

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

DIE AUSWIRKUNGEN EINER LOSS-OF-FUNCTION-MUTATION DES PKP2-GENS  
AUF DEN KALZIUMHAUSHALT IN KARDIOMYOZYTEN  
AUS INDUZIERTEN PLURIPOTENTEN STAMMZELLEN  
VON ARVC-PATIENTEN

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Maria Giglberger

2020



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

DIE AUSWIRKUNGEN EINER LOSS-OF-FUNCTION-MUTATION DES PKP2-GENS  
AUF DEN KALZIUMHAUSHALT IN KARDIOMYOZYTEN  
AUS INDUZIERTEN PLURIPOTENTEN STAMMZELLEN  
VON ARVC-PATIENTEN

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Maria Giglberger

2020

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Wagner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Johanthan Jantsch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2021

## Inhaltsverzeichnis

### 1 **Einleitung**

1.1	Hintergrund .....	1
1.1.1	ARVC .....	1
1.1.2	Symptome und Befunde .....	2
1.1.3	Ursache .....	8
1.2	Bisher bekannte Auswirkungen des PKP2-Gendefekts .....	10
1.2.1	PKP2-Mutation und Connexine .....	10
1.2.2	PKP2-Mutation und der spannungsabhängige Natrium-Kanal-Komplex.....	11
1.2.3	PKP2-Mutation und Transkriptionsprodukte .....	12
1.3	Physiologische Grundlagen zum Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten .....	14
1.4	Generierung der iPSC.....	17
1.4.1	Erstbeschreibung und Prinzip.....	17
1.4.2	Anwendung im vorliegenden Promotionsprojekt.....	19
1.5	Fragestellungen und Ziele der vorliegenden Promotionsarbeit .....	23

### 2 **Material und Methoden**

2.1	Auftauen der generierten iPSC .....	25
2.2	Kultivierung der iPSC .....	26
2.3	Differenzierungsvorgang der iPSC zu induzierten Kardiomyozyten .....	29
2.4	Kalziummessungen am Konfokalmikroskop.....	34
2.4.1	Lösungen.....	34
2.4.2	Fluoreszenzfarbstoffe Fluo-4 (AM) und Fluo-8 (AM) .....	36
2.4.3	Konfokalmikroskop und Versuchsaufbau .....	38

2.4.4	Vorbereitung einer Messkammer und Messprotokoll.....	41
2.5	Datenauswertung und Statistik .....	44
2.5.1	Erstellung von Intensitätsprofilen in ImageJ .....	44
2.5.2	Extraktion der Daten aus Intensitätsprofilen in Clampfit .....	44
2.5.3	Erstellen der Statistik in GraphPad Prism.....	46
<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b>	
3.1	Eigenfrequenzen unstimulierter induzierter Kardiomyozyten .....	47
3.2	Cytosolische Transienten unstimulierter induzierter Kardiomyozyten .....	48
3.3	Koffeintransienten .....	57
3.4	Cytosolische Transienten bei 0,5 Hz-stimulierten induzierten Kardiomyozyten .....	58
3.5	Qualitative Transientenanalyse bei 1 Hz-Stimulation.....	61
3.6	Nukleär-cytosolisch prozentuale Werte der Kalziumtransienten von unstimulierten induzierten Kardiomyozyten.....	64
3.7	Nukleär-cytosolisch prozentuale Werte der Kalziumtransienten von 0,5 Hz-stimulierten induzierten Kardiomyozyten.....	67
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b>	
4.1	Die Kinetik und Frequenz der Kalziumtransienten ohne elektrische Stimulation	71
4.1.1	Spontane Kalziumtransienten im Cytosol .....	71
4.1.2	SR-Kalzium-Gehalt.....	73
4.2	Die erhöhte Arrhythmieneigung bei PKP2-Mutation unter erhöhter Stimulationsfrequenz.....	75
4.2.1	Arrhythmogenes Verhalten der cytosolischen Transienten .....	75
4.2.2	Arrhythmogenes Verhalten im Zellkern .....	76
4.3	Der nukleäre Kalziumhaushalt in induzierten Kardiomyozyten mit PKP2-Mutation .....	78

4.3.1	Bedeutung und Kinetik von nukleärem Kalzium .....	78
4.3.2	Nukleäre Kalziumtransienten mit und ohne Stimulation .....	79
4.4	Der beeinträchtigte Kalziumhaushalt bei PKP2-Mutation .....	82
4.4.1	Die verlangsamte Kalziumfreisetzung im Cytosol .....	82
4.4.2	Die erniedrigte Kalziumamplitude im Cytosol .....	83
4.4.3	Die verlangsamte Kalziumelimination im Cytosol .....	84
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>87</b>
6.1	Karyotypisierung .....	87
6.2	Pluripotenznachweise der iPSC .....	88
6.2.1	Next Generation Sequencing.....	88
6.2.2	FACS- und Immunofluoreszenz-Analyse.....	89
6.3	RMP-Messung .....	91
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>92</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	

## Abbildungs-/Formel-/Tabellenverzeichnis

<b>Abbildung 1-1.</b> Darstellung eines Epsilon-Potentials im EKG. ....	2
<b>Abbildung 1-2.</b> Schematische Darstellung eines Desmosoms. ....	9
<b>Abbildung 1-3.</b> Schematische Darstellung des Kalziumhaushalts einer ventrikulären Kardiomyozyte. ....	16
<b>Abbildung 1-4.</b> Schematische Darstellung zur Entwicklung einer somatischen Zelle aus einer pluripotenten Stammzelle. ....	18
<b>Abbildung 1-5.</b> Darstellung von Befunden der Indexpatientin. ....	20
<b>Abbildung 1-6.</b> Stammbaum der Indexpatientin. ....	21
<b>Abbildung 2-1.</b> Schema zur zeitlichen Anwendung von Medien und Wachstumsbedingungen zur Differenzierung von iPSC zu induzierten Kardiomyozyten. ....	30
<b>Abbildung 2-2.</b> Spektraleigenschaften von Fluo-4/Fluo-8. ....	36
<b>Abbildung 2-3.</b> Schematische Beladung einer Zelle mit Fluo-4/Fluo-8 (AM). ....	37
<b>Abbildung 2-4.</b> Darstellung des Strahlengangs im Konfokalmikroskop. ....	39
<b>Abbildung 2-5.</b> Schematische Versuchsanordnung am Konfokalmikroskop. ....	41
<b>Abbildung 2-6.</b> Ablauf der Messvorbereitung einer Kammer. ....	42
<b>Abbildung 2-7.</b> Schematische Darstellung des Line-Scan-Messprotokolls. ....	43
<b>Abbildung 2-8.</b> Grober Ablauf eines Auswertungsvorganges. ....	45
<b>Abbildung 3-1.</b> Eigenfrequenzen der induzierten Kardiomyozyten. ....	47
<b>Abbildung 3-2.</b> Cytosolische Amplituden unstimuliert erhaltener Kalziumtransienten. ....	50
<b>Abbildung 3-3.</b> Cytosolische TTP-Werte unstimuliert erhaltener Kalziumtransienten. ....	53
<b>Abbildung 3-4.</b> Cytosolische RT50-Werte unstimuliert erhaltener Kalziumtransienten. ....	56



<b>Abbildung 3-5.</b> Cytosolische Werte der Amplituden von Koffein-induzierten Transienten.....	57
<b>Abbildung 3-6.</b> Cytosolische Amplitudenwerte von 0,5 Hz-stimuliert erhaltenen Kalziumtransienten. ....	58
<b>Abbildung 3-7.</b> Cytosolische TTP-Werte von 0,5 Hz-stimuliert erhaltenen Kalziumtransienten. ....	59
<b>Abbildung 3-8.</b> Cytosolische RT50-Werte von 0,5 Hz-stimuliert erhaltenen Kalziumtransienten. ....	60
<b>Abbildung 3-9.</b> Originalregistrierung von Frequenz-induzierten Arrhythmien im Vergleich zu normalen Kalziumtransienten.....	61
<b>Abbildung 3-10.</b> Qualitative prozentuale Transientenanalyse von 1 Hz-stimulierten induzierten Kardiomyozyten. ....	63
<b>Abbildung 3-11.</b> Die prozentualen Verhältnisse von nukleären zu cytosolischen Amplitudenwerten unstimuliert erhaltener Kalziumtransienten. ....	64
<b>Abbildung 3-12.</b> Die prozentualen Verhältnisse von nukleären zu cytosolischen TTP-Werten unstimuliert erhaltener Kalziumtransienten. ....	65
<b>Abbildung 3-13.</b> Die prozentualen Verhältnisse von nukleären zu cytosolischen RT50-Werten unstimuliert erhaltener Kalziumtransienten. ....	66
<b>Abbildung 3-14.</b> Prozentuale Verhältnisse von nukleären zu cytosolischen Amplitudenwerten von 0,5 Hz-stimuliert erhaltenen Kalziumtransienten. ....	67
<b>Abbildung 3-15.</b> Prozentuale Verhältnisse von nukleären zu cytosolischen TTP-Werten von 0,5 Hz- stimuliert erhaltenen Kalziumtransienten. ....	68
<b>Abbildung 3-16.</b> Prozentuale Verhältnisse von nukleären zu cytosolischen RT50-Werten von 0,5 Hz- stimuliert erhaltenen Kalziumtransienten. ....	69
<b>Abbildung 6-1.</b> Karyotypisierung .....	87
<b>Abbildung 6-2.</b> Next Generation Sequencing.....	88
<b>Abbildung 6-3.</b> FACS- und Immunofluoreszenzanalyse.....	90
<b>Abbildung 6-4.</b> RMP- Messung.....	91

<b>Formel 2-1.</b> Berechnung der relativen Fluoreszenz. ....	44
<b>Formel 2-2.</b> Berechnung des nukleären zu cytosolischen Verhältniswerts. ....	46
<b>Tabelle 1-1.</b> Diagnostische Kriterien der ARVC. ....	4
<b>Tabelle 1-2.</b> Beispiele von ARVC-Subtypen mit zugehörigem verursachenden Gen. ....	8
<b>Tabelle 2-1.</b> Die zum Auftauen eines Cryo-vials mit iPSC benötigten Materialien. ...	25
<b>Tabelle 2-2.</b> Inhaltsstoffe des iPSC-Nährmediums. ....	26
<b>Tabelle 2-3.</b> Materialien zur Beschichtung von 6-Well-Platten. ....	27
<b>Tabelle 2-4.</b> Materialien für einen Splittvorgang. ....	28
<b>Tabelle 2-5.</b> Bestandteile aller Differenzierungsmedien mit Mengenangaben. ....	31
<b>Tabelle 2-6.</b> Speziell für den Differenzierungsvorgang benötigte Materialien. ....	33
<b>Tabelle 2-7.</b> Inhaltsstoffe des Tyrode-10-fach-Stocks. ....	34
<b>Tabelle 2-8.</b> Inhaltsstoffe der Normaltyrode. ....	34
<b>Tabelle 2-9.</b> Herstellung der Koffeinelösung. ....	35
<b>Tabelle 2-10.</b> Herstellung der Fluoreszenzfarbstofflösung einer Messkammer. ....	35
<b>Tabelle 2-11.</b> Technische Daten zu den Fluoreszenzfarbstoffen Fluo-4 (AM) und Fluo-8 (AM). ....	38
<b>Tabelle 2-12.</b> Festgelegte Einstellungen des Konfokalmikroskops für die Kalziummessungen. ....	40

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund

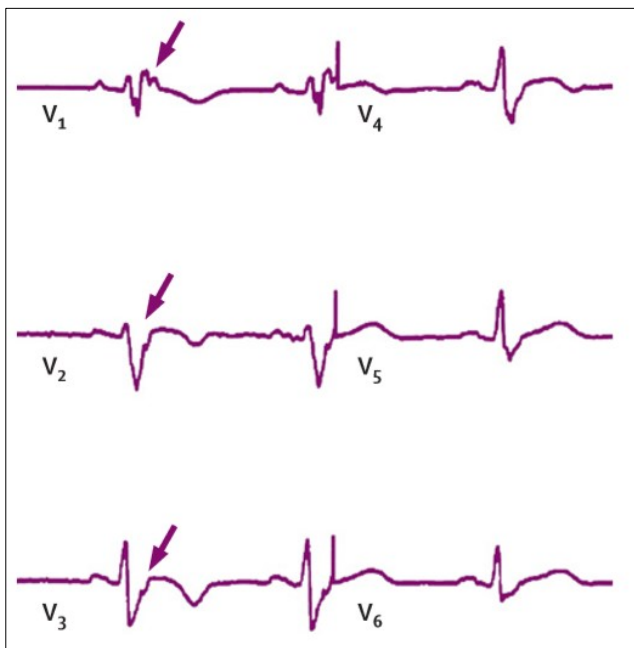
### 1.1.1 ARVC

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ist eine strukturelle Herzerkrankung, die den primären Kardiomyopathien zugeordnet wird und im Jahr 1994 von der WHO klassifiziert wurde (1,2). Die geschätzte Prävalenz der ARVC beträgt 1:1000 - 1:5000, genauere Zahlen werden durch geographische Unterschiede und eine hohe Dunkelziffer aufgrund einer schwierigen Diagnostizierung der ARVC erschwert (3–9). Die Erkrankung betrifft Männer dreifach häufiger im Vergleich zu Frauen und ist im Altersbereich unter 35 Jahren die häufigste Ursache für einen plötzlichen Herztod (4,10,11). Eine besondere Bedeutung hat die ARVC dabei als Ursache für den plötzlichen Herztod bei jungen Sportlern und vermeintlich gesunden Personen, für den die Erkrankung in über 20% der Fälle verantwortlich ist (12–14). Die Diagnostizierung der ARVC (siehe Kapitel 1.1.2) stellt häufig dahingehend eine Herausforderung dar, da die Erkrankung einen äußerst heterogenen Phänotyp mit sich bringt und der Nachweis mehrerer Kriterien nötig ist (2,15). Die Ursache der ARVC (siehe Kapitel 1.1.3) konnte noch nicht in allen Patientenfällen identifiziert werden, da unterschiedliche Genloci betroffen sein können. Bis dato gelang es auch nicht die Pathogenese nachzuvollziehen. Deshalb war bisher keine ursachenspezifische Therapie möglich, sondern lediglich eine symptomatische Therapie. Zur Aufklärung der Pathogenese fehlen viele Erkenntnisse, da bis jetzt kaum funktionale, zelluläre Daten zur elektromechanischen Kopplung, insbesondere zum Kalziumhaushalt, publiziert sind.

Im Rahmen des vorliegenden Promotionsprojekts wurde erstmals der Kalziumhaushalt von ARVC-patientenspezifischen Kardiomyozyten auf zellulärer Ebene untersucht, darauf hinblickend die Pathogenese aufzuklären.

### 1.1.2 Symptome und Befunde

Oftmals präsentieren sich betroffene Patienten mit unspezifischen, anstrengungsabhängigen Symptomen, wie z.B. Palpitationen, Synkopen und Brustschmerzen, die sich zu lebensbedrohlichen ventrikulären Arrhythmien entwickeln können. Doch nicht selten gibt es asymptomatische Krankheitsverläufe, bei denen ein plötzlicher Herztod infolge ventrikulärer Tachyarrhythmien als erstes „Symptom“ auftritt (7,8,13,16). Als EKG-Abnormalitäten finden sich häufig T-Negativierungen, ein verlängerter Aufstrich der S-Zacke (>55 ms) und verlängerte QRS-Komplexe (>110 ms), jeweils in den Ableitungen V1-V3. Desweiteren ist für die ARVC das sog. Epsilon-Potential (siehe Abbildung 1-1) charakteristisch. Es bezeichnet ein niedrigamplitudiges, elektrisches Potential, das zwischen dem Ende des QRS-Komplexes und dem Beginn der T-Welle auftritt (16).



**Abbildung 1-1.** Darstellung eines Epsilon-Potentials im EKG.

Das Epsilon-Potential ist ein niedrigamplitudiges, elektrisches Potential, das zwischen dem Ende des QRS-Komplexes und dem Beginn der T-Welle auftritt, und gilt als charakteristisches Merkmal im EKG für die ARVC. Es ist mit violetten Pfeilen markiert in der Ableitung V1, V2 und V3 zu sehen. (abgewandelt aus Basso et al. 2009 (17)).

Bei histopathologischen Untersuchungen zeigen sich Veränderungen in Form von Atrophien, Fibrose und fibrolipomatösem Umbau des Myokards, die epikardial beginnen und im Verlauf transmural fortschreiten. Gelegentlich finden sich auch inflammatorische Infiltrate. Je nach Ausprägungsgrad der myokardialen Veränderungen führt dies schließlich zu einer reduzierten Wandstärke, Herzkammerdilatation und aneurysmatischen Verformungen (1,17–19). Typischerweise ist zuerst der rechte Ventrikel von diesen Veränderungen betroffen. Die drei häufigsten rechtsventrikulären Lokalisationen sind dabei das anteriore Infundibulum, der rechtsventrikuläre Apex und der inferiobasale Bereich des rechten Ventrikels. Diese Konstellation wird als sog. „triangle of dysplasia“ bezeichnet und gilt als wichtiges Kennzeichen der ARVC (10). Es gibt jedoch auch Fälle linksventrikulär dominierender Manifestationen (11,20–22). Der Verlauf der ARVC ist als sehr individuell, aber überwiegend progredient bekannt. So bleibt die Erkrankung anfangs oft asymptomatisch und verursacht keine erkennbaren oder nur geringfügige Myokardveränderungen. Trotzdem kann es zu diesem Zeitpunkt bereits zu einem plötzlichen Herztod kommen. Im weiteren Verlauf zeigen sich kardial symptomatische, elektrische Instabilitäten - beispielsweise in Form von ventrikulären Arrhythmien - die typischerweise anstrengungsabhängig auftreten. Der fortschreitende fibrolipomatöse Umbau und die Atrophie des myokardialen Gewebes führen schließlich zu einer kardialen Insuffizienz, wobei diese meist als Rechtsherzinsuffizienz beginnt. Durch eine nachfolgende Ausbreitung auf das Septum und den linken Ventrikel kommt es letztendlich zu einer Globalherzinsuffizienz (7,12,21).

Die Diagnostizierung einer ARVC erfolgt anhand von sog. Task Force Criteria, (siehe Tabelle 1-1) die in sog. Major- und Minor-Kriterien unterteilt sind. Diese Kriterien stammen aus verschiedenen Kategorien, die für die ARVC eine diagnostische Relevanz aufweisen. Die Erkrankung gilt dann als diagnostiziert, sobald entweder zwei Major-Kriterien, ein Major-Kriterium und zwei Minor-Kriterien oder vier Minor-Kriterien erfüllt sind. Die Kategorien umfassen eine globale oder regionale Dysfunktion und strukturelle Veränderungen, wobei diese mittels zweidimensionaler Echokardiographie, Magnetresonanztomographie oder rechtsventrikulärer Angiographie nachgewiesen werden können. Weitere Kategorien sind die Gewebecharakterisierung der Herzwand, Repolarisationsabnormalitäten, Depolarisations- und Weiterleitungsabnormalitäten, Arrhythmien und die familiäre

Vorgeschichte. Anhand der Vielfältigkeit der Symptome und Befunde, die im Rahmen der Erkrankung auftreten können, mit deren Erscheinung jedoch nicht fest gerechnet werden kann, ist die Variabilität und der äußerst individuelle Verlauf dieser Erkrankung und die damit verbundene diagnostische und therapeutische Herausforderung erkennbar (2,7,15).

**Tabelle 1-1.** Diagnostische Kriterien der ARVC.

(Abgewandelt aus Marcus et al. 2010 (1) und Romero et al 2013 (2))

Kategorie: **globale oder regionale Dysfunktion und strukturelle Veränderungen**

Major	Minor
<p>➤ Im 2D-Echo: regionale rechtsventrikuläre Akinesie, Dyskinesie oder Aneurysma und einer der folgenden Punkte:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PLAX RVOT <math>\geq 32</math>mm (korrigiert für Körpergröße PLAX/BSA <math>\geq 19</math>mm/m<sup>2</sup>)</li> <li>- PSAX RVOT <math>\geq 36</math>mm (korrigiert für Körpergröße PSAX/BSA <math>\geq 21</math>mm/m<sup>2</sup>)</li> <li>- oder fraktionelle Arealveränderung <math>\leq 33\%</math></li> </ul>	<p>➤ Im 2D-Echo: regionale rechtsventrikuläre Akinesie oder Dyskinesie und einer der folgenden Punkte:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- PLAX RVOT <math>\geq 29</math> bis <math>&lt; 32</math>mm (korrigiert für Körpergröße PLAX/BSA <math>\geq 16</math> bis <math>&lt; 19</math>mm/m<sup>2</sup>)</li> <li>- PSAX RVOT <math>\geq 32</math> bis <math>&lt; 36</math>mm (korrigiert für Körpergröße PSAX/BSA <math>\geq 18</math> bis <math>&lt; 21</math>mm/m<sup>2</sup>)</li> <li>- oder fraktionelle Arealveränderung <math>&gt; 33</math> bis <math>\leq 40\%</math></li> </ul>
<p>➤ Im MRT: regionale rechtsventrikuläre Akinesie oder Dyskinesie oder dyssynchrone rechtsventrikuläre Kontraktion und einer der folgenden Punkte:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Quotient des rechtsventrikulären enddiastolischen Volumens zu BSA <math>\geq 110</math>ml/m<sup>2</sup> (beim Mann) bzw. <math>\geq 100</math>ml/m<sup>2</sup> (bei der Frau)</li> <li>- oder rechtsventrikuläre Auswurfraction <math>\leq 40\%</math></li> </ul>	<p>➤ Im MRT: regionale rechtsventrikuläre Akinesie oder Dyskinesie oder dyssynchrone rechtsventrikuläre Kontraktion und einer der folgenden Punkte:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Quotient des rechtsventrikulären enddiastolischen Volumens zu BSA <math>\geq 100</math> bis <math>&lt; 110</math>ml/m<sup>2</sup> (beim Mann) bzw. <math>\geq 90</math> bis <math>&lt; 100</math>ml/m<sup>2</sup> (bei der Frau)</li> <li>- oder rechtsventrikuläre Auswurfraction <math>&gt; 40\%</math> bis <math>\leq 45\%</math></li> </ul>

➤ In rechtsventrikulärer Angiographie: regionale rechtsventrikuläre Akinesie, Dyskinesie oder Aneurysma	---
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

(Abkürzungen: PLAX = parasternal long-axis, PSAX = parasternal short axis, RVOT = right ventricular outflow tract, BSA = body surface area)

#### Kategorie: **Gewebecharakterisierung der Herzwand**

Major	Minor
➤ In morphometrischer Analyse: residuale Myozyten <60% (falls geschätzt: <50%) mit fibrösem Ersatz in der rechtsventrikulär freien Myokardwand in ≥1 Probe, mit oder ohne lipomatösem Ersatz des Gewebes in der endomyokardialen Biopsie	➤ In morphometrischer Analyse: residuale Myozyten 60 bis 75% (falls geschätzt: 50 bis 65%) mit fibrösem Ersatz in der rechtsventrikulär freien Myokardwand in ≥1 Probe, mit oder ohne lipomatösem Ersatz des Gewebes in der endomyokardialen Biopsie

#### Kategorie: **Repolarisationsabnormalitäten**

Major	Minor
➤ Im EKG: negative T-Wellen in den rechtspräkordialen Ableitungen (V <sub>1</sub> , V <sub>2</sub> oder V <sub>3</sub> ) oder darüber hinaus bei einem Alter von über 14 Jahren (in Abwesenheit eines kompletten Rechtsschenkelblocks mit QRS ≥120ms)	➤ Im EKG: negative T-Wellen in den Ableitungen V <sub>1</sub> oder V <sub>2</sub> bei einem Alter von über 14 Jahren (in Abwesenheit eines kompletten Rechtsschenkelblocks) oder in den Ableitungen V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub> oder V <sub>6</sub>
---	➤ Im EKG: negative T-Wellen in den Ableitungen V <sub>1</sub> , V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> oder V <sub>4</sub> bei einem Alter von über 14 Jahren und mit einem kompletten Rechtsschenkelblock

**Kategorie: Depolarisations- und Weiterleitungsabnormalitäten**

Major	Minor
➤ Im EKG: Epsilonwelle in den rechtspräkordialen Ableitungen V <sub>1</sub> bis V <sub>3</sub>	➤ Spätpotentiale im signal-gemittelten EKG in ≥1 von 3 Parametern bei Abwesenheit einer QRS-Dauer ≥110ms im Standard-EKG
---	➤ Im EKG: gefilterte QRS-Dauer ≥114ms
---	➤ Im EKG: Dauer des terminalen QRS <40µV (niedrigamplitudige Signaldauer) ≥38ms
---	➤ Im EKG: quadratischer Mittelwert der Spannung der letzten 40ms ≤20µV
---	➤ Im EKG: terminale Aktivationsdauer des QRS ≥55ms (gemessen vom Tiefpunkt der S-Welle bis zum Ende des QRS, R' eingeschlossen) in V <sub>1</sub> , V <sub>2</sub> oder V <sub>3</sub> , bei Abwesenheit eines kompletten Rechtsschenkelblocks

**Kategorie: Arrhythmien**

Major	Minor
➤ Nichtanhaltende oder anhaltende ventrikuläre Tachykardien mit Linksschenkelblock- Morphologie mit superiorer Achse (negative oder unbestimmte QRS in den Ableitungen II, III und aVF und positive in der Ableitung aVL)	➤ Nichtanhaltende oder anhaltende ventrikuläre Tachykardien mit rechtsventrikulärer Ausfluss-Konfiguration, Linksschenkelblock-Morphologie mit inferiorer Achse (positive QRS in den Ableitungen II, III und aVF, negative in der Ableitung aVL) oder mit unbekannter Achse
---	➤ >500 ventrikuläre Extrasystolen innerhalb eines 24h-EKGs



Kategorie: **familiäre Vorgeschichte**

Major	Minor
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Bestätigte ARVC eines erstgradig Verwandten, der die Task Force Kriterien erfüllt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Krankheitsgeschichte einer ARVC eines erstgradig Verwandten, bei dem es nicht möglich ist festzustellen, ob die Kriterien einer ARVC erfüllt sind</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Pathologisch bestätigte ARVC mittels Autopsie oder Versorgung eines erstgradig Verwandten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Vorzeitiger plötzlicher Herztod (Alter &lt;35 Jahre), der verdächtig für eine ARVC erscheint, bei einem erstgradig Verwandten</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Identifikation einer pathogenetischen Mutation am Patienten, die kategorisiert ist als assoziiert oder wahrscheinlich assoziiert mit einer ARVC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Bestätigte ARVC mittels Pathologie oder über die Task Force Kriterien eines zweitgradig Verwandten</li> </ul>

---



---

### 1.1.3 Ursache

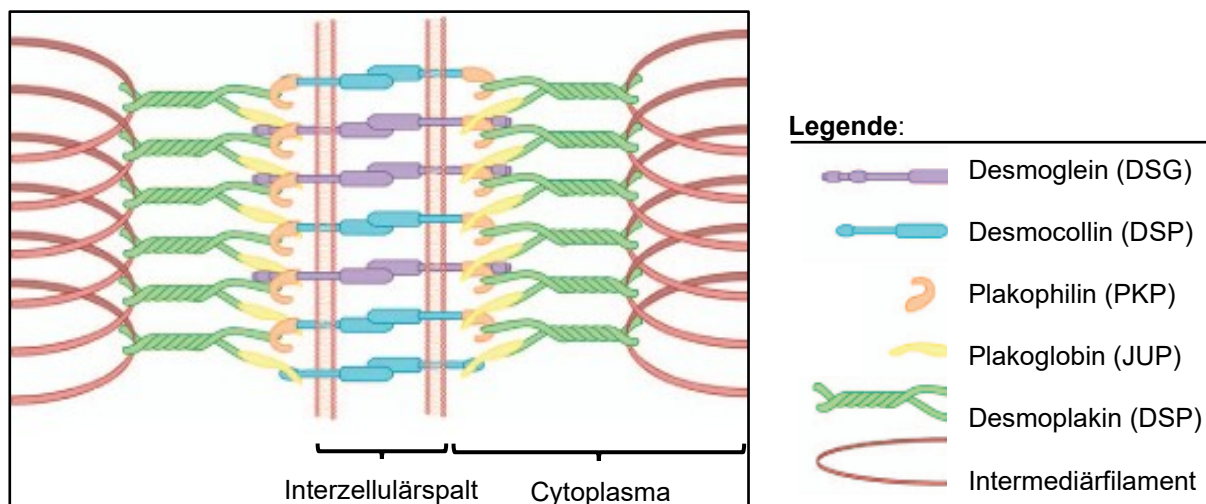
Die ARVC ist eine genetisch determinierte Erkrankung, deren Gendefekt unterschiedlich lokalisiert ist. Dadurch wird die ARVC in Subtypen unterteilt (siehe Tabelle 1-2) (7,23).

**Tabelle 1-2.** Beispiele von ARVC-Subtypen mit zugehörigem verursachenden Gen.

<b>Beispiele Subtyp ARVC</b>	<b>Gen</b>
ARVC1	Transforming Growth Factor $\beta$ 3 (TGF $\beta$ 3)
ARVC2	Ryanodin-Rezeptor-2 (RYR2)
ARVC8	Desmoplakin (DSP)
ARVC9	Plakophilin-2 (PKP2)
ARVC10	Desmoglein-2 (DSG2)

(abgewandelt aus Rampazzo et al. 2006 (1))

In über 60% der Fälle sind Gene betroffen, die desmosomale Proteine kodieren (24) (siehe Abbildung 1-2). Der Gendefekt kann sich aber auch auf nicht-desmosomale Gene beziehen, wie z.B. das Gen des kardialen Ryanodin-Rezeptors-2 (ARVC2) (25,26). Ebenso gibt es durchaus Fälle, in denen keine Mutation nachgewiesen werden kann, da für eine Diagnostizierung der ARVC viele Kriterien erfüllt sein können, aber nicht erfüllt sein müssen (12,15,27). Am häufigsten finden sich mit 11-43% Mutationen im Gen von Plakophilin-2 (PKP2), dem Subtyp ARVC9 (7,28). Das der p120-related-Armadillo-Subfamilie zugehörige Protein weist ein berechnetes Molekulargewicht von 92,756 kDa auf und besteht aus einer N-terminalen Kopfdomäne, der sich 10 Arm-Domänen aus je 42 Aminosäuren anschließen, sowie einem C-terminalen Ende (29–32). Plakophilin-2 dient als multifunktionelles Funktionsprotein, das die desmosomale Verankerung zwischen integralen Membranproteinen und intrazellulären Intermediärfilamenten unterstützt (siehe Abbildung 1-2) und an Signalwegen in Cytoplasma und Kern beteiligt ist (30–38).



**Abbildung 1-2.** Schematische Darstellung eines Desmosoms.

Die Transmembranproteine Desmocollin und Desmoglein (Cadherine) sind mit den zytoplasmatischen Intermediärfilamenten über einen Verankerungskomplex aus Plakophilin, Plakoglobin und Desmoplakin verbunden. (modifiziert nach Koster et al. 2014 (3))

Für den Subtyp ARVC9 wurden über 25 verschiedene Mutationen beschrieben (7,28,39). Die Vererbung erfolgt überwiegend autosomal dominant mit variabler Expression und unvollständiger Penetranz. In über 50% der Fälle tritt der Gendefekt familiär gehäuft auf (1,20,40).

Da in histopathologischen Untersuchungen am Myokard von ARVC-Patienten das Auftreten vorwiegend lymphozytärer Infiltrate beobachtet wurde, wurden virale Myokarditiden als Ursache diskutiert. Mittlerweile werden sie als Einflussfaktor in Betracht gezogen. Zusammenhänge zwischen der myokardialen Inflammation und der Pathogenese der ARVC sind nach wie vor weitgehend unbekannt. Vermutungen sind, dass es sich dabei um Exazerbationen der ARVC oder um Regenerationsphasen handelt (1,7,9,11,18,19,24,41–43). Sportliche Aktivität verschlechtert nachweislich die Symptomatik bei ARVC und erhöht deutlich das Risiko für das Auftreten eines plötzlichen Herztods (11,44–46).

Obgleich bereits viele für die ARVC ursächliche Genmutationen entdeckt wurden, gelang es bisher nicht die Zusammenhänge davon zu den klinischen Symptomen und Befunden vollständig aufzudecken.

## 1.2 Bisher bekannte Auswirkungen des PKP2-Gendefekts

### 1.2.1 PKP2-Mutation und Connexine

Connexine sind Proteine, die durch hexamere Zusammenlagerung Hemikanäle (Connexone) bilden können. Befinden sich Zellen in unmittelbarer Nähe zueinander, kann durch eine Verbindung zweier Connexone ein gap-junction-Kanal entstehen. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit eines direkten Austauschs von Molekülen mit einer Größe von bis zu 1kDa und einer direkten Kommunikation zwischen Zellen. Die Durchlässigkeit von gap junctions ist chemisch - z.B. durch den pH-Wert oder Kalziumionen - und durch eine Veränderung des Membranpotentials beeinflussbar (47,48).

Es wurde beobachtet, dass beeinträchtigt oder fehlendes PKP2 zu Veränderungen an Connexin43 (Cx43) führt. Cx43 ist das im Ventrikelmyokard überwiegend vorherrschende Connexin und teilt mit PKP2 eine gemeinsame Subdomäne (Cx43-PKP2-Subdomäne) (47,49–51). Neben einer reduzierten Gesamtmenge an Cx43 zeigte sich eine eingeschränkte Funktionstüchtigkeit und Lokalisation. Cx43 wurde statt im Bereich der Glanzstreifen vermehrt intrazellulär gefunden und die Anzahl an gap junctions erwies sich als vermindert (49,52–55). Die infolgedessen verschlechterte Zell-Zell-Interaktion konnte eine Verlangsamung der elektrischen Impulsweiterleitung bewirken (56). Hierbei konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass erst durch eine sehr starke Reduktion von Cx43 maligne ventrikuläre Tachyarrhythmien ausgelöst werden konnten (56). Es gelang ebenso bei einer weniger starken Reduktion von Cx43, wenn diese mit akuter kardialer Ischämie kombiniert war (57).

Neben Cx43 wurde bei ARVC-Patienten (mit überwiegend PKP2-Mutationen) auch eine Verminderung von Connexin40 (Cx40) und Connexin45 (Cx45) festgestellt (54). Cx40 ist im Vorhofmyokard und in Zellen des elektrischen Leitungssystems zu finden und sorgt für eine besonders schnelle Weiterleitung des Aktionspotentials (58).

### 1.2.2 PKP2-Mutation und der spannungsabhängige Natrium-Kanal-Komplex

Für die Entstehung des Aktionspotentials spielt der spannungsabhängige Natrium-Kanal-Komplex (voltage-gated-sodium-channel-complex bzw. VGSC) eine wichtige Rolle. VGSCs bestehen aus  $\beta$ -Untereinheiten und einer kanalbildenden  $\alpha$ -Untereinheit, die in Kardiomyozyten durch das Gen SCN5A kodiert und als Nav1.5 benannt ist (59–61).

Von dieser Nav1.5-Untereinheit ist unter anderem bekannt, dass sie bevorzugt an Glanzstreifen liegt, aber auch im peripheren Sarkolemm und an den T-Tubulis zu finden ist (61). Sie kopräzipitiert mit Cx43 und N-Cadherin und ist zusammen mit PKP2 kolokalisiert (59,62–64). Untersuchungen in kultivierten Kardiomyozyten zu PKP2 und Nav1.5 ergaben, dass sich bei fehlendem oder stark vermindertem PKP2 die Eigenschaften des Natriumstroms verändert darboten (62). Diese Beobachtung erfolgte ebenso im Tiermodell bei PKP2-Haploinsuffizienz (65). Die Weiterleitung des Aktionspotentials war verlangsamt, und die Zellen zeigten eine frequenzabhängige Insuffizienz sowie arrhythmisches Verhalten (62). In einem ähnlichen Experiment wurde reentry-Arrhythmieaktivität beobachtet und anhand einer mathematischen Simulation ebenfalls die Natrium-Strom-Kinetik als Schlüssel zur Ursache dafür ausgemacht (63).

Für den Zusammenhang zwischen PKP2 und Nav1.5 hat das Protein AnkyrinG (AnkG) große Bedeutung. Es fungiert in Kardiomyozyten als organisierendes Adaptorprotein, das sich ebenfalls hauptsächlich an den Glanzstreifen aufhält. Über eine direkte Interaktion bewerkstelligt AnkG die normale Expression und Membranlokalisierung von Nav1.5 und damit auch einen normalen Natriumstrom (61,66). Im Tiermodell wurde im Fall eines PKP2—Knockdowns eine Verringerung von AnkG entdeckt (51). Das verminderte AnkG wiederum hatte eine reduzierte Expression und eine veränderte Lage von Nav1.5 zur Folge. Statt an der Membranoberfläche war Nav1.5 vermehrt diffus im Intrazellularraum verteilt. Im Einklang damit war der Natriumstrom ( $I_{Na}$ ), der mit Bradykardien und elektrischen Weiterleitungsabnormalitäten am Herz in Assoziation steht, in funktionellen Untersuchungen auffällig reduziert (51,61,66).

Die Betrachtung etwaiger Veränderungen des Natriumhaushalts durch die PKP2-Mutation ist dahingehend wichtig, dass die Ionenhaushalte von Natrium und Kalzium eng zusammenhängen und miteinander interagieren. Einen wichtigen Stellenwert

nimmt hier beispielsweise der Natrium-Kalzium-Austauscher (siehe Kapitel 1.3) ein, da dieser sekundär aktive Transporter im Austausch von drei Natriumionen ein Kalziumion nach extrazellulär befördert und unter bestimmten Bedingungen diesen Ionentransport auch konvertieren kann. Zudem bewirken Natriumkanäle den schnellen Aufstrich des Aktionspotentials und bilden damit eine Voraussetzung für die Depolarisation des Sarkolems und die damit verbundene kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung (siehe Kapitel 1.3) (67–69).

### 1.2.3 PKP2-Mutation und Transkriptionsprodukte

Als Teil der Glanzstreifen fungiert PKP2 offenbar auch als Angriffspunkt im Hinblick auf strukturelles Remodeling. In kardialem Gewebe am Tiermodell mit PKP2-Knockdown wurde entdeckt, dass sich der sog. Hippo-Signalweg als aktiviert und der sog. canonical-Wnt-Signalweg als supprimiert darstellten. Beide Signalwege spielen bei der zellulären Differenzierung und Proliferation eine Rolle und werden teilweise über die Zellmembranen - vermutlich inklusive der Glanzstreifen - reguliert. Dabei stehen sowohl die Aktivierung des Hippo-Signalwegs, als auch die Unterdrückung des canonical-Wnt-Signalwegs in Zusammenhang mit einer verstärkten Adipogenese (43,70–72). Diese Lipomatose des Herzens ist neben der Fibrose ein morphologisches Kennzeichen der ARVC (15).

Eine andere Arbeitsgruppe konnte an Kardiomyozyten eines Tiermodells mit PKP2-Knockdown beobachten, dass die Menge an transforming growth factor  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ) und dadurch die Aktivität der sog. mitogen-activated protein kinase (MAPK) - Signalkette erhöht waren. Eine verstärkte Aktivierung dieser Signalkaskade setzt über eine erhöhte Expression von profibrotischen Zytokinen und ECM (extracellular matrix) – Proteinen, wie beispielsweise Fibronectin und Kollagen - ein profibrotisches und inflammatorisches Transkriptionsprogramm in Gang. Dies wiederum führt zu Fibrose, myokardialer Atrophie und Steifigkeit und damit letztendlich zu einer kardialen Dysfunktion (73–75). In anderen Experimenten wurde Fibrosierung und Veränderungen in der Erregungsweiterleitung im Herz auf gap-junction-Remodeling zurückgeführt. Hier wurde im Tiermodell gezeigt, dass eine verminderte Expression von Cx43 (siehe Kapitel 1.2.1) auf physiologischem (z.B. Alter) und

pathophysiologischem Weg mittels einer erhöhten Fibroblastenaktivität in Verbindung zu Herzfibrose steht (76).

Doch PKP2 moduliert möglicherweise nicht nur profibrotische oder adipogenetische Transkriptionsprogramme, sondern beeinflusst offenbar auch die Transkription von Genen, deren Produkte eine wichtige Rolle für den kardialen Kalziumstoffwechsel und Rhythmus spielen. In Untersuchungen am Tiermodell mit kardiospezifischem PKP2-Knockout wurden Transkriptionsdefizite und dementsprechend verminderte Proteingehalte für Ankyrin-2 (Ank2, codierend für Ankyrin-B bzw. AnkB), Ryanodinrezeptor-2 (Ryr2, codierend für den kardialen Ryanodin-Rezeptor), Triadin (Trdn) und Cacnac1c (codierend für den kardialen spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanal Cav1.2) festgestellt (77). AnkB und Trdn erfüllen wichtige Aufgaben bei der Organisation der Dyaden (siehe Kapitel 1.3) und der Lokalisierung der Kalziumkanäle Cav2.1 und Cav2.2 (78–80). Entsprechende ultrastrukturelle Veränderungen des dyadischen Spalts zwischen T-Tubuli und angrenzendem SR konnten dahingehend, dass der gemittelte Abstand dazwischen vermindert war, dargestellt werden. Konsistent zu der verminderten Menge an Cav1.2 und Ryr2 wurden funktionelle Veränderungen des zellulären Kalziumhaushaltes und der elektromechanischen Kopplung gefunden (77).

### 1.3 Physiologische Grundlagen zum Kalziumhaushalt von Kardiomyozyten

Die Entstehung eines kardialen Aktionspotentials und seine Ausbreitung über vorwiegend gap junctions bewirkt eine Depolarisation des Sarkolemm. Durch diesen elektrischen Reiz kommt es zur Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle, sodass Kalziumionen in die Herzmuskelzelle strömen. Dieser Kalziumeinstrom wird überwiegend durch Kalziumkanäle vom L-Typ hervorgerufen, die sich durch eine hohe Leitfähigkeit und langanhaltende Öffnungszeit auszeichnen und vor allem in der Membran von T-Tubulis lokalisiert sind. Als T-Tubuli werden transversale Einstülpungen des Sarkolemm bezeichnet. In unmittelbarer Nähe dazu befinden sich intrazellulär longitudinale Ausstülpungen des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR), die terminalen Zisternen, mit membranständigen kalziumsensitiven Kanälen, den sog. Ryanodin-Rezeptoren (RyR). Diese funktionelle Einheit bestehend aus den L-Typ-Kalziumkanälen der T-Tubuli und den RyR des SRs ist als Diade benannt, das geringe Volumen an dazwischen gelegenem Zytosol als Diadischer Spalt.

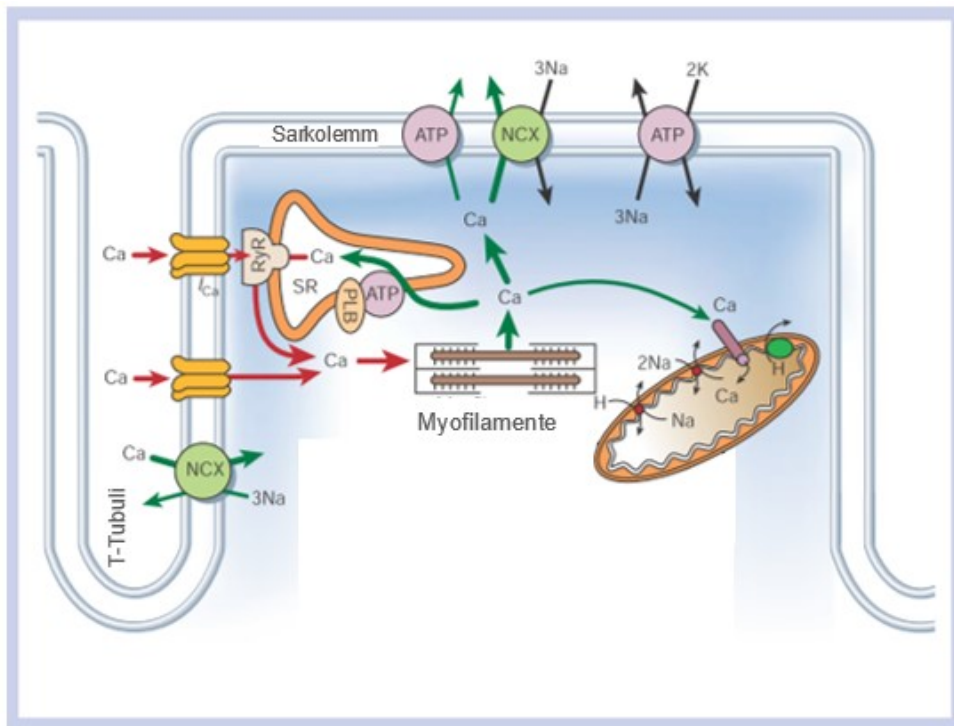
Die durch die Öffnung der spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanäle hervorgerufene erhöhte Kalziumkonzentration im Diadischen Spalt triggert eine Öffnung der RyR und damit die Freisetzung des im SR gespeicherten Kalziums. Dieser Vorgang ist als kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung bekannt. Die cytosolische Kalziumkonzentration erhöht sich dabei von diastolisch 100 bis 250 nmol/l auf bis zu 1µmol/l systolisch, wobei der größte Anteil davon aus dem SR stammt (67). Die freien Kalziumionen können an Troponin C binden, was eine Aktivierung der Myofilamente bewirkt. Über eine Interaktion von Aktin und Myosin ermöglicht dies ein Ineinandergleiten der Myofilamente und damit eine koordinierte Verkürzung der Zelle. So erfolgt über das Aktionspotential als elektrischer Reiz mithilfe von Kalzium als „second messenger“ eine mechanische Kontraktion des Kardiomyozyts, die sog. elektromechanische Kopplung (siehe Abbildung 1-3).

Damit eine Relaxation der Zelle vor sich gehen kann, ist die systolisch intrazellulär erhöhte Kalziumkonzentration zu verringern. Zum einen geschieht dies durch die Abnahme des Kalziumeinstroms durch die L-Typ-Kalziumkanäle während der Repolarisation, infolgedessen auch die Offenwahrscheinlichkeit des RyR sinkt. Zum



anderen greift eine Art negativer Rückkopplungsmechanismus und Adaptation am RyR, sodass der cytosolische Kalziumstrom aus dem SR abnimmt.

Desweiteren gibt es mehrere Mechanismen der Kalziumelimination (Abbildung 1-3): einen wichtigen Stellenwert nimmt dabei die SR-Kalzium-ATPase (SERCa2a) ein, eine SR-membranständige Kalziumpumpe, die über primär aktiven Transport den kardiomyozytären Kalziumspeicher wieder auffüllt. Eine Regulierung der Aktivität der SERCa2a erfolgt durch Hemmung über Phospholamban (PLB). Durch eine Nutzung des Natrium-Gradienten kann der sekundär aktive Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) im Sarkolemm ein Kalziumion im Austausch zu drei Natriumionen in den Extrazellularräum befördern. Der Natriumgradient wird durch die Natrium-Kalium-ATPase (NKA) erhalten, die primär aktiv drei Natriumionen im Austausch mit zwei Kaliumionen nach extrazellulär pumpt. Einen weiteren, jedoch geringeren Beitrag der Kalziumelimination leisten die sarkolemmnale Kalzium-ATPase (PMCA) und der mitochondriale Kalziumuniport (67,68,81).



**Abbildung 1-3.** Schematische Darstellung des Kalziumhaushalts einer ventrikulären Kardiomyozyte. Durch die Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle während des Aktionspotentials entsteht ein Kalziumeinstrom, der die kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung aus dem SR auslöst (rote Pfeile). Die frei gewordenen Kalziumionen bewirken daraufhin an den Myofilamenten die Kontraktionvorgangskaskade. Als Mechanismen zur Kalziumelimination (grüne Pfeile) dienen die primär aktive SR-Kalzium-ATPase (SERC2a), welche Kalzium von intrazellulär in das SR pumpt, der sekundär aktive Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) und die primär aktive sarkolemmale Kalzium-ATPase (PCMA), die beide Kalzium-Ionen nach extrazellulär transportieren, sowie der mitochondriale Uniport. (Abgewandelt aus Bers 2002 (4))

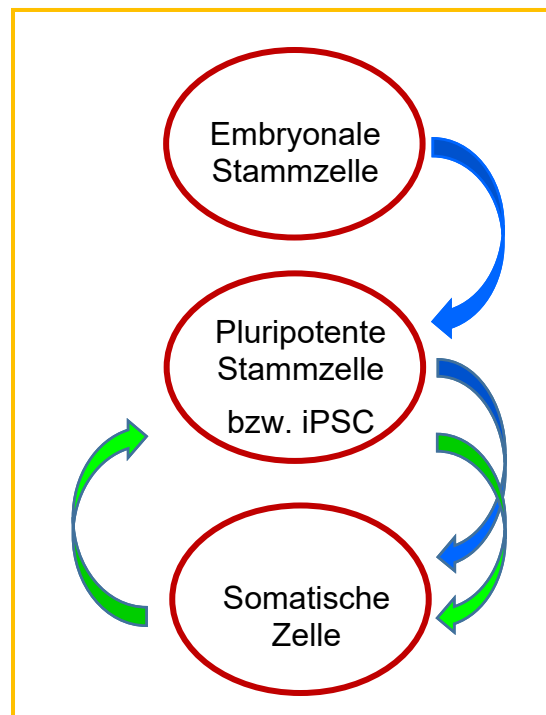
## 1.4 Generierung der iPSC

### 1.4.1 Erstbeschreibung und Prinzip

Mit ihrer Arbeit „Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors“ legten die Forscher K. Takahashi und S. Yamanaka im Jahr 2006 den Grundstein für die Methode der sog. induzierten pluripotenten Stammzellen (induced pluripotent stem cells = iPSC) (82). Yamanaka erhielt hierfür 2012 den Nobelpreis der Medizin. Den beiden Japanern gelang erstmals die Generierung von pluripotenten Stammzellen aus bereits differenzierten somatischen Zellen durch eine retrovirale Reprogrammierung. Unter den Kulturbedingungen embryonaler Stammzellen wurden adulten Maus-Fibroblasten mithilfe retroviraler Transduktion Gene für die vier Transkriptionsfaktoren Okt3/4, Sox2, c-Myc und Klf-4 eingeschleust. Daraufhin zeigten die Zellen die Fähigkeit zur Pluripotenz, sodass sich daraus sowohl in vivo, als auch in vitro Zellen aller drei Keimblätter differenzieren konnten (82). Die Vorgehensweise der Reprogrammierung wurde intensiv weiterentwickelt und ist nun auch mit humanen Zellen durchführbar (83,84). Desweiteren ist unter speziellen Wachstums- und Nährbedingungen eine zielgerichtete Differenzierung zu einer definierten Zellart wie z.B. Kardiomyozyten möglich (85). Das bedeutet, dass jede beliebige somatische Zelle, die aus einer pluripotenten Stammzelle hervorgegangen ist, auf eine solche zurückprogrammiert werden kann (siehe Abbildung 1-4). Aus dieser wiederum kann jede beliebige Art von somatischer Zelle entstehen. Da sich aus den pluripotenten Stammzellen nur somatische Zellen entwickeln können und keine Arbeit mit embryonalen Stammzellen nötig ist, ergeben sich keinerlei ethische Probleme.

In zahlreichen Forschungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass genetische Defekte von somatischen Zellen selbst nach Rückprogrammierung und erneuter Differenzierung gendefektspezifische Merkmale auch in funktioneller Form aufweisen (85–87). Es können also in vitro z.B. zelluläre Mechanismen bei der Entstehung von Krankheiten untersucht werden oder die Wirkung neuer Medikamente getestet werden. In Bezug auf die ARVC konnten beispielsweise Ma et al. 2013 die Funktionalität der iPSC als zelluläres Modell unter Beweis stellen (86). Auf diese Weise wird die Möglichkeit geboten patienten- und krankheitsspezifische iPSC als veritables

humanzelluläres Modell *in vitro* zu kreieren. Damit eröffnet sich durch die Generierung von iPSC eine ganz neue Grundlage der Stammzellforschung und der Erforschung sämtlicher Mechanismen zur Entstehung und Bekämpfung von Krankheiten.



**Abbildung 1-4.** Schematische Darstellung zur Entwicklung einer somatischen Zelle aus einer pluripotenten Stammzelle.

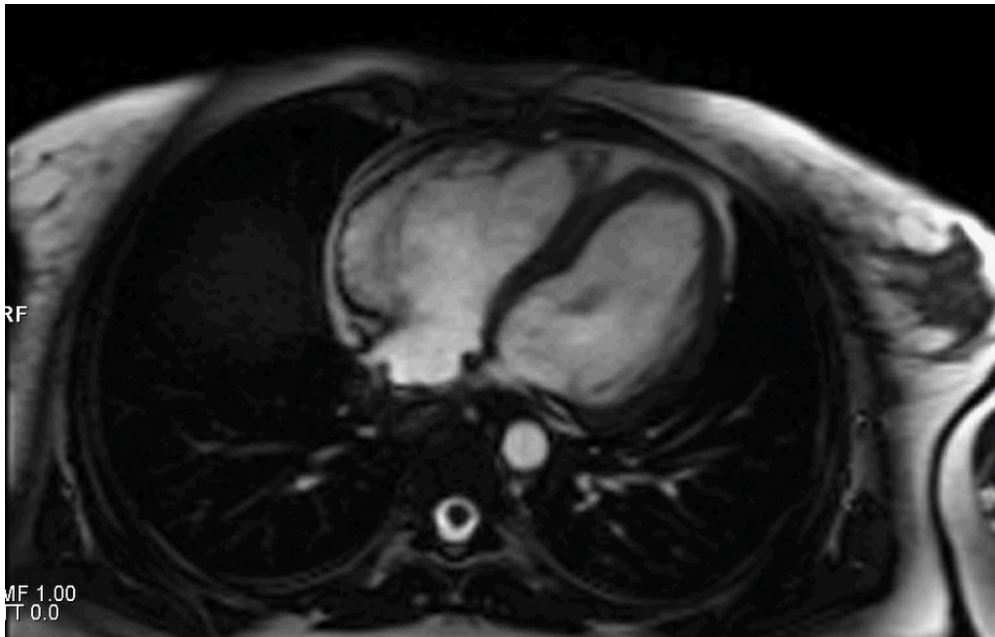
Auf natürlichem Weg (blau) entstehen aus embryonalen Stammzellen pluripotente Stammzellen, die sich zu somatischen Zellen entwickeln. Durch die Methode der iPSC (grün) können somatische Zellen zu pluripotenten Stammzellen reprogrammiert werden, welche wiederum zu somatischen Zellen differenziert werden können.

#### 1.4.2 Anwendung im vorliegenden Promotionsprojekt

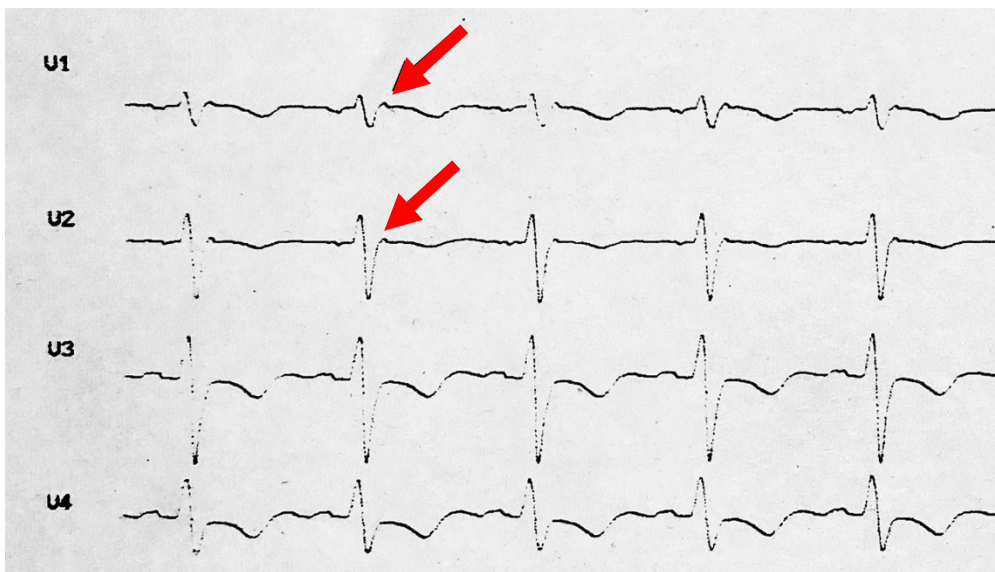
Im vorliegenden Promotionsprojekt wurde die Generierung der iPSC nach Yamanaka in Kombination mit einem optimierten Aufreinigungsprotokoll nach Fürstenau-Sharp et al. genutzt, um iPSC und patientenspezifische Kardiomyozyten im Hinblick auf die ARVC zu untersuchen. Zum einen wurden induzierte Kardiomyozyten einer ARVC-Patientin (Indexpatientin) mit denen einer gesunden Kontrollperson, die keine ARVC-verursachenden Mutationen aufweist, funktionell verglichen. Zum anderen wurden induzierte Kardiomyozyten einer leiblichen Schwester der ARVC-Patientin, die ebenfalls Mutationsträgerin ist, aber keine Anzeichen der Erkrankung trägt, für einen funktionellen Vergleich mit induzierten Kardiomyozyten der Kontrollperson und der ARVC-Patientin herangezogen. Dies bot die seltene Gelegenheit eine unmittelbare Entstehung einer genetisch ursächlichen Erkrankung zu untersuchen, da funktionelle Unterschiede induzierter Kardiomyozyten von einer erkrankten Mutationsträgerin und einer nicht erkrankten Mutationsträgerin einer gesunden Nicht-Mutationsträgerin direkt gegenübergestellt werden konnten. Desweiteren konnte auf diese Weise auch erforscht werden, welche Faktoren neben der Mutation zu einer Entstehung der Erkrankung führen.

Die Indexpatientin wurde im klinischen Alltag entdeckt, als sie im Alter von 20 Jahren während einer intensiven sportlichen Belastung einen plötzlichen Herztod erlitt. Sie konnte jedoch erfolgreich reanimiert und intensivmedizinisch stabilisiert werden. Im Zuge dessen erfolgte eine eingehende kardiologische Diagnostik. Das 12-Kanal-EKG zeigte Auffälligkeiten wie rechtspräkordiale T-Negativierungen und ein niedrigamplitudiges Epsilon-Potential am Ende des QRS-Komplexes (siehe Abbildung 1-5, (B)). Weiterhin fand sich eine Vergrößerung im rechten Ventrikel und in der Endomyokardbiopsie davon eine vermehrte interstitielle Fibrose ohne Lipomatose (Abbildung 1-5, (A)).

A



B

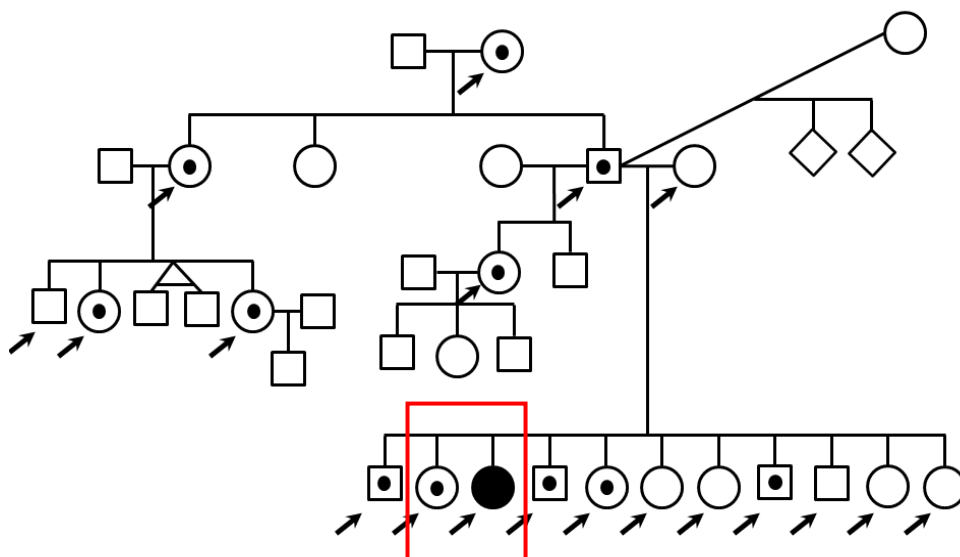


**Abbildung 1-5.** Darstellung von Befunden der Indexpatientin.

(A) In dem kardialen MRT-Bild im Axialschnitt der Indexpatientin ist die Dilatation des rechten Ventrikels erkennbar.

(B) In diesem Ausschnitt des EKGs mit den Ableitungen V1-V4 der Indexpatientin ist ein Epsilon-Potential in der Ableitung V1/V2 (mit roten Pfeilen markiert) zu sehen. Dieses EKG wurde unmittelbar nach dem überlebten plötzlichen Herztod der Indexpatientin aufgezeichnet.

Die molekulargenetische Diagnostik ergab eine loss-of-function-Mutation im PKP2-Gen (c.1664delT; p.PHe555SerfsX8, Exon 7). Diese Basenpaardeletion bedeutet den Funktionsverlust des Gens für das desmosomale Plaqueprotein Plakophilin-2 (PKP2). Damit wurde die Diagnose einer ARVC vom Typ 9 mit überlebtem plötzlichen Herztod definitiv. Ein anschließendes genetisches Screening zeigte bei 12 von 19 Familienmitgliedern dieselbe Mutation (siehe Abbildung 1-6). Mit Ausnahme einer leiblichen, mutationstragenden Schwester, die klinisch völlig asymptomatisch blieb, präsentierten sich die anderen mutationstragenden Familienmitglieder mit nur schwach ausgeprägter Symptomatik, teilweise waren rechtsventrikulär morphologische Auffälligkeiten nachweisbar.



**Abbildung 1-6.** Stammbaum der Indexpatientin.

Getestete Familienmitglieder der Indexpatientin (schwarzer Kreis) sind mit einem Pfeil markiert, nachgewiesene Träger der PKP2-Mutation mit einem schwarzen Punkt. Funktionelle Untersuchungen wurden an induzierten Kardiomyozyten der beiden rot umrandet gekennzeichneten Familienmitgliedern durchgeführt, also der Indexpatientin und ihrer leiblichen, nicht erkrankten, aber mutationstragenden Schwester.

Als Proben zur Zellgewinnung diente venöses Vollblut der Indexpatientin, ihrer Schwester und der Kontrollpatientin. Daraus wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) isoliert und zum Zweck einer T-Zell-Proliferation kultiviert. Diese wurden schließlich mithilfe pMX basierter Vektoren zu iPSC reprogrammiert (83,85). Bevor die iPSC auf Feeder-freies Medium umgestellt wurden, erfolgte die Generierung auf sog. Feeder-Zellen (mouse embryonic fibroblasts) nach etabliertem Protokoll. Anschließend wurden die iPSC kryokonserviert. Der Erfolg der Reprogrammierung wurde mithilfe der Durchflusszytometrie, Immunzytochemie und einem Next Generation Sequencing (NGS) kontrolliert. Durch die unauffällige Befundung der Karyogramme (Anhang 6.1) konnten chromosomale Veränderungen ausgeschlossen werden. Als Beweis für die Pluripotenz galten zum einen positive Immunfluoreszenzfärbungen der Pluripotenzmarker NANOG, SOX-2 und OCT-4. Zum anderen konnte die Pluripotenz durch eine Analyse des Pluripotenzmarkers OCT3/4 (octamer binding transcription factor) und des Differenzierungsmarkers SSEA-1 (stage specific embryonic antigen 1) am Durchflusszytometer im Vergleich zu einer Negativkontrolle bestätigt werden (85). OCT3/4 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz einer Zelle spielt und während des Differenzierungsprozesses zur somatischen Zelle herunterreguliert wird. Somit ist OCT3/4 bei pluripotenten Zellen in erhöhter Konzentration vorhanden (88–90). SSEA-1 ist ein Oberflächenantigen (CD15), das von Zellen im Zuge ihres Differenzierungsprozesses exprimiert wird, wodurch sich in pluripotenten Zellen eine geringe Konzentration davon findet. Es konnte eine regelrechte Erhöhung von OCT3/4 und Verminderung von SSEA-1 nachgewiesen werden (85) (siehe Anhang 6.2.2). Die Untersuchungen der Zellen mithilfe Durchflusszytometrie, Immunzytochemie, NGS sowie Karyotypisierung wurden für die vorliegenden Linien im Zuge dieses Projekts wiederholt und bestätigt (siehe Anhang 6.1 und 6.2).



### 1.5 Fragestellungen und Ziele der vorliegenden Promotionsarbeit

Die Symptomatik der ARVC und vorangegangene Studien (siehe Kapitel 1.2) geben Hinweise darauf, dass der Kalziumhaushalt der Kardiomyozyten von ARVC-Patienten Veränderungen aufweist. Mit der vorliegenden Promotionsarbeit wird erstmals am Modell der iPSC der cytosolische sowie nukleäre Kalziumstoffwechsel einer ARVC-Patientin, einer nicht erkrankten ARVC-Mutationsträgerin und einer Kontrollperson verglichen.

Da bereits gezeigt wurde, dass durch die PKP2-Mutation wichtige Transkriptionsprodukte des kardialen Kalziumhaushalts vermindert waren (77), sind somit zentrale Fragen:

1. Finden sich Veränderungen des kardiomyozytären Kalziumstoffwechsels der ARVC-Patientin im Vergleich zur ARVC-Mutationsträgerin und der Kontrollperson?
2. Welche Parameter des Kalziumstoffwechsels in Bezug auf Kalziumfreisetzung, Kalziummenge, Kalziumelimination sind dabei betroffen?
3. In welchem Ausmaß stellen sich etwaige Veränderungen da?
4. Stehen gefundene Veränderungen in Einklang mit Daten bereits publizierter Studien?

In Studien zum nukleären Kalziumstoffwechsel wurde zudem der Einfluss von Kalzium auf die Regulation der Genexpression deutlich gemacht. Es wurde festgestellt, dass Veränderungen zuerst an nukleären Kalziumtransienten auftraten (91–94). Deshalb ergeben sich folgende Fragen:

1. Zeigen sich Unterschiede an den nukleären Transienten der induzierten Kardiomyozyten der drei Linien?
2. Wie stellen sich die nukleär-cytosolischen Quotienten der verschiedenen Parameter des Kalziumstoffwechsels vergleichsweise dar?

Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen der PKP2-Mutation und einer kardial veränderten Expression von Connexinen und Natriumkanälen und damit verschlechterter Erregungsweiterleitung erkannt (49,51,52,54–56,61,62,66). Daher war von Interesse:

1. Welche Eigenfrequenzen zeigen die induzierten Kardiomyozyten der drei Linien?
2. Hat das Einfluss auf die Arrhythmogenität bzw. wie stellt sich die Arrhythmogenität in Cytosol und Zellkern dar?

All diese Fragestellungen zielen zum einen darauf ab, Unterschiede zu finden, warum manche Mutationsträger schwere Symptome der ARVC ausprägen und manche nicht. Zum anderen gilt es Hinweise zu finden, die die Aufklärung der Arrhythmogenese der ARVC unterstützen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Auftauen der generierten iPSC

Für die Arbeit an humanen Materialien liegt ein Ethikvotum der Universität Regensburg vor.

Die iPSC der Indexpatientin, ihrer mutationstragenden, aber nicht erkrankten Schwester und der Kontrollperson waren bereits im Rahmen des Projekts von Fuerstenau-Sharp et al. 2015 (85) generiert worden und wurden zwischenzeitlich in einem Stickstofftank bei  $-80^{\circ}\text{C}$  kryokonserviert. Um diese schonend aufzutauen (siehe Tabelle 2-1), wurden 9 ml des TeSR-Mediums in einen 15 ml-Falcon vorgelegt und auf  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt, sowie eine 6-Well-Platte für 1h bei Raumtemperatur. Danach wurde das iPSC-vial im Wasserbad aufgetaut und 1 ml der Zellen durch Tröpfeln in 5 ml TeSR-Medium eines 15-ml-Falcons überführt, sowie vorsichtig invertiert. Während der Falcon für 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert wurde, wurde die Flüssigkeit in der erwärmten Platte abgesaugt und in zwei Well je 2 ml des warmen TeSR-Mediums gegeben. Sobald die Zentrifugation erfolgt war, konnte der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml TeSR-Medium mit einer Glaspipette resuspendiert werden. Damit wurde ein Cryo-vial auf zwei Wells einer 6-well-plate zu je 500  $\mu\text{l}$  verteilt. Anschließend wurde die Platte 48h lang im Brutschrank inkubiert. Der Brutschrank zur Kultivierung der iPSC wies die Nährbedingungen  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  und 5%  $\text{O}_2$  auf.

**Tabelle 2-1.** Die zum Auftauen eines Cryo-vials mit iPSC benötigten Materialien.

<b>Material/Reagenz</b>	<b>Menge (Firma, Firmenangabe)</b>
TeSR-Medium	9 ml
6-Well-Platte	1x (OMNILAB, München), mit Matrigel beschichtet
15 ml- Falcon	2x (Sarstedt, Nümbrecht)
Cryo-vial mit iPSC	1x

## 2.2 Kultivierung der iPSC

Um die iPSC der drei Linien kultivieren zu können, waren im Vorhinein verschiedene Materialien und Reagenzien (siehe Tabelle 2-2) vorzubereiten. Alle Maßnahmen erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Werkbank.

Zur Erstellung des Nährmediums wurden 400 ml mTeSR-Basalmedium, 100 ml 5x-Supplement und 250 µl Antibiotikum (Gentamycin) sorgfältig vermengt. Die Lagerung des TeSR-Mediums erfolgte bis zum Gebrauch als 50 ml Aliquots bei -20°C.

**Tabelle 2-2.** Inhaltsstoffe des iPSC-Nährmediums.

<b>Material/ Reagenz</b>	<b>Menge (Firma, Firmenangabe)</b>
Basalmedium mTeSR®1	400 ml (STEMMCELL TECHNOLOGIES®, Köln)
5x-Supplement mTeSR®1	100 ml (STEMMCELL TECHNOLOGIES®, Köln)
Gentamycin	10 ml (Sigma-Aldrich®, Taufkirchen bei München)

Als Wachstumsgrundlage dienten den iPSC mit Matrigel beschichtete 6-Well-Platten (siehe Tabelle 2-3). Matrigel wurde auf Eis aufgetaut, während 25 ml DMEM bei 4°C gekühlt wurden. Schließlich wurde der gesamte Inhalt des Matrigel-Tubes in das kalte DMEM/F12 überführt und daraus pro Well der 6-Well-Platte 1ml pipettiert. Zur Lagerung wurden fertig beschichteten Platten als Verdunstungsschutz 1ml DMEM/F12 hinzugegeben, bevor sie mit Parafilm verschlossen und bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt wurden.

**Tabelle 2-3.** Materialien zur Beschichtung von 6-Well-Platten.

<b>Material/ Reagenz</b>	<b>Menge (Firma, Firmenangabe)</b>
DMEM/F12	25 ml (gibco®ThermoFisher SCIENTIFIC, Ulm)
1,5 ml-Matrigel-Tube	1x (Corning, Wiesbaden)
6-Well-Platten	4x (OMNILAB, München)

Das Nährmedium der iPSC wurde täglich gewechselt. Dazu war das frische Medium zuerst auf 37°C zu erwärmen. Danach wurde das alte Medium der Wells mit einer sterilen Glaspipette am Wellrand vorsichtig abgesaugt und 2,5 ml pro Well warmes, frisches TeSR-Medium zellschonend zugegeben. Um einer Zellverschleppung vorzubeugen, wurden die Pipetten pro Linie jeweils gewechselt.

Unter den vorherrschenden Wachstumsbedingungen gedeihen die iPSC, sodass meist nach wenigen Tagen die Überführung und Aufteilung der Zellen auf neue Wells nötig war.

Bevor ein Splittvorgang begonnen wurde, wurden alle Flüssigkeiten (siehe Tabelle 2-4) bei 37°C warmgestellt, bzw. frische 6-Well-Platten 1h an Raumtemperatur oder 1/2h bei 37°C. Um die iPSC später vom Wellboden lösen zu können, wurde das Enzym Dispase verwendet. Hierfür wurden 0,1g Dispase in 50 ml DMEM/F12 gelöst und steril filtriert. Die Enzymlösung wurde bei 4°C gelagert und jeweils vor dem Splitten erwärmt.

Anschließend wurden die Wells der Platte eingehend mikroskopiert (Mikroskop Nikon ECLIPSE TS 100). Dabei wurde das Wachstum der iPSC-Kolonien überprüft und iPSC, die morphologische Abweichungen zeigten, über einen Stempel markiert. Als morphologisch abweichende Kriterien galten beispielsweise vereinzelt Vorliegen außerhalb einer Kolonie, cytoplasmatische Ausziehungen oder cytoplasmatische Aufhellung. Die markierten Kolonien wurden später zielgerichtet abgesaugt. Somit konnte eine hohe Reinheit an pluripotenten Zellen gewährleistet werden. Desweiteren wurde über die Größe, Menge und Dichte der Kolonien ein Splittverhältnis festgelegt. Am häufigsten wurden die Splittverhältnisse 1:1, 1:2 und 1:3 verwendet. Der Verhältnisquotient bezieht sich dabei darauf, auf wie viele Wells der neuen Platte die

iPSC-Kolonien eines Wells der zu splittenden Platte verteilt werden. So werden z.B. bei einem Splittverhältnis 1:2 die Zellen eines Wells auf zwei aufgeteilt.

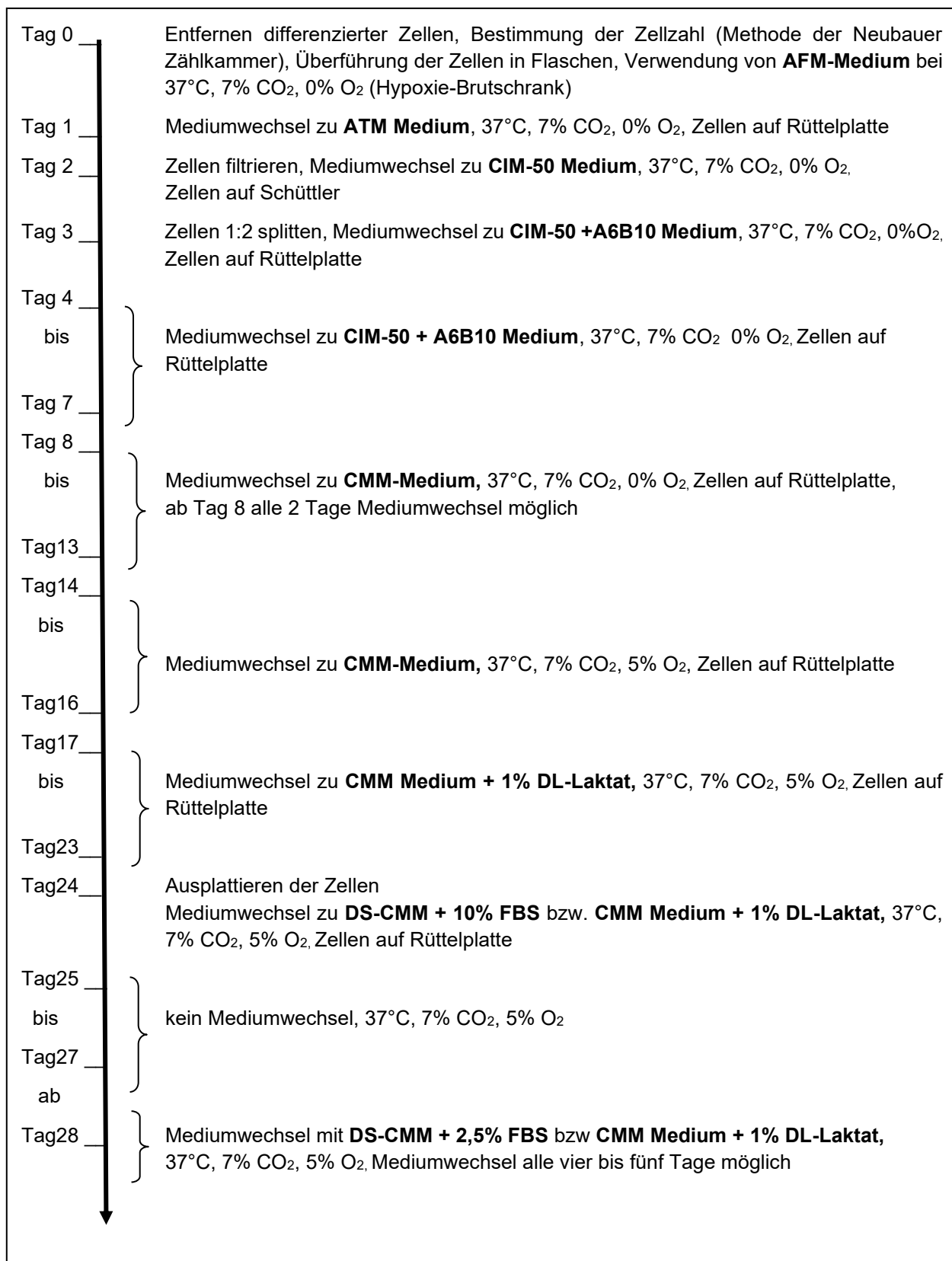
Zunächst wurden die Zellen mit je 2 ml pro Well gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 1 ml Dispase-Lösung pro Well für 5 min bei 37°C. Währenddessen konnte die neue Platte für die iPSC vorbereitet werden. Dazu wurden die Wells jeweils mit 2 ml DMEM/F12 gewaschen und mit 1,5 ml TeSR-Medium gefüllt. Im Anschluss an die Dispaseinkubation wurden das Enzym und die markierten Kolonien entfernt. Das verbliebene DMEM/F12 wurde durch die entsprechende Menge TeSR-Medium ersetzt und je Splittverhältnis wurde benötigtes TeSR-Medium zugegeben, d.h. 1 ml pro Well nach dem Splitten bzw. beim Splittverhältnis 1:2 je 2 ml pro Well. Mit einer Glaspipette wurden die Zellen vorsichtig abgespült und die Kolonien verkleinert, bevor sie auf die Wells der neuen 6-Well-Platte verteilt wurden. Der erste Mediumwechsel nach einem Splittvorgang erfolgte nach 48h.

**Tabelle 2-4.** Materialien für einen Splittvorgang.

<b>Material/Reagenz</b>	<b>Menge (Firma, Firmenstandort)</b>
Frische 6-Well-Platte beschichtet	1x
6-Well-Platte mit zu splittenden iPSCs	1x
Dispase	5 g (gibco®ThermoFisher SCIENTIFIC, Ulm)
TeSR-Medium	-Menge je Wellanzahl bzw Splittverhältnis-
DMEM/F12	-Menge je Wellanzahl bzw Splittverhältnis-
Glaspipette	1x (Corning, Wiesbaden)
Zellschaber S	1x (TPP, Trasadingen)
15 ml-Falcon	1x (Sarstedt, Nümbrecht)

### 2.3 Differenzierungsvorgang der iPSC zu induzierten Kardiomyozyten

Als Ausgangslage für einen Differenzierungsvorgang dienten gesunde, stabile iPSC-Kolonien auf jeweils drei 6-well-plates pro Linie. Diese durchliefen ein etabliertes Protokoll (siehe Abbildung 2-1) an Nährmedien und Wachstumsbedingungen, um zu induzierten Kardiomyozyten zu differenzieren.



**Abbildung 2-1.** Schema zur zeitlichen Anwendung von Medien und Wachstumsbedingungen zur Differenzierung von iPSC zu induzierten Kardiomyozyten.



Dieses Protokoll brachte schlagende Aggregate an induzierten Kardiomyozyten hervor. Ab dem ca 9. Tag zeigten die Zellen spontane Kontraktionen. Durch das glukosefreie Laktatmedium erhielt man eine hohe Aufreinigung an induzierten Kardiomyozyten, da Kardiomyozyten im Vergleich zu anderen Zellen in der Lage sind auch Laktat statt Glukose zu verstoffwechseln. Die Vereinzelnung der Zellen wurde enzymatisch mit 10x-Trypsin (Sigma-Aldrich®, Taufkirchen bei München) erreicht. Zur Ausplattierung der Zellen wurden mit 0,1% Gelatine beschichtete patch slides (FluoroDish Cell Culture Dish von WPI, Berlin) und chamber slides verwendet. Für die Herstellung der verschiedenen Medien (siehe Tabelle 2-5 und Tabelle 2-6) wurden deren Bestandteile zusammengefügt und steril filtriert. Bevor an den Zellen Kalziummessungen durchgeführt wurden, reiften die Zellen mindestens drei Monate (95).

**Tabelle 2-5.** Bestandteile aller Differenzierungsmedien mit Mengenangaben.

**Herstellung des AFM-Mediums (aggregate formation medium):**

Reagenz:	benötigte Menge (Firma, Firmensitz):
TeSR-Medium	50 ml (inkl. Gentamycin)
H1152 (100µM)	500 µl (Tocris Bioscience, Bristol)

**Herstellung des ATM-Mediums (aggregate transition medium):**

Reagenz:	benötigte Menge (Firma, Firmensitz):
TeSR-Medium	25 ml (inkl. Gentamycin)
DMEM low glucose	22,5 ml (Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München)
FBS	2,5 ml (gibco®ThermoFisher SCIENTIFIC, Ulm)
H1152 (100µM)	500 µl (Tocris Bioscience, Bristol)
FGF (100µg/ml)	25 µl (PeproTech, Hamburg)

**Herstellung des CIM-Mediums (cardiac induction medium):**

Reagenz:	benötigte Menge (Firma, Firmensitz):
DMEM low glucose	45 ml (Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München)
FBS	5 ml (gibco®ThermoFisher SCIENTIFIC, Ulm)
Gentamycin (50mg/ml)	25 µl (Sigma-Aldrich®, Taufkirchen bei München)
FGF (100µg/ml)	25 µl (PeproTech, Hamburg)

**Herstellung des CIM-50 + A6B10-Mediums (cardiac induction medium):**

Reagenz:	benötigte Menge (Firma, Firmensitz):
DMEM low glucose	90 ml (Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München)
FBS	10 ml (gibco®ThermoFisher SCIENTIFIC, Ulm)
Gentamycin (50mg/ml)	50 µl (Sigma-Aldrich®, Taufkirchen bei München)
FGF (100µg/ml)	50 µl (Sigma-Aldrich®, Taufkirchen bei München)
Aktivin A (6µg/ml)	100 µl (PeproTech, Hamburg)
BMP-4 (10µg/ml)	100 µl (PeproTech, Hamburg)

**Herstellung des CMM-Mediums (cardiac maintenance medium):**

Reagenz:	benötigte Menge (Firma, Firmensitz):
DMEM low glucose	90 ml (Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München)
FBS	10 ml (gibco®ThermoFisher SCIENTIFIC, Ulm)
Gentamycin (50mg/ml)	50 µl (Sigma-Aldrich®, Taufkirchen bei München)

**Herstellung des CMM Medium + 1% DL-Laktat (Selektionsmedium):**

Reagenz:	benötigte Menge (Firma, Firmensitz):
DMEM ohne Glukose	88,95 ml (Sigma-Aldrich®, Taufkirchen bei München)
FBS	10 ml (gibco®ThermoFisher SCIENTIFIC, Ulm)
Gentamycin (50 mg/ml)	50 µl (Sigma-Aldrich®, Taufkirchen bei München)
DL-Laktat (0,4M)	1 ml (Sigma-Aldrich®, Taufkirchen bei München)

**Herstellung des DS-CMM + 10% FBS-Medium:**

Reagenz:	benötigte Menge (Firma, Firmensitz):
DMEM ohne Glukose	43,7 ml (gibco®ThermoFisher SCIENTIFIC, Ulm)
Galaktose (500mM)	1 ml (Sigma-Aldrich®, Taufkirchen bei München)
Na-Pyruvat (100mM)	0,5 ml (Sigma-Aldrich®, Taufkirchen bei München)
Gentamycin	25 µl (Sigma-Aldrich®, Taufkirchen bei München)
HyClone®dialyzed FBS	5 ml (gibco®ThermoFisher SCIENTIFIC, Ulm), inaktiviert durch 30 min bei 56°C

**Herstellung des DS-CMM + 2,5% FBS-Medium:**

Reagenz:	benötigte Menge (Firma, Firmensitz):
DMEM ohne Glukose	47 ml (gibco®ThermoFisher SCIENTIFIC, Ulm)
Galaktose (500mM)	1 ml (Sigma-Aldrich®, Taufkirchen bei München)
Na-Pyruvat (100mM)	0,5 ml (Sigma-Aldrich®, Taufkirchen bei München)
Gentamycin	25 µl (Sigma-Aldrich®, Taufkirchen bei München)
HyClone®dialyzed FBS	1,25 ml (gibco®ThermoFisher SCIENTIFIC, Ulm), inaktiviert durch 30 min bei 56°C

**Tabelle 2-6.** Speziell für den Differenzierungsvorgang benötigte Materialien.

Material	Firma, Firmenstandort
Flaschen Corning®Ultra Low Attachment Surface T-25/ T-75	Corning, Wiesbaden
cell strainer	Greiner Bio-One, Frickenhausen BD Falcon Heidelberg
Corning® square bottle-top vacuum filter systems	Corning, Wiesbaden
Steriflip® Filtereinheiten	Millipore, Darmstadt

## 2.4 Kalziummessungen am Konfokalmikroskop

### 2.4.1 Lösungen

Als allgemeine Nährlösung der Zellen während der Messungen, sowie als Grundlage für alle bei den Messungen verwendete Lösungen, diente die sog. Normaltyrode. Zu deren Herstellung wurde erst ein 10-fach-Stock angefertigt. Die Bestandteile (siehe Tabelle 2-7) wurden zusammengefügt und in doppelt destilliertem Wasser gelöst, sodass das Endvolumen des 10-fach-Stocks ein Liter betrug. Der pH-Wert wurde auf 7,0 bei Raumtemperatur mit NaOH eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

**Tabelle 2-7.** Inhaltsstoffe des Tyrode-10-fach-Stocks.

Substanz	Menge pro Liter
KCl	2,982 g
NaCl	81,816 g
MgCl <sub>2</sub>	0,952 g
HEPES	11,916 g

Um aus dem Tyrode-10-fach-Stock die Normaltyrode zu erhalten wurde der 10-fach-Stock mit doppelt destilliertem Wasser verdünnt und D-Glucose sowie CaCl<sub>2</sub> zugegeben (siehe Tabelle 2-8). Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,4 bei Raumtemperatur mit NaOH eingestellt. Die Normaltyrode ist zwar bei 4°C lagerfähig, aber wurde am Messtag überwiegend frisch hergestellt.

**Tabelle 2-8.** Inhaltsstoffe der Normaltyrode.

Substanz	Menge pro Liter
D-Glucose	1,802 g
CaCl <sub>2</sub>	1 mM

Zur Herstellung der Koffeinlösung wurde Normaltyrode mit Koffein versetzt (siehe Tabelle 2-9).

**Tabelle 2-9.** Herstellung der Koffeinlösung.

<b>Substanz</b>	<b>Menge (Firma, Firmenstandort)</b>
Normaltyrode	50 ml
Koffein	0,1 g (Sigma-Aldrich, München)

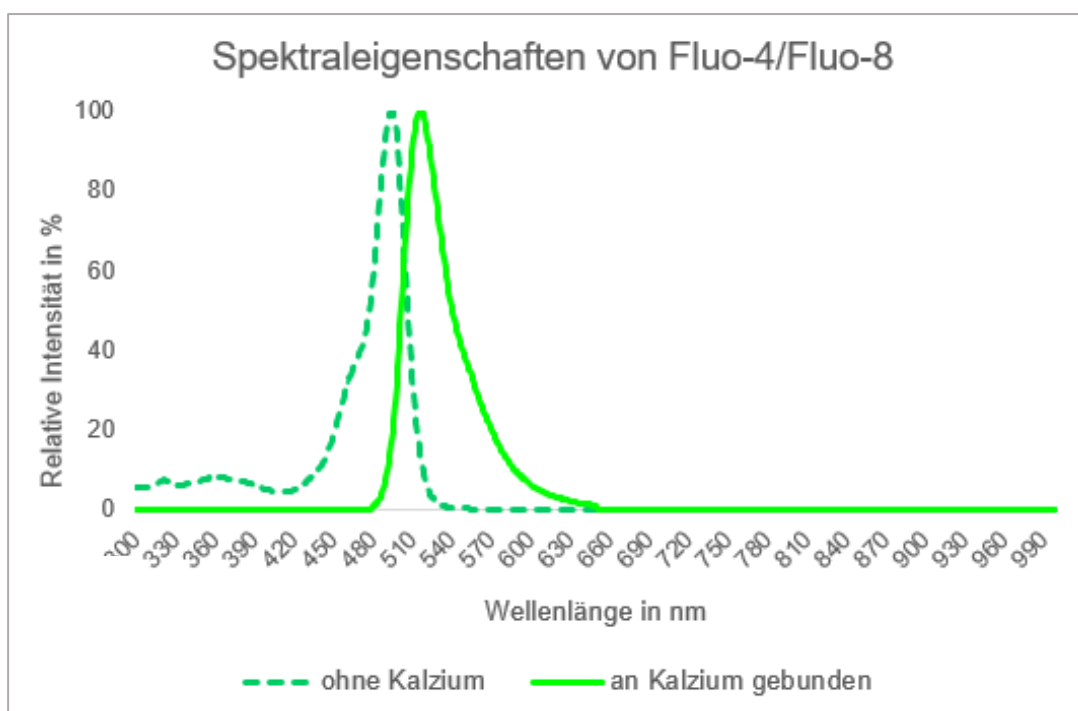
Für die Fluoreszenzfarbstofflösung einer Messkammer wurden die Bestandteile (siehe Tabelle 2-10) Pluronic, der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-8 bzw. Fluo-4 (AM) - angesetzt als 1mM-Konzentration in Dimethylsulphoxide (SIGMA®life science, München) - und Normaltyrode in ein lichtundurchlässiges 2 ml-Tube pipettiert. Um ein vorzeitiges Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern, erfolgte dies unter den lichtgeschützten Bedingungen eines abgedunkelten Raumes mit Rotlichtquelle. Die Fluoreszenzfarbstofflösung wurde vor jeder Messung frisch hergestellt, während der 1ml Farbstoffstock an sich bei -20°C gelagert werden konnte.

**Tabelle 2-10.** Herstellung der Fluoreszenzfarbstofflösung einer Messkammer.

<b>Substanz</b>	<b>Menge (Firma, Firmenstandort)</b>
Pluronic	1 µl (life technologies, Carlsbad)
Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 (AM) bzw. Fluo-8 (AM)	2 µl (life technologies, Carlsbad)
Normaltyrode	1000 µl

### 2.4.2 Fluoreszenzfarbstoffe Fluo-4 (AM) und Fluo-8 (AM)

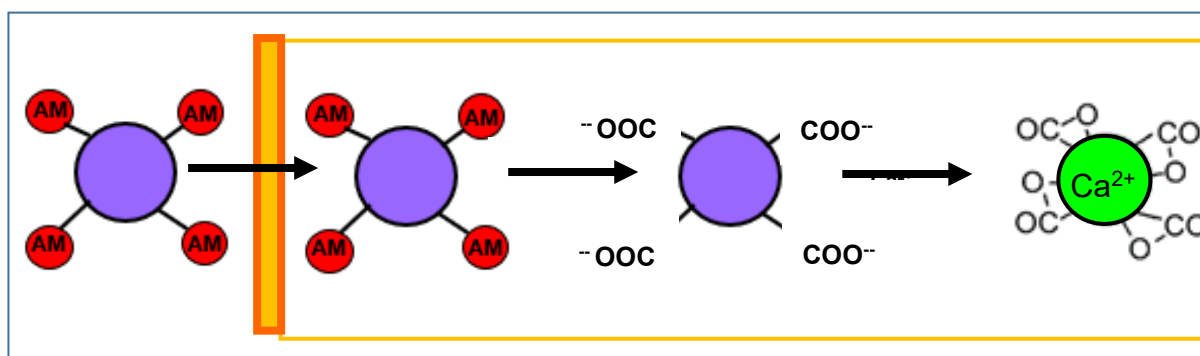
Zur Detektion von Kalzium bzw. deren relative Konzentrationsänderung wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluo-4 (AM) und Fluo-8 (AM) eingesetzt. Diese weisen die Eigenschaft auf, Licht der Wellenlänge 488 nm zu absorbieren und im grünen Wellenlängenbereich zu emittieren (siehe Abbildung 2-2). Sobald Fluo-4 bzw. Fluo-8 Kalziumionen binden, verstärkt sich die Fluoreszenzintensität 100-fach, während sich die Wellenlänge der Emission kaum verändert. Damit erfüllen diese beiden Fluoreszenzfarbstoffe das Merkmal eines nicht-ratiometrischen Kalzium-Indikators.



**Abbildung 2-2.** Spektraleigenschaften von Fluo-4/Fluo-8.

Die gepunktete Linie zeigt die relative Absorptionsintensität, die durchgängige Linie die relative Emissionsintensität der kalziumbindenden Fluoreszenzfarbstoffe Fluo-4/Fluo-8 im Zusammenhang mit der Wellenlänge. (Zahlenwerte von Thermofisher Spectra Viewer (96)).

Die unpolare AM-Ester-Form (Acetoxymethyl-Form) ermöglicht es Fluo-4 und Fluo-8 durch Diffusion in das Zellinnere zu gelangen. Dort vorherrschende zelleigene Esterasen spalten die AM-Gruppe ab, wodurch Carboxylgruppen freigelegt werden. Zum einen wird das Molekül dadurch polar und kann die Zellmembran nicht mehr passieren, zum anderen kann es nun eine Bindung mit Kalzium-Ionen eingehen (siehe Abbildung 2-3).



**Abbildung 2-3.** Schematische Beladung einer Zelle mit Fluo-4/Fluo-8 (AM).

Das unpolare Farbstoffmolekül (violett) diffundiert durch die Zellmembran (orange) in das Zellinnere. Dort spalten Esterasen die AM-Gruppe (rot) ab, sodass das nun polare Molekül Kalzium-Ionen binden kann.

Fluo-4 und Fluo-8 unterscheiden sich molekular nur äußerst geringfügig und weisen nahezu identische funktionelle Eigenschaften auf (siehe Tabelle 2-11). Der Vorteil am neueren Fluo-8 besteht lediglich darin, dass der Farbstoff im Vergleich zu Fluo-4 eine 1,5- bis 2-fach stärkere Helligkeit aufweist. Daher wurde im Lauf der Messungen der unstimulierten induzierten Kardiomyozyten von Fluo-4 (AM) überwiegend auf Fluo-8 (AM) umgestellt. Die Messungen der 0,5-Hz stimulierten induzierten Kardiomyozyten wurden ausschließlich mit Fluo-8 (AM) durchgeführt. Die Daten von Fluo-4 und Fluo-8 wurden aber letztendlich gepoolt, da sie sich nicht unterschieden und die Farbstoffe auch in Funktion und Handhabung komplett gleich sind (97–103).

**Tabelle 2-11.** Technische Daten zu den Fluoreszenzfarbstoffen Fluo-4 (AM) und Fluo-8 (AM).

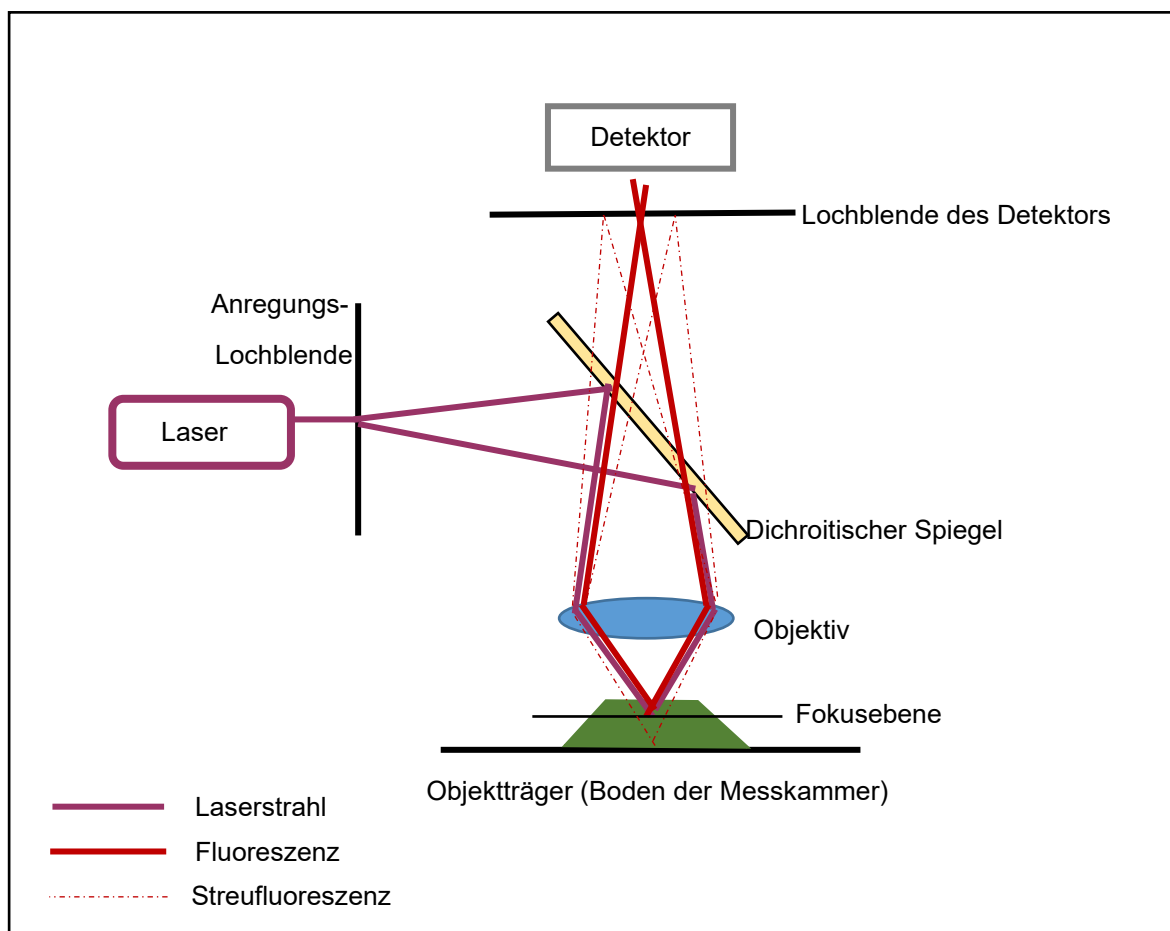
	<b>Fluo-4 (AM)</b>	<b>Fluo-8 (AM)</b>
<b>Summenformel</b>	C <sub>51</sub> H <sub>50</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>23</sub>	C <sub>50</sub> H <sub>50</sub> N <sub>2</sub> O <sub>23</sub>
<b>Exzitation</b>	494 nm	494 nm
<b>Emission</b>	516 nm	517 nm
<b>K<sub>d</sub></b>	335 nm	390 nm
<b>Lösungsmittel</b>	DMSO	DMSO

### 2.4.3 Konfokalmikroskop und Versuchsaufbau

Alle Kalziummessungen erfolgten am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Zeiss LSM700 mit der Imaging-Software ZEN black (Carl Zeiss AG, Oberkochen).

Das Konfokalmikroskop entspricht einem speziellen Lichtmikroskop, das aufgrund seines Aufbaus eine stark erhöhte Tiefenschärfe bietet. Ein Argonlaser dient als Anregungslicht für die mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Kalziummoleküle in den Zellen. Dessen Strahl wird durch eine Lochblende gebündelt und über einen dichroitischen Spiegel auf einen Punkt in der Fokusebene gelenkt. Durch die Wellenlänge von 488 nm des Lasers werden an diesem Punkt die Moleküle angeregt, sodass Fluoreszenzlicht emittiert wird. Der dichroitische Spiegel fungiert dabei als Strahlenteiler. Im Gegensatz zum Licht des Lasers ist er für das langwelligere Fluoreszenzlicht durchlässig, sodass es vom Detektor (Photomultiplier) erfasst werden kann (siehe Abbildung 2-4). Die Lochblende des Detektors ermöglicht eine Selektierung der Fluoreszenzemission im Hinblick auf Moleküle, die über und unter dem Fokuspunkt angeregt wurden, was zu der hohen Tiefenschärfe des Konfokalmikroskops beiträgt. Die Bezeichnung „konfokal“ verweist daher auf die Konstruktion, die es ermöglicht, dass der Punkt der Anregung im Präparat und der Punkt der Emission in der Mitte der Lochblende des Detektors gleichzeitig im Fokus sind.





**Abbildung 2-4.** Darstellung des Strahlengangs im Konfokalmikroskop.

Vom Laser gelangt der Strahl der Wellenlänge 488nm durch eine Lochblende gebündelt auf einen dichroitischen Spiegel, der das kurzwellige Licht in einen Punkt der Fokusebene spiegelt. Die mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Kalziummoleküle in den Zellen absorbieren das Licht und emittieren daraufhin Fluoreszenzlicht. Da der dichroitische Spiegel für das Fluoreszenzlicht durchlässig ist, kann es vom Detektor erfasst werden. Etwaige Streufluoreszenz, falls z.B. Moleküle auch unterhalb der Fokusebene angeregt werden, wird durch die Lochblende des Detektors blockiert.

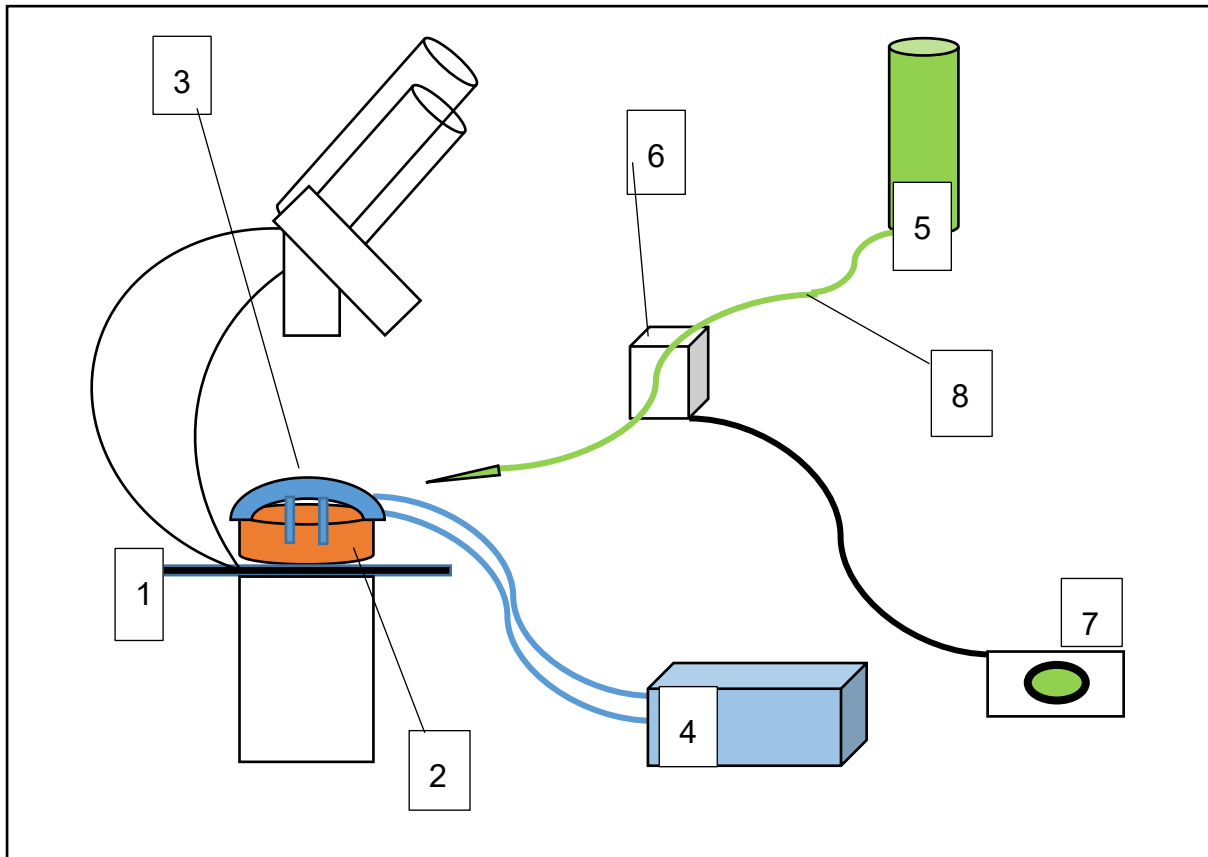
Bei den Kalziummessungen der vorliegenden Arbeit wurde die Technik der schnellen Line-Scans angewandt. Dabei wird eine Linie im Präparat festgelegt, die daraufhin vom fokussierten Laserstrahl in einer von der Linienlänge abhängigen Maximalgeschwindigkeit abgerastert wird. Das entstehende Bild wird dabei vom Computer aus den fokalen Abbildungen aller Punkte der Linie im zeitlichen Zusammenhang erstellt. Die Anzahl der Abrasterungsvorgänge (time series) war hier

mit 20.000 festgelegt. Die Intensität des Lasers war bei 1,0 eingestellt, die Öffnung der Lochblende (pinhole) bei 30,2 sowie die Verstärkung (Gain) bei 500. Über die Lochblende wird die Schichtdicke definiert. Diese Werte wurden gewählt, um bei minimal möglicher Laserintensität und geringstmöglicher Verstärkung ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs bzw. ein Detektor-Rauschen zu minimieren. Die festgelegten Einstellungen (siehe Tabelle 2-12) ermöglichen ferner die Vergleichbarkeit der erhaltenen Fluoreszenzwerte (104–106).

**Tabelle 2-12.** Festgelegte Einstellungen des Konfokalmikroskops für die Kalziummessungen.

<b>Einstellungen des Lasers</b>	<b>Wert</b>
time series	20.000
Intensität	1,0
pinhole	30,2
Gain	500
Wellenlänge	488 nm

Auf dem Objekthalter des Konfokalmikroskops wurden die Glasboden-Kulturschalen mit den zu messenden Zellen eingespannt. Die elektrische Stimulation der Zellen erfolgte mittels für die Messkammern passenden Platin-Stimulationselektroden, die mit dem Stimulator (MyoPacer Cell Stimulator, IonOptix Corporation, Milton, USA) verbunden waren. Für die Durchführung einer Koffeinmessung wurde statt des Stimulatordeckels eine feine Kanüle befestigt, die über einen Zulaufschlauch mit einem Reservoir an Koffeinlösung verbunden war. Die Tropfengeschwindigkeit hierfür war konstant eingestellt. Um die Koffeinlösung kontrolliert als Bolus auf die Zellen geben zu können, war der Zulaufschlauch in eine Regulationseinheit eingeklemmt, die sich über einen Druckauslöser öffnet (siehe Abbildung 2-5).

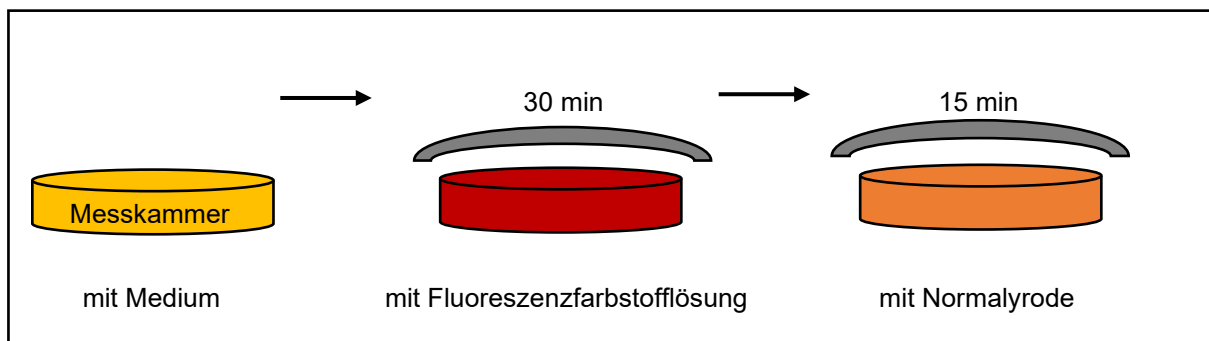


**Abbildung 2-5.** Schematische Versuchsanordnung am Konfokalmikroskop.

Legende: 1 Objektisch des Konfokalmikroskops, 2 Messkammer, 3 Stimulationsdeckel, 4 Stimulator, 5 Koffeinreservoir, 6 Regulationseinheit des Koffeinflusses, 7 Druckauslöser der Regulationseinheit, 8 Koffeinzulauf mit Kanüle.

#### 2.4.4 Vorbereitung einer Messkammer und Messprotokoll

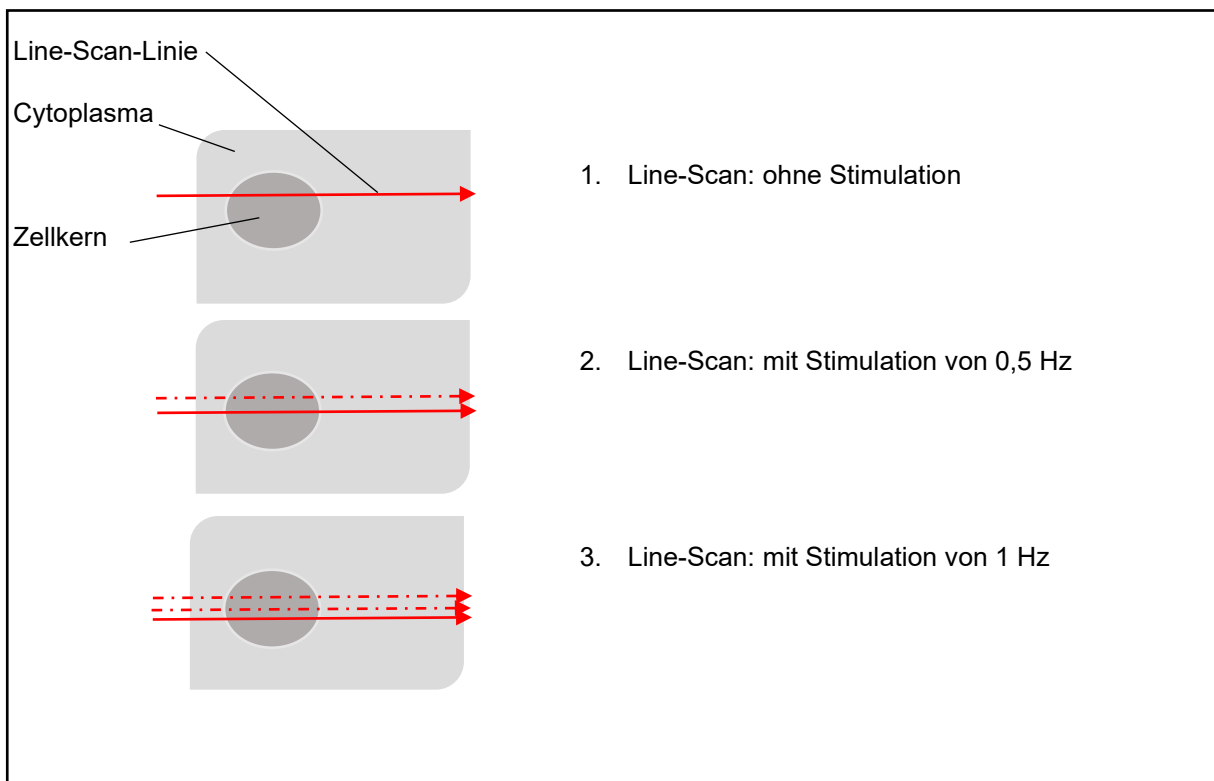
Die mit Gelatine beschichteten Glasboden-Kulturschalen, in denen die induzierten Kardiomyozyten im Zuge des Differenzierungsvorgangs ausplattiert wurden, konnten auch zur Messung eingesetzt werden. Daher wurde als erstes unter lichtgeschützten Bedingungen das Nährmedium der Zellkammer abgenommen und die Fluoreszenzfarbstofflösung vollständig darauf gegeben. Diese inkubierte daraufhin lichtabgeschirmt für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Farbstofflösung durch 1 ml Normaltyrode ersetzt und für weitere 15 min lichtabgeschirmt inkubiert (siehe Abbildung 2-6), um eine möglichst vollständige Deesterifikation des Fluoreszenzfarbstoffs zu erreichen.



**Abbildung 2-6.** Ablauf der Messvorbereitung einer Kammer.

Die Zellen werden für 30 min bei Raumtemperatur mit Fluoreszenzfarbstofflösung lichtabgeschirmt inkubiert. Danach erfolgt für 15 min eine lichtabgeschirmte Inkubation mit Normaltyrode.

Im Anschluss daran konnte mit dem Messprotokoll begonnen werden. Unter einem 40-fach-vergrößerndem Ölimmersionsobjektiv wurde eine geeignete Zelle ausfindig gemacht. Von dieser wurden jeweils drei Messungen durchgeführt. Die Anregung des Farbstoffs wurde in schneller Line-Scan-Technik bei 488nm vorgenommen. Der erste Line-Scan erfolgte unstimuliert, um die Transienten der spontanen Autokontraktionen zu messen. Beim zweiten Line-Scan wurde die Zelle mit 0,5 Hz bzw. beim dritten Line-Scan mit 1 Hz stimuliert. Dabei begann der Line-Scan erst, nachdem die Zelle ihr Steady State erreicht hatte. Nach ca. 2/3 der Messung wurde die Stimulation beendet, um etwaige nachfolgende spontane Aktivität der Zelle aufzeichnen zu können. Die Linie durch die Zelle wurde für den Laser stets so festgelegt, dass diese sowohl Cytoplasma, als auch Zellkern sowie den Hintergrund der Zelle erfasste. Auch wurde darauf geachtet, die Linie vor jedem weiteren Line-Scan jeweils ohne Veränderung der Linienlänge um einige Mykrometer zu versetzen (siehe Abbildung 2-7), um Messverfälschungen durch ein vorzeitiges Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs durch den Laser auszuschließen.



**Abbildung 2-7.** Schematische Darstellung des Line-Scan-Messprotokolls.

Die Linien werden jeweils sowohl durch Cytoplasma, Kern und Zellhintergrund gelegt. Der erste Line-Scan erfolgt unstimuliert, der zweite bei 0,5 Hz und der dritte bei 1 Hz, wobei die Linie vor dem zweiten und dritten Line-Scan etwas versetzt wird, um ein vorzeitiges Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu verhindern.

Als letzte Messung einer Kammer wurde die Reaktion einer Zelle auf Koffein untersucht. Hierfür wurde während einer unstimulierten Messung durch eine zellnah platzierte, schmale Kanüle ein langer Koffeinbolus abgegeben. Die Kanüle wurde durch ein Reservoir an Koffeinlösung gespeist. Durch die Koffein-induzierten Transienten werden Informationen zum Kalziumgehalt im Sarkoplasmatischen Retikulum erhalten, da Koffein an den Ryanodin-Rezeptoren RyR2 reversibel bindet, diese öffnet und offen hält. Dadurch bewirkt Koffein eine vollständige Entleerung des Kalziums aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum in das Cytosol, was den Rückschluss auf seinen Kalziumgehalt zulässt.

## 2.5 Datenauswertung und Statistik

### 2.5.1 Erstellung von Intensitätsprofilen in ImageJ

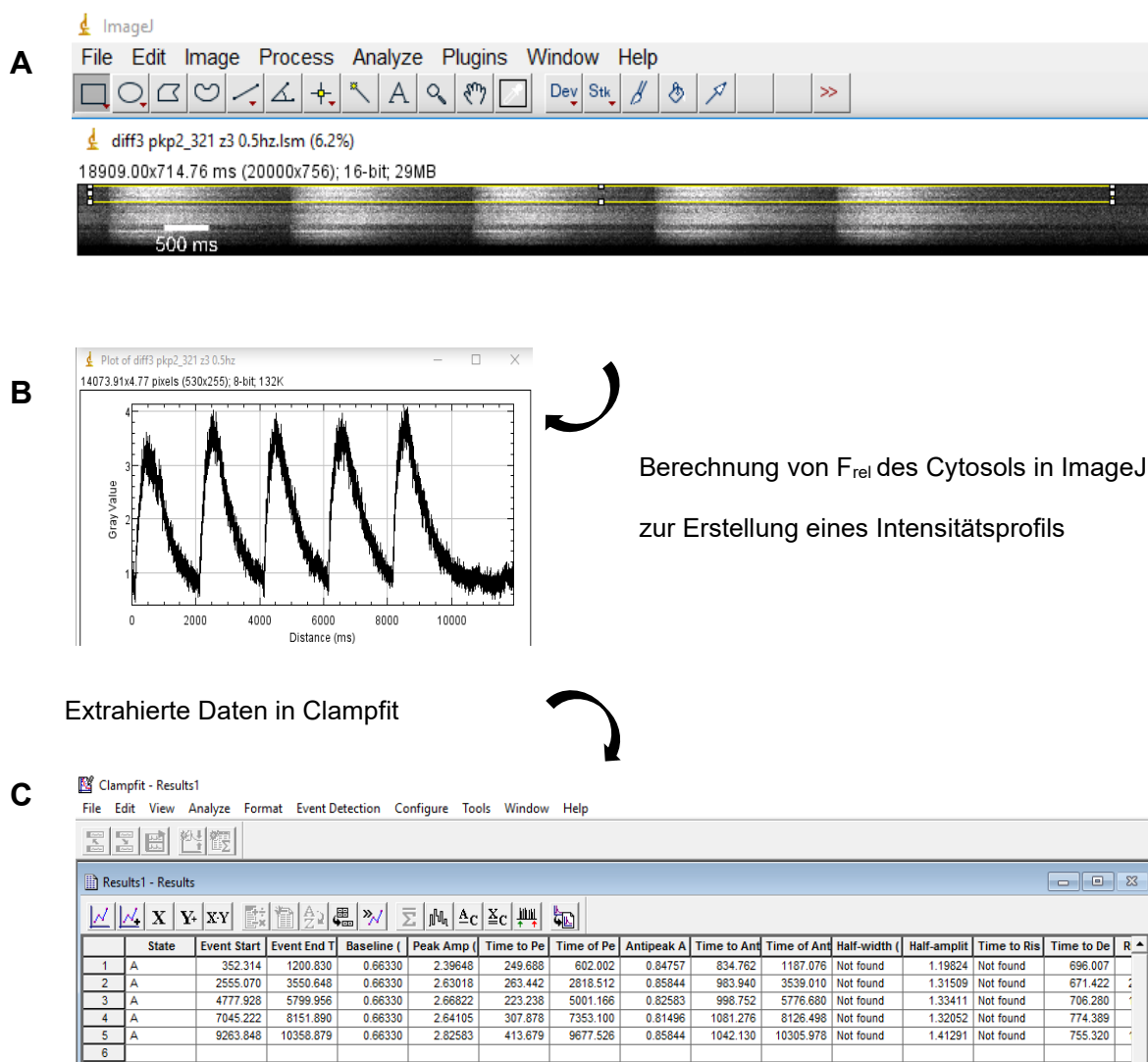
Über die pro Zelle erhaltene Ism-Datei wurde mithilfe der Software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda MD) ein Intensitätsprofil erstellt, das die Helligkeitsunterschiede der Fluoreszenz der kalziumbindenden Farbstoffe Fluo-8 und Fluo-4 (AM) in eine Funktion der Zeit umwandelt. Dies wurde jeweils für Cytosol und Zellkern einer Zelle vorgenommen. Dazu wird von den rohen Daten zuerst die Hintergrund-Fluoreszenz  $F_{Hi}$  subtrahiert, bevor sie durch ihren diastolischen Wert  $F_0$  dividiert werden (siehe Formel 2-1). Dadurch kann die relative Fluoreszenz  $F_{rel}$  in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt werden.

$$F_{rel} = \frac{F_{roh\ systolisch} - F_{Hi}}{F_{roh\ diastolisch} - F_{Hi}} = \frac{F}{F_0}$$

**Formel 2-1.** Berechnung der relativen Fluoreszenz.

### 2.5.2 Extraktion der Daten aus Intensitätsprofilen in Clampfit

Aus den erstellten Intensitätsprofilen wurden mit der Software Clampfit 10.6 (Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA) die Daten extrahiert (siehe Abbildung 2-8). Über die Anwendung „Threshold Search“ wurden die Peaks der Kalziumtransienten erfasst. Die erhaltenen Rohdaten wurden anschließend in Excel (Microsoft Corporation, Redmont WA, USA) gespeichert. Als relevante Parameter wurden daraus die Amplitude, TTP (time to peak), RT50 (relaxation time) und die Frequenz der Kalziumtransienten ausgewählt. Von diesen Parametern wurden in Excel die Mittelwerte errechnet, um einer fälschlichen Wichtung aufgrund der unterschiedlichen Transientenanzahl in einer Messung vorzubeugen.



**Abbildung 2-8.** Grober Ablauf eines Auswertungsvorganges.

Ein Auswertungsvorgang am Beispiel des Cytosols einer mit 0,5 Hz-stimulierten Zelle der Schwester. Im Programm ImageJ wird ein Intensitätsprofil erstellt, dessen Daten in txt-Form in der Software Clampfit analysiert werden.

Um Aussagen zu cytosolischen Werten im Zusammenhang zu nukleären Werten treffen zu können, wurden in Excel bei den Parametern Amplitude, TTP, RT50 von unstimuliert und bei 0,5 Hz stimulierten Kalziumtransienten die prozentualen Verhältnisse der Mittelwerte pro Zelle gebildet (siehe

Formel **2-2**).

$$V_Z = \frac{100 \% \cdot M_C}{M_N}$$

**Formel 2-2.** Berechnung des nukleären zu cytosolischen Verhältniswerts.

$V_Z$  = Verhältniswert einer Zelle in %;  $M_N$  = nukleärer Mittelwert;  $M_C$  = cytosolischer Mittelwert

### 2.5.3 Erstellen der Statistik in GraphPad Prism

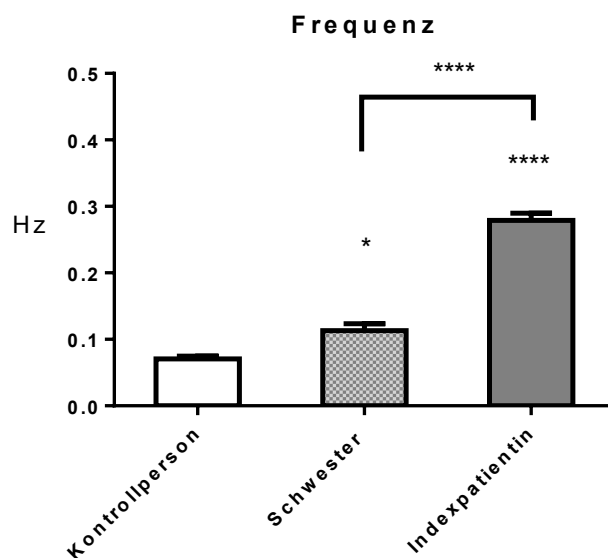
Aus den in Excel errechneten Mittelwerten erfolgte schließlich die statistische Analyse durch die Software GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla CA, USA). Es wurde der one-way-Anova-Test angewandt. Als statistisches Signifikanzniveau gilt  $p < 0,05$  (Kennzeichnung: \*), bzw.  $p < 0,01 - 0,001$  (Kennzeichnung: \*\*),  $p < 0,001 - 0,0001$  (Kennzeichnung: \*\*\*), sowie  $p < 0,0001$  (Kennzeichnung \*\*\*\*). Die Daten sind jeweils als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M. = standard error of the mean) dargestellt.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Eigenfrequenzen unstimulierter induzierter Kardiomyozyten

Aus iPSC differenzierte Kardiomyozyten weisen die Eigenschaft auf, auch ohne elektrische Stimulation Kalziumtransienten zu zeigen. Eine Überprüfung der Frequenz dieser Eigenkontraktionen ergab, dass sich unter den Zellen der Kontrollperson (n=62) mit  $0,07 \pm 0,004$  Hz im Mittel vergleichsweise deutlich erniedrigte Eigenfrequenzen fanden. Die Eigenfrequenzen der Zellen der Schwester (n=46) waren mit  $0,11 \pm 0,01$  Hz im Mittel signifikant erhöht zu denen der Kontrollperson und gleichzeitig hochsignifikant erniedrigt gegenüber den Eigenfrequenzen der Zellen der Indexpatientin (n=81). Diese erwiesen sich mit  $0,28 \pm 0,01$  Hz im Mittel gegenüber den Zellen der Schwester und der Kontrollperson als hochsignifikant erhöht (siehe Abbildung 3-1).



**Abbildung 3-1.** Eigenfrequenzen der induzierten Kardiomyozyten.

Es zeigt sich ein deutlicher, statistisch signifikanter Unterschied zwischen allen drei Zellgruppen. (Kontrollperson: n=62; Schwester: n=46; Indexpatientin: n=81; statistisches Signifikanzniveau: \* d.h.  $p < 0,05$ ; \*\*\*\* d.h.  $p < 0,0001$ ).

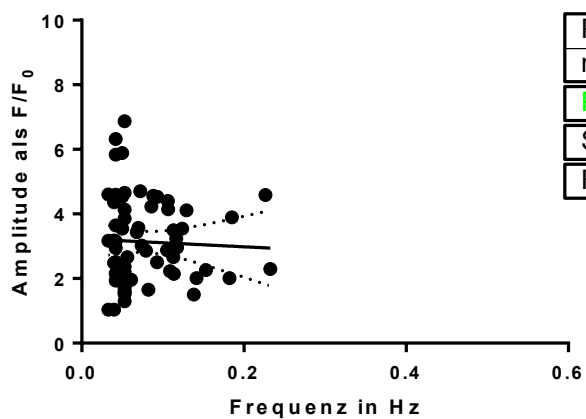
### 3.2 Cytosolische Transienten unstimulierter induzierter Kardiomyozyten

Die Auswertung der cytosolischen Amplituden der Kalziumtransienten von unstimulierten induzierten Kardiomyozyten zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Linien der Kontrollperson und der Indexpatientin, jedoch zwischen den Linien der Kontrollperson und der Schwester. Die cytosolischen Amplituden der Zellen der Indexpatientin (n=84) wiesen mit  $3,64 \pm 0,16$  im Mittel als  $F/F_0$  eine tendenzielle Erhöhung gegenüber denen der Kontrolle (n=66) mit  $3,16 \pm 0,16$  auf. Diejenigen der Schwester (n=42) betragen  $4,25 \pm 0,31$  im Mittel als  $F/F_0$  und unterschieden sich damit signifikant von der Kontrollperson, nicht aber von der Indexpatientin (siehe Abbildung 3-2).

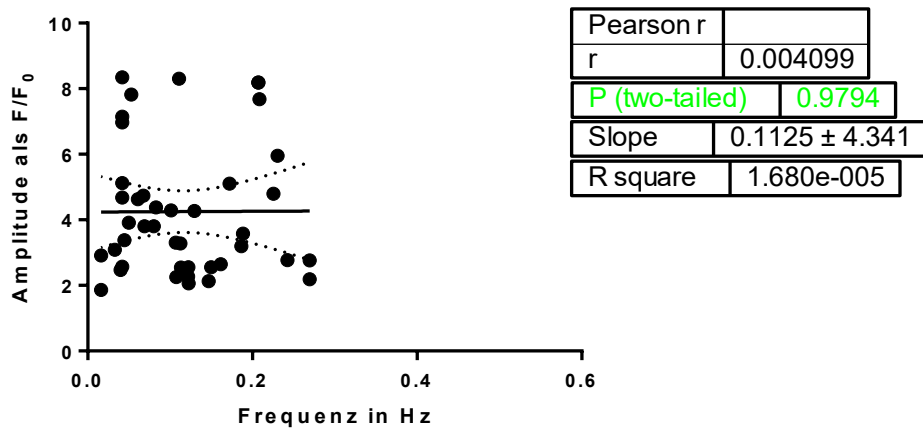
Aufgrund der deutlich unterschiedlichen Eigenfrequenzen der Zelllinien erfolgte bei unstimulierten Kalziumtransienten zusätzlich eine frequenzabhängige Analyse der Parameter. Als Maß des Zusammenhangs zwischen Frequenz und dem jeweiligen Kalziumparameter wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient  $r$  auf statistische Signifikanz geprüft. Außerdem wurden jeweils die Steigung der Regressionsgeraden (slope) sowie der Parameter  $R^2$  (R square) für die Güte der Regressionsgerade erfasst.

Hinsichtlich der Amplituden ergab sich sowohl bei den Zellen der Kontrollperson ( $r=-0,04310$ ), als auch bei der Schwester ( $r=-0,004099$ ) und der Indexpatientin ( $r=-0,1915$ ) keine signifikante Korrelation zur Frequenz (siehe Abbildung 3-2). Die Steigungen der Regressionsgeraden betragen bei den Zellen der Kontrollperson  $-1,246 \pm 3,638$  (R square= 0,001858), bei der Schwester  $0,1125 \pm 4,341$  (R square= 0,0000168) und bei der Indexpatientin  $-2,930 \pm 1,689$  (R square= 0,03668) und unterschieden sich jeweils nicht signifikant ( $p=0,7013$ ).

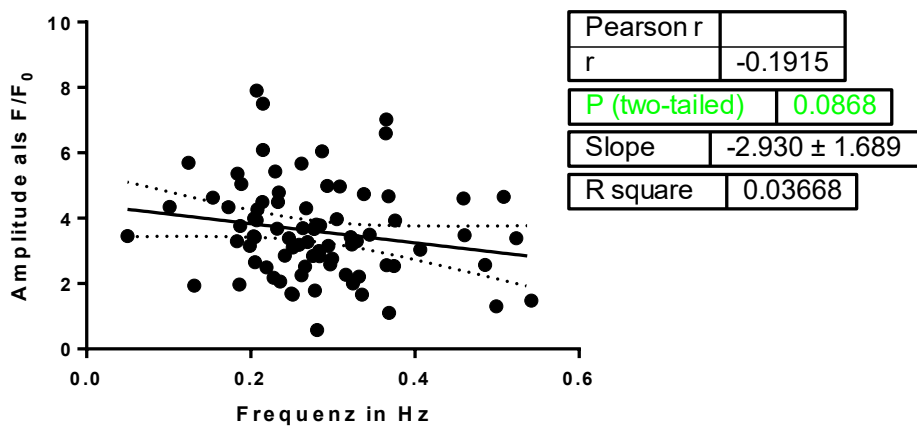
A

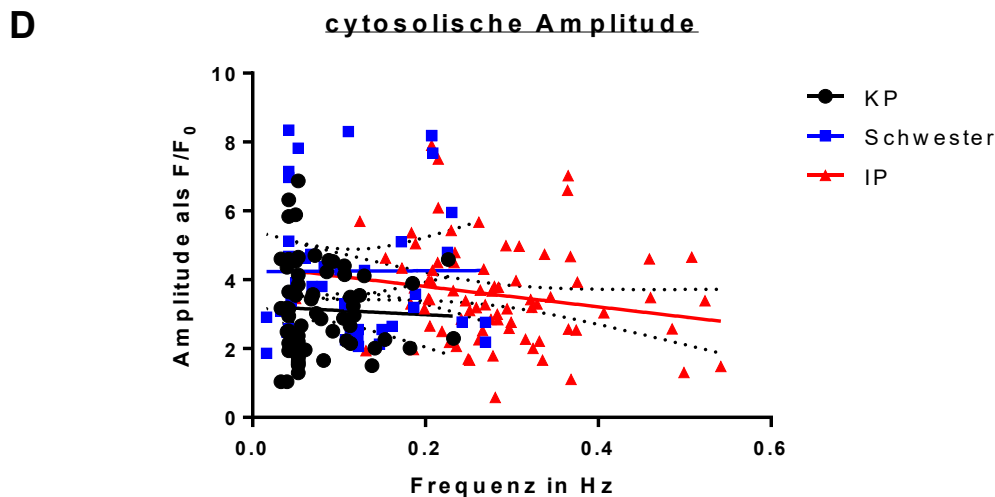
Kontrollperson cytosolische Amplitude

B

Schwester cytosolische Amplitude

C

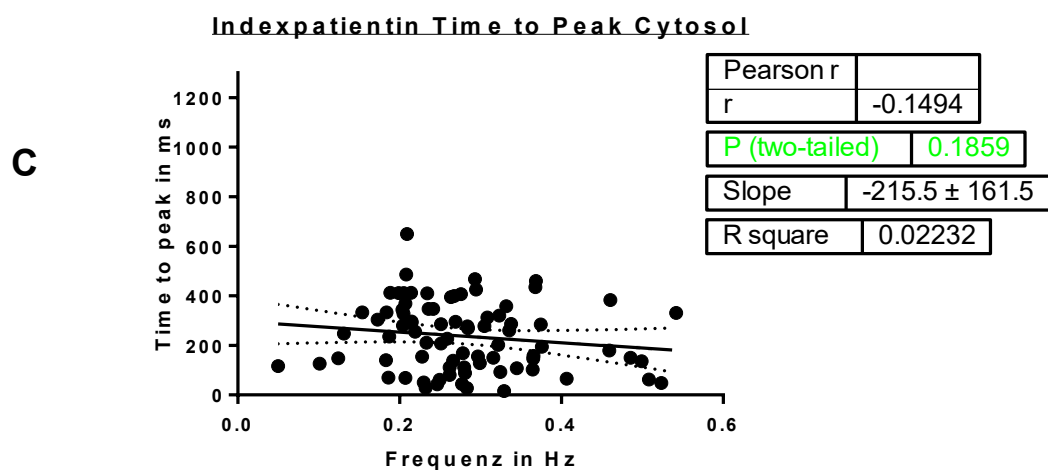
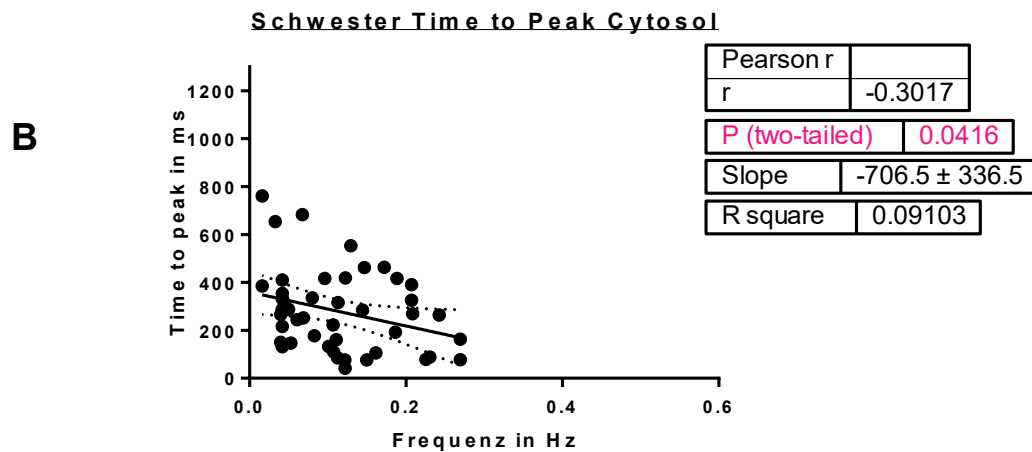
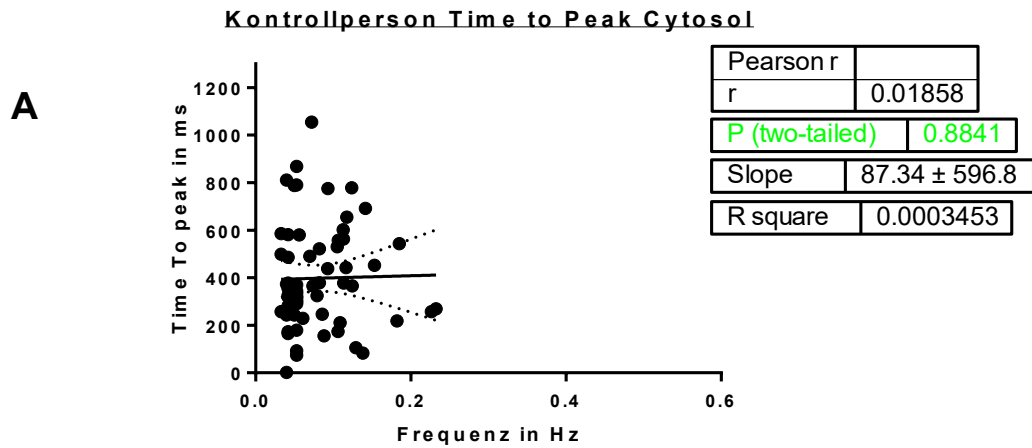
Indexpatientin cytosolische Amplitude

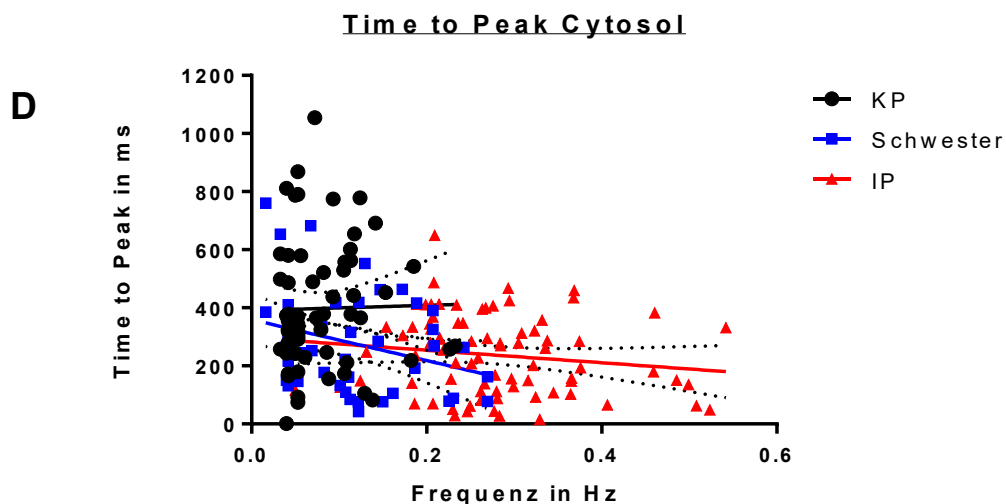


**Abbildung 3-2.** Cytosolische Amplituden unstimuliert erhaltener Kalziumtransienten.

Die Werte werden im Direktvergleich (D) und einzeln für die Zellgruppen der Kontrollperson (A), Schwester (B) und der Indexpatientin (C) dargestellt, jeweils mit Regressionsgerade (durchgezogene Linie) und Fehlergerade (gestrichelt). Die cytosolischen Amplituden der Zellen der Schwester unterschieden sich signifikant von denen der Kontrollperson, diejenigen der Indexpatientin hingegen nicht. Der ange deutete Unterschied zwischen cytosolischen Amplituden der Schwester und der Indexpatientin erwies sich als nicht signifikant. Der Pearson Korrelationskoeffizient zwischen den Parametern Frequenz und cytosolischer Amplitude ergab bei allen drei Zelllinien keinen statistisch signifikanten Zusammenhang (grüne Schriftfarbe). (Kontrollperson:  $n=66$ ; Schwester:  $n=42$ ; Indexpatientin:  $n=84$ ; statistisches Signifikanzniveau:  $p<0,01$ ).

Bei der Untersuchung der cytosolischen time to peak- (TTP-) Werte (siehe Abbildung 3-3) fanden sich signifikante Verminderungen sowohl bei den Kalziumtransienten der Zellen der Schwester (n=46), als auch bei der Indexpatientin (n=84), jeweils im Vergleich mit der Kontrollperson (n=65). Die absoluten Mittelwerte lagen bei  $394,7 \pm 26,98$  (Kontrollperson), sowie  $279,6 \pm 24,83$  (Schwester) und  $231,7 \pm 15,08$  ms (Indexpatientin). Die frequenzabhängige Analyse zeigte bei den Zellen der Schwester einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Frequenz und TTP-Werten ( $p=0,0416$ ), wobei die TTP bei steigender Frequenz abnahm. Der Pearson Korrelationskoeffizient betrug dabei  $r=-0,3017$  bei der Schwester. Bei den Zellen der Kontrollperson und der Indexperson wies dieser mit  $r=-0,01858$  (Kontrollperson) und  $r=-0,1494$  (Indexperson) keine Signifikanz auf. Die Betrachtung der slope-Werte ergab für die Zellen der Kontrollperson  $87,34 \pm 596,8$  (R square= 0,0003453), der Schwester  $-706,5 \pm 336,5$  (R square= 0,09103) und der Indexpatientin  $-215,5 \pm 161,5$  (R square= 0,02232), ein signifikanter Unterschied konnte nicht festgestellt werden ( $p=0,3548$ ).



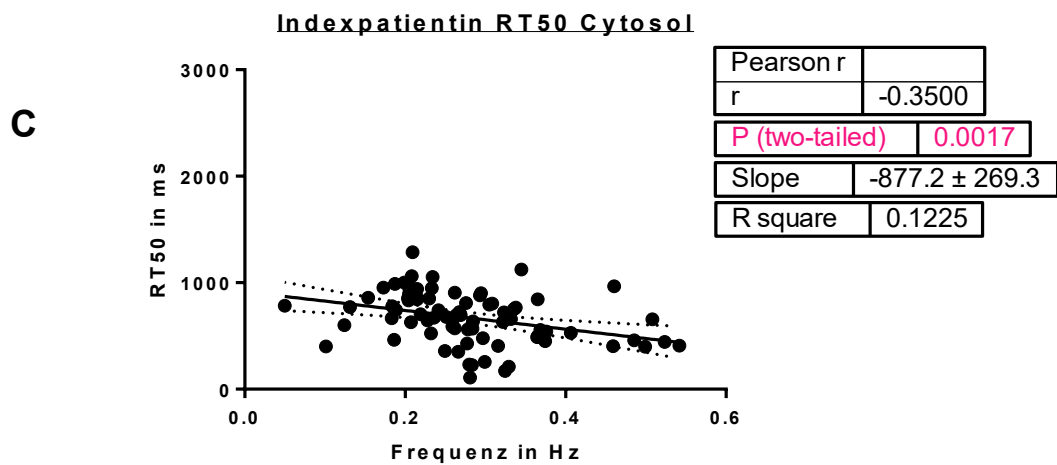
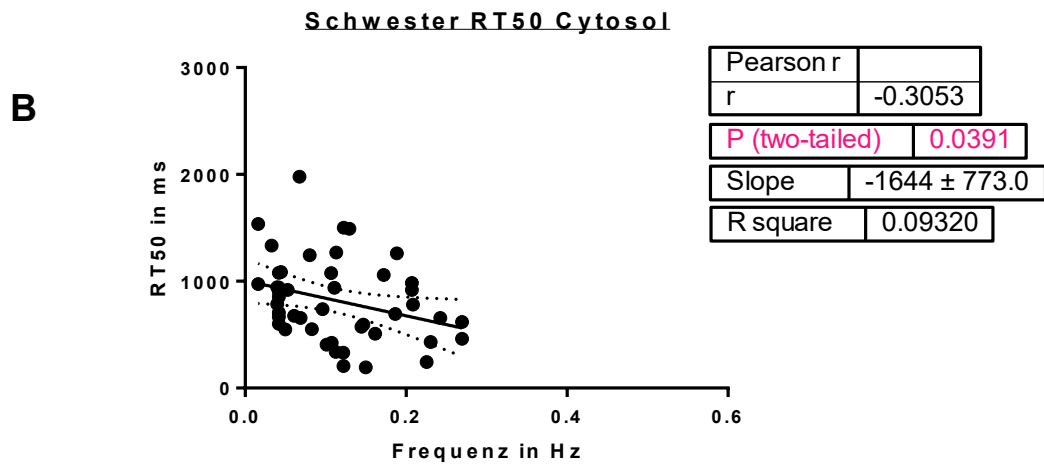
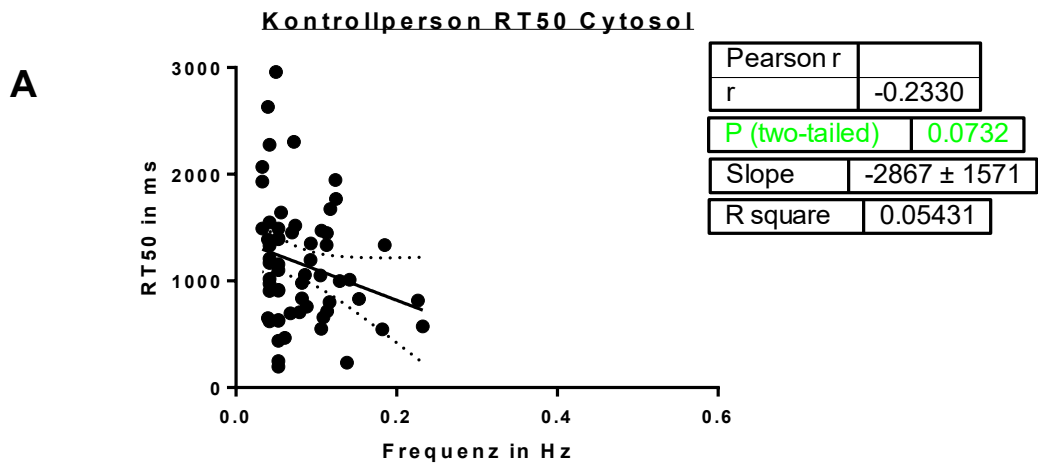


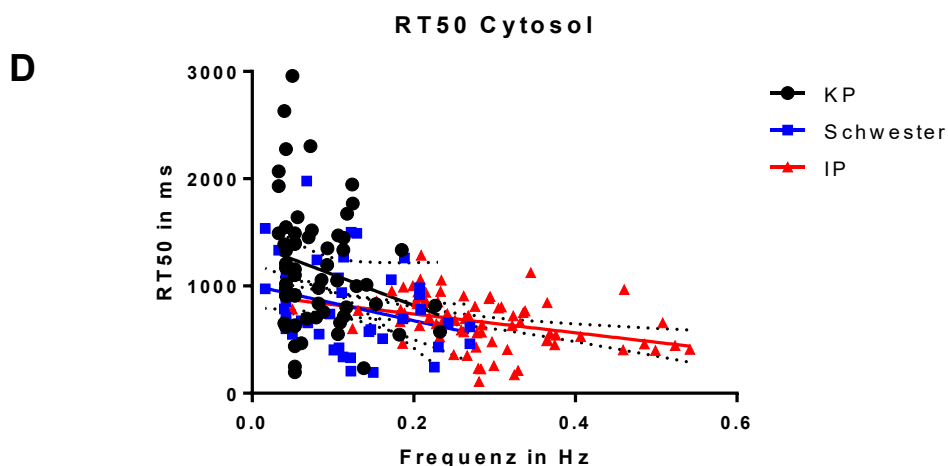
**Abbildung 3-3.** Cytosolische TTP-Werte unstimuliert erhaltener Kalziumtransienten.

Die Werte werden im Direktvergleich (D) und einzeln für die Zellgruppen der Kontrollperson (A), Schwester (B) und der Indexpatientin (C) dargestellt, jeweils mit Regressionsgerade (durchgezogene Linie) und Fehlergerade (gestrichelt). Die cytosolischen TTP-Werte der Zellen der Schwester und der Indexpatientin erwiesen sich gegenüber der Kontrollperson als signifikant vermindert. Bei der Zelllinie der Schwester ergab sich im Gegensatz zu den Zellen der Kontrollperson und der Indexperson auch eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Frequenz und Amplitude (pinke Schriftfarbe). (Kontrollperson: n=65; Schwester: n=46; Indexpatientin: n=84; statistisches Signifikanzniveau:  $p < 0,01$ ).

Um neben den TTP-Werten, die die Zeit der systolischen Kalziumfreisetzung aus dem SR beschreiben, auch die Zeit des Kalziumabfalls analysieren zu können, wurden Werte der Relaxationszeit auf 50 % der Amplitude (RT50) herangezogen. Hierbei fanden sich den TTP-Werten ähnliche Ergebnisse: Die RT50-Werte der Zellen der Schwester und der Indexpatientin waren im Hinblick auf die Kontrollperson signifikant erniedrigt, wobei sie bei der Indexpatientin am stärksten vermindert waren (siehe Abbildung 3-4). Der absolute Mittelwert war hierbei  $662,0 \pm 27,44$  ms (n=82), bei der Schwester (n=46)  $819,9 \pm 57,10$  ms und bei der Kontrollperson (n=60)  $1157 \pm 74,39$  ms. Der Pearson Korrelationskoeffizient zeigte bei allen drei Zelllinien mit  $r=-0,2330$  (Kontrollperson),  $r=-0,3053$  (Schwester) und  $r=-0,3500$  (Indexpatientin) einen tendenziellen Zusammenhang auf, bei den Zellen der Schwester und der Indexpatientin erwies dieser sich als statistisch signifikant. Die Steigung der Regressionsgeraden betrug bei den Zellen der Kontrollperson  $-2867 \pm 1571$  (R square= 0,05431), bei der Schwester  $-1644 \pm 773$  (R square= 0,09320) und bei der Indexpatientin  $-877,2 \pm 269,3$  (R square= 0,1225), sie unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p=0,2324$ ).





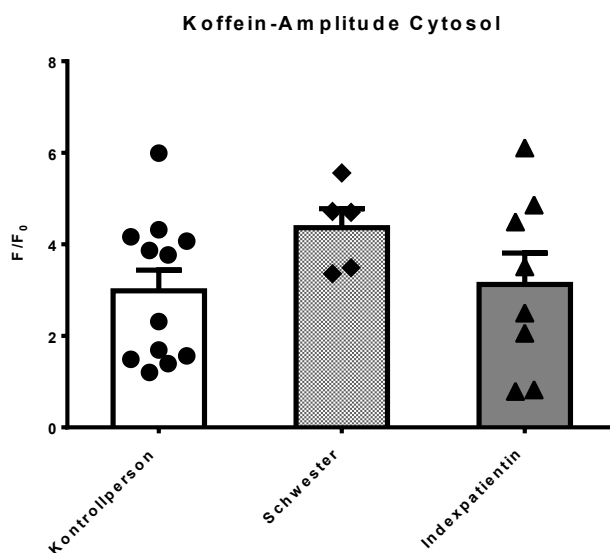


**Abbildung 3-4.** Cytosolische RT50-Werte unstimuliert erhaltener Kalziumtransienten.

Die Werte werden im Direktvergleich (D) und einzeln für die Zellgruppen der Kontrollperson (A), Schwester (B) und der Indexpatientin (C) dargestellt, jeweils mit Regressionsgerade (durchgezogene Linie) und Fehlergerade (gestrichelt). Die cytosolischen RT50-Werte der Zellgruppen mit Mutation wiesen signifikante Verminderungen gegenüber der Kontrollperson auf, wobei die Werte der Zellgruppe mit Mutation und Erkrankung am stärksten erniedrigt waren. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Parametern Frequenz und RT50 ließ bei den Zellen der Schwester und der Indexpatientin nachweisen (pinke Schriftfarbe), wenn auch eine gewisse Tendenz bei den Zellen der Kontrollperson angedeutet erscheint. (Kontrollperson: n=60; Schwester: n=46; Indexpatientin: n=82; statistisches Signifikanzniveau:  $p < 0,001$ ).

### 3.3 Koffeintransienten

Die Auswertung der Amplitude von spontan kontrahierenden Koffein-induzierten Transienten ermöglicht Informationen über den Kalziumgehalt des SR. Hintergrund dafür ist die durch Koffein bewirkte Öffnung der Ryanodinrezeptoren und die damit verbundene vollständige Entleerung des Kalziums aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum in das Cytosol. Hier wurden keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den Zellen der Kontrollperson (n=12), Schwester (n=5) und Indexpatientin (n=8) festgestellt, auch wenn sich die Werte der Zellen der Schwester mit einem  $F/F_0$  von  $4,36 \pm 0,42$  im Mittel tendenziell erhöht darstellten (siehe Abbildung 3-5). Das  $F/F_0$  der Zellen der Indexpatientin betrug im Mittel  $3,13 \pm 0,68$ , jenes der Kontrollperson  $2,99 \pm 0,45$ . Somit gibt es in Bezug auf koffein-induzierte Kalziumtransienten keinen Hinweis auf einen veränderten Kalziumgehalt des SR im Zusammenhang mit der PKP-Mutation.

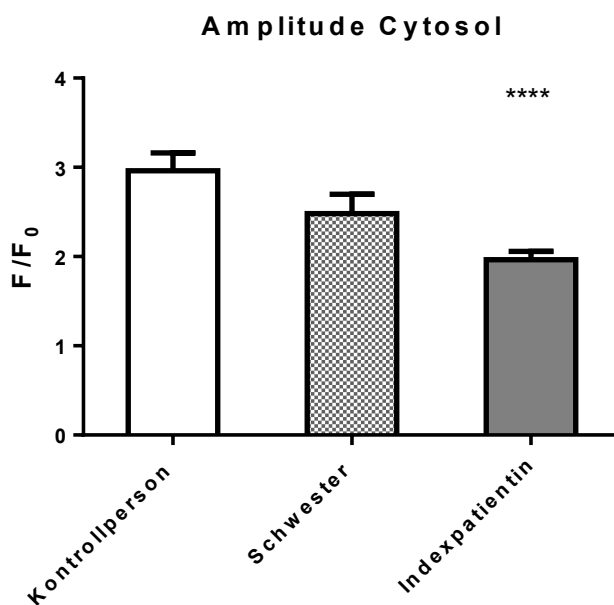


**Abbildung 3-5.** Cytosolische Werte der Amplituden von Koffein-induzierten Transienten.

Die statistische Analyse ergab keine signifikanten Zusammenhänge unter den drei Zellgruppen. Die Werte der Zellen der Schwester wiesen lediglich eine erhöhte Tendenz auf. (Kontrollperson: n=12; Schwester: n=5; Indexpatientin: n=8).

### 3.4 Cytosolische Transienten bei 0,5 Hz-stimulierten induzierten Kardiomyozyten

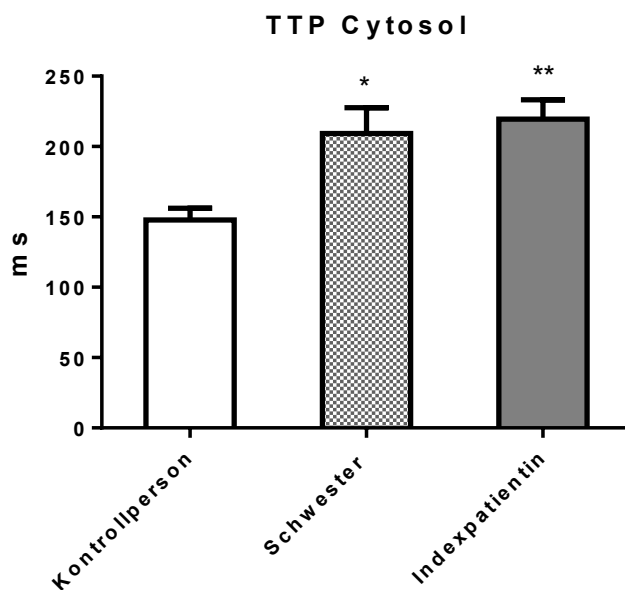
Die Analyse der cytosolischen Transientenamplituden von 0,5 Hz-stimulierten induzierten Kardiomyozyten ergab einen statistisch signifikanten Unterschied. So zeigten sich die cytosolischen Amplituden der Zellen der Indexpatientin stark vermindert im Hinblick auf die der Kontrollperson. In Bezug auf die Kontrollperson hingegen war die Amplitudenverminderung der Zellen der Schwester zwar angedeutet, aber nicht signifikant (siehe Abbildung 3-6). Das  $F/F_0$  war jeweils im Mittel bei  $2,96 \pm 0,20$  (Kontrollperson,  $n=47$ ),  $2,48 \pm 0,22$  (Schwester,  $n=45$ ) und  $1,97 \pm 0,09$  (Indexpatientin,  $n=65$ ).



**Abbildung 3-6.** Cytosolische Amplitudenwerte von 0,5 Hz-stimuliert erhaltenen Kalziumtransienten.

Die cytosolischen Amplituden der Zellen der Indexpatientin zeigten sich gegenüber der Kontrollperson signifikant vermindert. Ein Unterschied zwischen den Zellen der Schwester und der Kontrollperson schien angedeutet, erwies sich aber als nicht signifikant. (Kontrollperson:  $n=47$ ; Schwester:  $n=45$ ; Indexpatientin:  $n=65$ ; statistisches Signifikanzniveau: \*\*\*\* d.h.  $p<0,0001$ ).

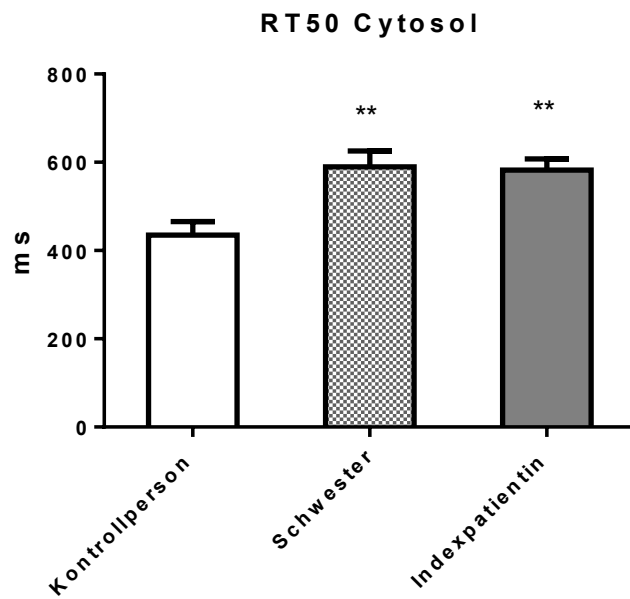
Die TTP-Werte bei den Zellen der Schwester und der Indexpatientin waren denen der Kontrollperson gegenüber signifikant erhöht (siehe Abbildung 3-7). Die absoluten TTP-Werte betragen bei den Zellen der Kontrollperson im Mittel  $147,8 \pm 8,43$  ms (n=30), bei den Zellen der Schwester  $209,2 \pm 18,40$  ms (n=39) und  $219,5 \pm 13,76$  ms bei Zellen der Indexpatientin (n=47).



**Abbildung 3-7.** Cytosolische TTP-Werte von 0,5 Hz-stimuliert erhaltenen Kalziumtransienten.

Die TTP-Werte im Cytosol der Zellen der Schwester und der Indexpatientin waren signifikant erhöht gegenüber denen der Kontrollperson. (Kontrollperson: n=30; Schwester: n=39; Indexpatientin: n=47; statistisches Signifikanzniveau: \* d.h.  $p < 0,05-0,01$ ; \*\* d.h.  $p < 0,01-0,001$ ).

Ähnliche Ergebnisse wie bei den cytosolischen TTP-Werten - die als zeitliches Maß der Kalziumfreisetzung aus dem SR gelten - wurden beim Parameter RT50 erhalten, einem zeitlichen Maß der Kalziumelimination aus dem Cytosol. Die RT50-Werte sowohl der Zellen der Schwester mit  $589,9 \pm 35,83$  ms im Mittel (n=39), als auch der Zellen der Indexpatientin mit  $582,00 \pm 25,40$  ms (n=45) zeigten eine signifikante Erhöhung im Hinblick auf die Zellen der Kontrollperson mit  $434,7 \pm 31,11$  ms (n=33) (siehe Abbildung 3-8).

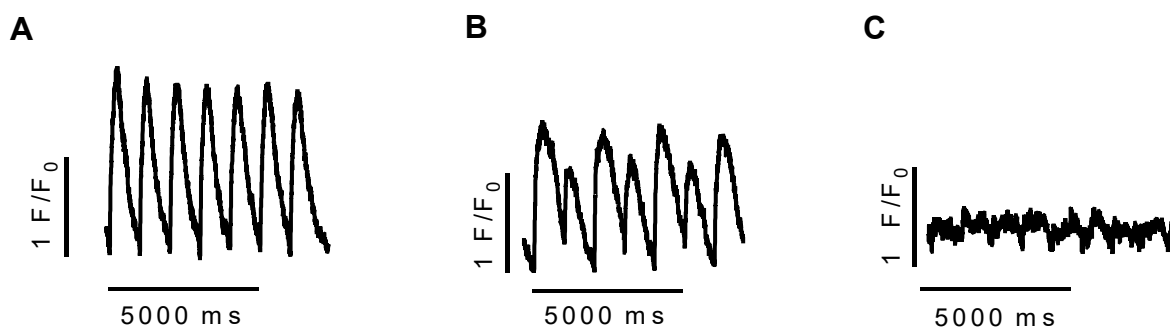


**Abbildung 3-8.** Cytosolische RT50-Werte von 0,5 Hz-stimuliert erhaltenen Kalziumtransienten.

Die cytosolischen RT50-Werte ergaben signifikante Erhöhungen der Zellen der Schwester und Indexpatientin gegenüber den Zellen der Kontrollperson. (Kontrollperson: n=33; Schwester: n=39; Indexpatientin: n=45; statistisches Signifikanzniveau: \*\* d.h.  $p < 0,01-0,001$ ).

### 3.5 Qualitative Transientenanalyse bei 1 Hz-Stimulation

Zur Feststellung der Arrhythmieneigung wurde eine qualitative Analyse bei 1 Hz vorgenommen, was in Anbetracht der Eigenfrequenzen von 0,01 - 0,03 Hz im Mittel einer deutlich gesteigerten Stimulationsfrequenz entsprach. Als Frequenz-induzierte Arrhythmien wurden Kalzium-Alternans, zusätzliche oder fehlende Kalziumtransienten, Tachykardien und völlig asynchrone Kalziumausschüttungen gewertet. So wurde die Häufung des aufgetretenen arrhythmischen Verhaltens in Zusammenschau mit Zellkompartiment - Cytosol oder Zellkern - und Zelllinie untersucht.



**Abbildung 3-9.** Originalregistrierung von Frequenz-induzierten Arrhythmien im Vergleich zu normalen Kalziumtransienten.

Für die qualitative Analyse von Arrhythmien, die im Rahmen der Stimulationsfrequenz von 1 Hz auftraten, wurden fehlerhafte Kalziumausschüttungen jeglicher Art wie beispielsweise Alternans (B) und asynchrone Tachykardien (C) im Vergleich zu korrekt umgesetzten Kalziumtransienten (A) erfasst.

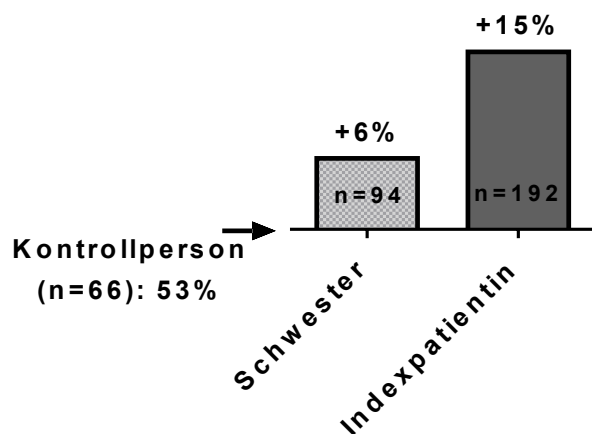
Es zeigte sich, dass unter dieser Stimulationsfrequenz Arrhythmien eindrucksvoll auslösbar waren. Der Anteil der Zellen mit arrhythmischem Verhalten bei 1 Hz überwog bei allen drei Zelllinien im Zellkern wie auch im Cytosol. Desweiteren war der arrhythmische Anteil im Zellkern gegenüber dem Cytosol unabhängig von der Zelllinie deutlich erhöht. Bei den Zellen der Indexpatientin (n=192) waren die Arrhythmieanteile sowohl im Zellkern (91 %), als auch im Cytosol (61 %) gegenüber denen der anderen

beiden Zelllinien am höchsten, während sie bei den Zellen der Kontrollperson (n=66) im Cytosol mit 53 % am niedrigsten waren. Die Zellen der Schwester (n=94) lagen mit ihrem cytosolischen Verhalten (56 % Arrhythmieanteil) zwischen den Werten der Zellen der Indexpatientin und der Kontrollperson, nukleär hatten sie mit 81 % einen fast gleichen Arrhythmieanteil als die Zellen der Kontrollperson mit 82 %. Obwohl diese Zelllinie mutationstragend ist, fand sich im Arrhythmieverhalten dennoch ein ausgeprägter Unterschied zur Zelllinie der Indexpatientin (siehe Abbildung 3-10). Damit betrug der prozentuale Unterschied im Vergleich zur Kontrolle bei den Kardiomyozyten der asymptomatischen Mutationsträgerin 6 % und bei der Indexpatientin 15 % im Cytosol, im Zellkern -1 % bei der asymptomatischen Mutationsträgerin und 11 % bei der Indexpatientin (siehe Abbildung 3-10).



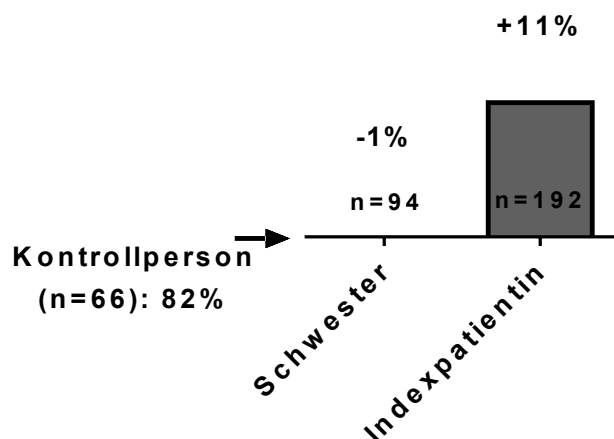
A

## Arrhythmien Cytosol



B

## Arrhythmien Zellkern



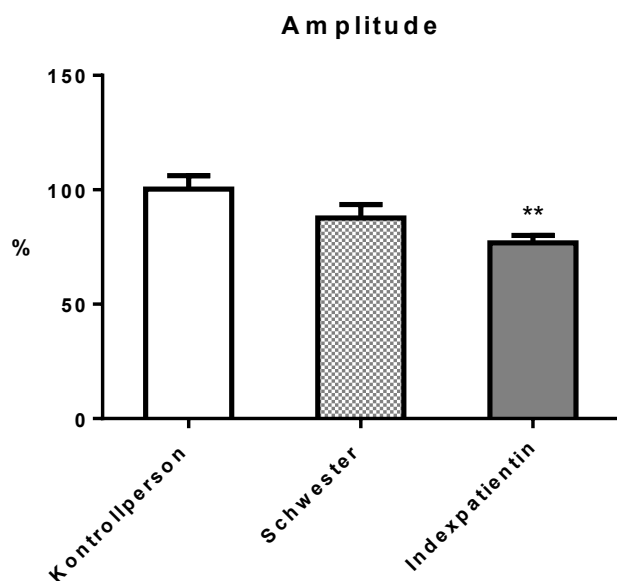
**Abbildung 3-10.** Qualitative prozentuale Transientenanalyse von 1 Hz-stimulierten induzierten Kardiomyozyten.

(A) Der Anteil an Zellen mit arrhythmischen Verhalten bei 1 Hz überwog im Cytosol unabhängig von der Zelllinie.

(B) Der höchste Anteil an nukleären Arrhythmien war bei den Zellen der Indexpatientin zu verzeichnen. Auffällig dabei war, dass bei der Zelllinie der Schwester der nukleäre Arrhythmieanteil dem der Zelllinie der Kontrollperson ähnelt und sich deutlich von dem der Indexpatientin unterscheidet. (Kontrollperson: n=66; Schwester: n=94; Indexpatientin: n=192).

### 3.6 Nukleär-cytosolisch prozentuale Werte der Kalziumtransienten von unstimulierten induzierten Kardiomyozyten

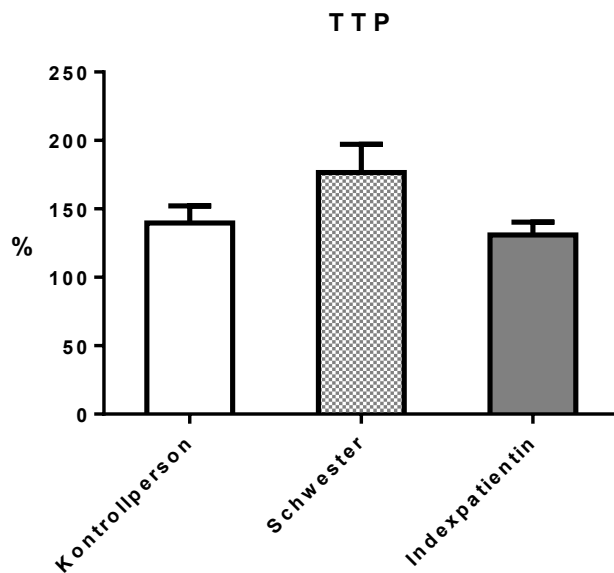
Die statistische Analyse der prozentualen Verhältnisse von nukleären zu cytosolischen Amplituden der unstimuliert erhaltenen Kalziumtransienten pro Zelllinie ergab im Hinblick auf die Zellen der Kontrollperson (n=65,) eine tendenzielle, nicht signifikante Erniedrigung der Zellen der Schwester (n=46). Diese Erniedrigung zeigte sich bei den Zellen der Indexpatientin (n=79) ausgeprägter, hier war der Unterschied statistisch signifikant (siehe Abbildung 3-11). Die absoluten Mittelwerte in Prozent betragen  $100,4 \pm 5,80$  bei den Zellen der Kontrollperson,  $87,63 \pm 6,00$  bei den Zellen der Schwester und  $76,80 \pm 3,30$  bei den Zellen der Indexpatientin.



**Abbildung 3-11.** Die prozentualen Verhältnisse von nukleären zu cytosolischen Amplitudenwerten unstimuliert erhaltener Kalziumtransienten.

Die Werte der Zellen der Schwester stellten sich als leicht (nicht signifikant) vermindert gegenüber denen der Zellen der Kontrollperson dar, diejenigen der Zellen der Indexpatientin waren deutlich (statistisch signifikant) vermindert. (Kontrollperson: n=65; Schwester: n=46; Indexpatientin: n=79; statistisches Signifikanzniveau: \*\* d.h.  $p < 0,01-0,001$ ).

In den prozentualen Verhältnissen der cytosolischen zu nukleären TTP-Werte unterschieden sich weder die TTP-Werte der Zellen der Schwester (n=44), noch die TTP-Werte der Zellen der Indexpatientin (n=68) signifikant von den Zellen der Kontrollperson (n=60). Bei den Zellen der Indexpatientin zeigte sich mit  $130 \pm 9,51$  im Mittel lediglich eine tendenzielle Verminderung gegenüber der Kontrollperson mit  $139,7 \pm 12,48$  an, bei den Zellen der Schwester mit  $176,5 \pm 20,66$  eine leichte Erhöhung (siehe Abbildung 3-12).

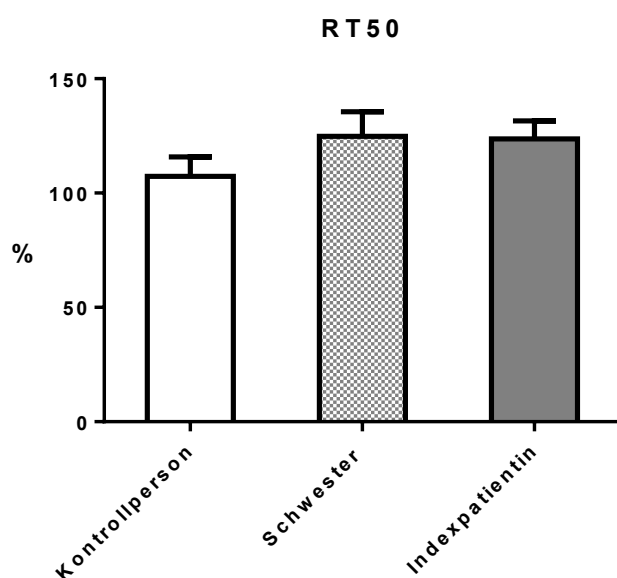


**Abbildung 3-12.** Die prozentualen Verhältnisse von nukleären zu cytosolischen TTP-Werten unstimuliert erhaltener Kalziumtransienten.

Bei der Gegenüberstellung der nukleären zu cytosolischen Verhältniswerte fand sich kein signifikanter Unterschied unter den drei Zellgruppen, auch wenn die Werte der Zellen der Schwester den Trend einer leichten Erhöhung bzw. die der Indexpatientin eine leichte Verminderung zeigten.

(Kontrollperson: n=60; Schwester: n=44; Indexpatientin: n=68).

Bei den prozentualen Verhältnissen der RT50-Werte von Nukleus zu Cytosol fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Die Werte der drei Zellgruppen wiesen mit  $123,7 \pm 7,90$  im Mittel (Indexpatientin:  $n=77$ ),  $124,8 \pm 10,70$  (Schwester:  $n=41$ ) und  $107,3 \pm 8,52$  (Kontrollperson:  $n=56$ ) ähnliche Werte auf, wenn auch sich bei den beiden Zellgruppen mit Mutation eine gewisse Tendenz zur Erhöhung abzeichnete (siehe Abbildung 3-13).

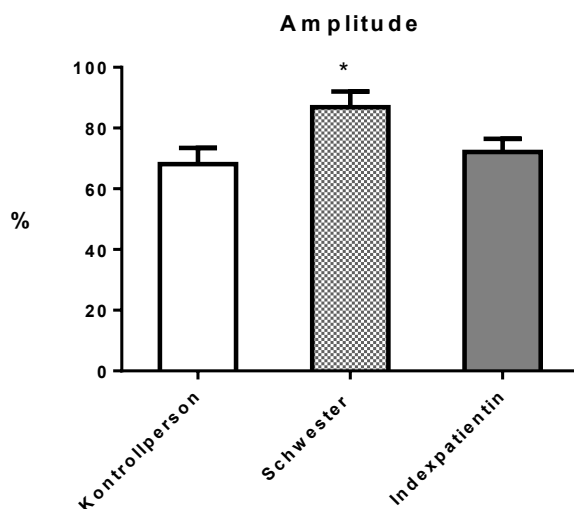


**Abbildung 3-13.** Die prozentualen Verhältnisse von nukleären zu cytosolischen RT50-Werten unstimuliert erhaltener Kalziumtransienten.

Die Analyse der jeweiligen prozentualen Verhältnisse ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede. (Kontrollperson:  $n=56$ ; Schwester:  $n=41$ ; Indexpatientin:  $n=77$ ).

### 3.7 Nukleär-cytosolisch prozentuale Werte der Kalziumtransienten von 0,5 Hz-stimulierten induzierten Kardiomyozyten

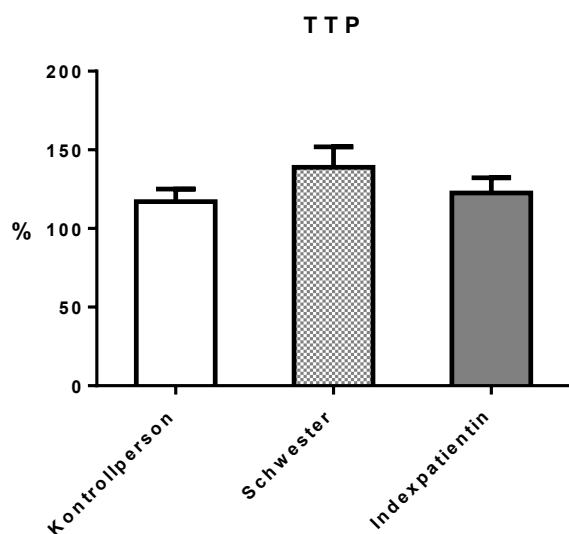
Die Abstufung der cytosolischen Amplituden von den Zellen der Kontrollperson über die der Schwester auf die der Indexpatientin (Kapitel 3.4) erwies sich bei der Betrachtung der prozentualen Verhältnisse der nukleären zu cytosolischen Amplituden als aufgehoben. Es zeigte sich hier eine signifikante Erhöhung des Verhältnisquotienten der Kardiomyozyten der Schwester (n=39) mit  $86,9 \pm 5,513$  im Mittel gegenüber der Kontrollperson (n=32) mit  $68,16 \pm 5,34$ , während sich dieser von der Indexpatientin (n=43) mit  $72,09 \pm 4,38$  im Mittel nicht signifikant unterschied. Dies ist darauf zurück zu führen, dass der Anteil der nukleären Amplituden der Zellen der Indexpatientin im gleichen Maß kleiner war wie bei denen der Kontrollperson, sodass sich der Quotient nicht änderte. Im Gegensatz dazu war dies bei den PKP2-3-21-Zellen nicht der Fall, wodurch sich der Quotient erhöhte (siehe Abbildung 3-14).



**Abbildung 3-14.** Prozentuale Verhältnisse von nukleären zu cytosolischen Amplitudenwerten von 0,5 Hz-stimuliert erhaltenen Kalziumtransienten.

Die prozentualen Verhältnisse der Zellen der Schwester gegenüber denen der Kontrollperson stellten sich erhöht dar, während bei denen der Indexpatientin kein signifikanter Unterschied erkennbar war. (Kontrollperson: n=32; Schwester: n=39; Indexpatientin: n=43; statistisches Signifikanzniveau: \* d.h.  $p < 0,05$ ).

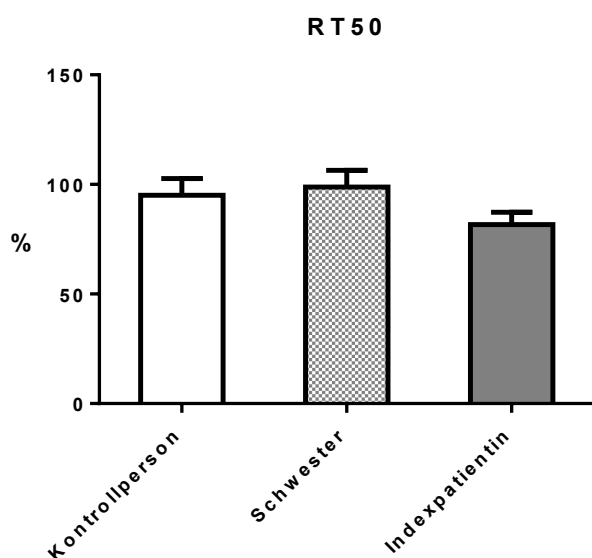
Bei den prozentualen Verhältnissen der TTP-Werte erwies sich die Erhöhung der Zellen der Schwester und der Indexpatientin in Bezug auf die Kontrollperson als nicht signifikant, diese schien lediglich schwach angedeutet (siehe Abbildung 3-15). Hier lagen die Werte im Mittel bei  $117,20 \pm 7,97$  (Kontrollperson:  $n=32$ ),  $138,8 \pm 13,11$  (Schwester:  $n=36$ ) und  $122,7 \pm 9,55$  (Indexpatientin:  $n=44$ ).



**Abbildung 3-15.** Prozentuale Verhältnisse von nukleären zu cytosolischen TTP-Werten von 0,5 Hz-stimuliert erhaltenen Kalziumtransienten.

Bei den prozentualen Verhältnissen unterschieden sich die drei Zelllinien in ihren Werten nicht signifikant, auch wenn sich eine dezente Erhöhung der Zellen der Schwester und der Indexpatientin abzeichnete. (Kontrollperson:  $n=32$ ; Schwester:  $n=36$ ; Indexpatientin:  $n=44$ ).

Die prozentuale Analyse der RT50-Werte (siehe Abbildung 3-16) ergab keine signifikanten Unterschiede. Lediglich bei den Zellen der Indexpatientin zeichnete sich die geringfügige Tendenz einer Verminderung ab. Hier war der Wert im Mittel bei  $81,69 \pm 5,64$  ( $n=41$ ), bei den Zellen der Kontrollperson betrug er  $95,05 \pm 7,69$  ( $n=31$ ) und bei den Zellen der Schwester  $98,77 \pm 7,61$  ( $n=34$ ).



**Abbildung 3-16.** Prozentuale Verhältnisse von nukleären zu cytosolischen RT50-Werten von 0,5 Hz-stimuliert erhaltenen Kalziumtransienten.

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede bei der prozentualen Analyse der RT50-Werte.

(Kontrollperson:  $n=31$ ; Schwester:  $n=34$ ; Indexpatientin:  $n=41$ ).

## 4 Diskussion

Mit der vorliegenden Promotionsarbeit werden erstmals funktionelle, zelluläre Daten zum Kalziumhaushalt in aus induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleiteten Kardiomyozyten (iPSC-KM) von einer symptomatischen ARVC-Patientin und einer asymptomatischen Mutationsträgerin im Vergleich mit einer Kontrollperson präsentiert. Nach erfolgreicher Generierung der iPSC-KM zeigt sich, dass Zellen von den Mutationsträgern einen gestörten Kalziumstoffwechsel, beeinträchtigte elektromechanische Kopplung und eine erhöhte Arrhythmogenität aufweisen. Eine große Besonderheit ist hier auch, dass eine Gegenüberstellung der Daten von zwei Mutationsträgern möglich wird, von denen nur eine Mutationsträgerin klinische Symptome aufwies. In den Daten konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die Kardiomyozyten der asymptomatischen Mutationsträgerin ebenfalls eine beeinträchtigte elektromechanische Kopplung und erhöhte Arrhythmogenität zeigten, aber in geringerem Ausmaß als die symptomatische Mutationsträgerin. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen funktionale Veränderungen im Kalzium-Haushalt von patientenspezifischen Kardiomyozyten, welche erstmals detaillierte Hinweise für die Prognostik von Mutationsträgern aufdecken und somit zum Verständnis der Arrhythmogenese der ARVC beitragen.



## 4.1 Die Kinetik und Frequenz der Kalziumtransienten ohne elektrische Stimulation

### 4.1.1 Spontane Kalziumtransienten im Cytosol

Die Eigenfrequenz der Kardiomyozyten der Indexpatientin war beim Vergleich der absoluten Mittelwerte mit der Kontrolle vervierfacht und damit hochsignifikant erhöht. Auch die Frequenz der Kardiomyozyten der asymptomatischen Schwester erwies sich als signifikant erhöht. Die erhöhte Eigenfrequenz könnte ein Zeichen von Herzinsuffizienz sein, da diese oftmals mit einer erhöhten Herzfrequenz assoziiert ist (107). Äußerst interessant ist der deutliche Unterschied der Eigenfrequenzen zwischen den Kardiomyozyten der beiden Mutationsträgerinnen, denn die Mittelwerte der Indexpatientin waren mehr als verdoppelt im Vergleich zur asymptomatischen Schwester. Die Kardiomyozyten der Indexpatientin scheinen eine vergleichsweise starke elektrische Instabilität aufzuweisen, die möglicherweise auch eine erhöhte Arrhythmogenität begünstigt. Bisher unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe bewiesen diese elektrische Instabilität auch durch Messungen des Ruhemembranpotenzials (resting membrane potential bzw. RMP) der Zellen. Es stellten sich die Werte der Indexpatientin als signifikant erhöht dar, die der Schwester hingegen waren nicht erhöht (siehe Anhang 6.3). Die Unterschiede der Frequenzen sind graduell. Bei der Schwester findet sich eine leichte Erhöhung, bei der Indexpatientin eine starke Erhöhung, wobei die Schwester keine klinischen Symptome zeigt. Daher wird vermutet, dass neben der zugrundeliegenden Mutation noch weitere Faktoren zur Arrhythmogenese beitragen.

Neben der Höhe der Eigenfrequenzen wurde dabei auch die Kalziumkinetik analysiert. Da die Eigenfrequenzen zwischen den Zelllinien eine hohe Variabilität präsentierten, ist eine vergleichende Beurteilung der Parameter deutlich erschwert. Es wurden deswegen nicht nur die Mittelwerte verglichen, sondern auch die Slopes der Regressionen und etwaige Korrelationen zur jeweiligen Eigenfrequenz überprüft. Denn eine erhöhte Anzahl an Kalziumtransienten pro Zeit erfordert Anpassungen z. B. in Form von schnellerer Kalziumfreisetzung und Kalziumelimination. So zeigte sich bei den Zelllinien der beiden Mutationsträgerinnen eine signifikant schnellere Kalziumelimination. Bei diesen beiden Zelllinien fand sich auch eine signifikante Korrelation zwischen Kalziumabfall und Eigenfrequenz und kein signifikanter

Unterschied im Slope. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass der vermeintlich schnellere Kalziumabfall hauptsächlich ein frequenzabhängiger Effekt ist. Die Kardiomyozyten der beiden Mutationsträgerinnen erzielen durch einen schnelleren Kalziumabfall eine physiologische Anpassung an höhere Frequenzen.

Bei der Kalziumfreisetzung hingegen, welche im Vergleich zur Kalziumelimination den geringeren Anteil an der Transientendauer hat, zeigt sich bei den Kardiomyozyten der asymptotischen Mutationsträgerin eine signifikante Korrelation, bei der symptomatischen Mutationsträgerin fehlt diese jedoch. Obwohl die Kardiomyozyten der Indexpatientin im Vergleich zur Kontrolle und zur Schwester die größte Frequenzvariabilität aufweisen, scheint diesen bei einer schnelleren Frequenz, wie sie auch z.B. bei Sport auftritt, keine adäquate Anpassung zu gelingen. Dies stellt möglicherweise einen weiteren Hinweis auf eine erhöhte Arrhythmogenität dar und ist stimmig mit der Klinik der Indexpatientin, welche lebensbedrohliche Arrhythmien bei der Ausübung von Leistungssport erlebte. Im Gegensatz dazu blieb die Schwester der Indexpatientin trotz derselben Mutation asymptotisch. Den Kardiomyozyten der Schwester scheint eine Art bessere Anpassungsfähigkeit gegeben, diese Tatsache ist vermutlich ein weiteres Anzeichen auf einen zusätzlichen Faktor bei der Arrhythmogenese. Dennoch ist hinsichtlich der Mittelwerte der vermeintlich schnellere Kalziumaufstrich der Kardiomyozyten beider Mutationsträgerinnen möglicherweise ein frequenzabhängiger Effekt, da sich die Slopes der Regressionen nicht signifikant unterscheiden.

Bei der Untersuchung der Amplituden der spontanen Kalziumtransienten kann im Vergleich zwischen den Zelllinien der Kontrollperson und der Indexpatientin davon ausgegangen werden, dass diese unverändert sind, denn es fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz dazu erwiesen sich die Mittelwerte der Kardiomyozyten der Schwester im Vergleich mit der Kontrollperson als signifikant erhöht. Auch wenn keine signifikante Korrelation mit der Frequenz vorhanden war, ist es möglicherweise dennoch ein frequenzabhängiger Effekt, da sich die Slopes der Regressionen nicht signifikant unterscheiden. Allem Anschein der verfügbaren statistischen Mittel nach kann bei spontanen Kalziumtransienten vermutlich von unveränderten Amplituden der Kardiomyozyten zwischen den drei Zelllinien ausgegangen werden.

Zusammenfassend kann zur Auswertung der spontan erhaltenen Kalziumtransienten neben weitestgehend fehlenden Unterschieden hinsichtlich der Amplituden und frequenzbedingten Unterschieden hinsichtlich der Kalziumelimination im Hinblick auf den Kalziumaufstrich festgehalten werden, dass die Indexpatientin wohl eine geringere Anpassungsfähigkeit an höhere Frequenzen aufweist. Grundsätzlich gilt allerdings bei der Analyse der spontanen Kalziumtransienten nochmals zu betonen, dass die Aussagekraft der vergleichenden Beurteilung über die Kalziumkinetik deutlich eingeschränkt ist. Die Bedingungen eines Vergleichs sind dadurch, dass die Kardiomyozyten in ihrer jeweiligen „Wohlfühl-Frequenz“ kontrahieren, und aufgrund der hohen Frequenzvariabilität zwischen den Zelllinien sehr unterschiedlich. Nichtsdestotrotz war die wissenschaftliche Untersuchung dessen von Interesse.

#### 4.1.2 SR-Kalzium-Gehalt

Eine wichtige Information zur Interpretation der Kalziumkinetik stellt außerdem der SR-Kalzium-Gehalt dar. Die Ergebnisse zwischen den drei Zelllinien zum Kalziumgehalt des SRs ergaben keine signifikanten Unterschiede. Der unveränderte Kalzium-Gehalt im SR deutet analog zu den Kalziumtransienten darauf hin, dass die Zellen sich im steady state befinden und somit weder Kalzium akkumulieren noch Kalzium verlieren. Dennoch gilt es die Ergebnisse aufgrund der Postpausenpotenzierung (post rest potentiation) bzw. dessen Umkehr (post rest decay) mit Vorsicht einzuschätzen. Das speziesabhängige Phänomen der Postpausenpotenzierung, das z.B. bei gesunden menschlichen Kardiomyozyten zu beobachten ist, beschreibt die Zunahme der Kontraktionskraftamplitude des ersten Schlags, sobald nach einer Stimulationspause die Stimulation wieder einsetzt. Es kommt dabei zu einer erhöhten Kalziumausschüttung aus dem SR, da während der Stimulationspause Kalziumionen durch den weiterarbeitenden NCX nach intrazellulär befördert werden und in das SR aufgenommen werden. Bei der Umkehr der Postpausenpotenzierung, wie sie z. B. bei menschlicher Herzinsuffizienz auftritt, kommt es zu einer verminderten Amplitude beim ersten Schlag nach einer Stimulationspause, vermutlich infolge einer SR-Kalziumentleerung während dieser Pause (108). Die Berücksichtigung dieser Phänomene der Postpausenpotenzierung und seiner Umkehr (post rest potentiation bzw. decay) sollte deswegen in Betracht gezogen werden, da die Messungen ohne Stimulation durchgeführt wurden und aufgrund der oft sehr langsamen

Eigenfrequenzen der Kardiomyozyten vor der Koffeinapplikation bis zu wenigen Sekunden lang keine Kontraktion der Kardiomyozyten erfolgte. Langsame Eigenfrequenzen zeigten sich vor allem bei den Kardiomyozyten der Kontrollperson, als gesunde menschliche Zellen unter Einfluss einer möglichen Postpausenpotenzierung könnten dabei z.B. falsch erhöhte Werte entstehen.

Allerdings zeigten sich in vorläufigen Daten der Arbeitsgruppe auch bei den Messungen der induzierten Kardiomyozyten mit Stimulation (0,5 Hz) keine Unterschiede zwischen den drei Zelllinien. Diese Daten sind konsistent zu einem Experiment von Cerrone et al. von 2017 (77). Dabei wurde an 1-Hz-vorstimulierten Mäusekardiomyozyten mit PKP2-Knockout ebenfalls über Koffeinmessungen der SR-Kalziumgehalt untersucht. Im Vergleich mit der Kontrolle konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. In Summe der vorliegenden Ergebnisse kann daher bei den Kardiomyozyten aller drei Linien von unverändertem SR-Kalzium-Gehalt ausgegangen werden.

#### 4.2 Die erhöhte Arrhythmieneigung bei PKP2-Mutation unter erhöhter Stimulationsfrequenz

In der Tat zeigten die Zellen der Indexpatientin eine erhöhte Arrhythmieneigung. Die Stimulationsfrequenz von 1 Hz, mit der die Arrhythmieneigung getestet wurde, war deutlich höher als die spontane Frequenz, aber in einem Bereich, in dem zumindest ein Teil der Zellen die Frequenz korrekt umsetzen konnte (109). Nachdem die höchsten gemessenen Eigenfrequenzen der Kardiomyozyten ca. 0,3 Hz betragen, wurde die Stimulationsfrequenz dieses Experiments auf 1 Hz festgelegt. Bei dieser Frequenz können auch in gesunden Zellen bei einem geringen Teil der Zellen arrhythmogenes Verhalten ausgelöst werden. Die Beobachtung der Arrhythmieneigung auf zellulärer Ebene anhand von Kalziumtransienten ist von besonderem Interesse, da ein wichtiges Charakteristikum der ARVC maligne Arrhythmien sind, deren Entstehung nach wie vor nicht vollständig geklärt sind. Selbst für junge, scheinbar gesunde Patienten besteht im Anfangsstadium einer ARVC, in dem noch keine oder kaum strukturelle Veränderungen erkennbar sind, das Risiko lebensbedrohlicher ventrikulärer Arrhythmien (8,13,24). Zudem ist das Auftreten von Symptomen und einem plötzlichen Herztod bei ARVC mit körperlicher Anstrengung und Sport assoziiert (7,8,13,44,45). Für die aus iPSC differenzierten Kardiomyozyten soll die erhöhte Stimulationsfrequenz von 1 Hz damit einen erhöhten Bedarf - wie er unter körperlicher Anstrengung auftritt – simulieren.

##### 4.2.1 Arrhythmogenes Verhalten der cytosolischen Transienten

Bei erhöhter Stimulationsfrequenz war das Auftreten von arrhythmogenem Verhalten bei beiden Mutationsträgerinnen erhöht. Die Rate an arrhythmogenem Verhalten im Cytosol zeigte bei den Kardiomyozyten der asymptomatischen Mutationsträgerin eine eher geringfügige Erhöhung von 6 %. Demgegenüber steht die klare Erhöhung von 15 % bei den Kardiomyozyten der Indexpatientin. Diese Ergebnisse spiegeln sich in der erhöhten Eigenfrequenz wider, was auf eine elektrische Instabilität schließen lässt, die das vermehrt arrhythmogene Verhalten der Kardiomyozyten unter erhöhter Stimulationsfrequenz begünstigen könnte. Tatsächlich haben unveröffentlichte

Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe ein erhöhtes Ruhemembranpotential in den Zellen der Indexpatientin nachgewiesen (siehe Anhang 6.3).

Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit dem klinischen Erscheinungsbild der beiden Probandinnen, da sich trotz derselben zugrundeliegenden Mutation im PKP2 die Schwester der Indexpatientin als weitestgehend asymptomatisch präsentiert, während bei der Indexpatientin die ARVC symptomhaft wurde und sie einen plötzlichen Herztod erlebte. Daraus schließen wir, dass abgesehen von der PKP2-Mutation weitere Veränderungen und Mechanismen für die Manifestation einer ARVC vorhanden sein müssen.

#### 4.2.2 Arrhythmogenes Verhalten im Zellkern

Ljubojevic et al. erkannten, dass Veränderungen an nukleären Kalziumtransienten in einem früheren Erkrankungsstadium auftreten als bei cytoplasmatischen Kalziumtransienten und sie somit frühe Anzeichen für proarrhythmische Veränderungen sein können (91,94). Es wurde dabei das Krankheitsmodell der transversalen Aortenkonstriktion (TAC) an Mäusen sowie eine kombinierte Aorteninsuffizienz und – Stenose an Hasen verwendet. Aus diesem Grund wurde auch hier die Arrhythmieeigung in den Zellkernen überprüft. Es war festzustellen, dass in jeder der drei Kardiomyozyten-Linien der Anteil an Arrhythmien im Kern im Vergleich zum Cytoplasma überwog, dass Arrhythmien also früher auftraten. Der Arrhythmieanteil im Zellkern der Kardiomyozyten der Indexpatientin aber war am deutlichsten erhöht, bei der Kontrolle und der asymptomatischen Mutationsträgerin nahezu gleich. Wie vermutet zeigten die Kardiomyozyten der Indexpatientin die meisten Arrhythmien.

Die Kardiomyozyten der Indexpatientin erscheinen - wie es bei einer Herzinsuffizienz oft der Fall ist - gegenüber dem Stress einer erhöhten Stimulationsfrequenz weniger widerstandsfähig als die Kardiomyozyten der Schwester der Indexpatientin und der Kontrolle. Das könnte bedeuten, dass den Zellen der asymptomatischen Mutationsträgerin neben der PKP2-Mutation eine Veränderung zu einem vermehrt arrhythmogenen Verhalten fehlt, oder dass sie von einem oder mehreren protektiven Faktor(en) profitieren.

Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten am Tiermodell Zusammenhänge zwischen vermindertem PKP2 und einer verlangsamten Weiterleitung des Aktionspotentials aufgrund einer verschlechterten elektrischen Kopplung (gap-junction-Remodeling, siehe Kapitel 1.2.1) und einem verminderten Natriumstrom (siehe Kapitel 1.2.2), was zu einer Neigung von frequenzabhängigen Arrhythmien führen kann (49,51,62,63). Wir konnten nun am Modell der aus iPSC differenzierten Kardiomyozyten die Assoziation zwischen vermindertem PKP2 und einer damit verbundenen erhöhten Neigung für Arrhythmien bei erhöhter Stimulationsfrequenz bestätigen. Welche Mechanismen dafür vornehmlich ursächlich sind, kann durch die Kalziummessungen dieser Promotionsarbeit allein nicht aufgeklärt werden. Allerdings wurde in weiteren Daten aus der Arbeitsgruppe festgestellt, dass bei Kardiomyozyten mit PKP2-Mutation zum einen die interzelluläre Kommunikation reduziert ist, zum anderen aber auch elektrophysiologische Pathologien, wie z.B. die Verlängerung des Aktionspotentials, vorliegen. Demzufolge kommen als proarrhythmogene Mechanismen sowohl getriggerte Aktivität, als auch Reentry-Arrhythmien in Frage (63,109–111).

Der erhöhte Anteil an Arrhythmien im Zellkern in den Zellen der symptomatischen Mutationsträgerin stellt daher möglicherweise auf zellulärer Ebene ein Anzeichen auf Herzinsuffizienz und erhöhter Arrhythmie neigung dar.

### 4.3 *Der nukleäre Kalziumhaushalt in induzierten Kardiomyozyten mit PKP2-Mutation*

#### 4.3.1 Bedeutung und Kinetik von nukleärem Kalzium

Neben seiner Bedeutung im Cytosol hat Kalzium auch wichtige Funktionen im Zellkern. Es ist in Kardiomyozyten nicht nur ein essentiell wichtiger second messenger für die elektromechanische Kopplung, sondern auch für die Erregungs-Transkriptions-Kopplung. Dieser Begriff bezeichnet Mechanismen zwischen der Erregung von Kardiomyozyten und infolgedessen einer Regulation der Transkription, z.B. über eine Aktivierung von Kalzium-abhängigen Transkriptionsfaktoren. Viele Vorgänge sind dabei zwar noch unverstanden, doch es besteht Evidenz dafür, dass das nukleäre Kalzium in Kardiomyozyten auf diese Weise viele Schlüsselprozesse wie Genexpression, Apoptose und nukleocytoplasmatischen Transport reguliert (92). Beim nukleären Kalziumstoffwechsel verhält sich der Zellkern als autonomes, subzelluläres Kompartiment, das sich durch die Kernmembran abgrenzt, aber über Kernporen mit dem Cytosol in permanenter Verbindung steht. Mittels passiver Diffusion bewirkt daher jeder cytosolische Kalziumtransient auch einen nukleären Kalziumtransienten. Ein nukleärer Kalziumtransient entsteht aber nicht ausschließlich durch passive Diffusion aus dem Cytosol, sondern die Kernmembran selbst ist auch in der Lage Kalzium in das Nukleoplasma freizusetzen. Die Kernmembran, die ähnlich wie das SR zahlreiche Einstülpungen bildet, funktioniert nicht nur als Abgrenzung zum Cytosol, sondern auch als Kalziumreservoir. Nukleäre Kalziumtransienten unterscheiden sich von cytoplasmatischen durch eine höhere diastolische Konzentration, wobei diese immer von der cytosolischen abhängt, und einer verlangsamten Kinetik. Zum einen weisen nukleäre Kalziumtransienten einen verzögerten Aufstrich aufgrund der cytosolisch-nukleären Kalziumdiffusion auf, zum anderen einen verlängerten Abfall, da unter anderem die nukleär-cytosolische Kalziumdiffusion ein wichtiger Mechanismus für die Kalziumelimination aus dem Nukleoplasma darstellt (92).

Im vorliegenden Promotionsprojekt war das nukleäre Kalzium nun aus mehreren Gründen von Interesse. Cerrone et al. lieferten Hinweise, dass die PKP2-Mutation unter anderem über transkriptionelle Regulation Einfluss auf die Kalziumhomöostase in Kardiomyozyten nimmt (77). Außerdem ist der Einfluss von Kalzium auf die Regulierung der Transkription, auf funktionelle und strukturelle Remodelingprozesse



im Rahmen einer Herzinsuffizienz bereits bekannt (93,94). Für das Voranschreiten des pathologischen, kardialen Remodelings sind dabei zwei kalziumabhängige Signalwege besonders wichtig, der Kalzium-/Calmodulin-abhängige Calcineurin-NFAT-GATA4- Signalpfad und der Kalzium-/Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (CaMKII)-HDAC-MEF2-Signalpfad. Diese beiden Signalwege sind an der Transkriptionsregulation vieler kardialer Gene beteiligt und stehen mit kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz in Verbindung (112–117).

Wie bereits erwähnt konnte Ljubojevic et al. am Tiermodell zu Herzinsuffizienz zeigen, dass an nukleären Kalziumtransienten Veränderungen auftraten, bevor diese an cytoplasmatischen Kalziumtransienten erkennbar waren. Beispielsweise war in einem Frühstadium, in dem cytoplasmatische Kalziumtransienten noch keinerlei Veränderungen aufwiesen, bereits die Amplitude von nukleären Kalziumtransienten vermindert (91). Da für das vorliegende Promotionsprojekt nun die induzierten Kardiomyozyten einer symptomzeigenden und einer asymptomatischen Mutationsträgerin verfügbar waren, bot sich durch diesen seltenen Vergleich die Möglichkeit zu überprüfen, inwieweit sich hier nukleäre Kalziumtransienten der Indexpatientin verändert darstellen und ob auch die nukleären Kalziumtransienten der asymptomatischen Mutationsträgerin bereits Veränderungen aufweisen. Zudem sind zu nukleärem Kalzium in induzierten Kardiomyozyten bis dato fast keine funktionellen, zellulären Daten bekannt.

#### 4.3.2 Nukleäre Kalziumtransienten mit und ohne Stimulation

Aufgrund dessen, dass nukleäre Kalziumtransienten immer von cytosolischen beeinflusst sind, wurden die nukleär pro cytosolischen Quotienten gebildet, um isoliert nukleäre Veränderungen adäquat zu erkennen und darstellen zu können. Die Quotientenauswertung bei den unstimuliert erhaltenen Kalziumtransienten ergab bezüglich der Zeit des Kalziumaufstrichs und des Kalziumabfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen allen drei Zelllinien. Der Quotient der Amplitude hingegen war bei den Kardiomyozyten der asymptomatischen Mutationsträgerin unverändert, jedoch bei den Kardiomyozyten der Indexpatientin deutlich vermindert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Erkenntnissen von Ljubojevic, die im Herzinsuffizienzmodell schon im Frühstadium nukleär eine verminderte Amplitude nachweisen konnte. So könnte

die verminderte nukleäre Amplitude ebenfalls als ein Zeichen von Herzinsuffizienz gewertet werden. Doch es ist zu berücksichtigen, dass die intrinsische Frequenz der unstimuliert erhaltenen Kalziumtransienten zwischen den Kardiomyozytenlinien eine große Bandbreite aufwies, während die Messungen von Ljubojevic unter einheitlicher elektrischer Stimulation vorgenommen wurden (91). Daher ist bei der verminderten nukleären Amplitude eher von frequenzabhängigen Effekten auszugehen.

Die nukleären Kalziumtransienten unter 0,5 Hz-Stimulation der drei Kardiomyozytenlinien unterschieden sich - mit einer Ausnahme – nicht voneinander. Dies überrascht etwas, da die Unterschiede zwischen den Kardiomyozytenlinien in der cytosolischen Kinetik des Kalziumstoffwechsels und in der cytosolischen wie auch nukleären Arrhythmogenität teilweise sehr eindrücklich waren. Der nukleäre Kalziumstoffwechsel wirkt in diesem Fall einigermmaßen unbeeinträchtigt.

Die eine Ausnahme zeigt einen Unterschied in der nukleären Amplitude bei den Kardiomyozyten zwischen der asymptomatischen Mutationsträgerin und der Kontrolle, denn diese ist interessanterweise erhöht. Es ist vermutlich auch nicht als früher Hinweis auf eine Herzinsuffizienz zu werten, da hierfür eher eine verminderte Amplitude zu erwarten wäre, und da bei den stimulierten Kardiomyozyten der Indexpatientin, bei denen am ehesten mit Zeichen einer Herzinsuffizienz zu rechnen wäre, keinerlei nukleäre Veränderungen auftraten. Möglicherweise zeigt diese erhöhte nukleäre Amplitude in den stimulierten induzierten Kardiomyozyten der asymptomatischen Mutationsträgerin einen protektiven Mechanismus. So ist denkbar, dass beispielsweise aufgrund einer zusätzlichen, schützend wirkenden Genmutation über die eigenen Kalziumfreisetzungsmechanismen der Kernmembran eine Erhöhung der Kalziumkonzentration im Nukleoplasma erreicht wird. Dadurch könnte über kalziumabhängige Signalwege, wie z.B. der Kalzium-/CaM-abhängige CN- NFAT-GATA4- Signalpfad und der CaMKII- HDAC- MEF2- Signalpfad, die Genexpression vorteilhaft reguliert werden (118–121).

In neueren Studien wurden auch Anhaltspunkte für epigenetische Pathomechanismen bei ARVC gefunden. Es ist bekannt, dass veränderte Expressionmuster von myocardialer microRNA (miR) an der Pathophysiologie einiger kardiovaskulärer Erkrankungen, wie z.B. Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt, Arrhythmien und Atherosklerose, beteiligt sind. Derartige Veränderungen konnten nun auch bei ARVC nachgewiesen werden. Im Rahmen dessen wurde gezeigt, dass insbesondere miR-

21-5p und miR135b bei ARVC-Patienten eine veränderte Expression zeigten. Diese beiden miR sind an den Wnt- und Hippo-Signalwegen beteiligt, die für die myokardiale Fibroadipogenese bei ARVC vornehmlich verantwortlich gemacht werden (43,70–72,122,123). In einer weiteren Studie wurde eine Assoziation zwischen zirkulierender miR-494 und dem erhöhten Auftreten von ventrikulären Arrhythmien nach Katheterablation bei ARVC-Patienten entdeckt (123). In weiterer Folge wäre es nun interessant, mögliche Zusammenhänge zwischen veränderten miRs und kalziumabhängigen Signalwegen zu untersuchen. Da miRs hochvariable Expressionsprofile aufweisen, könnte dies in Zusammenhang mit der großen Bandbreite an ARVC-Phänotypen stehen, falls sich die Involvierung von epigenetischen Mechanismen bei der Pathophysiologie von ARVC bei der aktuell eher dünnen Datenlage bestätigt.

Im Wesentlichen lassen sich aus der Untersuchung des nukleären Kalziumhaushaltes der induzierten Kardiomyozyten der asymptomatischen wie auch der symptomatischen Mutationsträgerin im Vergleich zur Kontrolle keine Hinweise auf frühzeitige Veränderungen oder höhergradige Beeinträchtigungen ableiten.

#### 4.4 *Der beeinträchtigte Kalziumhaushalt bei PKP2-Mutation*

Um den Kalziumhaushalt und die elektromechanische Kopplung auf zellulärer Ebene vergleichend beurteilen zu können, wurden Messungen bei der einheitlichen Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz vorgenommen. Diese Frequenz befand sich oberhalb der intrinsischen Frequenz der Kardiomyozyten von 0,3 Hz, sodass die applizierte Frequenz dominierte. Die Zellen waren in der Lage, jedem Stimulus mit einem Kalzium-Transienten zu folgen, ohne arrhythmogenes Verhalten zu zeigen. Auf diese Weise werden die verschiedenen Zelllinien besser vergleichbar und sozusagen die Schwächen der Messung spontaner Transienten durch die unterschiedliche Frequenz eliminiert.

##### 4.4.1 Die verlangsamte Kalziumfreisetzung im Cytosol

Die Dauer des cytosolischen Konzentrationsanstiegs von Kalzium infolge eines Aktionspotentials erwies sich in den Kardiomyozyten der Indexpatientin und der asymptomatischen Mutationsträgerin als deutlich verlängert. Dabei war der systolische Kalziumanstieg im Cytosol der Kardiomyozyten der Indexpatientin am stärksten verlangsamt. Ein verlängerter Kalziumeinstrom in Kardiomyozyten mit PKP2-Mutation konnte auch bereits am Mausmodell festgestellt werden (77).

Ein möglicher Erklärungsansatz wäre eine Störung der kalziuminduzierten Kalziumfreisetzung, beispielsweise ein beeinträchtigter Kalziumeinstrom über die L-Typ-Kalzium-Kanäle (LTCC) aufgrund einer verminderten Gesamtmenge oder einer Funktionseinschränkung. Es könnte aber genauso auch eine reduzierte Expression, Funktionstüchtigkeit oder Offenwahrscheinlichkeit der RyR vorliegen. Eine rasche Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration kann nur gelingen, wenn infolge des Kalziumeinstroms über die L-Typ-Kalziumkanäle im Diadischen Spalt eine ausreichend hohe Kalziumkonzentration erreicht wird und daraufhin mittels einer schnellen, geordneten Öffnung der RyR die Entleerung des SR erfolgt. Durch einen verminderten Kalziumeinstrom über die spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanäle oder eine unkoordinierte, verlangsamte Öffnung der RyR würde sich daher die Kalziumfreisetzung aus dem SR verzögern.

Ähnliche Ergebnisse erhielt die Arbeitsgruppe von Cerrone, in deren Kalziummessungen an Mäusekardiomyozyten mit PKP2-Knockout ebenfalls eine signifikante Verlängerung der Kalziumfreisetzung (TTP) und eine signifikant verminderte Expression von Cav1.2 gezeigt wurden. Cerrone et al. führen diese funktionelle Veränderung des Kalziumhaushalts und der Expression auf bisher unbekannte Mechanismen zurück, die über die PKP2-Mutation vermittelt Transkriptionsdefizite von Proteinen verursacht, welche besonders für den intrazellulären Kalziumstoffwechsel von Bedeutung sind, wie z.B. Cav1.2 (77). Entgegen den Vermutungen zeigten jedoch vorläufige Daten aus der Arbeitsgruppe, dass die Expression von Cav1.2 – der porenbildenden Untereinheit des L-Typ-Kalzium-Kanals – genauso wie die Expression der RyR in den induzierten Kardiomyozyten der Indexpatientin und der asymptomatischen Mutationsträgerin im Vergleich zur Kontrolle keine Unterschiede aufweist (124).

Eine weitere Erklärungsursache könnte ein erniedrigter diastolischer Kalziumgehalt im Cytosol sein, aufgrund dessen es länger dauert, bis die Konzentration an Kalzium entsprechend ansteigt. In den bereits erwähnten, vorläufigen Daten wurden Messungen zu dieser Fragestellung durchgeführt, in denen eine signifikante Erniedrigung des diastolischen Kalziums in den Kardiomyozyten der Indexpatientin ersichtlich war. Ein verringerter Kalziumgehalt im SR, der die Verzögerung des Kalziumaufstrichs bedingen könnte, konnte durch die Ergebnisse der Koffeinmessungen ausgeschlossen werden, da sich (siehe oben) keine signifikanten Veränderungen darstellten. Ebenfalls unveränderte Ergebnisse ergaben auch die vorläufigen Daten der Koffeinmessungen mit Stimulation der Arbeitsgruppe.

#### 4.4.2 Die erniedrigte Kalziumamplitude im Cytosol

Die Analyse der cytosolischen Kalziumtransienten ergab neben dem verlangsamten Aufstrich auch eine signifikant verminderte Amplitude bei den Kardiomyozyten der Indexpatientin. Interessanterweise erwies sich die Amplitude bei den Kardiomyozyten der Schwester nicht vermindert, was sich passend zu den fehlenden Symptomen darstellt. Eine verminderte Amplitude der Kalziumtransienten stellt ein wichtiges Zeichen einer verminderten Kontraktilität bei Herzinsuffizienz dar, wie sie im Verlauf einer ARVC auftritt (7,125–127). Ebenso wie den verlangsamten Kalziumaufstrich

könnte auch die verminderte Kalziumamplitude in den Kardiomyozyten der Indexpatientin durch eine Beeinträchtigung oder reduzierte Menge der Kalziumkanäle, RyR oder durch einen verminderten SR-Kalzium-Gehalt erklärt werden. Dieser erwies sich jedoch - wie zuvor erwähnt - in den Koffeinmessungen als unverändert, ebenso auch die Expression der RyR und der Kalziumkanäle laut den vorläufigen Daten der Arbeitsgruppe. Dennoch könnten Funktionsstörungen der Ionenkanäle ursächlich sein oder eine verminderte Offenwahrscheinlichkeit. In den vorläufigen Daten fiel allerdings ein stark erhöhtes Expressionslevel des NCX auf, als Austauschkanal von Calciumionen zu Natriumionen beeinflusst möglicherweise dieser die Kalziumströme.

#### 4.4.3 Die verlangsamte Kalziumelimination im Cytosol

Bei der Analyse der Kalziumtransienten war die RT50 in den Kardiomyozyten beider Mutationsträgerinnen im Vergleich zur Kontrolle verlangsamt. Dieser Parameter, der die Zeit widerspiegelt, die bis zum Erreichen von 50% des systolischen Maximums an Kalzium nötig ist, beschreibt die Funktionalität der Relaxation in Kardiomyozyten. Die beiden Hauptmechanismen der Kalziumelimination aus dem Cytosol in humanen Kardiomyozyten sind SERCA und NCX. Diese Beobachtung einer verminderten RT50 ist ein Merkmal humaner, höhergradiger Herzinsuffizienz und wird darauf zurückgeführt, dass dabei häufig eine verminderte Expression und/oder Funktion der SERCA vorliegt. Es gelingt in diesen Kardiomyozyten nicht, die aus dem SR freigesetzte Kalziummenge wieder zurück zu pumpen, sodass es zu einer Erhöhung des diastolischen Kalziums kommt, zu dessen Reduktion eine verstärkte Aktivität des sarkolemmalen NCX notwendig wird. Daher ist ein weiteres wichtiges Charakteristikum einer humanen Herzinsuffizienz eine hochregulierte Expression und Funktion des NCX (67,111,125–131).

Interessanterweise zeigten jedoch die vorläufigen Daten der Arbeitsgruppe des Promotionsprojekts eine signifikant erhöhte Expression des NCX in den Kardiomyozyten der Indexpatientin. Obwohl von der Kenntnis der Expression keine Rückschlüsse auf die Funktion möglich sind, könnte dies auch die in der Arbeitsgruppe beobachtete Verminderung des diastolischen Kalziums in den Kardiomyozyten der Indexpatientin erklären. Durch ein vermehrtes Vorkommen NCX besteht mehr Potential Kalzium nach extrazellulär zu befördern. Aber angenommen, den

Kardiomyozyten der Indexpatientin stünden mehr an funktionstüchtigem NCX zur Verfügung, dann müsste die Kalziumelimination effektiver und schneller ablaufen. Doch eben die Kardiomyozyten der Indexpatientin wiesen einen verlangsamten Kalziumabfall auf, genauso wie auch die Kardiomyozyten der asymptomatischen Mutationsträgerin. Und obwohl sich die Kalziumelimination in den Kardiomyozyten der asymptomatischen Mutationsträgerin genauso verlangsamt darstellte, ergaben die vorläufigen Daten der Arbeitsgruppe bei ihr überraschenderweise keine erhöhte Expression des NCX und auch keine Erhöhung des diastolischen Kalziums im Vergleich zur Kontrolle. Damit ergibt sich ein weiterer Hinweis auf zusätzliche Pathomechanismen neben der PKP2-Mutation, wie beispielsweise eine verminderte Funktionstüchtigkeit des NCX. Es wäre daher interessant die Funktionalität des NCX in den Kardiomyozyten der Indexpatientin zu untersuchen und inwieweit sich diese von der asymptomatischen Schwester unterscheidet.

## 5 Zusammenfassung

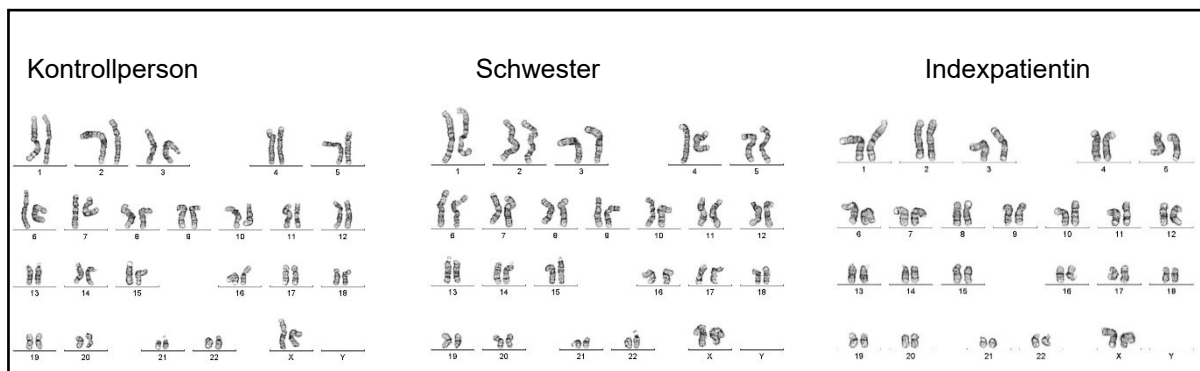
Im vorliegenden Promotionsprojekt wurde erstmals der cytosolische und nukleäre Kalziumhaushalt am Modell von patientenspezifischen, aus iPSC-induzierten Kardiomyozyten einer an ARVC-erkrankten PKP2-Mutationsträgerin, sowie einer asymptomatischen PKP2-Mutationsträgerin im Vergleich mit einer gesunden Kontrollperson ohne Mutation untersucht. Dies erfolgte mit dem Ziel, die bis dato nicht vollständig nachvollziehbare Pathogenese der ARVC weiter aufzuklären. In den Ergebnissen stellte sich heraus, dass die Kardiomyozyten der ARVC-Patientin komplexe Veränderungen aufweisen. Es zeigten sich eine gestörte elektromechanische Kopplung, eine auffällig stark erhöhte intrinsische Frequenz und eine deutlich erhöhte Neigung zu Arrhythmien. Da bei den Kardiomyozyten der asymptomatischen Mutationsträgerin ähnliche Veränderungen in deutlich abgeschwächter Form vorlagen, liegt der Verdacht nahe, dass das Vorliegen einer loss-of-function-PKP2-Mutation allein für diesen proarrhythmogenen Phänotyp nicht ursächlich sein kann. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Veränderungen im Kalziumhaushalt die Grundlage für proarrhythmogenes Verhalten darstellen, aber erst die Kombination mit weiteren mutationsbedingten Funktionseinschränkungen wie z.B. an den Connexinen und am spannungsgesteuerten Natriumkanal zum Vollbild einer ARVC mit schweren Arrhythmien führt. Zum ersten Mal wird hier der Vergleich zweier Mutationsträger mit unterschiedlicher Symptomausprägung gezeigt, wodurch wertvolle Erkenntnisse zur Arrhythmogenese gewonnen werden konnten.



## 6 Anhang

### 6.1 Karyotypisierung

Der Ausschluss chromosomaler Veränderungen während der Induktion der Pluripotenz wurde durch Karyotypisierungen jeder Zelllinie bewiesen.



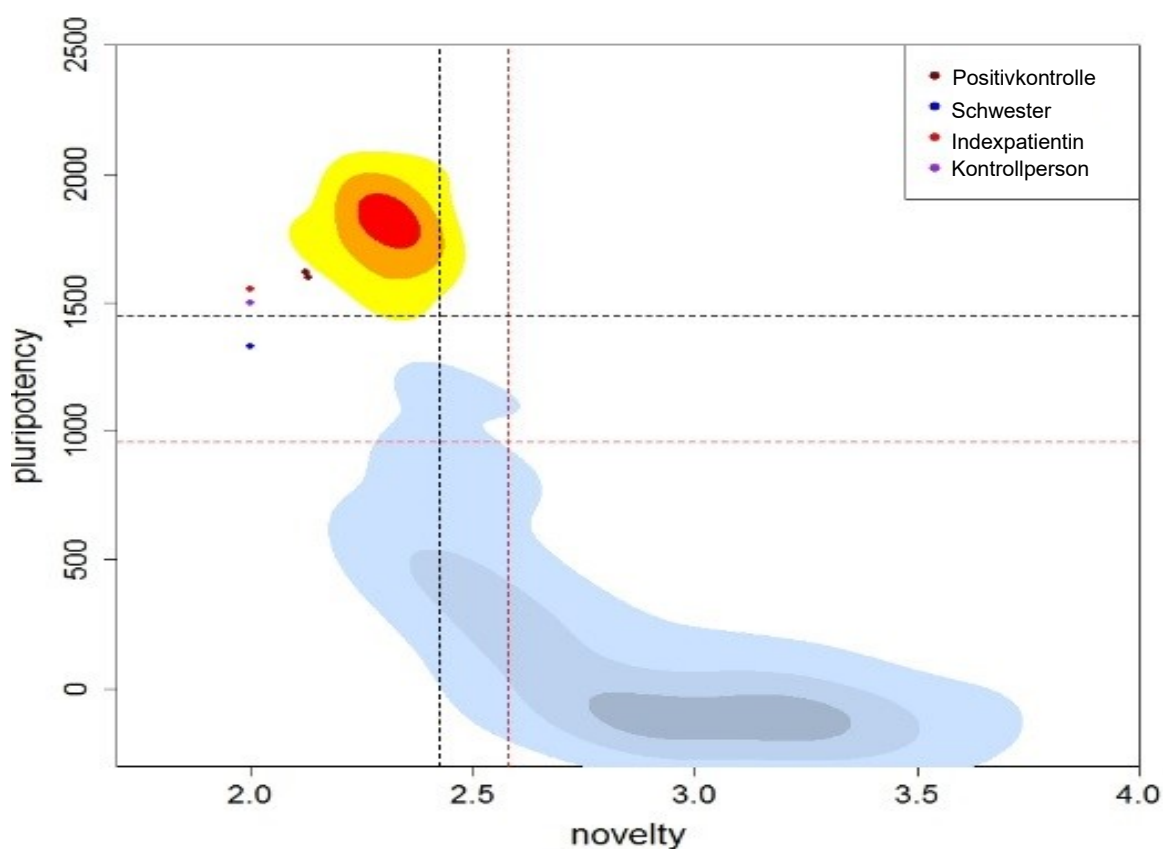
**Abbildung 6-1.** Karyotypisierung

Jede der drei iPSC-Linien wies der einen intakten Karyotyp auf. Für die Überprüfung wurden diese in Matrigel beschichteten Zellflaschen vorbereitet. Die Karyotypisierung erfolgte durch das Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Regensburg.

## 6.2 Pluripotenznachweise der iPSC

Der Erfolg der retroviralen Reprogrammierung zu iPSC wurde im Rahmen dieses Projekts bei allen drei Zelllinien mehrfach überprüft und bestätigt. Dazu wurden die Methoden NGS, FACS- und Immunfluoreszenzanalyse angewendet.

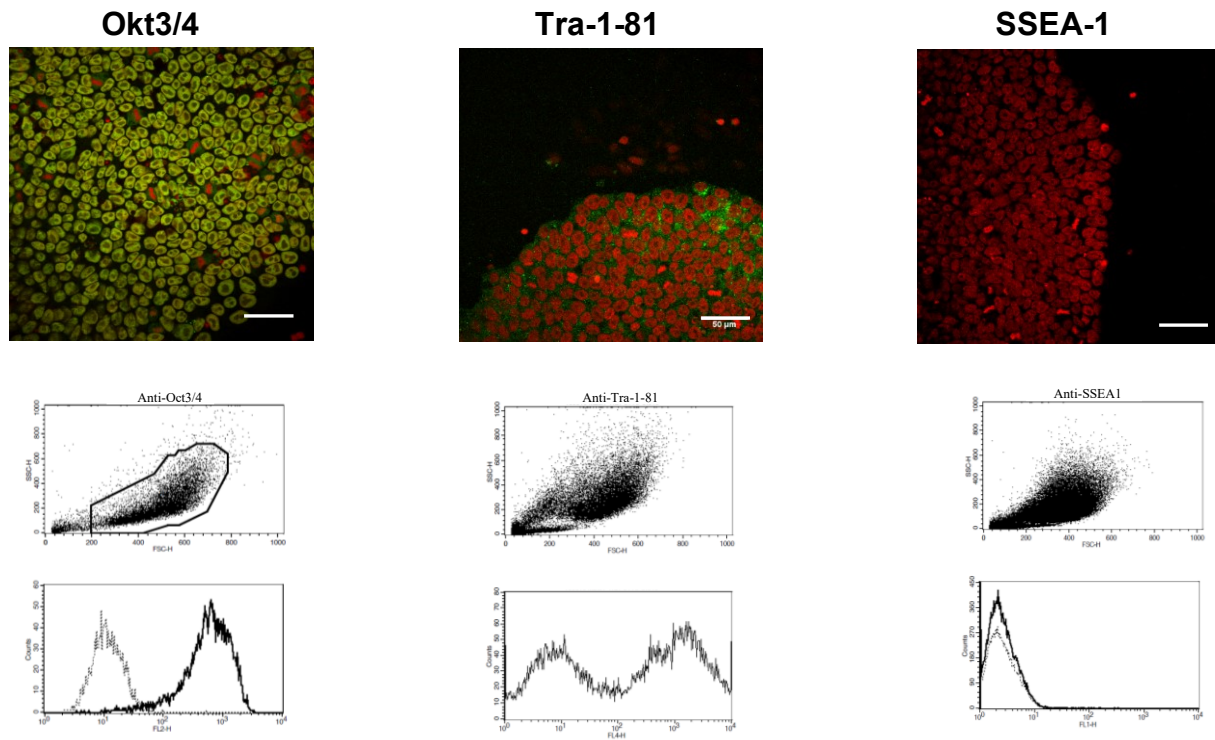
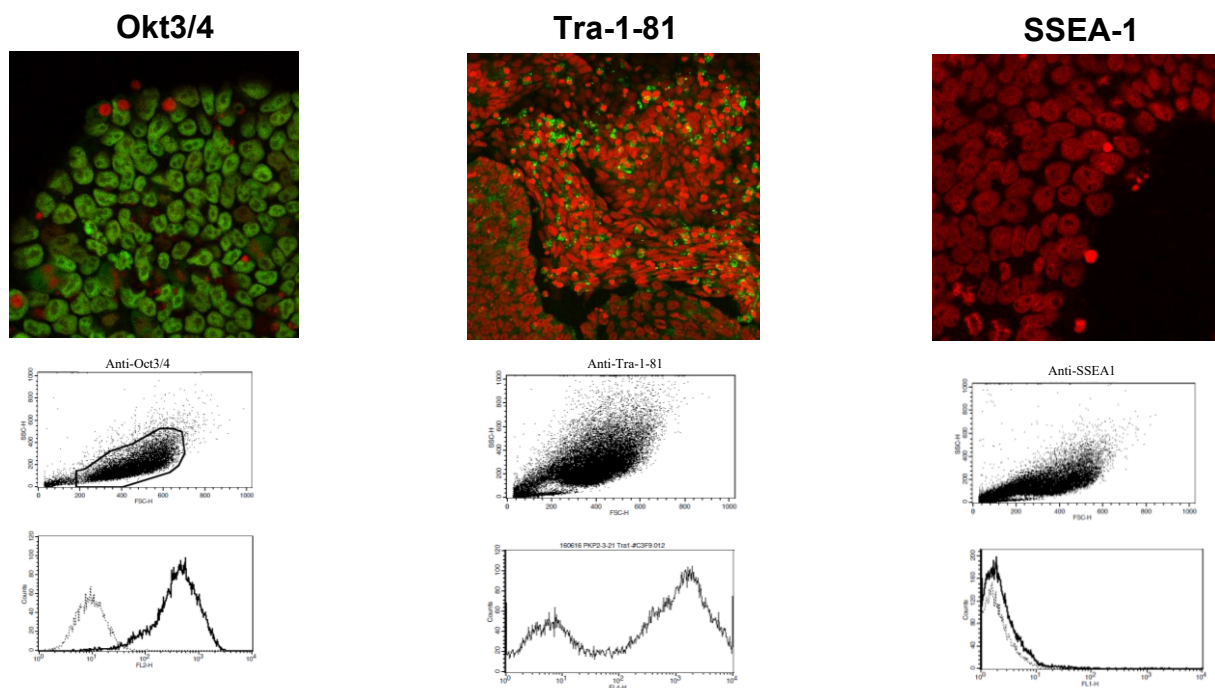
### 6.2.1 Next Generation Sequencing

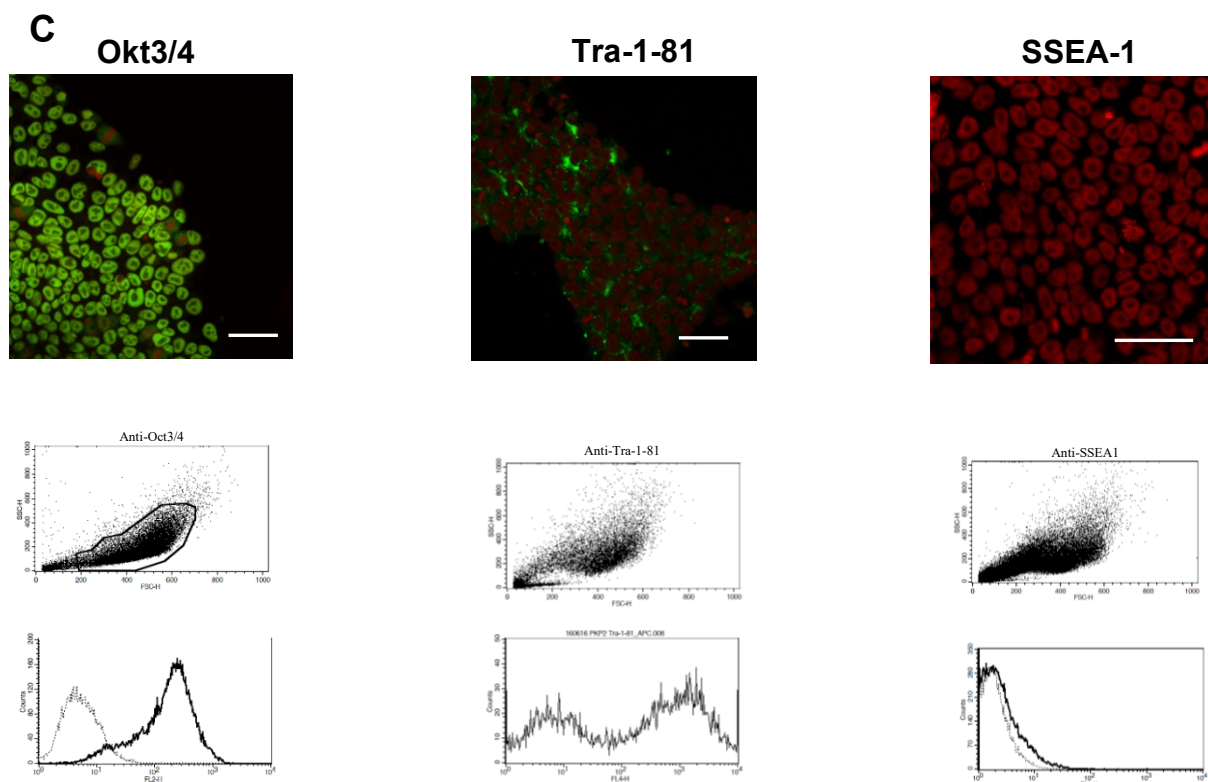


**Abbildung 6-2.** Next Generation Sequencing.

Die Pluripotenz der drei iPSC-Linien (Kontrollperson, Schwester, Indexpatientin) wurde mittels Next Generations Sequencing (NGS) getestet. Die Analyse des Testergebnisses in einer adaptierten Version des PluriTest® bestätigte die Pluripotenz (132,133). Alle drei Zelllinien befanden sich innerhalb der Grenzen der statistisch errechneten Schwellenwerte. Die Durchführung des NGS nahm das Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Regensburg vor.

## 6.2.2 FACS- und Immunfluoreszenz-Analyse

**A****B**

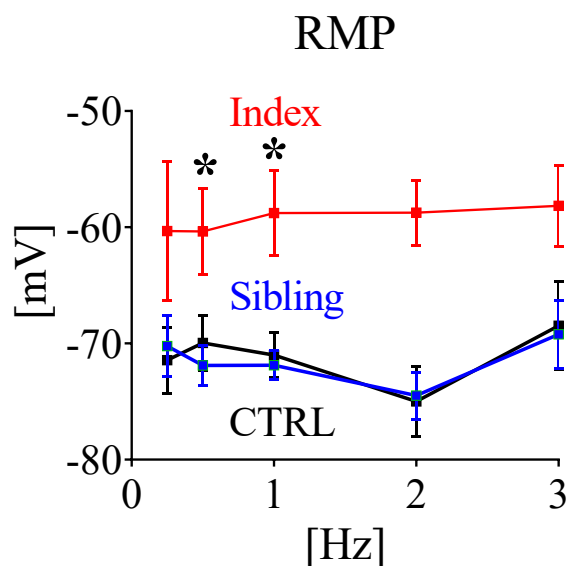


**Abbildung 6-3.** FACS- und Immunfluoreszenzanalyse.

Die in mit Matrigel beschichteten 6-well-Platten wachsenden iPSC wurden mit spezifischen Antikörpern zu den Pluripotenzmarkern Okt3/4 (grün) und Tra-1-81 (grün, mit roter Kernfärbung), sowie dem Differenzierungsmarker SSEA-1 (grün; mit roter Kernfärbung) markiert. Im Konfokalmikroskop analysiert zeigte sich, dass der Pluripotenzmarker Okt3/4 (grün) in allen drei Linien positiv und korrekt im Zellkern lokalisiert war, ebenso wie Tra-1-81 (grün) im Cytosol. Der negative Oberflächenmarker SSEA-1 (grün), der nur im Cytosol differenzierter Zellen vorkommt, war nicht nachweisbar. Für eine nachfolgende FACS-Analyse wurden dieselben Antikörper verwendet (Okt3/4 mit Isotypenkontrolle, Tra-1-81, SSEA-1 mit Isotypenkontrolle). Im Vergleich mit der Kontrolle stellte sich für Okt3/4 in allen drei Linien ein deutlich versetzter Gipfel dar. Auch Tra-1-81 war in allen drei Linien positiv, wohingegen sich der Gipfel des Oberflächenmarkers SSEA-1 komplett mit der Isotypenkontrolle überlagerte und damit ein negatives Ergebnis demonstrierte. So wurde für alle drei iPSC-Linien (A-C) Pluripotenz bestätigt.

### 6.3 RMP-Messung

Mittels der Patch-Clamp-Technik erfolgten Messungen des Ruhemembranpotenzials der Kardiomyozyten aller drei Linien. Es zeigte sich, dass es in den Zellen der Indexpatientin im Vergleich zur Kontrolle um 10 mV erhöht war, während sich das Ruhemembranpotenzial in den Zellen der Schwester von der Kontrolle nicht unterschied. Die Ergebnisse dessen sind dahingehend von Interesse, da die Funktion zahlreicher Ionenkanäle durch das Ruhemembranpotenzial maßgeblich beeinflusst wird.



**Abbildung 6-4.** RMP- Messung.

Messungen des Ruhepotenzials ergaben eine Erhöhung um 10mV in den Zellen der Indexpatientin (Index) gegenüber der Kontrolle (CTRL). Im Gegensatz dazu unterschied sich das Ruhepotenzial in den Zellen der asymptotischen Schwester (Sibling) nicht von dem in den Zellen der Kontrolle. (Index:  $p=0,0022$  bei 0,5 Hz und  $p=0,0236$  bei 1 Hz,  $n=11$ ; Kontrolle:  $n=21$ , Schwester:  $n=21$ ; one-way ANOVA)

## 7 Literaturverzeichnis

1. Nava A, Thiene G, Canciani B, Scognamiglio R, Daliento L, Buja G, Martini B, Stritoni P, Fasoli G. Familial occurrence of right ventricular dysplasia: A study involving nine families. *J Am Coll Cardiol*. 1988;12(5):1222–8. doi:10.1016/0735-1097(88)92603-4
2. McKenna WJ, Thiene G, Nava A, Fontaliran F, Blomstrom-Lundqvist C, Fontaine G, Camerini F. 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.
3. Jacob KA, Noorman M, Cox MGPJ, Groeneweg JA, Hauer RNW, van der Heyden MAG. Geographical distribution of plakophilin-2 mutation prevalence in patients with arrhythmogenic cardiomyopathy. *Neth Heart J*. 2012;20(5):234–9. doi:10.1007/s12471-012-0274-x
4. Domenico Corrado, MD, PhD, Gaetano Thiene MD. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: Clinical Impact of Molecular Genetic Studies. *Circulation*. 2006;113(13):1634–7. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.616490
5. Gemayel C, Pelliccia A, Thompson PD. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(7):1773–81.
6. Quarta G, Elliott PM. Diagnostic criteria for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2012;65(7):599–605. eng;spa. doi:10.1016/j.recesp.2012.02.016
7. Romero J, Mejia-Lopez E, Manrique C, Lucariello R. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy (ARVC/D): A Systematic Literature Review. *Clin Med Insights Cardiol*. 2013;797–114. eng. doi:10.4137/CMC.S10940
8. 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. doi:10.1056/NEJM198801213180301

9. Basso C, Corrado D, Bauce B, Thiene G. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2012;5(6):1233–46. doi:10.1161/CIRCEP.111.962035
10. Marcus FI, Fontaine GH, Guiraudon G, Frank R, Laurenceau JL, Malergue C, Grosgeat Y. Right ventricular dysplasia: a report of 24 adult cases. *Circulation*. 1982;65(2):384–98.
11. Sen-Chowdhry S, Morgan RD, Chambers JC, McKenna WJ. Arrhythmogenic cardiomyopathy: etiology, diagnosis, and treatment. *Annu Rev Med*. 2010;61:233–53. doi:10.1146/annurev.med.052208.130419
12. Corrado D, Fontaine G, Marcus FI, McKenna WJ, Nava A, Thiene G, Wichter T. Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy: Need for an International Registry. *Circulation*. 2000;101(11):e101-e106. doi:10.1161/01.CIR.101.11.e101
13. Dalal D, Nasir K, Bomma C, Prakasa K, Tandri H, Piccini J, Roguin A, Tichnell C, James C, Russell SD, Judge DP, Abraham T, Spevak PJ, Bluemke DA, Calkins H. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia: a United States experience. *Circulation*. 2005;112(25):3823–32. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.542266
14. Corrado D, Thiene G, Nava A, Rossi L, Pennelli N. Sudden death in young competitive athletes: Clinicopathologic correlations in 22 cases. *Am J Med*. 1990;89(5):588–96.
15. Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, Basso C, Bauce B, Bluemke DA, Calkins H, Corrado D, Cox MGPJ, Daubert JP, Fontaine G, Gear K, Hauer R, Nava A, Picard MH, Protonotarios N, Saffitz JE, Sanborn DMY, Steinberg JS, Tandri H, Thiene G, Towbin JA, Tsatsopoulou A, Wichter T, Zareba W. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: Proposed modification of the Task Force Criteria. *Eur Heart J*. 2010;31(7):806–14. doi:10.1093/eurheartj/ehq025
16. Nasir K, Bomma C, Tandri H, Roguin A, Dalal D, Prakasa K, Tichnell C, James C, Spevak PJ, Marcus F, Calkins H. Electrocardiographic features of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy according to disease

- severity: a need to broaden diagnostic criteria. *Circulation*. 2004;110(12):1527–34. doi:10.1161/01.CIR.0000142293.60725.18
17. Basso C, Corrado D, Marcus FI, Nava A, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *The Lancet*. 2009;373(9671):1289–300. doi:10.1016/S0140-6736(09)60256-7
  18. Basso C, Thiene G, Corrado D, Angelini A, Nava A, Valente M. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: Dysplasia, Dystrophy, or Myocarditis? *Circulation*. 1996;94(5):983–91. doi:10.1161/01.CIR.94.5.983
  19. Thiene G, Corrado D, Nava A, Rossi L, Poletti A, Boffa GM, Daliento L, Pennelli N. Right ventricular cardiomyopathy: Is there evidence of an inflammatory aetiology? *Eur Heart J*. 1991;12(suppl D):22–5. doi:10.1093/eurheartj/12.suppl\_D.22
  20. 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.
  21. Pinamonti B, Brun F, Mestroni L, Sinagra G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: From genetics to diagnostic and therapeutic challenges. *World J Cardiol*. 2014;6(12):1234–44. doi:10.4330/wjc.v6.i12.1234
  22. Tsatsopoulou AA, Protonotarios NI, McKenna WJ. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia, a cell adhesion cardiomyopathy: Insights into disease pathogenesis from preliminary genotype--phenotype assessment. *Heart*. 2006;92(12):1720–3. doi:10.1136/hrt.2005.081679
  23. Moric-Janiszewska E, Markiewicz-Loskot G. Review on the genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Europace*. 2007;9(5):259–66. doi:10.1093/europace/eum034
  24. Asimaki A, Kleber AG, Saffitz JE. Pathogenesis of Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Can J Cardiol*. 2015;31(11):1313–24. doi:10.1016/j.cjca.2015.04.012
  25. Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, Larderet G, Brahmhatt B, Brown K, Bauce B, Muriago M, Basso C, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene



- in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet.* 2001;10(3):189–94.
26. Beffagna G, Occhi G, Nava A, Vitiello L, Ditadi A, Basso C, Bauce B, Carraro G, Thiene G, Towbin JA, Danieli GA, Rampazzo A. Regulatory mutations in transforming growth factor-beta3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1. *Cardiovasc Res.* 2005;65(2):366–73. doi:10.1016/j.cardiores.2004.10.005
  27. van der Zwaag PA, Jongbloed JDH, van den Berg MP, van der Smagt JJ, Jongbloed R, Bikker H, Hofstra RMW, van Tintelen JP. A genetic variants database for arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Hum Mutat.* 2009;30(9):1278–83. doi:10.1002/humu.21064
  28. van Tintelen JP, Entius MM, Bhuiyan ZA, Jongbloed R, Wiesfeld ACP, Wilde AAM, van der Smagt J, Boven LG, Mannens MMAM, van Langen IM, Hofstra RMW, Otterspoor LC, Doevendans PAFM, Rodriguez L-M, van Gelder IC, Hauer RNW. Plakophilin-2 mutations are the major determinant of familial arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circulation.* 2006;113(13):1650–8. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.609719
  29. Bonné S, van Hengel J, Nollet F, Kools P, van Roy F. Plakophilin-3, a novel armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. *J Cell Sci.* 1999;112 ( Pt 14):2265–76.
  30. Chen X, Bonne S, Hatzfeld M, van Roy F, Green KJ. Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta -catenin signaling. *J Biol Chem.* 2002;277(12):10512–22. doi:10.1074/jbc.M108765200
  31. Mertens C, Kuhn C, Franke WW. Plakophilins 2a and 2b: Constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J Cell Biol.* 1996;135(4):1009–25.
  32. Neuber S, Mühmer M, Wratten D, Koch PJ, Moll R, Schmidt A. The desmosomal plaque proteins of the plakophilin family. *Dermatol Res Pract.* 2010;2010101452. doi:10.1155/2010/101452

33. North AJ, Bardsley WG, Hyam J, Bornslaeger EA, Cordingley HC, Trinnaman B, Hatzfeld M, Green KJ, Magee AI, Garrod DR. Molecular map of the desmosomal plaque. *J Cell Sci.* 1999;112 ( Pt 23)4325–36.
34. Hatzfeld M. Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(1):69–77. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.04.009
35. Hatzfeld M, Wolf A, Keil R. Plakophilins in desmosomal adhesion and signaling. *Cell Commun Adhes.* 2014;21(1):25–42. doi:10.3109/15419061.2013.876017
36. Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP. The desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(2):a002543. doi:10.1101/cshperspect.a002543
37. Koster MI, Dinella J, Chen J, O'Shea C, Koch PJ. Integrating animal models and in vitro tissue models to elucidate the role of desmosomal proteins in diseases. *Cell Commun Adhes.* 2014;21(1):55–63. doi:10.3109/15419061.2013.876015
38. Rickelt S. Plakophilin-2: A cell-cell adhesion plaque molecule of selective and fundamental importance in cardiac functions and tumor cell growth. *Cell Tissue Res.* 2012;348(2):281–94. doi:10.1007/s00441-011-1314-3
39. Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA, Lerman BB, Markowitz SM, Ellinor PT, MacRae CA, Peters S, Grossmann KS, Drenckhahn J, Michely B, Sasse-Klaassen S, Birchmeier W, Dietz R, Breithardt G, Schulze-Bahr E, Thierfelder L. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet.* 2004;36(11):1162–4. doi:10.1038/ng1461
40. Rampazzo A. Genetic bases of arrhythmogenic right ventricular Cardiomyopathy. *Heart Int.* 2006;2(1):17. doi:10.4081/hi.2006.17
41. Calabrese F, Basso C, Carturan E, Valente M, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: Is there a role for viruses? *Cardiovasc Pathol.* 2006;15(1):11–7. doi:10.1016/j.carpath.2005.10.004
42. Bowles NE, Ni J, Marcus F, Towbin JA. The detection of cardiotropic viruses in the myocardium of patients with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(5):892–5.

43. Mazurek S, Kim GH. Genetic and epigenetic regulation of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(8):2064–9. doi:10.1016/j.bbadis.2017.04.020
44. Furlanello F, Bertoldi A, Dallago M, Furlanello C, Fernando F, Inama G, Pappone C, Chierchia S. Cardiac arrest and sudden death in competitive athletes with arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Pacing Clin Electrophysiol.* 1998;21(1 Pt 2):331–5.
45. James CA, Bhonsale A, Tichnell C, Murray B, Russell SD, Tandri H, Tedford RJ, Judge DP, Calkins H. Exercise increases age-related penetrance and arrhythmic risk in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy-associated desmosomal mutation carriers. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(14):1290–7. doi:10.1016/j.jacc.2013.06.033
46. Cruz FM, Sanz-Rosa D, Roche-Molina M, García-Prieto J, García-Ruiz JM, Pizarro G, Jiménez-Borreguero LJ, Torres M, Bernad A, Ruíz-Cabello J, Fuster V, Ibáñez B, Bernal JA. Exercise triggers ARVC phenotype in mice expressing a disease-causing mutated version of human plakophilin-2. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(14):1438–50. doi:10.1016/j.jacc.2015.01.045
47. Pfenniger A, Wohlwend A, Kwak BR. Mutations in connexin genes and disease. *Eur J Clin Invest.* 2011;41(1):103–16. doi:10.1111/j.1365-2362.2010.02378.x
48. Maurer P, Weingart R. Cell pairs isolated from adult guinea pig and rat hearts: Effects of Ca<sup>2+</sup>i on nexal membrane resistance. *Pflugers Arch.* 1987;409(4-5):394–402.
49. 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. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.154252
50. Agullo-Pascual E, Reid DA, Keegan S, Sidhu M, Fenyo D, Rothenberg E, Delmar M. Super-resolution fluorescence microscopy of the cardiac connexome reveals plakophilin-2 inside the connexin43 plaque. *Cardiovasc Res.* 2013;100(2):231–40. doi:10.1093/cvr/cvt191
51. Sato PY, Coombs W, Lin X, Nekrasova O, Green KJ, Isom LL, Taffet SM, Delmar M. Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac

- intercalated disc. *Circ Res.* 2011;109(2):193–201. eng. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.247023
52. Noorman M, Hakim S, Kessler E, Groeneweg JA, Cox MGPJ, Asimaki A, van Rijen HVM, van Stuijvenberg L, Chkourko H, van der Heyden MAG, Vos MA, Jonge N de, van der Smagt JJ, Dooijes D, Vink A, Weger RA de, Varro A, Bakker JMT de, Saffitz JE, Hund TJ, Mohler PJ, Delmar M, Hauer RNW, van Veen TAB. 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. doi:10.1016/j.hrthm.2012.11.018
53. Asimaki A, Tandri H, Huang H, Halushka MK, Gautam S, Basso C, Thiene G, Tsatsopoulou A, Protonotarios N, McKenna WJ, Calkins H, Saffitz JE. A new diagnostic test for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2009;360(11):1075–84. doi:10.1056/NEJMoa0808138
54. Paul M, Wichter T, Gerss J, Arps V, Schulze-Bahr E, Robenek H, Breithardt G, Weissen-Plenz G. Connexin expression patterns in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2013;111(10):1488–95. eng. doi:10.1016/j.amjcard.2013.01.299
55. Fidler LM, Wilson GJ, Liu F, Cui X, Scherer SW, Taylor GP, Hamilton RM. Abnormal connexin43 in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by plakophilin-2 mutations. *J Cell Mol Med.* 2009;13(10):4219–28. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00438.x
56. Danik SB, Liu F, Zhang J, Suk HJ, Morley GE, Fishman GI, Gutstein DE. Modulation of cardiac gap junction expression and arrhythmic susceptibility. *Circ Res.* 2004;95(10):1035–41. doi:10.1161/01.RES.0000148664.33695.2a
57. Lerner DL, Yamada KA, Schuessler RB, Saffitz JE. Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in Cx43-deficient mice. *Circulation.* 2000;101(5):547–52.
58. Kirchhoff S, Nelles E, Hagendorff A, Krüger O, Traub O, Willecke K. Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr Biol.* 1998;8(5):299–302.

59. Leo-Macias A, Agullo-Pascual E, Sanchez-Alonso JL, Keegan S, Lin X, Arcos T, Feng-Xia-Liang, Korchev YE, Gorelik J, Fenyö D, Rothenberg E, Delmar M. Nanoscale visualization of functional adhesion/excitability nodes at the intercalated disc. *Nat Commun.* 2016;7:10342. doi:10.1038/ncomms10342
60. Kruger LC, Isom LL. Voltage-Gated Na<sup>+</sup> Channels: Not Just for Conduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(6). doi:10.1101/cshperspect.a029264
61. Lowe JS, Palygin O, Bhasin N, Hund TJ, Boyden PA, Shibata E, Anderson ME, Mohler PJ. Voltage-gated Nav channel targeting in the heart requires an ankyrin-G dependent cellular pathway. *J Cell Biol.* 2008;180(1):173–86. doi:10.1083/jcb.200710107
62. Sato PY, Musa H, Coombs W, Guerrero-Serna G, Patino GA, Taffet SM, Isom LL, Delmar M. 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. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.201418
63. Deo M, Sato PY, Musa H, Lin X, Pandit SV, Delmar M, Berenfeld O. Relative contribution of changes in sodium current versus intercellular coupling on reentry initiation in 2-dimensional preparations of plakophilin-2-deficient cardiac cells. *Heart Rhythm.* 2011;8(11):1740–8. doi:10.1016/j.hrthm.2011.06.029
64. 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. doi:10.1371/journal.pone.0078087
65. Cerrone M, Noorman M, Lin X, Chkourko H, Liang F-X, van der Nagel R, Hund T, Birchmeier W, Mohler P, van Veen TA, van Rijen HV, Delmar M. Sodium current deficit and arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency. *Cardiovasc Res.* 2012;95(4):460–8. doi:10.1093/cvr/cvs218
66. Makara MA, Curran J, Little SC, Musa H, Polina I, Smith SA, Wright PJ, Unudurthi SD, Snyder J, Bennett V, Hund TJ, Mohler PJ. Ankyrin-G coordinates intercalated disc signaling platform to regulate cardiac excitability in vivo. *Circ Res.* 2014;115(11):929–38. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.305154

67. Bers DM. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. Dordrecht: Springer Netherlands; 2001. 1 online resource (445. (Developments in cardiovascular medicine; vol. v. 237).
68. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198–205. doi:10.1038/415198a
69. 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. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304678
70. Chen SN, Gurha P, Lombardi R, Ruggiero A, Willerson JT, Marian AJ. The hippo pathway is activated and is a causal mechanism for adipogenesis in arrhythmogenic cardiomyopathy. *Circ Res*. 2014;114(3):454–68. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302810
71. Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysik E, Johnson RL, Martin JF. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science*. 2011;332(6028):458–61. doi:10.1126/science.1199010
72. Tzahor E. Wnt/beta-catenin signaling and cardiogenesis: Timing does matter. *Dev Cell*. 2007;13(1):10–3. doi:10.1016/j.devcel.2007.06.006
73. Dubash AD, Kam CY, Aguado BA, Patel DM, Delmar M, Shea LD, Green KJ. Plakophilin-2 loss promotes TGF- $\beta$ 1/p38 MAPK-dependent fibrotic gene expression in cardiomyocytes. *J Cell Biol*. 2016;212(4):425–38. doi:10.1083/jcb.201507018
74. Jellis C, Martin J, Narula J, Marwick TH. Assessment of nonischemic myocardial fibrosis. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(2):89–97. doi:10.1016/j.jacc.2010.02.047
75. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J*. 2004;18(7):816–27. doi:10.1096/fj.03-1273rev
76. Jansen JA, van Veen TAB, Jong S de, van der Nagel R, van Stuijvenberg L, Driessen H, Labzowski R, Oefner CM, Bosch AA, Nguyen TQ, Goldschmeding R, Vos MA, Bakker JMT de, van Rijen HVM. Reduced Cx43 expression triggers increased fibrosis due to enhanced fibroblast activity. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012;5(2):380–90. doi:10.1161/CIRCEP.111.966580

77. Cerrone M, Montnach J, Lin X, Zhao Y-T, Zhang M, Agullo-Pascual E, Leo-Macias A, Alvarado FJ, Dolgalev I, Karathanos TV, Malkani K, van Opbergen CJM, van Bavel JJA, Yang H-Q, Vasquez C, Tester D, Fowler S, Liang F, Rothenberg E, Heguy A, Morley GE, Coetzee WA, Trayanova NA, Ackerman MJ, van Veen TAB, Valdivia HH, Delmar M. Plakophilin-2 is required for transcription of genes that control calcium cycling and cardiac rhythm. *Nat Commun.* 2017;8(1):106. doi:10.1038/s41467-017-00127-0
78. Camors E, Mohler PJ, Bers DM, Despa S. Ankyrin-B reduction enhances Ca spark-mediated SR Ca release promoting cardiac myocyte arrhythmic activity. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52(6):1240–8. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.02.010
79. Chopra N, Knollmann BC. Triadin regulates cardiac muscle couplon structure and microdomain Ca(2+) signalling: A path towards ventricular arrhythmias. *Cardiovasc Res.* 2013;98(2):187–91. doi:10.1093/cvr/cvt023
80. Kline CF, Scott J, Curran J, Hund TJ, Mohler PJ. Ankyrin-B regulates Cav2.1 and Cav2.2 channel expression and targeting. *J Biol Chem.* 2014;289(8):5285–95. doi:10.1074/jbc.M113.523639
81. Behrends JC. *Physiologie: 93 Tabellen.* 2nd ed. Stuttgart: Thieme; 2012. 830 p. (Duale Reihe). ger.
82. 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. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
83. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131(5):861–72. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
84. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 2008;26(1):101–6. doi:10.1038/nbt1374
85. Fuerstenau-Sharp M, Zimmermann ME, Stark K, Jentsch N, Klingenstein M, Drzymalski M, Wagner S, Maier LS, Hehr U, Baessler A, Fischer M, Hengstenberg C. Generation of highly purified human cardiomyocytes from

- peripheral blood mononuclear cell-derived induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE*. 2015;10(5):e0126596. eng. doi:10.1371/journal.pone.0126596
86. Ma D, Wei H, Lu J, Ho S, Zhang G, Sun X, Oh Y, Tan SH, Ng ML, Shim W, Wong P, Liew R. 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. eng. doi:10.1093/eurheartj/ehs226
  87. Kim C, Wong J, Wen J, Wang S, Wang C, Spiering S, Kan NG, Forcales S, Puri PL, Leone TC, Marine JE, Calkins H, Kelly DP, Judge DP, Chen H-SV. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature*. 2013;494(7435):105–10. doi:10.1038/nature11799
  88. Hay DC, Sutherland L, Clark J, Burdon T. Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2004;22(2):225–35. doi:10.1634/stemcells.22-2-225
  89. Pesce M, Schöler HR. Oct-4: Control of totipotency and germline determination. *Mol. Reprod. Dev.* 2000;55(4):452–7. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(200004)55:4<452:AID-MRD14>3.0.CO;2-S
  90. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000;24(4):372–6. doi:10.1038/74199
  91. Ljubojevic S, Radulovic S, Leitinger G, Sedej S, Sacherer M, Holzer M, Winkler C, Pritz E, Mittler T, Schmidt A, Sereinigg M, Wakula P, Zissimopoulos S, Bisping E, Post H, Marsche G, Bossuyt J, Bers DM, Kockskamper J, Pieske B. Early remodeling of perinuclear Ca<sup>2+</sup> stores and nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup> signaling during the development of hypertrophy and heart failure. *Circulation*. 2014;130(3):244–55. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008927
  92. Ljubojevic S, Walther S, Asgarzoei M, Sedej S, Pieske B, Kockskamper J. In situ calibration of nucleoplasmic versus cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration in adult cardiomyocytes. *Biophys J*. 2011;100(10):2356–66. doi:10.1016/j.bpj.2011.03.060



93. Dewenter M, Lieth A v. d., Katus HA, Backs J. Calcium Signaling and Transcriptional Regulation in Cardiomyocytes. *Circ Res.* 2017;121(8):1000–20. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.310355
94. Ljubojevic S, Bers DM. Nuclear calcium in cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2015;65(3):211–7. doi:10.1097/FJC.000000000000174
95. Jiang Y, Park P, Hong S-M, Ban K. Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Pluripotent Stem Cells: Current Strategies and Limitations. *Mol Cells.* 2018;41(7):613–21. doi:10.14348/molcells.2018.0143
96. [Internet] [cited 2018 Oct 8]. Available from: [https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?gclid=EAlalQobChMI2sXXsvv23QIVD9-yCh1yoAOhEAAYASAAEgKTmvD\\_BwE&s\\_kwcid=AL!3652!3!211105705082!p!lg!!spectraviewer&ef\\_id=W3FTNwAAAKiC4ANC:20181008133647:s](https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?gclid=EAlalQobChMI2sXXsvv23QIVD9-yCh1yoAOhEAAYASAAEgKTmvD_BwE&s_kwcid=AL!3652!3!211105705082!p!lg!!spectraviewer&ef_id=W3FTNwAAAKiC4ANC:20181008133647:s)
97. [Internet] [cited 2018 Sep 27]. Available from: <https://www.abcam.com/fluo-8-am-ab142773.html>
98. [Internet] [cited 2018 Sep 27]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F14201>
99. [Internet] [cited 2018 Sep 27]. Available from: [https://www.biomol.de/product\\_Fluo-4-AM-Ultrapure-Grade-CAS-273221-67-3.html?aRelated=ABD-20552](https://www.biomol.de/product_Fluo-4-AM-Ultrapure-Grade-CAS-273221-67-3.html?aRelated=ABD-20552)
100. [Internet] [cited 2018 Sep 27]. Available from: <https://www.aatbio.com/products/fluo-8-am>
101. [Internet] [cited 2018 Sep 27]. Available from: <http://www.genecopoeia.com/product/fluo-4-am-facs canto/>
102. [Internet] [cited 2018 Sep 27]. Available from: <https://www.embl.de/eamnet/html/calcium/dyes/fluorescentdyes3.htm>
103. [Internet] [cited 2018 Sep 27]. Available from: [https://www.biomol.de/product\\_Fluo-4-AM-Ultrapure-Grade-CAS-273221-67-3.html?aRelated=ABD-20552](https://www.biomol.de/product_Fluo-4-AM-Ultrapure-Grade-CAS-273221-67-3.html?aRelated=ABD-20552)

104. [Internet] [cited 2018 Sep 27]. Available from: <https://www.zeiss.at/mikroskopie/produkte/confocal-microscopes.html>
105. [Internet] [cited 2018 Sep 27]. Available from: <https://de.wikipedia.org/wiki/Konfokalmikroskop>
106. Wilhelm, S., Gröbler, B., Gluch, M. and Heinz, H. Confocal Laser Scanning Microscopy [Internet]; [30 p.].
107. Bielecka-Dabrowa A, Haehling S v., Rysz J, Banach M. Novel drugs for heart rate control in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2018;23(4):517–25. doi:10.1007/s10741-018-9696-x
108. Maier LS. Die Bedeutung von Natrium und Calcium für die elektromechanische Kopplung des Myokards: Neue Methoden zur Messung der intrazellulären Natriumkonzentration, der intrazellulären Calciumtransienten und des Calciumgehalts des sarkoplastischen Retikulums im menschlichen Myokard und Tiermyokard Zugl.: Freiburg (Breisgau), Univ., Diss., 1999. Marburg: Tectum-Verl.; 1999. 129 p. (Pathophysiologie der Herzkreislauferkrankungen; vol. Bd. 1). ger.
109. Hammer KP, Ljubojevic S, Ripplinger CM, Pieske BM, Bers DM. Cardiac myocyte alternans in intact heart: Influence of cell-cell coupling and  $\beta$ -adrenergic stimulation. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;841–9. eng. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.03.012
110. Hammer KP, Hohendanner F, Blatter LA, Pieske BM, Heinzel FR. Variations in local calcium signaling in adjacent cardiac myocytes of the intact mouse heart detected with two-dimensional confocal microscopy. *Front Physiol.* 2014;5517. eng. doi:10.3389/fphys.2014.00517
111. Wang Y, Hill JA. Electrophysiological remodeling in heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(4):619–32. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.01.009
112. Plačkić J, Preissl S, Nikonova Y, Pluteanu F, Hein L, Kockskämper J. Enhanced nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup> signaling in ventricular myocytes from young hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;10158–68. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.11.001

113. Oliveira AG, Guimarães ES, Andrade LM, Menezes GB, Fatima Leite M. Decoding calcium signaling across the nucleus. *Physiology* (Bethesda). 2014;29(5):361–8. doi:10.1152/physiol.00056.2013
114. Guatimosim S, Amaya MJ, Guerra MT, Aguiar CJ, Goes AM, Gómez-Viquez NL, Rodrigues MA, Gomes DA, Martins-Cruz J, Lederer WJ, Leite MF. Nuclear Ca<sup>2+</sup> regulates cardiomyocyte function. *Cell Calcium*. 2008;44(2):230–42. doi:10.1016/j.ceca.2007.11.016
115. Hohendanner F, McCulloch AD, Blatter LA, Michailova AP. Calcium and IP<sub>3</sub> dynamics in cardiac myocytes: Experimental and computational perspectives and approaches. *Front Pharmacol*. 2014;535. doi:10.3389/fphar.2014.00035
116. Zarain-Herzberg A, Fragoso-Medina J, Estrada-Avilés R. Calcium-regulated transcriptional pathways in the normal and pathologic heart. *IUBMB Life*. 2011;63(10):847–55. doi:10.1002/iub.545
117. Domínguez-Rodríguez A, Ruiz-Hurtado G, Benitah J-P, Gómez AM. The other side of cardiac Ca(2+) signaling: Transcriptional control. *Front Physiol*. 2012;3452. doi:10.3389/fphys.2012.00452
118. Zima AV, Bare DJ, Mignery GA, Blatter LA. IP<sub>3</sub>-dependent nuclear Ca<sup>2+</sup> signalling in the mammalian heart. *J Physiol (Lond)*. 2007;584(Pt 2):601–11. doi:10.1113/jphysiol.2007.140731
119. Nakao S, Wakabayashi S, Nakamura TY. Stimulus-dependent regulation of nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiomyocytes: A role of neuronal calcium sensor-1. *PLoS ONE*. 2015;10(4):e0125050. doi:10.1371/journal.pone.0125050
120. Kiess T-O, Kockskämper J. SERCA Activity Controls the Systolic Calcium Increase in the Nucleus of Cardiac Myocytes. *Front Physiol*. 2019;1056. doi:10.3389/fphys.2019.00056
121. Chen M, Xu D, Wu AZ, Kranias E, Lin S-F, Chen P-S, Chen Z. Phospholamban regulates nuclear Ca<sup>2+</sup> stores and inositol 1,4,5-trisphosphate mediated nuclear Ca<sup>2+</sup> cycling in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;123185–97. doi:10.1016/j.yjmcc.2018.09.008

122. Zhang H, Liu S, Dong T, Yang J, Xie Y, Wu Y, Kang K, Hu S, Gou D, Wei Y. Profiling of differentially expressed microRNAs in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Sci Rep.* 2016;6:28101. doi:10.1038/srep28101
123. Yamada S, Hsiao Y-W, Chang S-L, Lin Y-J, Lo L-W, Chung F-P, Chiang S-J, Hu Y-F, Tuan T-C, Chao T-F, Liao J-N, Lin C-Y, Chang Y-T, Te ALD, Tsai Y-N, Chen S-A. Circulating microRNAs in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with ventricular arrhythmia. *Europace.* 2018;20(F11):f37-f45. doi:10.1093/europace/eux289
124. Schwoerer AP, Neef S, Broichhausen I, Jacubeit J, Tiburcy M, Wagner M, Biermann D, Didié M, Vettel C, Maier LS, Zimmermann WH, Carrier L, Eschenhagen T, Volk T, El-Armouche A, Ehmke H. Enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  influx through cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels maintains the systolic  $\text{Ca}^{2+}$  transient in early cardiac atrophy induced by mechanical unloading. *Pflugers Arch.* 2013;465(12):1763–73. doi:10.1007/s00424-013-1316-y
125. Davlouros PA, Gkizas V, Vogiatzi C, Giannopoulos G, Alexopoulos D, Deftereos S. Calcium Homeostasis and Kinetics in Heart Failure. *Med Chem.* 2016;12(2):151–61.
126. Beuckelmann DJ, Erdmann E.  $\text{Ca}^{2+}$ -currents and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -transients in single ventricular myocytes isolated from terminally failing human myocardium. *Basic Res Cardiol.* 1992;87 Suppl 1235–43.
127. Lehnart SE, Maier LS, Hasenfuss G. Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 2009;14(4):213–24. doi:10.1007/s10741-009-9146-x
128. Hasenfuss G, Pieske B. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(8):951–69.
129. Hasenfuss G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res.* 1998;37(2):279–89.
130. Lou Q, Janardhan A, Efimov IR. Remodeling of calcium handling in human heart failure. *Adv Exp Med Biol.* 2012;740:1145–74. doi:10.1007/978-94-007-2888-2\_52

131. Bers DM, Despa S. Cardiac Myocytes  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  Regulation in Normal and Failing Hearts. *J Pharmacol Sci.* 2006;100(5):315–22. doi:10.1254/jphs.CPJ06001X
132. Müller F-J, Schuldt BM, Williams R, Mason D, Altun G, Papapetrou EP, Danner S, Goldmann JE, Herbst A, Schmidt NO, Aldenhoff JB, Laurent LC, Loring JF. A bioinformatic assay for pluripotency in human cells. *Nat Methods.* 2011;8(4):315–7. doi:10.1038/nmeth.1580
133. 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. doi:10.1089/scd.2015.0266

## 8 Danksagung

Bedanken möchte ich mich von ganzem Herzen bei...

...meinem Doktorvater **Prof. Dr. Stefan Wagner**, dass ich dieses spannende Promotionsthema erhalten durfte, für die Betreuung des Projekts, die Unterstützung bei der Interpretation und Darstellung der Ergebnisse und die Lehrtätigkeit im Labor sowie in den Doktorandenseminaren.

...meiner Betreuerin **Dr. Karin Hammer**, dass ich Teil dieses Projekts sein durfte, dass ich die vielen Methoden (Konfokalmikroskopie, Epifluoreszenzmikroskopie, iPSC- und Kardiomyozyten-Kultivierung, statistische Auswertungen) erlernen durfte, für die unendliche Geduld, Hilfsbereitschaft, Verständnis, Erreichbarkeit, die Unterstützung bei Labortätigkeiten sowie dem wissenschaftlichem Arbeiten und vieles mehr.

...dem gesamten **Labor-Team** für ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft.

...meiner Projektskollegin und Freundin **Lena Albersdörfer**, dass wir den Weg durch Studium und Promotion gemeinsam gegangen sind, für den guten Zusammenhalt, den bereichernden Austausch auf wissenschaftlicher und privater Ebene, die Arbeitsteilung bei den Zellkultivierungen, die stetige Unterstützung, Motivation und vieles mehr.

...meinen **Eltern, Geschwistern, Verwandten** und allen **Freunden** für ihr grenzenloses Verständnis, Rücksichtnahme, Motivation und rege Unterstützung in den unterschiedlichsten Bereichen.

...unserer **Tagesmutter Martina** (bzw. dem Tagesmütterverein Gmunden und der Gemeinde Gmunden), die mir durch ihre außergewöhnlich liebevolle Betreuung von Benedikt ein konzentriertes, sorgenfreies und effektives Arbeiten ermöglicht hat.

...meinem Sohn **Benedikt** für sein fröhliches Wesen und seine Mittagsschläfchen, in denen ich an der Arbeit weitermachen und schreiben konnte.

...meinem Verlobten **Andreas Lukas** für die bedingungslose Liebe, die tatkräftige Unterstützung auf verschiedensten Ebenen, den immerwährenden Rückhalt, die Motivation, Geduld, das Interesse und das viele Verständnis.

