich vom I_{Kr} abhängt. Da die nach dem in der vorliegenden Arbeit befolgten Protokoll gewonnenen hiPSC-CMs nach dreimonatiger Reifung ein stabiles, negatives RMP sowie eine geringe Eigenfrequenz spontaner Aktionspotentiale zeigten, wären weitere Untersuchungen der repolarisierenden Kaliumströme mittels Patch-Clamp-Technik sicherlich einer näheren Betrachtung wert. Bei zu geringer I_{K1} -Dichte gäbe es darüber hinaus auch noch die Möglichkeit, diese mittels verschiedener Methoden nachträglich zu verstärken (192, 206, 207).

Ein weiterer Mechanismus für die Depolarisation des RMPs wäre eine verstärkte Aktivität des $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX). Der NCX ist hauptverantwortlich für den diastolischen Ca^{2+} -Abtransport im Herzen (208) und ein entscheidender Knotenpunkt nicht nur der Natrium/Kalzium-Homöostase, sondern der elektromechanischen Kopplung insgesamt. In Western Blots zeigte sich eine deutliche Steigerung des Expressionslevels des kardialen NCX1, und zwar ausschließlich in den Zellen der Indexpatientin (s. Abb. 34.A). Der NCX sorgt aufgrund seiner Stöchiometrie (s. Kap. 1.3.2) für einen depolarisierenden Natriumstrom in die Zelle, was – im Falle einer verstärkten NCX-Aktivität – wiederum das RMP ins Positive verschieben würde (120). Passend dazu war die diastolische Kalziumkonzentration signifikant reduziert (s. Abb. 34.B). Bisher gab es noch keine Hinweise auf eine veränderte NCX-Aktivität bei Patienten mit ARVC. Die Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe liefern erste Hinweise auf eine mögliche Rolle des NCX im Rahmen dieser Erkrankung; diese sind durch gezielte Untersuchung der NCX-Funktion bei weiteren ARVC-Patienten zu untermauern.

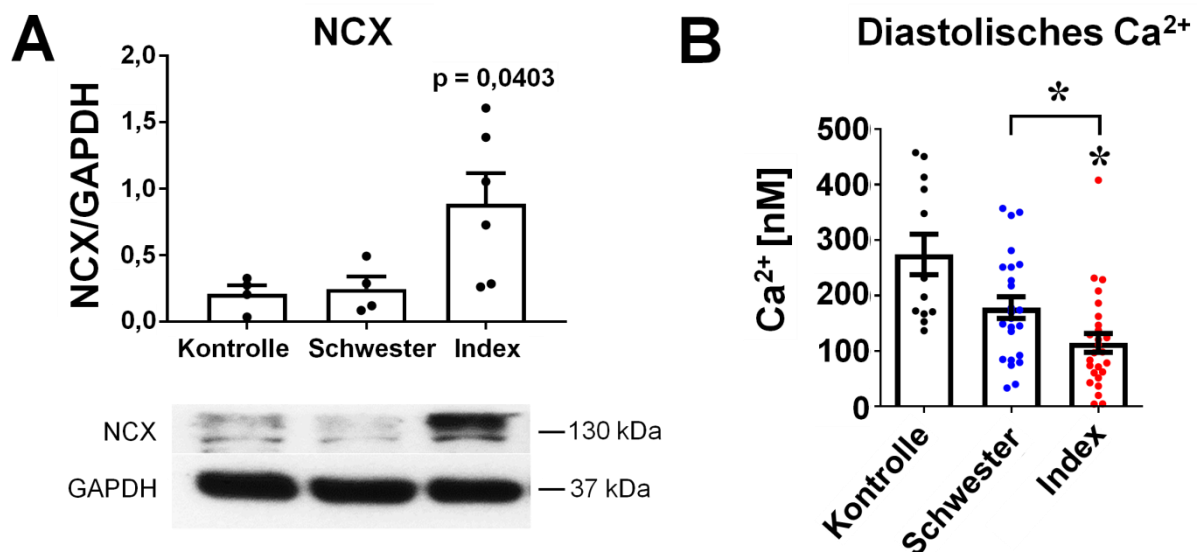


Abb. 34 Gesteigerte NCX-Aktivität in hiPSC-CMs der ARVC-Patientin. **A.** Es zeigte sich eine deutlich gesteigerte Expressionsdichte des kardialen $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX1) nur in den hiPSC-CMs der Indexpatientin, nicht in denen der asymptotischen Trägerin der gleichen *PKP2*-Mutation. **B.** Passend dazu fand sich eine verringerte Expression der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration, die jedoch auch schon bei der Schwester beginnend zu beobachten war (Daten freundlicherweise von Karin P. Hammer zur Verfügung gestellt).

4.2.2 APD-Verlängerung als Risikofaktor für die Entstehung von Nachdepolarisationen

Neben einer Verschiebung des RMP sind Veränderungen der Aktionspotentialdauer (APD) kritisch für die Entstehung kardialer Arrhythmien. Interessanterweise fand sich in den hiPSC-CMs der hier untersuchten ARVC-Patientin eine deutliche

Verlängerung der Aktionspotentialdauer; die APD in den Kardiomyozyten der asymptomatischen Schwester war im Gegensatz dazu unverändert. Die APD wird in ventrikulären Herzmuskelzellen hauptsächlich durch die lange Plateauphase (Phase 2) bestimmt. Bereits kleine Veränderungen im feinen Zusammenspiel an Ionenströmen während dieser Phase können die APD beeinflussen und zu arrhythmogenem Verhalten führen. Wie bereits in Kap. 1.3.2 ausführlich beschrieben, stellt eine Verlängerung der APD einen wichtigen Risikofaktor für die Entstehung von frühen bzw. in der Folge auch späten Nachdepolarisationen dar (38, 85, 97). Außerdem ist eine APD-Verbreiterung ein Risikofaktor für die Entstehung von APD-Alternans (209). Passend dazu zeigten sich in den Herzmuskelzellen der Indexpatientin eine gesteigerte Short-Term-Variabilität der APD50 sowie ein möglicher Trend zur insgesamt gesteigerten APD-Variabilität. Zum aktuellen Kenntnisstand wurde eine APD-Verlängerung bisher nicht im Zusammenhang mit einer Mutation im *PKP2*-Gen oder einem anderen mit der ARVC assoziierten Gen beobachtet. In der elektrophysiologischen Untersuchung einer kleinen Kohorte von ARVC-Patienten zeigte sich jedoch eine verzögerte Repolarisation im Vergleich zu Nicht-ARVC-Patienten (210). Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass eine gestörte Repolarisation in der Arrhythmogenese von ARVC-Patienten eine Rolle spielt. Im 12-Kanal-EKG der hier untersuchten ARVC-Patientin konnte keine Verbreiterung der QRS-Komplexes bzw. der QT-Zeit als Folge der APD-Verlängerung beobachtet werden (s. Abb. 3).

Als Ursache der verbreiterten APD kommen verschiedene Mechanismen infrage. Ganz allgemein gesprochen führt ein vergrößerter Einwärtsstrom bzw. ein verringerter Auswärtsstrom während der Plateauphase zur Verlängerung der APD (42). Ein vergrößerter später Natriumstrom ($I_{Na,L}$), der beispielsweise für die APD-Verbreiterung bei Patienten mit Long-QT-Syndrom Typ 3 (LQTS3) verantwortlich gemacht wird (61, 103), kann als Folge der hier betrachteten *PKP2*-Mutation nicht beobachtet werden; stattdessen findet sich sogar ein geringerer $I_{Na,L}$ in den hiPSC-induzierten Herzmuskelzellen der ARVC-Patientin. Der zweite hauptsächliche Einwärtsstrom während der Plateauphase ist $I_{Ca,L}$ über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (94). Auch dieser zeigte sich in den hiPSC-CMs der hier untersuchten ARVC-Patientin reduziert⁹ und scheidet somit als Verursacher der APD-Verlängerung aus. Die Verbreiterung der Plateauphase ist somit am ehesten durch einen reduzierten Kalium-

⁹ Daten nicht gezeigt

Auswärtsstrom via I_{Ks} , I_{Kr} bzw. in der späten Repolarisationsphase I_{K1} bedingt. Zur Dichte der repolarisierenden Kaliumströme gibt es bisher kaum Daten im Zusammenhang mit der ARVC. In einer umfassenden Untersuchung des elektrophysiologischen Verhaltens von hiPSC-CMs mit *DSG2*-Mutation konnte ein vergrößerter I_{Kr} bei unverändertem I_{Ks} aufgezeichnet werden; die Dichte des I_{K1} wurde nicht gemessen (198). Ein reduzierter I_{K1} , welcher auch für das hier beobachtete positive Ruhemembranpotential infrage kommt, würde zu einer Verringerung repolarisierender Ströme am Ende der Plateauphase und somit zur Verzögerung der Repolarisation führen (42). Dieser Mechanismus spielt u.a. eine Rolle in der Pathogenese des Andersen-Tawil-Syndroms bzw. LQTS7: Die in diesen Patienten beobachtete APD-Verlängerung ist durch eine Mutation im *KCNJ2*-Gen bedingt, das für den einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanal Kir2.1 kodiert (211). Eine mögliche Rolle des Kir2.1 in der Pathogenese der ARVC wurde in Kap. 4.2.1 bereits diskutiert. Für die Verbreiterung der APD kommt zu guter Letzt erneut der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX) in Frage, dessen Expressionslevel in den Herzmuskelzellen der Indexpatientin deutlich erhöht waren. Eine veränderte Aktivität des NCX kann die APD maßgeblich beeinflussen; ein verringerter NCX-vermittelter Kalziumausstrom führt zur APD-Verkürzung (212). Folglich würde eine vermehrte NCX-Aktivität – mit gesteigertem Kalzium-Auswärts- bzw. Natrium-Einwärtsstrom – nicht nur das RMP depolarisieren, sondern darüber hinaus auch die APD verlängern. Dem NCX könnte somit eine entscheidende Rolle für die hier beobachteten Veränderungen des Aktionspotentials zukommen. Zur Klärung wären elektrophysiologische Messungen des I_{NCX} nötig.

Eine Verlängerung der Repolarisationsphase hat eine Reaktivierung von L-Typ-Kalzium-Kanälen zur Folge, deren depolarisierender Ca^{2+} -Einstrom die Auslösung früher Nachdepolarisationen (EADs) begünstigt (94). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten AP-Messungen konnten keine EADs oder DADs beobachtet werden. In den Messungen stimulierter Kalziumtransienten zeigte sich jedoch ein deutlich arrhythmogenes Verhalten der hiPSC-induzierten Kardiomyozyten der ARVC-Patientin. Interessanterweise traten jedoch bereits in den hiPSC-CMs der klinisch asymptomatischen Mutationsträgerin vermehrt Arrhythmien auf, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei der Patientin selbst¹⁰.

¹⁰ Daten nicht gezeigt (M. Giglberger)

4.2.3 Rolle des spannungsabhängigen Natriumstroms

In dieser Arbeit sollte der Schwerpunkt auf den Auswirkungen der untersuchten PKP2-Mutation auf den spannungsabhängigen Natriumstrom liegen. Die reduzierte Dichte des Gesamt- sowie des späten Natriumstroms in den hiPSC-CMs der ARVC-Patientin erklären jedoch nur einen Teil der beobachteten Veränderungen des kardialen Aktionspotentials. Als mögliche Folge des insgesamt verringerten Natriumstroms war die Aktionspotentialamplitude (APA) um circa 10 mV verringert; dies könnte jedoch auch durch das depolarisierte RMP bedingt sein. Außerdem fand sich eine Tendenz zu einer verzögerten Aufstrichgeschwindigkeit, wenn auch nicht statistisch signifikant und weniger stark ausgeprägt als zuvor im Tiermodell beobachtet (170–172). Beide Phänomene, die reduzierte APA sowie die verlangsamte Aufstrichgeschwindigkeit, können eine Störung der Erregungsweiterleitung zur Folge haben, wie sie bei ARVC-Patienten diskutiert wird (s. Kap. 4.1.1). Eine vermehrte Variabilität der AP-Aufstrichgeschwindigkeit als potentieller Hinweis auf ein V_{\max} -Alternans konnte nicht festgestellt werden. Ein V_{\max} -Alternans und in der Folge eine alternierende Reizleitungsgeschwindigkeit stellen wichtige proarrhythmische Veränderungen im Rahmen verschiedener kardialer Erkrankungen dar und treten vermehrt bei höheren Herzfrequenzen auf (213). Das Auftreten von V_{\max} -Alternans hängt vor allem von der I_{Na} -Erholung nach Inaktivierung ab (214). Diese zeigte sich jedoch bei den hier untersuchten hiPSC-CMs unverändert.

Neben den soeben genannten AP-Veränderungen, die auf die reduzierte I_{Na} -Dichte zurückzuführen sein könnten, ergab die Auswertung der Aktionspotentiale jedoch noch weitere wesentliche Befunde. Die Verlängerung der Aktionspotentialdauer sowie das depolarisierte Ruhemembranpotential sind nicht durch die Veränderungen des Natriumstroms erklärbar. Diese Ergebnisse implizieren, dass noch andere Ionenkanäle oder Transportproteine in der Arrhythmogenese bei ARVC-Patienten beteiligt sein müssen, wie sie u.a. in den vorangegangenen Kapiteln diskutiert worden sind.

4.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse der beiden Mutationsträgerinnen

Die Risikostratifizierung Familienangehöriger von ARVC-Patienten, die eine mit der Erkrankung assoziierte Mutation tragen, stellt nach wie vor eine große

Herausforderung dar. Mithilfe moderner Methoden wie dem *Next Generation Sequencing* (NGS) ist ein genetisches Screening von Verwandten von ARVC-Patienten mit überschaubarem Aufwand möglich; das Problem ist vielmehr die Interpretation der Ergebnisse dieser Untersuchungen und die Frage, welche prophylaktischen bzw. therapeutischen Konsequenzen sich daraus ergeben. Wie bereits in Kap. 1.5.1 beschrieben, wird die ARVC mit reduzierter Penetranz und äußerst variabler Expressivität vererbt. Das Spektrum reicht von plötzlichem Herztod im frühen Jugendalter bis hin zu lebenslanger Symptombefreiheit – bei identischer (desmosomaler) Mutation (215). Insgesamt entwickeln nur ca. 30 – 40% der betroffenen Personen, die eine Mutation in einem mit der ARVC assoziierten Gen tragen, eine charakteristische Symptomatik (33, 216), hinzu kommen atypische Verläufe und Erstdiagnosen im fortgeschrittenen Lebensalter (217, 218). Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, molekulare Pathomechanismen aufzudecken, die dieser heterogenen Ausprägung des klinischen Phänotyps zugrunde liegen. Auf lange Sicht können dadurch diagnostische Methoden entwickelt werden, die den weiteren klinischen Verlauf und insbesondere das Risiko für Rhythmusereignisse besser voraussagen.

Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe leisten hierzu einen wichtigen Beitrag, indem sie Veränderungen auf zellulärer Ebene aufdecken, die in Zusammenhang mit zwei unterschiedlichen Phänotypen infolge der gleichen Mutation gestellt werden können. Dazu wurden funktionelle Messungen an hiPSC-CMs einer symptomatischen und einer asymptomatischen Trägerin der gleichen *PKP2*-Mutation durchgeführt und die Ergebnisse gegenübergestellt.

4.3.1 Unterschiede zwischen den Mutationsträgerinnen: Zusammenfassung

Bei der elektrophysiologischen Untersuchung der hiPSC-CMs mittels *Whole-Cell-Patch-Clamp*-Technik zeigten sich wesentliche Unterschiede zwischen den beiden Mutationsträgerinnen. Während sich die Aktionspotential-Kinetik der Kardiomyozyten der asymptomatischen Mutationsträgerin nicht von denen der gesunden Probandin unterschied, konnten in den Zellen der ARVC-Patientin ein depolarisiertes RMP, eine verringerte AP-Amplitude sowie eine deutlich verlängerte Dauer des Aktionspotentials festgestellt werden. D.h. es finden sich in den Kardiomyozyten der klinisch kranken Mutationsträgerin proarrhythmogene Veränderungen des Aktionspotentials, die sich bei der asymptomatischen Schwester nicht nachweisen

lassen – obwohl beide die gleiche *PKP2*-Mutation tragen. In der Messung des spannungsabhängigen Natriumstroms zeigte sich der $I_{Na,max}$ in den Herzmuskelzellen der ARVC-Patientin wie erwartet verringert, wohingegen er in den Zellen der asymptomatischen Schwester sogar vergrößert war. Wie in Kap. 4.1.2 bereits diskutiert, dient die vergrößerte I_{Na} -Dichte möglicherweise als Schutzmechanismus zur Kompensation einer gestörten Gap-Junction-Kopplung, wie sie bei beiden Mutationsträgerinnen zu finden ist. Liegt die gestörte elektrische Kommunikation über Gap Junctions in Kombination mit einem reduzierten Spitzennatriumstrom vor, wie im Fall der ARVC-Patientin, kommt es zur relevanten Verzögerung der Erregungsweiterleitung und zur Entstehung von Arrhythmien. Da beide Schwestern die gleiche Mutation im *PKP2*-Gen tragen, kann diese also nicht die alleinige Ursache für die Ausprägung des ARVC-typischen Phänotyps sein.

4.3.2 Ursachen des unterschiedlich ausgeprägten Phänotyps

Als Ursachen für die heterogenen klinischen Ausprägungen und Verläufe bei ARVC-Patienten bzw. asymptomatischen Mutationsträgern werden zum einen modulierende Faktoren wie Alter, Geschlecht oder sportliche Aktivität diskutiert (219). Beide der hier untersuchten Mutationsträger sind fast gleich alt und weiblichen Geschlechts; außerdem haben beide nach anamnestischen Angaben intensiv Sport betrieben. Zum anderen gibt es starke Hinweise auf genetische Einflussfaktoren, die für die Ausprägung des ARVC-Phänotyps eine Rolle spielen. Dazu zählen Phänomene wie die kombinierte Heterozygotie (220), d.h. das Vorliegen von zwei unterschiedlichen Varianten eines Gens auf den zugehörigen Allelen, oder Zweitmutationen, auch *Second-Hit*-Mutationen genannt. In 4 – 11% der ARVC-Patienten findet sich nämlich mehr als eine Mutation im betroffenen Gen bzw. in weiteren mit der Erkrankung assoziierten Genen (220–223). Diese Patienten präsentieren sich meist mit schwereren Symptomen und einem höheren Risiko, einen plötzlichen Herztod zu erleiden (224, 225). In diese Auswertungen sind stets nur die typischen „ARVC-Gene“ eingeschlossen (s. Kap. 1.5.1). In einer großen Kohorte konnte jedoch bei mehr als einem Drittel der ARVC-Patienten keine (potentiell) ursächliche Mutation nachgewiesen werden (226). Das bedeutet, dass andere Einflussfaktoren oder weitere Krankheits-modulierende Gene daran beteiligt sein müssen, dass es letztendlich zur Ausbildung der ARVC-typischen Symptomatik kommt.

Zur Aufdeckung möglicher Zweitmutationen wurden PBMCs der Indexpatientin, ihrer asymptomatischen Schwester sowie von drei weiteren Familienmitgliedern einer DNA-Sequenzierung mittels *Whole Exome Sequencing (WES)*¹¹ unterzogen. Von den gescreenten Personen, die alle die gleiche Mutation im *PKP2*-Gen trugen, fanden sich bei allen unterschiedlich stark ausgeprägte Auffälligkeiten in der Echokardiographie und z.T. Veränderungen im 12-Kanal-Ruhe-EKG, mit Ausnahme der Schwester der Patientin. Im *WES* konnten tatsächlich bei fast allen untersuchten Personen verschiedene Varianten im *ANK3*-Gen (exon17:c.A2209T:p.T737S) festgestellt werden, welches für das Glanzstreifenprotein Ankyrin G kodiert – außer bei der bis zum heutigen Zeitpunkt klinisch asymptomatischen Schwester. Passend dazu fand sich in den Immunofluoreszenz-Messungen der hiPSC-CMs der Indexpatientin eine deutlich reduzierte AnkG-Expression, wohingegen das AnkG-Signal in den Zellen der Schwester unverändert war. Dem Anker- und Regulatorprotein AnkG wird, wie in Kap. 1.5.2 ausführlich dargelegt, eine entscheidende Rolle für die Integrität der Glanzstreifenarchitektur zugeschrieben. Ein AnkG-Verlust führt u.a. zum Gap-Junction-Remodeling und zur fehlerhaften Lokalisation der benachbarten Glanzstreifenproteine PKP2, Na_v1.5 und CamKII (125, 175). Außerdem gehen Mutationen im *ANK3*-Gen mit einem reduzierten Spitzennatriumstrom und einer verlangsamten Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials einher (79, 80, 175). Den hier beobachteten *ANK3*-Varianten wird, wenn sie isoliert vorliegen, keine Pathogenität zugeschrieben. Es wäre jedoch denkbar, dass diese Varianten in Kombination mit der hier untersuchten *Loss-of-Function*-Mutation *c.1664delT* im *PKP2*-Gen zur Ausprägung des klinischen Phänotyps der ARVC führen, während die *PKP2*-Mutation für sich alleine noch keine ausreichende Störung der Glanzstreifen-Integrität und in der Folge des elektrophysiologischen Gleichgewichts bewirkt. Insbesondere für die beobachteten Unterschiede im spannungsgesteuerten Natriumstrom zwischen den beiden Schwestern könnte die zusätzliche *ANK3*-Mutation der ARVC-Patientin den entscheidenden Faktor darstellen. Sie würde neben dem verringerten Spitzennatriumstrom in den hiPSC-CMs der ARVC-Patientin nämlich auch den reduzierten späten Natriumstrom erklären, möglicherweise über den Mechanismus einer verminderten Na_v1.5-Phosphorylierung durch die CaMKII (s. Kap. 4.1.3). Das Fehlen einer zusätzlichen *ANK3*-Mutation bzw. -Variante könnte also die Erklärung

¹¹ Daten nicht gezeigt

für den bisher asymptomatischen klinischen Verlauf der Schwester der Indexpatientin sein. Dazu müssten die Folgen der in den anderen Familienangehörigen vorliegenden *ANK3*-Varianten in separaten Zellmodellen untersucht werden. Außerdem wäre ein Screening einer größeren Kohorte an ARVC-Patienten auf Varianten im *ANK3*-Gen nötig.

4.4 Kardiomyozyten aus hiPSCs als patientenspezifisches Zellmodell

4.4.1 hiPSC-induzierte Kardiomyozyten zur Risikostratifizierung von Mutationsträgern

Die Risikostratifizierung bleibt nach wie vor eines der führenden Probleme im klinischen Management von ARVC-Patienten und deren Verwandten. Deshalb wäre es von hoher klinischer Relevanz, Zellmodelle zu finden, anhand derer man Aussagen über den Zusammenhang zwischen einer vorliegenden Mutation und der klinischen Ausprägung der Erkrankung – kurz: über die Genotyp-Phänotyp-Korrelation – treffen könnte. Eine für die Patienten wenig invasive und patientenspezifische Methode stellt die Arbeit an Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC-CMs) dar. Bereits für andere erbliche Erkrankungen wie dem Long-QT-Syndrom konnten im hiPSC-CM-Modell deutliche Unterschiede auf zellulärer Ebene zwischen klinisch kranken Patienten und asymptomatischen Mutationsträgern nachgewiesen werden (183, 227). Nach unserem Wissen ist die vorliegende Arbeit die erste umfassende Analyse des elektrophysiologischen Verhaltens von hiPSC-CMs einer symptomatischen ARVC-Patientin im Vergleich zu einer gesunden Mutationsträgerin. Obwohl der hohe zeitliche und finanzielle Aufwand aktuell noch einen berechtigten Einwand gegen einen routinemäßigen Einsatz dieser Methode darstellt, kann sie einen entscheidenden Beitrag zur Aufdeckung molekularer Pathomechanismen leisten. Mithilfe des in dieser Arbeit befolgten Protokolls zur Induktion und Differenzierung pluripotenter Stammzellen aus patienteneigenen PBMCs konnten erstaunlich reife Kardiomyozyten gewonnen werden. Diese lieferten ein brauchbares, patientenspezifisches Zellmodell für weitere funktionelle Untersuchungen.

4.4.2 Fortgeschrittene Reife der gewonnenen Kardiomyozyten

Nach erfolgreicher Differenzierung der induzierten pluripotenten Stammzellen und anschließender dreimonatiger Reifung konnten Herzmuskelzellen mit einer

fortgeschritten organisierten Ultrastruktur und einem für hiPSC-CMs reifen elektrophysiologischen Verhalten gewonnen werden. In den mit dem Kardiomyozyten-spezifischen Marker cTnT gefärbten Kardiomyozyten aller drei Zelllinien zeigte sich eine parallele Anordnung der Myofibrillen mit typischer Querstreifung. Mit 71 % der Kardiomyozyten vom ventrikulären, 15,1 % vom atrialen sowie 14 % vom nodalen Typ war die Verteilung der Zelltypen, eingeteilt anhand der Morphologie ihres Aktionspotentials, vergleichbar mit den Ergebnissen aus anderen Arbeitsgruppen (181–183, 185). Die langsame Eigenfrequenz der Kardiomyozyten im Vergleich zu anderen Arbeiten (s. (187)) spricht für das reife elektrophysiologische Verhalten der gewonnenen Kardiomyozyten. Mit einem RMP von -71,00 mV (Kontrolle) befanden sich die gewonnenen Kardiomyozyten im Durchschnitt stimulierter ventrikulärer hiPSC-CMs (187). Hervorzuheben ist die lange Aktionspotentialdauer, die vergleichbar mit der von adulten humanen Ventrikulkardiomyozyten ist. Bei Betrachtung der gemessenen APD-Werte zeigt sich darüber hinaus eine Verkürzung der APD mit zunehmender Stimulationsfrequenz. Diese frequenzabhängige AP-Verkürzung ist auch in adulten humanen Herzmuskelzellen zu beobachten. Sie wird zum einen durch den zunehmenden langsam gleichrichtenden Kaliumstrom (I_{Ks}) verursacht (189), zum anderen durch eine Steigerung des Natrium-Kalzium-Austauschs über den NCX (188). Dies lässt vermuten, dass die hiPSC-CMs nach der dreimonatigen Reifungszeit eine ausgeprägte I_{Ks} -Dichte besitzen sowie einen funktionstüchtigen NCX exprimieren (181). Die hier gemessene Gesamtdichte an spannungsabhängigem Natriumstrom (I_{Na}) war geringer als in den meisten anderen Arbeiten an hiPSC-CMs (184, 187, 228). Dies ist jedoch durch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lösungen der $I_{Na,max}$ -Messungen erklärbar: Da der gefundene I_{Na} unerwartet groß war, konnte mit dem normalerweise bei embryonalen bzw. induzierten pluripotenten Stammzellen eingesetzten Protokoll keine ausreichende Spannungskontrolle erreicht werden. Stattdessen wurden Bad- bzw. Pipettenlösungen verwendet, die auch bei Messungen an adulten humanen Kardiomyozyten eingesetzt werden (s. Kap. 2.4.2). Auch das spricht für die fortgeschrittene Reife des elektrophysiologischen Verhaltens der hiPSC-CMs nach dreimonatiger Zellkultur.

4.5 Limitationen der vorliegenden Arbeit

4.5.1 Methodische Einschränkungen des hiPSC-Modells

Trotz der vielversprechenden Vorzüge des hiPSC-CM-Zellmodells sollen einige relevante Limitationen dieser Methode nicht unerwähnt bleiben.

Ein Einwand, der im Zuge der Arbeit an hiPSC-induzierten Kardiomyozyten oft genannt wird, ist ihr im Vergleich zu adulten ventrikulären Kardiomyozyten unreifer (elektrischer) Phänotyp (229). Nach durchlaufener Differenzierung besitzen die hiPSC-CMs zunächst ein vergleichsweise depolarisiertes RMP sowie eine verringerte AP-Aufstrichgeschwindigkeit, ähnlich wie bei embryonalen Stammzellen (230). Es werden zudem ein abweichendes Ionenkanalmuster mit geringer Dichte an einwärts-gleichrichtendem Kaliumstrom (I_{K1}) sowie ein veränderter Ca^{2+} -Haushalt beschrieben (200, 231). Dies schränkt die Übertragbarkeit auf adulte humane Herzmuskelzellen natürlich ein. Um möglichst reife Herzmuskelzellen zu gewinnen, hat sich unsere Arbeitsgruppe deshalb für die lange Reifungszeit von drei Monaten entschieden. Es konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass die hiPSC-CMs mit zunehmender Zeit in Kultur einen immer reiferen Phänotyp entwickeln und sich adulten Kardiomyozyten annähern (205, 231).

Ein weiteres Problem des hiPSC-CM-Zellmodells stellt die Aufreinigung der gewonnenen Kardiomyozyten dar. Mit den aktuell verfügbaren technischen Möglichkeiten können bisher keine reinen Kulturen an Kardiomyozyten erzeugt werden. Obwohl mit dem hier verwendeten Protokoll nach Selektionierung mit einem speziellen Laktatmedium bemerkenswerte Kardiomyozyten-Reinheiten von > 90% erreicht werden können (181), verbleibt ein kleiner Prozentsatz an anderen Zellarten.

Trotz dieser Einschränkungen eignet sich dieses Zellmodell, Korrelate kardialer Erkrankungen auf zellulärer Ebene nachzuweisen und das elektrophysiologische Verhalten patientenspezifischer Kardiomyozyten zu untersuchen. Außerdem muss man betonen, dass es sich beim hiPSC-CM-Modell immer noch um eine sehr junge Methode handelt. Zahlreiche methodische Arbeiten haben die Qualität der gewonnenen Kardiomyozyten in den vergangenen Jahren stetig verbessert (s. (232)), sodass auch in Zukunft eine gesteigerte Qualität der hiPSC-CM-Kulturen zu erwarten ist.

4.5.2 Immunofluoreszenzfärbungen

Zur Untersuchung der Auswirkungen der *PKP2*-Mutation auf die Expression relevanter Glanzstreifen-Proteine wurden Immunofluoreszenzfärbungen durchgeführt. Auch vor diesen Experimenten wurde, wie vor den restlichen funktionellen Messungen, eine Reifungszeit von drei Monaten abgewartet. Die ermittelte Lokalisation der untersuchten Proteine ist mit einem gewissen Vorbehalt zu betrachten, da das Proteinexpressionsmuster von hiPSC-induzierten Kardiomyozyten auf der einen Seite nicht gänzlich mit dem adulter isolierter Herzmuskelzellen vergleichbar ist und sich auf der anderen Seite im Laufe der Reifungszeit kontinuierlich verändert (231, 233). Hinzu kommt, dass die gewonnenen hiPSC-CMs auch nach der langen Reifungszeit nicht die gleiche Morphologie wie adulte Kardiomyozyten aufweisen; aufgrund der eher rundlichen Zellform war eine Aufteilung der Zellmembran in die Komponenten laterale Membran bzw. Glanzstreifen nicht möglich. Dies stellt eine Limitation dieses Zellmodells dar, handelt es sich bei der ARVC doch um eine Erkrankung dieser besonderen kardialen Zell-Zell-Kontakte.

4.5.3 Patch-Clamp-Messungen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Patch-Clamp-Messungen erfolgten an Einzelzellen, die keinen Kontakt zu benachbarten Zellen hatten. Es ergaben sich erste Hinweise auf proarrhythmogene Veränderungen auf Einzelzell-Ebene. Die Arrhythmien im Rahmen der ARVC entstehen jedoch *in vivo* in einem dreidimensionalen System, was die Übertragbarkeit der Ergebnisse limitiert. Dieses Problem stellt sich grundsätzlich bei allen Arbeiten am Zellmodell. Gerade bei der Untersuchung der Pathomechanismen der ARVC, die ja die interzelluläre Kommunikation betreffen, wären jedoch Messungen zumindest im zweidimensionalen Zellverbund interessant. Beispielsweise könnte man die Erregungsausbreitung, die maßgeblich von der Kinetik des schnellen Natriumstroms sowie der Gap-Junction-Kopplung abhängt, mittels Multielektrodenarray (MEA) untersuchen.

Ein weiteres Problem, das insbesondere für die Natriumstrommessungen relevant ist, stellt die Heterogenität der gewonnenen Kardiomyozyten-Typen dar. Neben ventrikulär-ähnlichen Zellen differenzieren sich die induzierten pluripotenten Stammzellen auch in Kardiomyozyten vom atrialen bzw. nodalen Typ, die sich

morphologisch nicht voneinander unterscheiden lassen. Diese Zellen sind jedoch bekanntermaßen durch eine unterschiedliche Expression und Aktivität von Ionenkanälen charakterisiert (41). Obwohl Zellen vom ventrikulären Typ mit durchschnittlich 77,6% die deutliche Mehrheit der Zellen darstellten und die Verteilung auf die unterschiedlichen Zelltypen für alle drei Zelllinien vergleichbar war, kann eine Verzerrung der Ergebnisse nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Zu guter Letzt erfolgten die Messungen nach dem hier verwendeten Protokoll bei Raumtemperatur. Eine Abweichung von der physiologischen Temperatur von 37°C beeinflusst u.a. die Aktionspotentials-Parameter RMP, APD und Aufstrichgeschwindigkeit. Da bei allen drei Zelllinien jedoch das gleiche Protokoll verwendet wurde, sollten temperaturbedingte Veränderungen der Elektrophysiologie alle Zellen in gleichem Maße betreffen. Auch eine mögliche Verzerrung durch eine unbewusste Selektionierung nicht-schlagender Zellen, deren RMP in der Regel niedriger ist (228), müsste bei allen drei Zellgruppen gleich stark ausgeprägt und somit nicht relevant sein.

4.5.4 Patientenrekrutierung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Familienmitglieder einer großen ARVC-Familie untersucht. Aufgrund der geringen Zahl an untersuchten Mutationsträgern sind die hier gezeigten Ergebnisse zunächst rein deskriptiver Natur. Die ermittelten Daten geben erste Hinweise auf die proarrhythmogenen Veränderungen als Folge der *PKP2*-Mutation *c.1664delT*. Außerdem zeigen sich bereits entscheidende Unterschiede zwischen der klinisch erkrankten und der asymptomatischen Mutationsträgerin. Neben der in dieser Arbeit untersuchten ARVC-Patientin leiden jedoch noch weitere Verwandte an unterschiedlich stark ausgeprägten Symptomen. Zur Bestätigung der zellulären Auswirkungen der vorherrschenden Mutation sowie zur weiteren Untersuchung der heterogenen Ausprägung des klinischen Phänotyps wäre die Wiederholung der hier durchgeführten Experimente an hiPSC-CMs weiterer Familienangehöriger interessant und sinnvoll.

Zur Gegenüberstellung einer klinisch kranken ARVC-Patientin und einer asymptomatischen Trägerin der gleichen Mutation wurden hiPSC-induzierte Kardiomyozyten von zwei vergleichbaren Verwandten 1. Grades untersucht. Beide Schwestern tragen die identische Mutation im *PKP2*-Gen, sind fast gleich alt und haben beide nach anamnestischen Angaben intensiv Sport betrieben. Es kann

trotzdem nicht ausgeschlossen werden, dass modulierende Faktoren wie eine abweichende Intensität der sportlichen Aktivität, inflammatorische Erkrankungen wie eine durchgemachte Myokarditis oder Unterschiede im Lebensstil die Ausprägung des klinischen Phänotyps bzw. die Geschwindigkeit des klinischen Verlaufs beeinflusst haben. Außerdem ist die vorliegende Arbeit eine Momentaufnahme des aktuellen klinischen Zustands der beiden Mutationsträgerinnen; es ist demnach nicht absehbar, ob die Schwester in der Zukunft nicht auch Symptome entwickeln wird. Eine Beobachtung des weiteren klinischen Verlaufs ist vorgesehen; die Familie befindet sich in enger Betreuung durch die Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums Regensburg.

Zu guter Letzt wurde in dieser Arbeit nur eine von zahlreichen mit der ARVC assoziierten Mutationen untersucht. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Mutationen in Genen für desmosomale Bestandteile und weiteren kardialen Proteinen ist ein umfassendes Verständnis der Pathophysiologie dieser Erkrankung nur in Zusammenschau mit Untersuchungen aller beteiligten Mutationen möglich. Nichtsdestotrotz bedeuten die hier gefundenen Ergebnisse einen wichtigen Schritt in Richtung eines verbesserten Verständnisses der Pathogenese der ARVC.

Zusammenfassung

Die Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) stellt eine häufige Ursache für plötzlichen Herztod in der jungen, sportlichen Bevölkerung dar. Aufgrund des nach wie vor eingeschränkten Verständnisses über die Pathogenese dieser Erkrankung sind die diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten derzeit noch deutlich limitiert. Insbesondere die Entstehung der lebensbedrohlichen Arrhythmien ist nur unzureichend verstanden. Die wissenschaftlichen Ergebnisse der vergangenen Jahrzehnte haben zur Annahme geführt, dass es sich bei der ARVC um eine genetisch determinierte Erkrankung der Glanzstreifen, also der speziellen kardialen Zell-Zell-Kontakte, handelt. Der häufigste Subtyp der Erkrankung, ARVC Typ 9, ist mit verschiedenen Mutationen im *PKP2*-Gen assoziiert, das für das desmosomale Protein Plakophilin-2 kodiert. Plakophilin-2 (PKP2) kommt nicht nur eine wichtige Rolle in der mechanischen Verbindung benachbarter Herzmuskelzellen zu, es interagiert darüber hinaus mit verschiedenen benachbarten Glanzstreifen-Proteinen. Eine dieser Interaktionen, die in den vergangenen Jahren ins wissenschaftliche Interesse gerückt ist, ist die Beeinflussung des spannungsabhängigen Natriumkanals $\text{Na}_v1.5$. Dieser ist in Kammerkardiomyozyten für die schnelle Aufstrichphase des Aktionspotentials verantwortlich und beeinflusst dadurch wesentlich die Ausbreitungsgeschwindigkeit elektrischer Erregungen im Herzen. Veränderungen im spannungsgesteuerten Natriumstrom sind mit vielen kardialen Pathologien vergesellschaftet, darunter hereditären Herzrhythmusstörungen wie dem Brugada- oder Long-QT-Syndrom, aber auch der Herzinsuffizienz. Bereits im Tiermodell hatten sich als Folge einer gestörten PKP2-Expression eine verringerte Natriumstromdichte sowie eine verlangsamte Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials gezeigt – ein erster Hinweis darauf, dass Veränderungen des spannungsabhängigen Natriumstroms eine Rolle in der Arrhythmogenese von ARVC-Patienten spielen könnten.

Ein Problem im klinischen Management der Erkrankung stellt die Risikostratifizierung von Trägern einer mit der ARVC assoziierten Mutation dar. Während einige Mutationsträger bereits im frühen Jugendalter einen plötzlichen Herztod erleiden, entwickeln andere nie Symptome.

Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit das elektrophysiologische Verhalten von Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC-CMs) zwischen einer ARVC-Patientin und ihrer bislang klinisch asymptomatischen Schwester, beide Trägerinnen der gleichen *PKP2*-Mutation, verglichen werden. Mittels Patch-Clamp-Technik wurde der Frage nachgegangen, welche Auswirkungen die erstmals beschriebene *Loss-of-Function*-Mutation *c.1664delT* auf die Dichte und Kinetik des spannungsgesteuerten Natriumstroms (I_{Na}) sowie auf das kardiale Aktionspotential hat. In den Herzmuskelzellen der ARVC-Patientin zeigten sich eine Reduktion des Spitzennatriumstroms durch verzögerte Aktivierung der Natriumkanäle sowie ein verminderter später Natriumstrom. Daneben wurden deutliche Veränderungen der Aktionspotential-Kinetik festgestellt, die sich nur teilweise durch die Veränderungen im Natriumstrom erklären lassen. Mit verringerter Amplitude sowie leicht verzögerter Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials sind erste Hinweise auf eine I_{Na} -bedingte Störung der Erregungsleitung gegeben. Daneben fanden sich aber auch ein depolarisiertes Ruhemembranpotential sowie eine deutlich verlängerte Aktionspotentialdauer in den hiPSC-CMs der Patientin. Für die Entstehung dieser kritischen proarrhythmogenen Veränderungen müssen noch andere Mechanismen eine Rolle spielen. Der einwärts-gleichrichtende Kaliumkanal Kir2.1 oder der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX) sind dafür denkbare Strukturen, deren nähere Untersuchung lohnend wäre.

Interessanterweise unterschied sich die Schwester der Patientin in Bezug auf das Aktionspotential nicht von der gesunden Kontrolle, obwohl sie die gleiche Mutation im *PKP2*-Gen trägt. Der einzige Unterschied, der sich bei den elektrophysiologischen Messungen zwischen den beiden Mutationsträgerinnen ergab, war der deutlich vergrößerte Natriumstrom in den hiPSC-CMs der Schwester – auch und sogar im Vergleich zur Kontrolle. Er dient womöglich als Kompensationsmechanismus einer gestörten elektrischen Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions; diese ist nämlich in den Kardiomyozyten der Indexpatientin und der Schwester gleichermaßen verringert. Eine gestörte Gap-Junction-Kommunikation kann die Erregungsleitung wesentlich beeinflussen. Während sich also bei der Indexpatientin proarrhythmogene Veränderungen im spannungsgesteuerten Natriumstrom und Aktionspotential finden, dient der vergrößerte Natriumstrom in den Herzmuskelzellen der asymptomatischen Mutationsträgerin womöglich als Schutzmechanismus für die Entstehung lebensbedrohlicher Herzrhythmusstörungen. Als Ursache für diese Unterschiede auf

zellulärer Ebene kommt eine parallel vorliegende Zweitmutation in Frage. Während die ARVC-Patientin sowie weitere erkrankte Familienmitglieder neben der *PKP2*-Mutation eine Variante im *ANK3*-Gen tragen, findet sich bei der asymptomatischen Mutationsträgerin Wildtyp-*ANK3*. *ANK3* kodiert für das regulatorische Glanzstreifenprotein Ankyrin G (AnkG), dem eine wichtige Rolle in der Pathogenese der ARVC zugeschrieben wird.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass sich deutliche Unterschiede im elektrophysiologischen Verhalten der Herzmuskelzellen zwischen der ARVC-Patientin und ihrer asymptomatischen Schwester erkennen lassen, die mit dem klinischen Phänotyp korrelieren. Die Untersuchung an Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen ist eine geeignete Methode, um diese individuellen Unterschiede auf zellulärer Ebene näher zu erforschen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit leisten also einen wichtigen Beitrag nicht nur zu einem gesteigerten Verständnis der Pathogenese der ARVC, sondern vor allem zu einer langfristig verbesserten Risikostratifizierung von Mutationsträgern.

Anhang

6.1 Charakterisierung der induzierten pluripotenten Stammzellen

6.1.1 Karyotypisierung

Zum Ausschluss von Chromosomendefekten wurden induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs) aller drei Zelllinien einer klassischen Karyotypisierung unterzogen. Bei dieser Methode erfolgt eine lichtmikroskopische Darstellung des Chromosomensatzes einer Zelle im sogenannten Karyogramm. Um die Chromosomen gut sichtbar zu machen, werden die teilungsaktiven Zellen durch den Mitose-Hemmer Colchicin in der Metaphase der Mitose fixiert. In dieser Phase der Mitose sind die Chromosomen am stärksten kondensiert und lassen sich anhand ihrer Größe und Form sortieren. Diese Diagnostik wurde dankenswerterweise vom Zentrum für Humangenetik Regensburg unter der Leitung von Frau PD Dr. med. Ute Hehr übernommen. Bei der Chromosomenanalyse zeigte sich bei allen drei Zelllinien ein unauffälliger weiblicher Karyotyp (46, XX) ohne sichtbare Chromosomenaberrationen (s. Abb. 35).

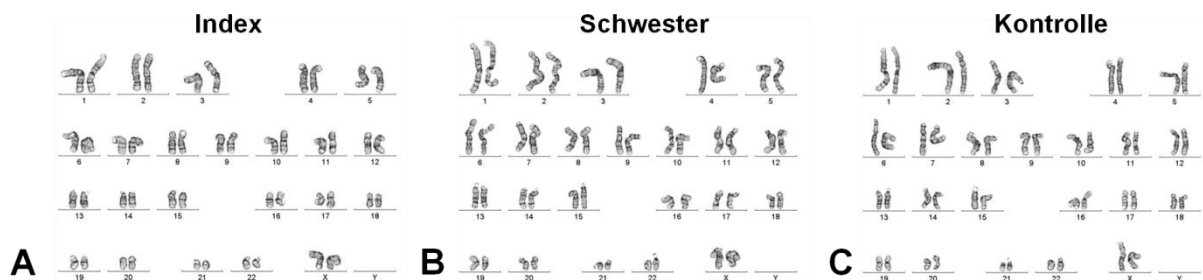


Abb. 35 Karyotypisierung der hiPSCs. Unauffällige Karyogramme (46, XX) der induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) der Indexpatientin (A), der asymptotischen Schwester der Patientin (B) sowie der gesunden Kontrollperson (C). Diagnostik durch PD Dr. med. Ute Hehr, Zentrum für Humangenetik Regensburg.

6.1.2 Nachweis embryonaler Marker

Darüber hinaus sollte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Ausgangszellen für die Differenzierung zu Kardiomyozyten tatsächlich um (induzierte pluripotente) Stammzellen handelt. Dafür wurde die Expression embryonaler Marker mittels Immunofluoreszenzfärbungen und Durchflusszytometrie untersucht. Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur qualitativen und quantitativen Untersuchung von Zelleigenschaften einer großen Zellpopulation. Das Prinzip dieser

Untersuchung beruht auf der Aussendung von optischen Signalen seitens fluoreszenzmarkierter Zellen beim Auftreffen auf einen Laserstrahl. Die mit einem Antikörper gegen bestimmte zelluläre Bestandteile beladenen Zellen können anhand ihres Signalverhaltens sortiert und analysiert werden. In dieser Arbeit wurde diese Methode für den Nachweis typischer embryonaler Marker in hiPSCs verwendet. Hierfür wurden die Stammzellen mit 1ml/well Accutase (Sigma) für 5 Minuten bei 37°C mittels Shake-Off-Verfahren von der MatrigelTM-Beschichtung gelöst. Im Anschluss daran wurden sie in 2 ml DMEM/F12 + 10% FBS überführt und für 5 Minuten mit 1200 Upm bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Nach Resuspension des Zellpellets im eben genannten Medium und Filtration durch einen 70µm-Membranfilter (Greiner Bio-One) erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer. Je 200.000 Zellen auf 100 µl Medium wurden auf ein Well einer 96-Well-Platte überführt. Nach dem Ausplattieren erfolgten zwei weitere Zentrifugationsschritte (1200 Upm, 5 min, RT). Daran schloss sich dann die eigentliche Färbung gewünschter Zellstrukturen an. Es wurden folgende primäre Antikörper (AK) verwendet: mouse anti-TRA-1-81 (Alexa Fluor 647), mouse anti-SSEA-1 (FITC) sowie der jeweils zugehörige IgM-Isotyp (Human Pluripotent Stem Cell Sorting Kit and Analysis Kit, BD Biosciences). Die AK wurden im Verhältnis 1:11 mit PBS verdünnt und direkt auf die ausplattierten Zellen gegeben. Zur Darstellung des intrazellulären Markers Oct3/4 wurde der Antikörper mouse anti-Oct3/4 (PE) im Verhältnis 1:10 bzw. der zugehörige IgM-Isotyp im Verhältnis 1:11 eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst mit 200 µl Cytofix/CytopermTM (BD Biosciences) für 20 Minuten bei 4°C lichtgeschützt fixiert. Nach nachfolgender zweimaliger Zentrifugation (1200 Upm, 5 min, RT) wurde der fluoreszenzkonjugierte Antikörper hinzugegeben und über Nacht lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mittels Durchflusszytometer analysiert.

Abb. 36 zeigt die Expression der untersuchten Proteine zum Pluripotenznachweis von hiPSCs der drei Zelllinien Index, Schwester und Kontrolle. Es konnte in den hiPSCs aller drei Zelllinien eine für embryonale Stammzellen typische Expression des intrazellulären Markers OCT-3/4 sowie des Oberflächen-Proteins TRA-1-81 nachgewiesen werden. Außerdem ließ sich das membranständige Protein SSEA-1, ein Marker für die Differenzierung von Zellen, nicht anfärben.

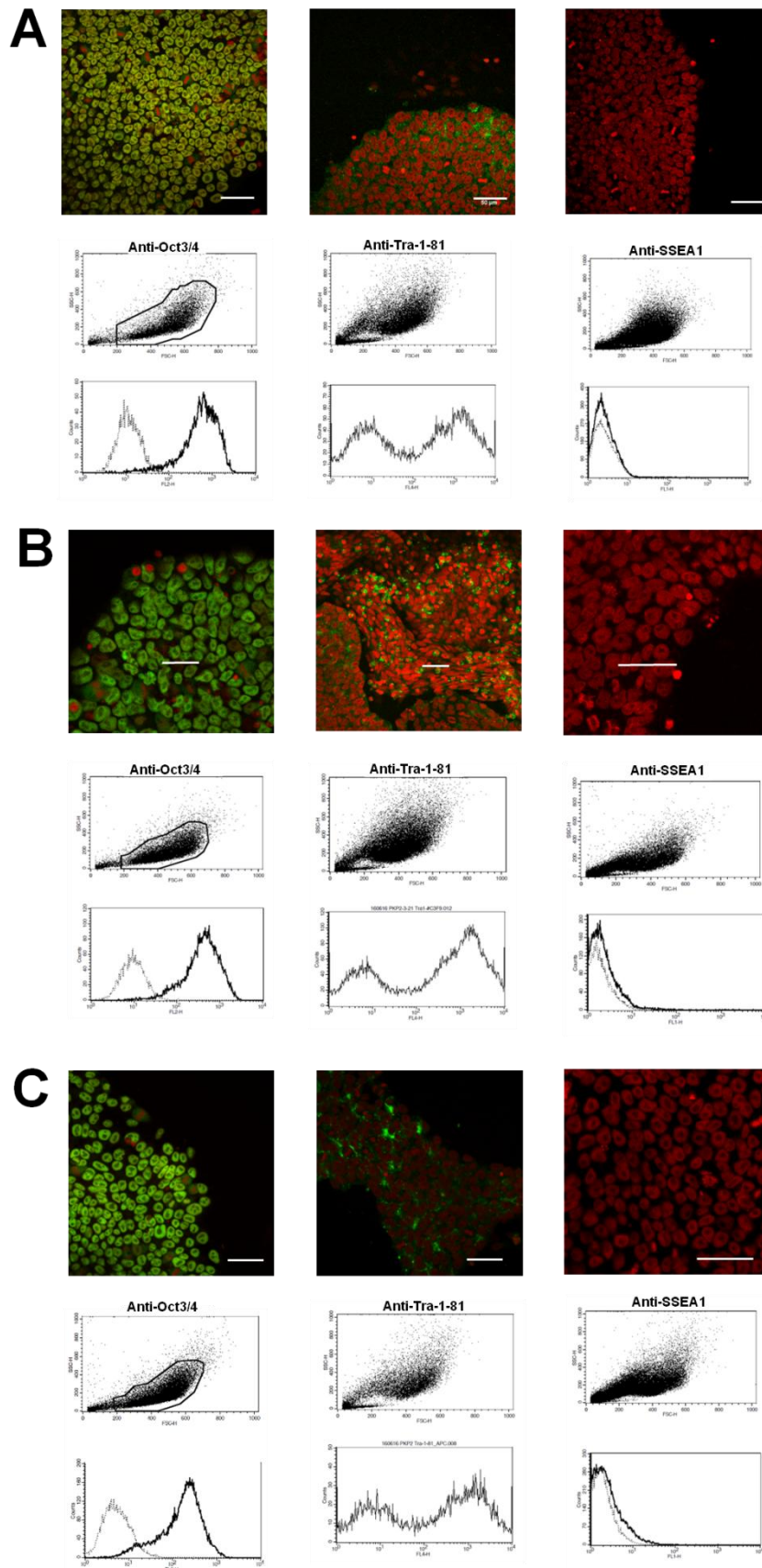


Abb. 36 Nachweis charakteristischer Stammzell-Marker in hiPSCs. Mittels Immunofluoreszenz und Durchflusszytometrie (FACS) konnte die Expression der embryonalen Marker OCT-3/4 und TRA-1-81 in hiPSCs aller drei untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden; SSEA-1, ein Marker für die Zelldifferenzierung, zeigte sich in beiden Methoden negativ. Untersuchte Zelllinien: Kontrolle (A), Schwester (B), Index (C). Messungen durchgeführt von Teresa Stauber.

6.1.3 Bestätigung der Pluripotenz

Um den Erfolg der Reprogrammierung zu bestätigen, wurden die gewonnenen hiPSCs im Hinblick auf ihre Pluripotenz sowie die Expression embryonaler Marker untersucht.

Zum Nachweis der Pluripotenz der hiPSCs wurde das Genom aller drei Zelllinien mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) sequenziert und im Hinblick auf ausgewählte Pluripotenz-Marker analysiert. Das NGS ist eine Kombination der „klassischen“ DNA-Sequenzierung nach Sanger mit moderner Bioinformatik und erlaubt es, ein komplettes Genom innerhalb eines Tages mit sehr hoher Auflösung zu entschlüsseln. Um diese Analysen durchzuführen, musste zunächst genetisches Material von hiPSCs aller drei Zelllinien gewonnen werden. Für die hierfür durchgeführte RNA-Isolation wurde das RNeasy®-Mini-Kit (QUIAGEN®) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Qualität der RNA-Proben wurde mithilfe des NanoDrop 2000 Spektrometers (PEQLAB®) analysiert. Die anschließende DNA-Sequenzierung und Pluripotenzanalyse wurden von der Abteilung für Neuropathologie des Universitätsklinikums Regensburg unter der Leitung von Prof. Dr. Markus J. Riemenschneider durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Bioinformatik-Assay PluriTest®, einer vom Institut für Neuropathologie Regensburg entwickelten Methode zur Beurteilung der Pluripotenz und somit der Qualität von hiPSCs (234). Abb. 37 bestätigt die erhaltene Pluripotenz für die hiPSCs aller drei Zelllinien.

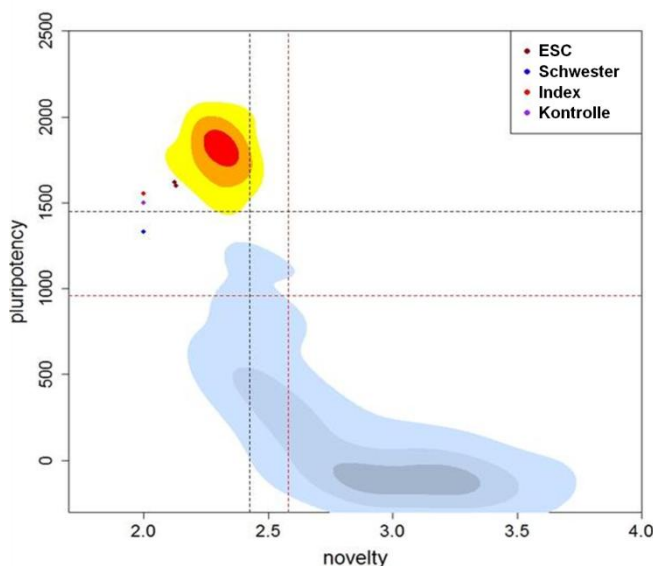


Abb. 37 Pluripotenznachweis der hiPSCs mittels NGS und PluriTest®: Es erfolgte die Pluripotenzanalyse der induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) mithilfe von *Next Generation Sequencing* (NGS) sowie der Software PluriTest®. Es konnte die erhaltene Pluripotenz für alle drei Zelllinien – Schwester, Index und Kontrolle – bestätigt werden; als Positivkontrolle dienten humane embryonale Stammzellen (ESC). Diagnostik durch die Abteilung für Neuropathologie Regensburg unter Prof. Dr. Markus Riemenschneider.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AnkG	Ankyrin G
ANK3	Gen kodierend für Ankyrin G
AP	Aktionspotential
APA	Aktionspotential-Amplitude
APD	Aktionspotentialdauer
ARVC/D	Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie / Dysplasie
BrS	Brugada-Syndrom
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II
C _M	Membrankapazität
c-MYC	Myelocytomatose-Onkogen
cTnT	kardiales Troponin T
Cx43	Connexin43
DAD	späte Nachdepolarisation (<i>Delayed After-Depolarization</i>)
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC2	Desmocollin-2
DSG2	Desmoglein-2
DSP	Desmoplakin
EAD	frühe Nachdepolarisation (<i>Early After-Depolarization</i>)
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
E _M	Membranpotential
E _{Rev}	Umkehrpotential; Potential der halbmaximalen Aktivierung
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESC	Embryonale Stammzellen
(Ø)F	Frequenz
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting

FBS	Fetal Bovine Serum
FRAP	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>
HCN-Kanäle	unselektive Kationenkanäle, sog. „ <i>funny channels</i> “ (<i>Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channels</i>)
hERG	auswärts gleichrichtender Kaliumkanal (<i>human Ether-a-go-go Related Gene</i>)
hiPSCs	humane induzierte pluripotente Stammzellen (<i>human induced Pluripotent Stem Cells</i>)
hiPSC-CMs	hiPSC-induzierte Kardiomyozyten (<i>hiPSC-derived Cardiomyocytes</i>)
ICD	implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
$I_{Ca,L}$	L-Typ-Kalziumstrom
I_f	unselektiver Kationenstrom / Schrittmacherstrom
I_{K1}	einwärts gleichrichtender Kaliumstrom
$I_{Kur}/I_{Kr}/I_{Ks}$	verzögert gleichrichtender Kaliumstrom
I_{IM}	intermediäre Inaktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle
I_{Na}	spannungsabhängiger Natriumstrom
$I_{Na,L}$	später Natriumstrom
$I_{Na,max}$	Spitzennatriumstrom
I_{to}	verzögert auswärtsrichtender Kaliumstrom
JUP2	Gen kodierend für Plakoglobin (<i>Junction Plakoglobin 2</i>)
KD	Knock-Down
KLF4	Kruppel-like factor 4
Kir2.1	einwärts gleichrichtender Kaliumkanal
$K_V(1.4/2.1/4.2)$	spannungsabhängige Kaliumkanäle
LQTS	Long-QT-Syndrom
LTV	Long-Term-Variabilität der APD
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
Max $\Delta V/\Delta t$	Maximale Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials
min	Minute
MRT	Magnetresonanztomographie

n	Anzahl untersuchter Zellen bzw. Personen
Na _v 1.5	spannungsgesteuerter Natriumkanal
NCX	Natrium-Kalzium-Austauscher
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NS	nicht signifikant
OCT3/4	octamer-binding transcription factor 3/4
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Dulbeccos Phosphate-buffered Saline
PKP2	Plakophilin-2
RMP	Ruhemembranpotential
RNA	Ribonukleinsäure
R _s	Serienwiderstand
RT	Raumtemperatur
RVEDD	rechtsventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
SAP97	<i>Synapse-associated Protein 97</i>
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SCN5A	Gen kodierend für Na _v 1.5 (<i>sodium voltage-gated channel alpha subunit 5</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>Standard Error of the Mean</i>)
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STV	Short-Term-Variabilität der APD
TGFβ3	Transformational Growth Factor β3
TMAC	Tetramethylammoniumchlorid
TMEM43	Transmembranprotein 43
T-Tubuli	Transversaltubuli der Plasmamembran von Kardiomyozyten
TTX	Tetrodotoxin
V _{1/2}	Spannung der halbmaximalen Aktivierung
V _{max}	maximale Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials
WES	<i>Whole Exome Sequencing</i>

6.3 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Das kardiale Aktionspotential	S. 7
Abb. 2	Schematische Darstellung der molekularen Glanzstreifen-Architektur	S. 19
Abb. 3	Kardiologische Diagnostik der 20-jährigen ARVC-Patientin	S. 31
Abb. 4	Stammbaum der Familie der Indexpatientin	S. 32
Abb. 5	Kultur induzierter pluripotenter Stammzellen	S. 36
Abb. 6	Protokoll zur Differenzierung von hiPSCs zu Kardiomyozyten	S. 38
Abb. 7	Differenzierung der hiPSCs zu Kardiomyozyten	S. 39
Abb. 8	Schematischer Aufbau einer Patch-Clamp-Messstation	S. 43
Abb. 9	Messprotokoll der I_{Na} -Messungen im <i>Whole-Cell/Voltage-Clamp</i> -Modus	S. 50
Abb. 10	Nachweis von cTnT in den gewonnenen hiPSC-CMs	S. 53
Abb. 11	Reduzierte PKP2-Expressionslevel nur in hiPSC-CMs der klinisch kranken Mutationsträgerin	S. 54
Abb. 12	Reduzierte Expression von Ankyrin G in hiPSC-CMs der Indexpatientin	S. 55
Abb. 13	Unveränderte Expression von $Na_v1.5$ in hiPSC-CMs der Mutationsträgerinnen	S. 56
Abb. 14	Klassifizierung der Aktionspotential-Phänotypen	S. 57
Abb. 15	Charakteristische Verteilung der AP-Phänotyp	S. 58
Abb. 16	Intrinsische AP-Frequenz der spontan kontrahierenden hiPSC-CMs	S. 59
Abb. 17	Depolarisiertes Ruhemembranpotential in Kardiomyozyten der ARVC-Patientin	S. 60
Abb. 18	Verlängerte Aktionspotentialdauer in Kardiomyozyten der ARVC-Patientin	S. 61
Abb. 19	APD-Variabilität: Gesteigerte STV50 in den hiPSC-CMs der ARVC-Patientin	S. 62
Abb. 20	Verringerte AP-Amplitude in den Kardiomyozyten der ARVC-Patientin	S. 63
Abb. 21	Tendenz zu verringerter maximaler AP-Aufstrichgeschwindigkeit in Herzmuskelzellen der ARVC-Patientin	S. 64
Abb. 22	Keine Unterschiede in der Variabilität der AP-Aufstrichgeschwindigkeit (V_{max} -Variabilität)	S. 65
Abb. 23	Spitzennatriumstrom reduziert in Kardiomyozyten der ARVC-Patientin, vergrößert in denen der asymptomatischen Mutationsträgerin	S. 68
Abb. 24	Keine Unterschiede in der Verteilung der Membrankapazitäten	S. 69
Abb. 25	Veränderte I_{Na} -Aktivierung bzw. -Inaktivierung in hiPSC-CMs der ARVC-Patientin	S. 70
Abb. 26	Messung der I_{Na} -Steady-State-Inaktivierung	S. 71
Abb. 27	<i>Window current</i> reduziert bei ARVC-Patientin, vergrößert bei asymptomatischer Mutationsträgerin	S. 72
Abb. 28	Keine Unterschiede in der intermediären Inaktivierung	S. 73

Abb. 29	Unveränderte Erholung nach Inaktivierung in hiPSC-CMs der Mutationsträgerinnen	S. 74
Abb. 30	Reduzierter später Natriumstrom ($I_{Na,L}$) in den hiPSC-CMs der Indexpatientin	S. 76
Abb. 31	Kein Zusammenhang zwischen $I_{Na,L}$ und Zellgröße	S. 76
Abb. 32	Gestörte Gap-Junction-Kommunikation in hiPSC-CMs der Mutationsträgerinnen	S. 81
Abb. 33	Erhöhte Frequenz spontaner Ca^{2+} -Transienten in hiPSC-CMs der Mutationsträgerinnen	S. 85
Abb. 34	Gesteigerte NCX-Aktivität in den hiPSC-CMs der ARVC-Patientin	S. 87
Abb. 35	Karyotypisierung der hiPSCs	S. 103
Abb. 36	Nachweis charakteristischer Stammzell-Marker in hiPSCs	S. 105
Abb. 37	Pluripotenznachweis der hiPSCs mittels NGS und PluriTest®	S. 106

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	AFM-Medium (<i>Aggregate Formation Medium</i>)	S. 39
Tab. 2	ATM-Medium (<i>Aggregate Transition Medium</i>)	S. 39
Tab. 3	CIM-50-Medium (<i>Cardiac Induction Medium</i>)	S. 39
Tab. 4	CIM-50-Medium + A6B10	S. 39
Tab. 5	CMM-Medium (<i>Cardiac Maintenance Medium</i>)	S. 40
Tab. 6	CMM-Medium + 1% DL-Laktat (Selektionsmedium)	S. 40
Tab. 7	DS-CMM-Medium + 2,5% FBS	S. 40
Tab. 8	mTeSR TM 1-Medium	S. 40
Tab. 9	Primäre Antikörper für Immunofluoreszenzfärbungen an hiPSC-CMs	S. 42
Tab. 10	Sekundäre Antikörper für Immunofluoreszenzfärbungen an hiPSC-CMs	S. 42
Tab. 11	Lösungen für Aktionspotential-Messungen bei RT	S. 45
Tab. 12	Lösungen für $I_{Na,max}$ -Messungen bei RT	S. 47
Tab. 13	Lösungen für Messungen des $I_{Na,L}$ sowie des Öffnungsverhaltens des $Na_v1.5$ bei RT	S. 50
Tab. 14	APD-Variabilität	S. 64
Tab. 15	V_{max} -Variabilität	S. 66
Tab. 16	AP-Analysen bei 0,25 Hz Stimulation	S. 67
Tab. 17	AP-Analysen bei 0,5 Hz Stimulation	S. 67
Tab. 18	AP-Analysen bei 1 Hz Stimulation	S. 67
Tab. 19	AP-Analysen bei 2 Hz Stimulation	S. 67
Tab. 20	AP-Analysen bei 3 Hz Stimulation	S. 67
Tab. 21	Fitting-Parameter der I_{Na} -Aktivierung und -Inaktivierung	S. 76

Literaturverzeichnis

1. Thiene G, Nava A, Corrado D, Rossi L, Pennelli N. Right ventricular cardiomyopathy and sudden death in young people. *N Engl J Med* 1988; 318(3):129–33.
2. Corrado D, Basso C, Schiavon M, Thiene G. Screening for Hypertrophic Cardiomyopathy in Young Athletes. *N Engl J Med* 1998; 339(6):364–369.
3. McKenna WJ, Thiene G, Nava A, Fontaliran F, Blomstrom-Lundqvist C, Fontaine G et al. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Task Force of the Working Group Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the International Society and Federation of Cardiology. *Br Heart J* 1994; 71(3):215–8.
4. Miani D, Pinamonti B, Bussani R, Silvestri F, Sinagra G, Camerini F. Right ventricular dysplasia: a clinical and pathological study of two families with left ventricular involvement. *Br Heart J* 1993; 69(2):151–7.
5. Nava A, Thiene G, Canciani B, Scognamiglio R, Daliento L, Buja G et al. Familial occurrence of right ventricular dysplasia: a study involving nine families. *J Am Coll Cardiol* 1988; 12(5):1222–8.
6. Corrado D, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: clinical impact of molecular genetic studies. *Circulation* 2006; 113(13):1634–7.
7. Gemayel C, Pelliccia A, Thompson PD. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38(7):1773–81.
8. Sen-Chowdhry S, Morgan RD, Chambers JC, McKenna WJ. Arrhythmogenic cardiomyopathy: etiology, diagnosis, and treatment. *Annu Rev Med* 2010; 61:233–53.
9. Sen-Chowdhry S, Lowe MD, Sporton SC, McKenna WJ. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: clinical presentation, diagnosis, and management. *Am J Med* 2004; 117(9):685–95.
10. Nasir K, Bomma C, Tandri H, Roguin A, Dalal D, Prakasa K et al. Electrocardiographic features of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy according to disease severity: a need to broaden diagnostic criteria. *Circulation* 2004; 110(12):1527–34.
11. Dalal D, Molin LH, Piccini J, Tichnell C, James C, Bomma C et al. Clinical features of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in plakophilin-2. *Circulation* 2006; 113(13):1641–9.

12. Thiene G, Basso C, Danieli G, Rampazzo A, Corrado D, Nava A. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy A Still Underrecognized Clinic Entity. *Trends Cardiovasc Med* 1997; 7(3):84–90.
13. Pinamonti B, Sinagra G, Salvi A, Di Lenarda A, Morgera T, Silvestri F et al. Left ventricular involvement in right ventricular dysplasia. *Am Heart J* 1992; 123(3):711–24.
14. Webb JG, Kerr CR, Huckell VF, Mizgala HF, Ricci DR. Left ventricular abnormalities in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Am J Cardiol* 1986; 58(6):568–70.
15. Bauce B, Basso C, Rampazzo A, Beffagna G, Daliento L, Frigo G et al. Clinical profile of four families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by dominant desmoplakin mutations. *Eur Heart J* 2005; 26(16):1666–75.
16. Corrado D, Basso C, Thiene G, McKenna WJ, Davies MJ, Fontaliran F et al. Spectrum of clinicopathologic manifestations of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a multicenter study. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30(6):1512–20.
17. Sen-Chowdhry S, Syrris P, Prasad SK, Hughes SE, Merrifield R, Ward D et al. Left-dominant arrhythmogenic cardiomyopathy: an under-recognized clinical entity. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52(25):2175–87.
18. Corrado D, Basso C, Judge DP. Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Circ Res* 2017; 121(7):784–802.
19. Basso C, Bauce B, Corrado D, Thiene G. Pathophysiology of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* 2011; 9(4):223–33.
20. Priori SG, Blomström-Lundqvist C, Mazzanti A, Blom N, Borggrefe M, Camm J et al. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *Eur Heart J* 2015; 36(41):2793–867.
21. Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, Basso C, Bauce B, Bluemke DA et al. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the task force criteria. *Circulation* 2010; 121(13):1533–41.
22. Marcus FI, Fontaine GH, Guiraudon G, Frank R, Laurenceau JL, Malergue C et al. Right ventricular dysplasia: a report of 24 adult cases. *Circulation* 1982; 65(2):384–98.

23. Nava A, Canciani B, Daliento L, Miraglia G, Buja G, Fasoli G et al. Juvenile sudden death and effort ventricular tachycardias in a family with right ventricular cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 1988; 21(2):111–26.
24. Corrado D, Fontaine G, Marcus FI, McKenna WJ, Nava A, Thiene G et al. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: need for an international registry. Study Group on Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy of the Working Groups on Myocardial and Pericardial Disease and Arrhythmias of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the World Heart Federation. *Circulation* 2000; 101(11):E101-6.
25. Niroomand F, Carbucicchio C, Tondo C, Riva S, Fassini G, Apostolo A et al. Electrophysiological characteristics and outcome in patients with idiopathic right ventricular arrhythmia compared with arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Heart* 2002; 87(1):41–7.
26. Lombardi R, Marian AJ. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy is a disease of cardiac stem cells. *Curr Opin Cardiol* 2010; 25(3):222–8.
27. Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA et al. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet* 2004; 36(11):1162–4.
28. Thiene G, Nava A, Angelini A, Daliento L, Scognamiglio R, Corrado D. Anatomoclinical Aspects of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. In: Baroldi G, Camerini F, Goodwin JF, editors. *Advances in Cardiomyopathies*. Berlin: Springer Berlin; 2013. p. 397–408.
29. Corrado D, Calkins H, Link MS, Leoni L, Favale S, Bevilacqua M et al. Prophylactic implantable defibrillator in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia and no prior ventricular fibrillation or sustained ventricular tachycardia. *Circulation* 2010; 122(12):1144–52.
30. Corrado D, Wichter T, Link MS, Hauer R, Marchlinski F, Anastasakis A et al. Treatment of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: an international task force consensus statement. *Eur Heart J* 2015; 36(46):3227–37.
31. Boisselle PM, Bluemke DA, Manning WJ, Sen-Chowdhry S. Expert Opinion: International Task Force Criteria for the Clinical Diagnosis of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *J Thorac Imaging* 2016; 31(6):323.
32. Basso C, Corrado D, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: what's in a name? From a congenital defect (dysplasia) to a genetically determined cardiomyopathy (dystrophy). *Am J Cardiol* 2010; 106(2):275–7.

33. Zorzi A, Rigato I, Pilichou K, Perazzolo Marra M, Migliore F, Mazzotti E et al. Phenotypic expression is a prerequisite for malignant arrhythmic events and sudden cardiac death in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Europace* 2016; 18(7):1086–94.
34. Epstein AE, DiMarco JP, Ellenbogen KA, Estes NAM, Freedman RA, Gettes LS et al. ACC/AHA/HRS 2008 Guidelines for Device-Based Therapy of Cardiac Rhythm Abnormalities: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the ACC/AHA/NASPE 2002 Guideline Update for Implantation of Cardiac Pacemakers and Antiarrhythmia Devices) developed in collaboration with the American Association for Thoracic Surgery and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51(21):e1-62.
35. Zipes DP, Camm AJ, Borggrefe M, Buxton AE, Chaitman B, Fromer M et al. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death). *J Am Coll Cardiol* 2006; 48(5):e247-346.
36. Bers DM. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. 2nd edition. Dordrecht: Springer Netherlands; 2001.
37. Kléber AG, Rudy Y. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol Rev* 2004; 84(2):431–88.
38. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002; 415(6868):198–205.
39. Sperelakis N. An electric field mechanism for transmission of excitation between myocardial cells. *Circ Res* 2002; 91(11):985–7.
40. Kucera JP, Rohr S, Rudy Y. Localization of Sodium Channels in Intercalated Disks Modulates Cardiac Conduction. *Circ Res* 2002; 91(12):1176–82.
41. Antzelevitch C, Dumaine R. Electrical Heterogeneity in the Heart: Physiological, Pharmacological and Clinical Implications. In: Terjung R, editor. *Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: Wiley; 2011. p. 175.
42. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005; 85(4):1205–53.
43. Luo CH, Rudy Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. *Circ Res* 1994; 74(6):1071–96.

44. Luo CH, Rudy Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. II. Afterdepolarizations, triggered activity, and potentiation. *Circ Res* 1994; 74(6):1097–113.
45. Bers D. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res* 1999; 42(2):339–60.
46. Wang Z, Fermini B, Nattel S. Delayed rectifier outward current and repolarization in human atrial myocytes. *Circ Res* 1993; 73(2):276–85.
47. Wagner S, Maier LS, Bers DM. Role of sodium and calcium dysregulation in tachyarrhythmias in sudden cardiac death. *Circ Res* 2015; 116(12):1956–70.
48. Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 1993; 362(6416):127–33.
49. Irisawa H, Brown HF, Giles W. Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev* 1993; 73(1):197–227.
50. Cho H-S, Takano M, Noma A. The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node. *J Physiol* 2003; 550(Pt 1):169–80.
51. DiFrancesco D. The cardiac hyperpolarizing-activated current, *if*. Origins and developments. *Prog Biophys Mol Biol* 1985; 46(3):163–83.
52. Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 1998; 393(6685):587–91.
53. Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952; 117(4):500–44.
54. Weidmann S. The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium-carrying system. *J Physiol* 1955; 127(1):213–24.
55. Tan HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, van Tintelen PJ et al. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 2001; 409(6823):1043–7.
56. Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000; 26(1):13–25.
57. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC et al. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000; 28(2):365–8.

58. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57(4):397–409.
59. Roden DM, Balser JR, George AL, Anderson ME. Cardiac ion channels. *Annu Rev Physiol* 2002; 64:431–75.
60. Gellens ME, George AL, Chen LQ, Chahine M, Horn R, Barchi RL et al. Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(2):554–8.
61. Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL et al. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995; 80(5):805–11.
62. Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL, JR. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 1995; 376(6542):683–5.
63. Liu H, Clancy C, Cormier J, Kass R. Mutations in cardiac sodium channels: clinical implications. *Am J Pharmacogenomics* 2003; 3(3):173–9.
64. Marbán E. Cardiac channelopathies. *Nature* 2002; 415(6868):213–8.
65. Maltsev VA, Sabbah HN, Higgins RS, Silverman N, Lesch M, Undrovinas AI. Novel, ultraslow inactivating sodium current in human ventricular cardiomyocytes. *Circulation* 1998; 98(23):2545–52.
66. Attwell D, Cohen I, Eisner D, Ohba M, Ojeda C. The steady state TTX-sensitive ("window") sodium current in cardiac Purkinje fibres. *Pflugers Arch* 1979; 379(2):137–42.
67. Makielski JC, Kyle JW. Late I(Na) in the Heart: Physiology, Pathology, and Pathways. *Circulation* 2015; 132(7):553–5.
68. Makielski JC, Farley AL. Na(+) current in human ventricle: implications for sodium loading and homeostasis. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006; 17 Suppl 1:S15-S20.
69. Maier SKG, Westenbroek RE, McCormick KA, Curtis R, Scheuer T, Catterall WA. Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation* 2004; 109(11):1421–7.
70. Cohen SA. Immunocytochemical localization of rH1 sodium channel in adult rat heart atria and ventricle. Presence in terminal intercalated disks. *Circulation* 1996; 94(12):3083–6.

71. Mohler PJ, Rivolta I, Napolitano C, LeMaillet G, Lambert S, Priori SG et al. Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(50):17533–8.
72. Baba S, Dun W, Cabo C, Boyden PA. Remodeling in Cells From Different Regions of the Reentrant Circuit During Ventricular Tachycardia. *Circulation* 2005; 112(16):2386–96.
73. Brette F, Orchard CH. Density and sub-cellular distribution of cardiac and neuronal sodium channel isoforms in rat ventricular myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348(3):1163–6.
74. Abriel H. Roles and regulation of the cardiac sodium channel Na v 1.5: recent insights from experimental studies. *Cardiovasc Res* 2007; 76(3):381–9.
75. Meadows LS, Isom LL. Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc Res* 2005; 67(3):448–58.
76. Hund TJ, Koval OM, Li J, Wright PJ, Qian L, Snyder JS et al. A beta(IV)-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *J Clin Invest* 2010; 120(10):3508–19.
77. Isom LL. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* 2001; 7(1):42–54.
78. LeMaillet G, Walker B, Lambert S. Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits. *J Biol Chem* 2003; 278(30):27333–9.
79. Lowe JS, Palygin O, Bhasin N, Hund TJ, Boyden PA, Shibata E et al. Voltage-gated Nav channel targeting in the heart requires an ankyrin-G dependent cellular pathway. *J Cell Biol* 2008; 180(1):173–86.
80. Dun W, Lowe JS, Wright P, Hund TJ, Mohler PJ, Boyden PA. Ankyrin-G participates in INa remodeling in myocytes from the border zones of infarcted canine heart. *PLoS One* 2013; 8(10):e78087.
81. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2018; 137(12):e67-e492.
82. Weiss JN, Qu Z, Chen P-S, Lin S-F, Karagueuzian HS, Hayashi H et al. The dynamics of cardiac fibrillation. *Circulation* 2005; 112(8):1232–40.
83. Huikuri HV, Castellanos A, Myerburg RJ. Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med* 2001; 345(20):1473–82.

84. Keefe DL, Schwartz J, Somberg JC. The substrate and the trigger: The role of myocardial vulnerability in sudden cardiac death. *Am Heart J* 1987; 113(1):218–25.
85. Qu Z, Weiss JN. Mechanisms of ventricular arrhythmias: from molecular fluctuations to electrical turbulence. *Annu Rev Physiol* 2015; 77:29–55.
86. Pertsov AM, Davidenko JM, Salomonsz R, Baxter WT, Jalife J. Spiral waves of excitation underlie reentrant activity in isolated cardiac muscle. *Circ Res* 1993; 72(3):631–50.
87. Pandit SV, Jalife J. Rotors and the Dynamics of Cardiac Fibrillation. *Circ Res* 2013; 112(5):849–62.
88. Papadatos GA, Wallerstein PMR, Head CEG, Ratcliff R, Brady PA, Benndorf K et al. Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(9):6210–5.
89. Restivo M, Caref EB, Kozhevnikov DO, El-Sherif N. Spatial dispersion of repolarization is a key factor in the arrhythmogenicity of long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004; 15(3):323–31.
90. Armoundas AA, Tomaselli GF, Esperer HD. Pathophysiological basis and clinical application of T-wave alternans. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40(2):207–17.
91. Qu Z, Xie Y, Garfinkel A, Weiss JN. T-wave alternans and arrhythmogenesis in cardiac diseases. *Front Physiol* 2010; 1:154.
92. Xie Y, Sato D, Garfinkel A, Qu Z, Weiss JN. So little source, so much sink: requirements for afterdepolarizations to propagate in tissue. *Biophys J* 2010; 99(5):1408–15.
93. Nuss HB, Kääh S, Kass DA, Tomaselli GF, Marbán E. Cellular basis of ventricular arrhythmias and abnormal automaticity in heart failure. *Am J Physiol* 1999; 277(1):H80-91.
94. January CT, Riddle JM. Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca^{2+} current. *Circ Res* 1989; 64(5):977–90.
95. Bers DM. Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. *Annu Rev Physiol* 2014; 76:107–27.
96. Pogwizd SM. Nonreentrant mechanisms underlying spontaneous ventricular arrhythmias in a model of nonischemic heart failure in rabbits. *Circulation* 1995; 92(4):1034–48.
97. Pogwizd SM, Corr B. The contribution of nonreentrant mechanisms to malignant ventricular arrhythmias. *Basic Res Cardiol* 1992; 87 Suppl 2:115–29.

98. Silva J, Rudy Y. Mechanism of pacemaking in I(K1)-downregulated myocytes. *Circ Res* 2003; 92(3):261–3.
99. Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E. Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993; 73(2):379–85.
100. Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res* 2001; 88(11):1159–67.
101. Bezzina CR, Rook MB, Wilde AA. Cardiac sodium channel and inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc Res* 2001; 49(2):257–71.
102. Clancy CE, Chen-Izu Y, Bers DM, Belardinelli L, Boyden PA, Csernoch L et al. Deranged sodium to sudden death. *J Physiol* 2015; 593(6):1331–45.
103. Horvath B, Banyasz T, Jian Z, Hegyi B, Kistamas K, Nanasi PP et al. Dynamics of the late Na⁽⁺⁾ current during cardiac action potential and its contribution to afterdepolarizations. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 64:59–68.
104. Undrovinas AI, Maltsev VA, Kyle JW, Silverman N, Sabbah HN. Gating of the late Na⁺ channel in normal and failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34(11):1477–89.
105. Undrovinas AI, Maltsev VA, Sabbah HN. Repolarization abnormalities in cardiomyocytes of dogs with chronic heart failure: role of sustained inward current. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55(3):494–505.
106. Wang DW, Makita N, Kitabatake A, Balser JR, George AL. Enhanced Na⁽⁺⁾ channel intermediate inactivation in Brugada syndrome. *Circ Res* 2000; 87(8):E37-43.
107. Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M et al. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet* 1999; 23(1):20–1.
108. Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baro I et al. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation* 2001; 104(25):3081–6.
109. Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P et al. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998; 392(6673):293–6.
110. Alings M, Wilde A. "Brugada" syndrome: clinical data and suggested pathophysiological mechanism. *Circulation* 1999; 99(5):666–73.

111. Grant AO. Molecular biology of sodium channels and their role in cardiac arrhythmias. *The American Journal of Medicine* 2001; 110(4):296–305.
112. Remme CA, Wilde AAM, Bezzina CR. Cardiac sodium channel overlap syndromes: different faces of SCN5A mutations. *Trends Cardiovasc Med* 2008; 18(3):78–87.
113. Kirchhefer U. Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 1999; 42(1):254–61.
114. Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P. Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 1999; 84(6):713–21.
115. Swaminathan PD, Purohit A, Hund TJ, Anderson ME. Calmodulin-dependent protein kinase II: linking heart failure and arrhythmias. *Circ Res* 2012; 110(12):1661–77.
116. Wagner S, Dybkova N, Rasenack ECL, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest* 2006; 116(12):3127–38.
117. Maack C, Cortassa S, Aon MA, Ganesan AN, Liu T, O'Rourke B. Elevated cytosolic Na⁺ decreases mitochondrial Ca²⁺ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circ Res* 2006; 99(2):172–82.
118. Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T et al. Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase II δ is required for late I(Na) augmentation leading to cellular Na and Ca overload. *Circ Res* 2011; 108(5):555–65.
119. Bers DM, Chen-Izu Y. Sodium and calcium regulation in cardiac myocytes: from molecules to heart failure and arrhythmia. *J Physiol* 2015; 593(6):1327–9.
120. Despa S, Bers DM. Na⁺ transport in the normal and failing heart – remember the balance. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 61:2–10.
121. Forbes MS, Sperelakis N. Intercalated discs of mammalian heart: a review of structure and function. *Tissue Cell* 1985; 17(5):605–48.
122. Melnyk P, Zhang L, Shrier A, Nattel S. Differential distribution of Kir2.1 and Kir2.3 subunits in canine atrium and ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283(3):H1123–33.

123. Cunha SR, Mohler PJ. Cardiac ankyrins: Essential components for development and maintenance of excitable membrane domains in heart. *Cardiovasc Res* 2006; 71(1):22–9.
124. Rampazzo A, Calore M, van Hengel J, van Roy F. Intercalated discs and arrhythmogenic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2014; 7(6):930–40.
125. Sato PY, Coombs W, Lin X, Nekrasova O, Green KJ, Isom LL et al. Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc. *Circ Res* 2011; 109(2):193–201.
126. Leo-Macias A, Agullo-Pascual E, Delmar M. The cardiac connexome: Non-canonical functions of connexin43 and their role in cardiac arrhythmias. *Semin Cell Dev Biol* 2016; 50:13–21.
127. Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou N-H. Gap junctions. *Compr Physiol* 2012; 2(3):1981–2035.
128. Willecke K, Hennemann H, Dahl E, Jungbluth S, Heynkes R. The diversity of connexin genes encoding gap junctional proteins. *Eur J Cell Biol* 1991; 56(1):1–7.
129. Agullo-Pascual E, Lin X, Leo-Macias A, Zhang M, Liang F-X, Li Z et al. Super-resolution imaging reveals that loss of the C-terminus of connexin43 limits microtubule plus-end capture and NaV1.5 localization at the intercalated disc. *Cardiovasc Res* 2014; 104(2):371–81.
130. Rhett JM, Gourdie RG. The perinexus: a new feature of Cx43 gap junction organization. *Heart Rhythm* 2012; 9(4):619–23.
131. McCain ML, Desplantez T, Geisse NA, Rothen-Rutishauser B, Oberer H, Parker KK et al. Cell-to-cell coupling in engineered pairs of rat ventricular cardiomyocytes: relation between Cx43 immunofluorescence and intercellular electrical conductance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 302(2):H443–50.
132. Dupont E, Matsushita T, Kaba RA, Vozzi C, Coppen SR, Khan N et al. Altered connexin expression in human congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33(2):359–71.
133. Gollob MH, Jones DL, Krahm AD, Danis L, Gong X-Q, Shao Q et al. Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2006; 354(25):2677–88.
134. Paul M, Wichter T, Gerss J, Arps V, Schulze-Bahr E, Robenek H et al. Connexin expression patterns in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2013; 111(10):1488–95.

135. Danik SB, Liu F, Zhang J, Suk HJ, Morley GE, Fishman GI et al. Modulation of Cardiac Gap Junction Expression and Arrhythmic Susceptibility. *Circ Res* 2004; 95(10):1035–41.
136. Chopra A, Tabdanov E, Patel H, Janmey PA, Kresh JY. Cardiac myocyte remodeling mediated by N-cadherin-dependent mechanosensing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 300(4):H1252-66.
137. Ganz A, Lambert M, Saez A, Silberzan P, Buguin A, Mège RM et al. Traction forces exerted through N-cadherin contacts. *Biol Cell* 2006; 98(12):721–30.
138. Mertens C, Hofmann I, Wang Z, Teichmann M, Sepehri Chong S, Schnölzer M et al. Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(14):7795–800.
139. Garrod D, Chidgey M. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778(3):572–87.
140. Holthöfer B, Windoffer R, Troyanovsky S, Leube RE. Structure and function of desmosomes. *Int Rev Cytol* 2007; 264:65–163.
141. Spindler V, Eming R, Schmidt E, Amagai M, Grando S, Jonkman MF et al. Mechanisms Causing Loss of Keratinocyte Cohesion in Pemphigus. *J Invest Dermatol* 2018; 138(1):32–7.
142. Franke WW, Borrmann CM, Grund C, Pieperhoff S. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins. *Eur J Cell Biol* 2006; 85(2):69–82.
143. Borrmann CM, Grund C, Kuhn C, Hofmann I, Pieperhoff S, Franke WW. The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. II. Colocalizations of desmosomal and fascia adhaerens molecules in the intercalated disk. *Eur J Cell Biol* 2006; 85(6):469–85.
144. Lancisi Giovanni Maria. *De Motu Cordis et Aneurysmatibus: Opus Posthumum In Duas Partes Divisum*. Rom: Giovanni Maria Salvioni; 1736.
145. Uhl HSM. A previously undescribed congenital malformation of the heart: almost total absence of the myocardium of the right ventricle. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1952; 91(3):197–209.
146. Calkins H. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy-three decades of progress. *Circ J* 2015; 79(5):901–13.
147. Coonar AS, Protonotarios N, Tsatsopoulou A, Needham EW, Houlston RS, Cliff S et al. Gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with diffuse

- nonepidermolytic palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) maps to 17q21. *Circulation* 1998; 97(20):2049–58.
148. McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A et al. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet* 2000; 355(9221):2119–24.
 149. Rampazzo A, Nava A, Malacrida S, Beffagna G, Bauce B, Rossi V et al. Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2002; 71(5):1200–6.
 150. Rampazzo A, Nava A, Erne P, Eberhard M, Vian E, Slomp P et al. A new locus for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVD2) maps to chromosome 1q42-q43. *Hum Mol Genet* 1995; 4(11):2151–4.
 151. Lazzarini E, Jongbloed JDH, Pilichou K, Thiene G, Basso C, Bikker H et al. The ARVD/C genetic variants database: 2014 update. *Hum Mutat* 2015; 36(4):403–10.
 152. Marcus FI, Zareba W, Calkins H, Towbin JA, Basso C, Bluemke DA et al. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia, Clinical Presentation and Diagnostic Evaluation: Results from the North American Multidisciplinary Study. *Heart Rhythm* 2009; 6(7):984–92.
 153. Romero J, Mejia-Lopez E, Manrique C, Lucariello R. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy (ARVC/D): A Systematic Literature Review. *Clin Med Insights Cardiol* 2013; 7:97–114.
 154. van Tintelen JP, Entius MM, Bhuiyan ZA, Jongbloed R, Wiesfeld ACP, Wilde AAM et al. Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circulation* 2006; 113(13):1650–8.
 155. Rowland E, McKenna WJ, Sugrue D, Barclay R, Foale RA, Krikler DM. Ventricular tachycardia of left bundle branch block configuration in patients with isolated right ventricular dilatation. Clinical and electrophysiological features. *Br Heart J* 1984; 51(1):15–24.
 156. Foale RA, Nihoyannopoulos P, Ribeiro P, McKenna WJ, Oakley CM, Krikler DM et al. Right ventricular abnormalities in ventricular tachycardia of right ventricular origin: relation to electrophysiological abnormalities. *Br Heart J* 1986; 56(1):45–54.
 157. Martini B, Nava A, Thiene G, Buja G, Canciani B, Miraglia G et al. Monomorphic repetitive rhythms originating from the outflow tract in patients with minor forms of right ventricular cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 1990; 27(2):211–21.

158. Willis BC, Ponce-Balbuena D, Jalife J. Protein assemblies of sodium and inward rectifier potassium channels control cardiac excitability and arrhythmogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; 308(12):H1463-73.
159. Fidler LM, Wilson GJ, Liu F, Cui X, Scherer SW, Taylor GP et al. Abnormal connexin43 in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by plakophilin-2 mutations. *J Cell Mol Med* 2009; 13(10):4219–28.
160. Leo-Macías A, Liang F-X, Delmar M. Ultrastructure of the intercellular space in adult murine ventricle revealed by quantitative tomographic electron microscopy. *Cardiovasc Res* 2015; 107(4):442–52.
161. Li MWM, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Connexin 43 and plakophilin-2 as a protein complex that regulates blood–testis barrier dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(25):10213–8.
162. Oxford EM, Musa H, Maass K, Coombs W, Taffet SM, Delmar M. Connexin43 remodeling caused by inhibition of plakophilin-2 expression in cardiac cells. *Circ Res* 2007; 101(7):703–11.
163. Agullo-Pascual E, Reid DA, Keegan S, Sidhu M, Fenyö D, Rothenberg E et al. Super-resolution fluorescence microscopy of the cardiac connexome reveals plakophilin-2 inside the connexin43 plaque. *Cardiovasc Res* 2013; 100(2):231–40.
164. Agullo-Pascual E, Cerrone M, Delmar M. Arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome: diseases of the connexome. *FEBS Lett* 2014; 588(8):1322–30.
165. Danik SB, Rosner G, Lader J, Gutstein DE, Fishman GI, Morley GE. Electrical remodeling contributes to complex tachyarrhythmias in connexin43-deficient mouse hearts. *FASEB J* 2008; 22(4):1204–12.
166. Lübke-meier I, Requardt RP, Lin X, Sasse P, Andrié R, Schrickel JW et al. Deletion of the last five C-terminal amino acid residues of connexin43 leads to lethal ventricular arrhythmias in mice without affecting coupling via gap junction channels. *Basic Res Cardiol* 2013; 108(3):348.
167. 167. Malhotra JD, Thyagarajan V, Chen C, Isom LL. Tyrosine-phosphorylated and nonphosphorylated sodium channel beta1 subunits are differentially localized in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2004; 279(39):40748–54.
168. Jansen JA, Noorman M, Musa H, Stein M, Jong S de, van der Nagel R et al. Reduced heterogeneous expression of Cx43 results in decreased Nav1.5 expression and reduced sodium current that accounts for arrhythmia vulnerability in conditional Cx43 knockout mice. *Heart Rhythm* 2012; 9(4):600–7.

169. Desplantez T, McCain ML, Beauchamp P, Rigoli G, Rothen-Rutishauser B, Parker KK et al. Connexin43 ablation in foetal atrial myocytes decreases electrical coupling, partner connexins, and sodium current. *Cardiovasc Res* 2012; 94(1):58–65.
170. Sato PY, Musa H, Coombs W, Guerrero-Serna G, Patino GA, Taffet SM et al. Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circ Res* 2009; 105(6):523–6.
171. Cerrone M, Noorman M, Lin X, Chkourko H, Liang F-X, van der Nagel R et al. Sodium current deficit and arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency. *Cardiovasc Res* 2012; 95(4):460–8.
172. Cerrone M, Lin X, Zhang M, Agullo-Pascual E, Pfenniger A, Chkourko Gusky H et al. Missense mutations in plakophilin-2 cause sodium current deficit and associate with a Brugada syndrome phenotype. *Circulation* 2014; 129(10):1092–103.
173. Cerrone M, Delmar M. Desmosomes and the sodium channel complex: implications for arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome. *Trends Cardiovasc Med* 2014; 24(5):184–90.
174. Nilsson KR, Bennett V. Ankyrin-based patterning of membrane microdomains: new insights into a novel class of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 54(2):106–15.
175. Makara MA, Curran J, Little SC, Musa H, Polina I, Smith SA et al. Ankyrin-G coordinates intercalated disc signaling platform to regulate cardiac excitability in vivo. *Circ Res* 2014; 115(11):929–38.
176. Noorman M, Hakim S, Kessler E, Groeneweg JA, Cox MGPJ, Asimaki A et al. Remodeling of the cardiac sodium channel, connexin43, and plakoglobin at the intercalated disk in patients with arrhythmogenic cardiomyopathy. *Heart Rhythm* 2013; 10(3):412–9.
177. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4):663–76.
178. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858):1917–20.
179. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5):861–72.

180. Miyoshi K, Tsuji D, Kudoh K, Satomura K, Muto T, Itoh K et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from oral mucosa. *J Biosci Bioeng* 2010; 110(3):345–50.
181. Fuerstenau-Sharp M, Zimmermann ME, Stark K, Jentsch N, Klingenstein M, Drzymalski M et al. Generation of highly purified human cardiomyocytes from peripheral blood mononuclear cell-derived induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2015; 10(5):e0126596.
182. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 2009; 104(4):e30-41.
183. Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Zwi-Dantsis L, Caspi O, Winterstern A et al. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 471(7337):225–9.
184. Moreau A, Mercier A, Thériault O, Boutjdir M, Burger B, Keller DI et al. Biophysical, Molecular, and Pharmacological Characterization of Voltage-Dependent Sodium Channels From Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Can J Cardiol* 2017; 33(2):269–78.
185. Ma D, Wei H, Lu J, Ho S, Zhang G, Sun X et al. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2013; 34(15):1122–33.
186. Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976; 260(5554):799–802.
187. Hoekstra M, Mummery CL, Wilde AAM, Bezzina CR, Verkerk AO. Induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes as models for cardiac arrhythmias. *Front Physiol* 2012; 3:346.
188. Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circ Res* 1993; 72(1):75–83.
189. Harrison SM, Boyett MR. The role of the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger in the rate-dependent increase in contraction in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 1995; 482 (Pt 3):555–66.
190. Hinterseer M, Beckmann B-M, Thomsen MB, Pfeufer A, Ulbrich M, Sinner MF et al. Usefulness of short-term variability of QT intervals as a predictor for electrical remodeling and proarrhythmia in patients with nonischemic heart failure. *Am J Cardiol* 2010; 106(2):216–20.

191. Tereshchenko LG, Han L, Cheng A, Marine JE, Spragg DD, Sinha S et al. Beat-to-beat three-dimensional ECG variability predicts ventricular arrhythmia in ICD recipients. *Heart Rhythm* 2010; 7(11):1606–13.
192. Meijer van Putten, Rosalie M E, Mengarelli I, Guan K, Zegers JG, van Ginneken, Antoni C G, Verkerk AO et al. Ion channelopathies in human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes: a dynamic clamp study with virtual IK1. *Front Physiol* 2015; 6:7.
193. Stein M, van Veen TAB, Hauer RNW, Bakker JMT de, van Rijen HVM. A 50% reduction of excitability but not of intercellular coupling affects conduction velocity restitution and activation delay in the mouse heart. *PLoS One* 2011; 6(6):e20310.
194. 194. Tsumoto K, Ashihara T, Haraguchi R, Nakazawa K, Kurachi Y. Roles of subcellular Na⁺ channel distributions in the mechanism of cardiac conduction. *Biophys J* 2011; 100(3):554–63.
195. Brugada R, Brugada J, Antzelevitch C, Kirsch GE, Potenza D, Towbin JA et al. Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST-segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts. *Circulation* 2000; 101(5):510–5.
196. Corrado D, Zorzi A, Cerrone M, Rigato I, Mongillo M, Bauce B et al. Relationship Between Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy and Brugada Syndrome: New Insights From Molecular Biology and Clinical Implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2016; 9(4):e003631.
197. Caballero R, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Amorós I, Barana A, La González de Fuente M et al. Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311, decreasing the polyamine-induced rectification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(35):15631–6.
198. El-Battrawy I, Zhao Z, Lan H, Cyganek L, Tombers C, Li X et al. Electrical dysfunctions in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with an arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Europace* 2018; 20(F11):f46-f56.
199. van Opbergen CJM, Delmar M, van Veen TAB. Potential new mechanisms of pro-arrhythmia in arrhythmogenic cardiomyopathy: focus on calcium sensitive pathways. *Neth Heart J* 2017; 25(3):157–69.
200. Ma J, Guo L, Fiene SJ, Anson BD, Thomson JA, Kamp TJ et al. High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301(5):H2006-17.

- 201.** Synnergren J, Améen C, Jansson A, Sartipy P. Global transcriptional profiling reveals similarities and differences between human stem cell-derived cardiomyocyte clusters and heart tissue. *Physiol Genomics* 2012; 44(4):245–58.
- 202.** Ponce-Balbuena D, Guerrero-Serna G, Valdivia CR, Caballero R, Diez-Guerra FJ, Jiménez-Vázquez EN et al. Cardiac Kir2.1 and NaV1.5 Channels Traffic Together to the Sarcolemma to Control Excitability. *Circ Res* 2018; 122(11):1501–16.
- 203.** Milstein ML, Musa H, Balbuena DP, Anumonwo JMB, Auerbach DS, Furspan PB et al. Dynamic reciprocity of sodium and potassium channel expression in a macromolecular complex controls cardiac excitability and arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(31):E2134-43.
- 204.** Doss MX, Di Diego JM, Goodrow RJ, Wu Y, Cordeiro JM, Nesterenko VV et al. Maximum diastolic potential of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes depends critically on I(Kr). *PLoS One* 2012; 7(7):e40288.
- 205.** Ivashchenko CY, Pipes GC, Lozinskaya IM, Lin Z, Xiaoping X, Needle S et al. Human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes exhibit temporal changes in phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 305(6):H913-22.
- 206.** Lieu DK, Fu J-D, Chiamvimonvat N, Tung KC, McNerney GP, Huser T et al. Mechanism-based facilitated maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2013; 6(1):191–201.
- 207.** Bett GCL, Kaplan AD, Lis A, Cimato TR, Tzanakakis ES, Zhou Q et al. Electronic "expression" of the inward rectifier in cardiocytes derived from human-induced pluripotent stem cells. *Heart Rhythm* 2013; 10(12):1903–10.
- 208.** Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 1999; 79(3):763–854.
- 209.** Wang Y, Hill JA. Electrophysiological remodeling in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48(4):619–32.
- 210.** Andrews CM, Srinivasan NT, Rosmini S, Bulluck H, Orini M, Jenkins S et al. Electrical and Structural Substrate of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Determined Using Noninvasive Electrocardiographic Imaging and Late Gadolinium Magnetic Resonance Imaging. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2017; 10(7).
- 211.** Tristani-Firouzi M, Jensen JL, Donaldson MR, Sansone V, Meola G, Hahn A et al. Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J Clin Invest* 2002; 110(3):381–8.
- 212.** Armoundas AA, Hobai IA, Tomaselli GF, Winslow RL, O'Rourke B. Role of Sodium-Calcium Exchanger in Modulating the Action Potential of Ventricular Myocytes From Normal and Failing Hearts. *Circ Res* 2003; 93(1):46–53.

- 213.** Rosenbaum DS, Jackson LE, Smith JM, Garan H, Ruskin JN, Cohen RJ. Electrical alternans and vulnerability to ventricular arrhythmias. *N Engl J Med* 1994; 330(4):235–41.
- 214.** Qu Z, Karagueuzian HS, Garfinkel A, Weiss JN. Effects of Na(+) channel and cell coupling abnormalities on vulnerability to reentry: a simulation study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286(4):H1310-21.
- 215.** Dalal D, Nasir K, Bomma C, Prakasa K, Tandri H, Piccini J et al. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia: a United States experience. *Circulation* 2005; 112(25):3823–32.
- 216.** Nava A, Bauce B, Basso C, Muriago M, Rampazzo A, Villanova C et al. Clinical profile and long-term follow-up of 37 families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(7):2226–33.
- 217.** Frigo G, Bauce B, Basso C, Nava A. Late-onset arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2006; 7(1):74–6.
- 218.** Adachi Y, Hayashi T, Mitsuhashi T, Sakakura K, Yamada Y, Wada Y et al. Late presentation of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in an octogenarian associated with a pathogenic variant in the plakophilin 2 gene: a case report. *BMC Cardiovasc Disord* 2019; 19(1):41.
- 219.** Sen-Chowdhry S, Syrris P, Pantazis A, Quarta G, McKenna WJ, Chambers JC. Mutational heterogeneity, modifier genes, and environmental influences contribute to phenotypic diversity of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2010; 3(4):323–30.
- 220.** Xu T, Yang Z, Vatta M, Rampazzo A, Beffagna G, Pilichou K et al. Compound and digenic heterozygosity contributes to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55(6):587–97.
- 221.** den Haan AD, Tan BY, Zikusoka MN, Lladó LI, Jain R, Daly A et al. Comprehensive desmosome mutation analysis in north americans with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2(5):428–35.
- 222.** Fressart V, Duthoit G, Donal E, Probst V, Deharo J-C, Chevalier P et al. Desmosomal gene analysis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: spectrum of mutations and clinical impact in practice. *Europace* 2010; 12(6):861–8.
- 223.** Bauce B, Nava A, Beffagna G, Basso C, Lorenzon A, Smaniotto G et al. Multiple mutations in desmosomal proteins encoding genes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Heart Rhythm* 2010; 7(1):22–9.

- 224.** Bao J, Wang J, Yao Y, Wang Y, Fan X, Sun K et al. Correlation of ventricular arrhythmias with genotype in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2013; 6(6):552–6.
- 225.** Rigato I, Baucé B, Rampazzo A, Zorzi A, Pilichou K, Mazzotti E et al. Compound and digenic heterozygosity predicts lifetime arrhythmic outcome and sudden cardiac death in desmosomal gene-related arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* 2013; 6(6):533–42.
- 226.** Groeneweg JA, Bhonsale A, James CA, te Riele AS, Dooijes D, Tichnell C et al. Clinical Presentation, Long-Term Follow-Up, and Outcomes of 1001 Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Patients and Family Members. *Circ Cardiovasc Genet* 2015; 8(3):437–46.
- 227.** Lahti AL, Kujala VJ, Chapman H, Koivisto A-P, Pekkanen-Mattila M, Kerkelä E et al. Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture. *Dis Model Mech* 2012; 5(2):220–30.
- 228.** Davis RP, Casini S, van den Berg CW, Hoekstra M, Remme CA, Dambrot C et al. Cardiomyocytes derived from pluripotent stem cells recapitulate electrophysiological characteristics of an overlap syndrome of cardiac sodium channel disease. *Circulation* 2012; 125(25):3079–91.
- 229.** Veerman CC, Kosmidis G, Mummery CL, Casini S, Verkerk AO, Bellin M. Immaturity of human stem-cell-derived cardiomyocytes in culture: fatal flaw or soluble problem? *Stem Cells Dev* 2015; 24(9):1035–52.
- 230.** Davis RP, van den Berg CW, Casini S, Braam SR, Mummery CL. Pluripotent stem cell models of cardiac disease and their implication for drug discovery and development. *Trends Mol Med* 2011; 17(9):475–84.
- 231.** Lundy SD, Zhu W-Z, Regnier M, Laflamme MA. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 2013; 22(14):1991–2002.
- 232.** Brandão KO, Tabel VA, Atsma DE, Mummery CL, Davis RP. Human pluripotent stem cell models of cardiac disease: from mechanisms to therapies. *Dis Model Mech* 2017; 10(9):1039–59.
- 233.** Kamakura T, Makiyama T, Sasaki K, Yoshida Y, Wuriyanghai Y, Chen J et al. Ultrastructural Maturation of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Long-Term Culture. *Circ J* 2013; 77(5):1307–14.
- 234.** Schulze M, Hoja S, Winner B, Winkler J, Edenhofer F, Riemenschneider MJ. Model Testing of PluriTest with Next-Generation Sequencing Data. *Stem Cells Dev* 2016; 25(7):569–71.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich erkläre hiermit, dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen.

Regensburg, 17. März 2020

Lena Albersdörfer

Danksagung

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. Stefan Wagner für die Überlassung dieses spannenden Promotionsthemas sowie die exzellente Betreuung während der Zeit meiner Promotion. Prof. Wagners Interesse für die kardiologische Forschung, sein unermüdliches Streben nach neuen Erkenntnissen und seine scharfen Fragen, sei es im Doktorandenseminar oder in persönlichen Gesprächen, haben mich stets motiviert und bestärkt. Ich danke ihm, ebenso wie Prof. Dr. Lars Maier, für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe „Translationale Kardiologie“. Durch das hohe wissenschaftliche Niveau innerhalb der Arbeitsgruppe wurde mir eine wissenschaftliche Ausbildung ermöglicht, von der ich mein Leben lang profitieren werde.

Nicht weniger großer Dank gebührt meiner Betreuerin, Dr. rer. nat. Karin Hammer, für das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten und die hervorragende Betreuung. Ihr Vertrauen in meine Arbeit, ihre wissenschaftliche Kompetenz sowie ihre kontinuierliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft haben den Erfolg dieser Arbeit maßgeblich mitbestimmt.

Ebenso zu großem Dank verpflichtet bin ich der Biologisch-Technischen Assistentin Teresa Stauber für ihre unterstützenden Anleitungen bei der Arbeit an den induzierten pluripotenten Stammzellen und ihre unerschöpfliche Geduld. Auch bei den Medizinisch-Technischen Assistenten Felicitas Steuer und Thomas Sowa möchte ich mich für ihre wertvollen Hilfestellungen im Labor bedanken.

Gedankt sei auch den Doktoranden Simon Lebek und Maximilian Trum für die technische Unterstützung an der Patch-Clamp-Anlage sowie Maria Giglberger für die wertvollen Diskussionen und die freundliche Überlassung einiger Daten.

Nicht zuletzt gebührt mein herzlicher Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich während dieser gesamten Zeit unterstützt haben.

Diese Arbeit wurde mit dem Otto-Hess-Promotionsstipendium der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. gefördert. Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden darüber hinaus auf dem Kongress „Herztage“ im Oktober 2018 in Berlin präsentiert und mit dem Otto-Hess-Promotionspreis (3. Preis) ausgezeichnet. Ich bin der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie zu großem Dank verpflichtet; durch die Förderung war es mir möglich, mich ohne finanzielle Sorgen ganz der Durchführung dieser Arbeit zu widmen.

