

Aus der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg
Prof. Dr. Samuel Sossalla
Innere Medizin

**Effekte unterschiedlicher Vorhofflimmer-Lasten auf die
Funktion von ventrikulären Kardiomyozyten in einem
„back to bench“- Ansatz**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johanna Trausel

JAHR 2024

Aus der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg
Prof. Dr. Samuel Sossalla
Innere Medizin

**Effekte unterschiedlicher Vorhofflimmer-Lasten auf die
Funktion von ventrikulären Kardiomyozyten in einem
„back to bench“- Ansatz**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johanna Trausel

JAHR 2024

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Samuel Sossalla

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Hirt

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
Formelverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	10
1.1 Interaktion von Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern	10
1.2 Grundlage der zellulären Struktur: Die Ultrastruktur des Myokards	12
1.3 Physiologische Grundlagen des Herzmuskels	15
1.3.1 Das Aktionspotential des Arbeitsmyokards	15
1.3.2 Elektromechanische Kopplung des Herzmuskels	16
1.4 Elektrophysiologische Mechanismen zur Entstehung des VHF.....	18
1.5 Pathophysiologische Veränderungen bei VHF	19
1.5.1 Fibrotische Umbauprozesse.....	19
1.5.2 Molekulare und zelluläre Veränderungen bei VHF.....	21
1.6 Ziele und Fragestellungen der Dissertation	24
2 Methoden	25
2.1 Verwendete Medien und Substanzen.....	25
2.2 Isolation von iPSC-KM.....	28
2.2.1 Gewinnung von iPSC-KM.....	28
2.2.2 Verdau von iPSC-KM	29
2.2.3 Stimulation von iPSC-KM	29
2.3 Fluoreszenzmikroskopie	31
2.3.1 Grundlagen der fluoreszenzmikroskopischen Messung.....	31
2.3.2 Fluoreszenzfarbstoffe	32
2.3.3 Epifluoreszenzmikroskop	35
2.4 Immunfluoreszenzfärbung	39
2.4.1 Grundlagen der Immunfluoreszenzfärbung.....	39

2.4.2	Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung	41
2.4.3	Auswertung	41
2.5	Statistische Auswertung	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Illustration der zentralen Ergebnisse	44
3.2	Effekte verschiedener VHF-Lasten auf die Ca ²⁺ -Homöostase	45
3.2.1	Auswirkungen verschiedener VHF-Lasten auf die Ca ²⁺ -Transientenamplitude	45
3.2.2	Auswirkungen verschiedener VHF-Lasten auf die diastolische Ca ²⁺ - Konzentration	52
3.2.3	Auswirkungen verschiedener VHF-Lasten auf die RT 80%	57
3.3	Effekte verschiedener VHF-Lasten auf die Sarkomerorganisation.....	61
3.3.1	Auswirkungen verschiedener VHF-Lasten auf α-Actinin	61
3.3.2	Auswirkungen verschiedener VHF-Lasten auf Titin	64
4	Diskussion.....	67
4.1	Ergebnisse als möglicher Erklärungsansatz der CASTLE-AF Studie	67
4.2	Verwendung von iPSC-KM als repräsentative Zellen.....	67
4.3	Mechanistische Erklärungsansätze der Veränderungen im Ca ²⁺ -Haushalt.....	69
4.4	Durch das VHF-Simulationsmodell induzierte Sarkomerirregularität.....	70
4.5	Korrelation zellulärer Veränderungen mit der Höhe der VHF-Last.....	72
4.6	Rhythmuskontrolle als vorteilhafter Therapieansatz bei VHF	73
4.7	Translationale Relevanz eines frühen Rhythmusverlust bei VHF	77
4.8	Limitationen der Arbeit.....	78
4.9	Ausblick	78
5	Zusammenfassung	80
6	Literaturverzeichnis.....	81
	Veröffentlichung und Förderung.....	91

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Sarkomers	13
Abbildung 2: Aufnahmen von Glanzstreifen in der Herzmuskulatur.....	14
Abbildung 3: Kontraktiler Apparat und Membranstrukturen der Herzmuskelzelle.....	15
Abbildung 4: Schema der elektromechanischen Kopplung im Herzmuskel.....	18
Abbildung 5: Übersicht der iPSC-KM Simulation	30
Abbildung 6: Fluoreszenzanregungsspektrum von Fura-2 in Lösung (A) und Strukturformel von Fura-2 und Summenformeln der Analoga (B).....	33
Abbildung 7: Optischer Pfad und die Komponenten des Hyperswitch Dual Excitation Light Source	36
Abbildung 8: Eigene Aufzeichnung eines beispielhaften Ca^{2+} -Transienten gemessen mit Fura-2, AM	38
Abbildung 9: Grafische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenzfärbung	39
Abbildung 10: Absorptionsspektren verschiedener Alexa-Farbstoffe	40
Abbildung 11: Illustration der zentralen Ergebnisse.....	44
Abbildung 12: (A) Originalabbildungen der Ca^{2+} -Transientenamplituden (48 h, 30 bpm). (B) Originalabbildungen der Ca^{2+} -Transientenamplituden (7 d, 30 bpm). (C) Darstellung der Ca^{2+} -Transientenamplitude bei 30 bpm nach 48 h VHF-Simulation und 7 d VHF-Simulation.	47
Abbildung 13: (A) Originalabbildungen der Ca^{2+} -Transientenamplituden (48 h, 60 bpm). (B) Originalabbildungen der Ca^{2+} -Transientenamplituden (7 d, 60 bpm). (C) Darstellung der Ca^{2+} -Transientenamplitude bei 60 bpm nach 48 h und 7 d VHF- Simulation	50
Abbildung 14: Darstellung der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration bei 30 bpm nach 48 h und 7 d VHF-Simulation	54
Abbildung 15: Darstellung der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration bei 60 bpm nach 48 h und 7 d VHF-Simulation	56
Abbildung 16: Darstellung der RT 80% bei 30 bpm nach 48 h und 7 d VHF-Simulation	58
Abbildung 17: Darstellung der RT 80% bei 60 bpm nach 48 h und 7 d VHF-Simulation	60

Abbildung 18: Repräsentative Originalabbildungen von iPSC-KM mit Anfärbung von α -Actinin nach 7 d VHF-Simulation62

Abbildung 19: Darstellung der Amplitude des Peaks erster Ordnung von α -Actinin nach 7 d VHF-Simulation63

Abbildung 20: Repräsentative Originalabbildungen von iPSC-KM mit Anfärbung von Titin nach 7 d VHF-Simulation65

Abbildung 21: Darstellung der Amplitude des Peaks erster Ordnung von Titin nach 7 d VHF-Simulation66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Grundsubstanzen	25
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Medien.....	26
Tabelle 3: Zusammensetzung der Messtyrode für iPSC-KM	26
Tabelle 4: Zusammensetzung der Farbstofflösung für die Epifluoreszenzmessung..	27
Tabelle 5: Lösungen für die Immunfluoreszenzfärbung	27
Tabelle 6: Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung	27
Tabelle 7: Übersicht der Alexa-Farbstoffe mit entsprechender Absorptions-, Emissionswellenlänge und Emissionsfarbe	40
Tabelle 8: Darstellung der p-Werte der Ca ²⁺ -Transienten- amplituden (48 h, 30 bpm)	46
Tabelle 9: Darstellung der p-Werte der Ca ²⁺ -Transienten- amplituden (7 d, 30 bpm)	46
Tabelle 10: Darstellung der p-Werte der Ca ²⁺ -Transienten- amplituden (48 h, 60 bpm)	48
Tabelle 11: Darstellung der p-Werte der Ca ²⁺ -Transienten- amplituden (7 d, 60 bpm)	49
Tabelle 12: Darstellung der p-Werte der diastolischen Ca ²⁺ -Konzentration (48 h, 30 bpm)	53
Tabelle 13: Darstellung der p-Werte der diastolischen Ca ²⁺ -Konzentration (7 d, 30 bpm)	53
Tabelle 14: Darstellung der p-Werte der diastolischen Ca ²⁺ -Konzentration (48 h, 60 bpm)	55
Tabelle 15: Darstellung der p-Werte der diastolischen Ca ²⁺ -Konzentration (7 d, 60 bpm)	55
Tabelle 16: Darstellung der p-Werte der RT 80% (48 h, 30 bpm)	57
Tabelle 17: Darstellung der p-Werte der RT 80% (7 d, 30 bpm).....	57
Tabelle 18: Darstellung der p-Werte der RT 80% (48 h, 60 bpm).....	59
Tabelle 19: Darstellung der p-Werte der RT 80% (7 d, 60 bpm).....	59
Tabelle 20: Darstellung der p-Werte von α -Actinin (7 d)	63
Tabelle 21: Darstellung der p-Werte von Titin (7 d)	66

Formelverzeichnis

Formel 1: Formel nach Grynkiewicz.....	34
Formel 2: Exponentialfunktion zur Darstellung der Ca^{2+} -Konzentration	37
Formel 3: Formel zur Berechnung des SEM.....	43

Abkürzungsverzeichnis

AIC	Arrhythmie-induzierte Kardiomyopathie
AM	Acetoxymethylester
AP	Aktionspotential
AS	Aortenstenose
bpm	Schläge pro Minute, engl. <i>beats per minute</i>
Ca ²⁺	Calciumion
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre cytosolische Ca ²⁺ -Konzentration
CaMKII	Ca ²⁺ -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CRT	kardiale Resynchronisationstherapie, engl. <i>Cardiac Resynchronization Therapy</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EF	Ejektionsfraktion
ESC	Europäische Gesellschaft für Kardiologie
FBS	fetales Rinderserum
FFT	2D-Fourier-Transformation
HI	Herzinsuffizienz
iPSC-KM	humane ventrikuläre induzierte pluripotente stammzellabgeleitete Kardiomyozyten
I _x	Ionenstrom X
Kardio-MRT	kardiale Magnetresonanztomographie
KCl	Kaliumchlorid
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LSVD	linksventrikuläre systolische Dysfunktion
LTCC	L-Typ-Ca ²⁺ -Kanal
LV	linker Ventrikel
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
PLB	Phospholamban
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen, engl. <i>reactive oxygen species</i>
RT 80%	Zeit bis zur 80%igen Relaxation
RyR2	Ryanodinrezeptor vom Subtyp 2 (kardialer Subtyp)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts, engl. <i>standard error of mean</i>
SERCA	Sarkoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
SR	Sinusrhythmus
T-Tubuli	transversale Tubuli
transforming growth factor β	TGF-β1
VHF	Vorhofflimmern

1 Einleitung

1.1 Interaktion von Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern

Vorhofflimmern (VHF) und Herzinsuffizienz (HI) sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die häufig gleichzeitig bei Patienten auftreten. Diese Koexistenz beider Krankheitsbilder ist mit einer Verschlechterung des kardiovaskulären Outcomes assoziiert. Überproportional häufig sind hierbei ältere Menschen von diesen beiden Erkrankungen betroffen. Folglich wird mit einer zunehmender Alterung der Bevölkerung ein Anstieg der beiden Erkrankungen und der damit assoziierten kardiovaskulären Folgen erwartet (1–4). Um die Auswirkungen des kombinierten Auftretens der beiden Erkrankungen besser verstehen zu können, wird nun zuerst VHF definiert und im Anschluss auf assoziierte Komorbiditäten wie HI eingegangen.

VHF ist eine supraventrikuläre Tachykardie, die durch eine unkoordinierte Vorhofkontraktion gekennzeichnet ist (5). Die Rhythmusstörung stellt die häufigste persistierende klinische Arrhythmie dar und geht mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität einher (2,6). Zu den typischen Komorbiditäten zählen HI und thromboembolische Komplikationen wie Schlaganfall oder Demenz (1,2,7,8). Schätzungsweise litten 2010 in der Europäischen Union 8,8 Millionen Menschen über 55 Jahre an VHF, bis 2060 soll dabei die Zahl auf 17,9 Millionen ansteigen (9). Aufgrund dieser hohen Inzidenz ist VHF eine der klinisch relevantesten kardiovaskulären Erkrankungen.

Als Begleiterkrankung bei VHF tritt häufig eine HI auf. 10-50% der Patienten mit HI sind auch an VHF erkrankt und 20-30% der an VHF erkrankten Patienten leiden an einer HI (10,11). Nicht sicher geklärt ist dabei die Frage, ob VHF zur HI oder HI zu VHF führt („Henne-Ei-Frage“). Es besteht somit eine bidirektionale Relation. Ein wichtiger Zusammenhang hierbei ist, dass VHF eine HI induzieren kann, was dann als sog. Arrhythmie-induzierte Kardiomyopathie (AIC), die als Unterform der dilatativen Kardiomyopathie gilt, bezeichnet wird (12–15). Die Kriterien für die Diagnose einer AIC sind der Nachweis einer persistierenden Arrhythmie und einer HI, die durch keine anderen Ursachen erklärbar ist. Die Therapie fokussiert sich auf die Behandlung der verursachenden Arrhythmie. Ist die HI nach einer erfolgreichen Therapie innerhalb von Wochen bzw. Monaten (bei einer vorbestehenden Herzerkrankung teilweise)

reversibel, gilt die Diagnose der AIC als bestätigt. Da die Arrhythmie oft nur als Folge und nicht als Ursache für eine Kardiomyopathie erachtet wird, ist die Relevanz der AIC im klinischen Kontext wahrscheinlich noch unterschätzt (4).

VHF per se ist also nicht nur eine auf den Vorhof begrenzte Erkrankung. Bestätigt werden konnte dieser kausale Aspekt auch im klinischen Alltag. Bei Patienten mit VHF, die therapeutisch mit einer Katheterablation behandelt wurden, verbesserte sich die ventrikuläre Funktion signifikant (6). Eine wichtige Untersuchung in diesem Zusammenhang ist die CASTLE-AF Studie. Die Probanden der Studie waren Patienten mit gleichzeitig bestehendem VHF und linksventrikulärer systolischer Dysfunktion (LSVD). Dabei zeigte sich, dass Patienten mit VHF und LVSD nach Katheterablation im Vergleich zu Probanden, die eine medikamentöse Standardtherapie erhielten, prognostisch profitierten.

Der kombinierte primäre Endpunkt bestand hier aus Mortalität und Hospitalisierung aufgrund einer Verschlechterung der HI. Die Patienten wurden in 2 verschiedene Gruppen randomisiert, die sich in ihrer Therapieform unterschieden. Die Interventionsgruppe wurde mittels Katheterablation behandelt, in der Kontrollgruppe erfolgte eine medikamentöse Standardtherapie gemäß den aktuellen Leitlinien. Diese konnte in den Studienzentren ohne spezifische Vorgaben patientenindividuell vom jeweils behandelnden Arzt festgelegt werden. Bei ca. 30% der Patienten in der Kontrollgruppe wurde eine medikamentöse Rhythmuskontrolle initiiert, die meist mit Amiodaron durchgeführt wurde.

Der primäre Endpunkt wurde in der Ablationsgruppe bei 28,5% der Patienten erreicht, in der medikamentösen Therapiegruppe hingegen bei 44,6%. Somit trat der primäre Endpunkt bei signifikant weniger Patienten in der Ablationsgruppe als in der medikamentösen Gruppe auf. Beim letzten Follow-up nach 60 Monaten waren 63,1% der Patienten in der Ablationsgruppe und 21,7% der Patienten in der Kontrollgruppe im Sinusrhythmus (SR).

Des Weiteren zeigte sich in der Ablationsgruppe, dass die Patienten eine verringerte VHF-Last aufwiesen, eine Besserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) auftrat sowie die körperliche Leistungsfähigkeit im 6-Minuten-Gehtest zunahm (16).

Eine weiterführende Subanalyse der CASTLE-AF Studie lässt Schlussfolgerungen bezüglich der Relevanz der VHF-Last zu. In dieser Subanalyse konnte festgestellt werden, dass sich in der Ablationsgruppe die VHF-Last postinterventionell nach 6

Monaten signifikant verringerte, während Patienten in der medikamentösen Gruppe keine signifikante Veränderung der VHF-Last aufwiesen. Bei Patienten in der Interventionsgruppe mit einer VHF-Last von weniger als 50% konnte ein Rückgang der Gesamtmortalität und Hospitalisierung aufgrund einer Verschlechterung der HI beobachtet werden. Somit hatten Patienten mit einer VHF-Last von weniger als 50% nach sechs Monaten nach Katheterablation ein signifikant besseres Outcome als Patienten mit einer VHF-Last über 50%. Interessanterweise korrelierte das alleinige Auftreten eines VHF-Rezidivs nicht mit einer schlechteren Prognose, solange VHF weniger als die Hälfte der Zeit auftrat. Folglich steht die VHF-Last nach 6 Monaten im direkten Zusammenhang mit dem klinischen Outcome (17).

1.2 Grundlage der zellulären Situation: Die Ultrastruktur des Myokards

Um die Pathophysiologie klinischer Erkrankungsbilder wie VHF und HI besser verstehen zu können, wird im Folgenden auf die Ultrastruktur des Myokards als Grundlage der zellulären Situation eingegangen.

Das Myokard ist in der Lage chemische Energie in mechanische Energie umzuwandeln, was die Grundlage jeder Herzaktion bildet. Die Kontraktilität wird in der quergestreiften Herzmuskulatur durch die Myofibrillen gewährleistet. Das Sarkomer ist die funktionelle kontraktile Einheit der Myofibrille und besteht aus Myofilamenten. Die entscheidenden myofibrillären Moleküle sind Aktin- und Myosinfilamente sowie Titin (18). Die Myofilamente zeigen lichtmikroskopisch eine typische Bandenstruktur auf. Der Abschnitt, der durch die sichtbaren Z-Linien begrenzt wird, heißt Sarkomer. Wesentlicher Strukturbestandteil der Z-Linie ist das Protein α -Actinin. α -Actinin ist ein Aktin-bindendes Protein des Cytoskeletts und lässt sich der Spektrin-Superfamilie zuordnen. Hierbei tritt v.a. α -Actinin 2 als wichtigste kardiale Unterform auf. Es bildet eine gitterartige Struktur, indem es die Aktinfilamente benachbarter Sarkomere vernetzt und dient somit zur Stabilisierung des kontraktiven Muskelapparats (19).

Die für die Kontraktion verantwortlichen Myosinfilamente kommen in der A-Bande vor und werden in der Mitte der Bande (M-Bande) stabilisiert. Die I-Bande besteht aus Aktinfilamenten, welche in der Z-Linie verankert sind. Ein weiteres wichtiges Myofilament ist das Strukturprotein Titin. Die Titinfilamente verlaufen von der M-Linie bis zur Z-Linie und sind in der A-Bande über Proteine mit den Myosinfilamenten

verbunden (18,20,21). Titin beeinflusst als entropische Feder die Flexibilität und die kontraktile Eigenschaften des Herzmuskels (22). Als Riesenprotein bildet es ein Filamentnetzwerk in Kardiomyozyten und trägt zu mechanischen und Signalfunktionen des Herzens bei. Neben der Aufgabe zur viskoelastischen Kräfteerzeugung hält Titin die Myosinfilamente im Sarkomer zentriert, was eine optimale Kraftentwicklung ermöglicht. Zudem ist es über Bindungspartner an mechano-chemischen Signalwegen beteiligt (22,23). Des Weiteren ist das für Titin codierende Gen TTN ein wichtiges Krankheitsgen (24).

Die verschiedenen Abschnitte des Sarkomers sind in Abbildung 1 dargestellt. Aufgrund ihrer Verzweigungen sind die Myofilamente im Gegensatz zu denen der Skelettmuskulatur weniger strukturiert (18).

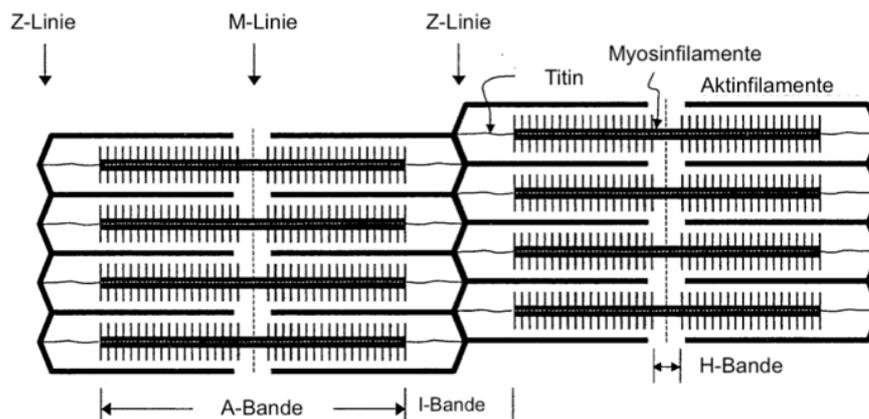


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Sarkomers. Die Abbildung skizziert die unterschiedlichen Abschnitte des Sarkomers auf schematische Weise, modifiziert nach (18).

Eine Besonderheit der meist einkernigen Kardiomyozyten ist, dass sie über Glanzstreifen (disci intercalares), bestehend aus gap junctions (Nexus), Fascia adhaerens und Desmosomen, verbunden sind (25). In Abbildung 2 sind Aufnahmen von Glanzstreifen sichtbar. Die zwei Adhäsionskontakte - Desmosomen und Fascia adhaerens - dienen dabei als mechanische Verbindungen zwischen den Zellen. Im Gegensatz dazu ist die Funktion der gap junctions die Weiterleitung der elektrischen Erregung. Jede Zelle bildet dabei einen Halbkanal (Connexon), der aus sechs membrandurchspannenden Proteinen (Connexinen) besteht. Lagern sich nun zwei Connexone zusammen, entsteht ein Kanal mit einer Pore in der Mitte und verbindet beide Zellen miteinander. Dadurch wird ermöglicht, dass alle Kardiomyozyten in Kontakt stehen und ein funktionelles Synzytium bilden (18,26). Die Plasmamembran

der Muskelzelle, das Sarkolemm, besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht mit Ionenkanälen wie den spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanal (LTCC) oder Transmembranproteinen. Somit sind sie ein wesentlicher Bestandteil der elektromechanischen Kopplung der Herzmuskelzelle. Die transversalen Tubuli (T-Tubuli) stellen Einstülpungen des Sarkolems dar, die stark verzweigt sind und auf Höhe der Z-Linien liegen. Das sarkoplasmatische Retikulum fungiert hauptsächlich zur Speicherung und Freisetzung von Ca^{2+} in das Sarkoplasma. In der Wand des sarkoplasmatischen Retikulums sind Ionenkanäle wie der Ryanodinrezeptor lokalisiert. T-Tubuli und erweiterte Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums, die Terminalzisternen, bilden zusammen Dyaden und stehen in engen Kontakt zueinander (18). Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung des kontraktiven Apparats und der Membranstrukturen der Herzmuskelzelle.

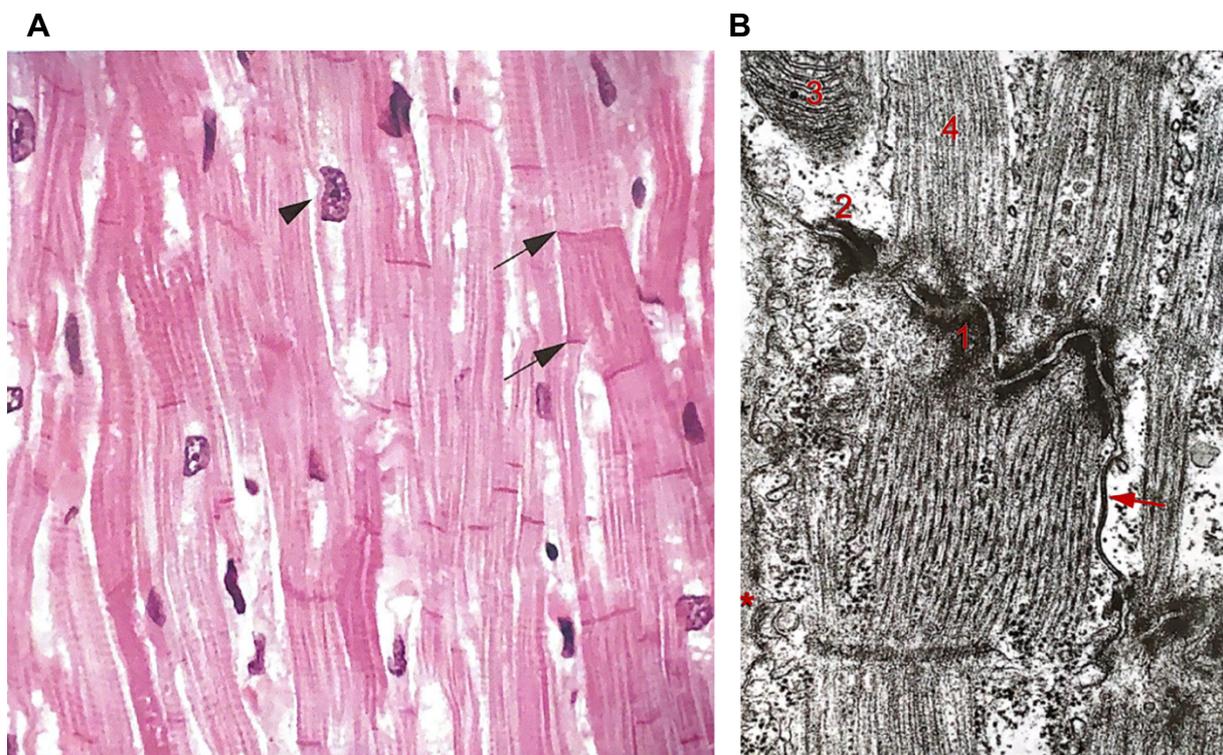


Abbildung 2: Aufnahmen von Glanzstreifen in der Herzmuskulatur.

A: Die Abbildung zeigt ein histologisches Präparat eines kardialen humanen Glanzstreifen in H.E.-Färbung; 300-fache Vergrößerung. ► Zellkerne → Glanzstreifen

B: Die EM-Aufnahme stellt einen Glanzstreifen in der Herzmuskulatur einer Ratte dar. 50.000-fache Vergrößerung 1) Fascia adhaerens; 2) Desmosom; → Nexus; 3) Mitochondrium; 4) Myofibrille;

*Basallamina der Muskelzelle, modifiziert nach (21).

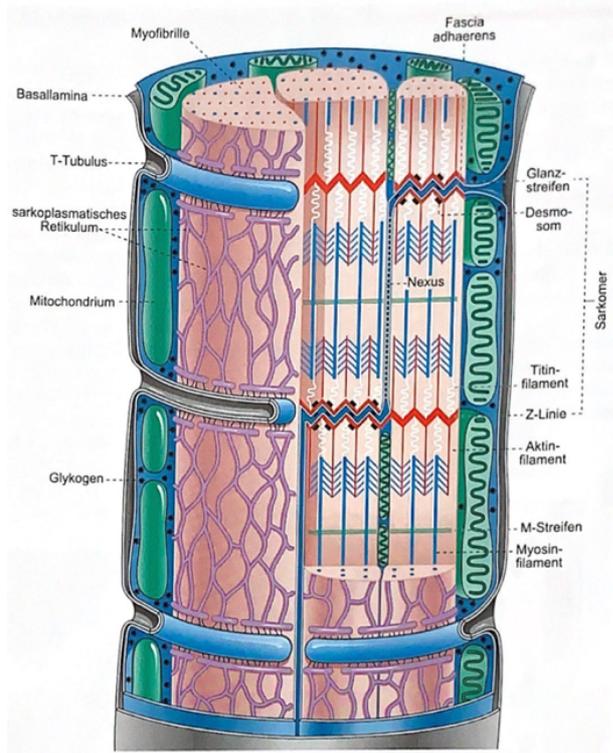


Abbildung 3: Kontraktilem Apparat und Membranstrukturen der Herzmuskelzelle. Die Außenansicht einer Fibrille wird schematisch dargestellt, modifiziert nach (27).

1.3 Physiologische Grundlagen des Herzmuskels

1.3.1 Das Aktionspotential des Arbeitsmyokards

Die Schrittmacherzellen, physiologischerweise der Sinusknoten, erzeugen spontan Aktionspotentiale (AP), die über das atriale Arbeitsmyokard zum atrioventrikulären Knoten (AV-Knoten) und mittels His-Bündel und den Purkinje-Fasern zum ventrikulären Arbeitsmyokard gelangen. Das Aktionspotential des Arbeitsmyokards lässt sich hierbei in fünf Phasen einteilen (18,28).

Phase 4 (Ruhemembranpotential): Das stabile Ruhemembranpotential der atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten liegt bei ca. -80 bis -90 mV. Erreicht wird dies durch die starke Leitfähigkeit der einwärtsgleichrichtenden K^+ -Kanäle. Durch diese können K^+ -Ionen aus der Zelle diffundieren und stabilisieren dadurch das Ruhemembranpotential. Daher liegt das Ruhemembranpotential des Arbeitsmyokards nahe des K^+ -Gleichgewichtspotentials. Wird das AP der Schrittmacherzellen an die Zellen des Arbeitsmyokards weitergeleitet, depolarisieren diese.

Phase 0 (initiale Depolarisation): Durch Membranpotentialänderung werden die spannungsabhängigen K^+ -Kanäle geschlossen und spannungsabhängige Na^+ -Kanäle geöffnet, die einen Na^+ -Einwärtsstrom (I_{Na}) entlang des elektrochemischen Gradienten in die Zelle ermöglichen. Das AP verläuft nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip. Wenn das Schwellenpotential überschritten wird, wird ein AP generiert. Dieser schnelle I_{Na} dauert ca. 1 bis 2 ms, depolarisiert die Zelle auf ca. +30 mV (sog. „overshoot“) und führt zum Schluss der Na^+ -Kanäle. Das Na^+ -Gleichgewicht wird dabei nicht erreicht, da die Na^+ -Kanäle bereits vorher teilweise inaktiviert werden.

Phase 1 (partielle Repolarisation): Infolge eines transienten K^+ -Auswärtsstrom (I_{to}) wird das Membranpotential negativer. Das Membranpotential nähert sich ca. 0 mV, dem Niveau des Plateaus.

Phase 2 (Plateauphase): Durch die Aktivierung von LTCC kommt es zum Ca^{2+} -Einstrom. Das Plateau wird v.a. mithilfe des Ca^{2+} -Einwärtsstrom durch LTCC ($I_{Ca,L}$) und des K^+ -Auswärtsstrom durch spannungsgesteuerte Kaliumkanäle unterschiedlicher Kinetik (I_{Kur} , sehr-schnell (Vorhöfe); I_{Kr} , schnell; I_{Ks} , langsam) erreicht. Das Membranpotential bleibt in dieser Phase annähernd gleich, da der Einwärts- und Auswärtsstrom nahezu ausgeglichen ist.

Phase 3 (Repolarisation): Aufgrund des abnehmenden Ca^{2+} -Einstroms und des zunehmenden K^+ -Ausstroms durch die verzögerten auswärtsgleichrichtenden K^+ -Kanäle wird die Zelle repolarisiert. Zusätzlicher K^+ -Auswärtsstrom durch die einwärtsgleichrichtenden K^+ -Kanäle (I_{K1}) führt zur Stabilisierung des Ruhemembranpotentials (18,29).

1.3.2 Elektromechanische Kopplung des Herzmuskels

Die elektromechanische Kopplung ist die biochemische Grundlage für die Pumpfunktion des Herzens. Sie beschreibt die Umwandlung eines elektrischen Signals, des APs, in eine mechanische Kontraktion des Myokards. Wird die Myokardzelle durch ein AP erregt, gelangen Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellularraum durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in die Zelle.

In den Myozyten unterscheidet man zwei spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle: die LTCC (Dihydropyridin-Rezeptoren) und T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (30–32). Für die elektromechanische Kopplung von Bedeutung sind dabei die LTCC, die v.a. an den T-

Tubuli lokalisiert sind. Der Beitrag der T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle zur elektromechanischen Kopplung ist in den meisten ventrikulären Myozyten zu vernachlässigen. Die intrazellulären Ca^{2+} -Ionen binden an die Ryanodinrezeptor vom Subtyp 2 (kardialer Subtyp) (RyR2) an die Membran des sarkoplasmatischen Retikulums und öffnen diese. Dadurch wird ein Ca^{2+} -Ausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ins Cytosol ausgelöst (18). Dieser Prozess wird als Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung bezeichnet (33,34). Systolisch erhöht sich die freie intrazelluläre cytosolische Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) von ca. 10^{-7} mol/l auf ca. 10^{-5} mol/l (35). Das freie Ca^{2+} kann an das Myofilament Protein C binden. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Tropomyosinkomplexes, sodass Aktin und Myosin nun ungehindert interagieren können und der Querbrückenzyklus stattfinden kann (18,36). Es kommt zur Sarkomerverkürzung und Kontraktion. Fällt die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wieder ab, dissoziiert Ca^{2+} von Troponin C und die Bindungsstelle ist wieder blockiert.

Damit das Herz relaxieren kann, muss das Ca^{2+} wieder aus der Zelle transportiert werden. Dabei sind vier Transportsysteme beteiligt: sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA), sarkolemmaler $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX), sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase und mitochondriale Ca^{2+} -Uniporter (37). SERCA und NCX leisten hierbei den größten Beitrag. Die genauen prozentualen Anteile der Systeme für diesen Ca^{2+} -Transport variieren zwischen verschiedenen Spezies. In humanen Ventrikelzellen liegt der Anteil der SERCA bei 70%, des NCX bei 28% und der gemeinsame Anteil der sarkolemmalen Ca^{2+} -ATPase und des mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter bei ca. 1% (18,38). Die elektromechanische Kopplung ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

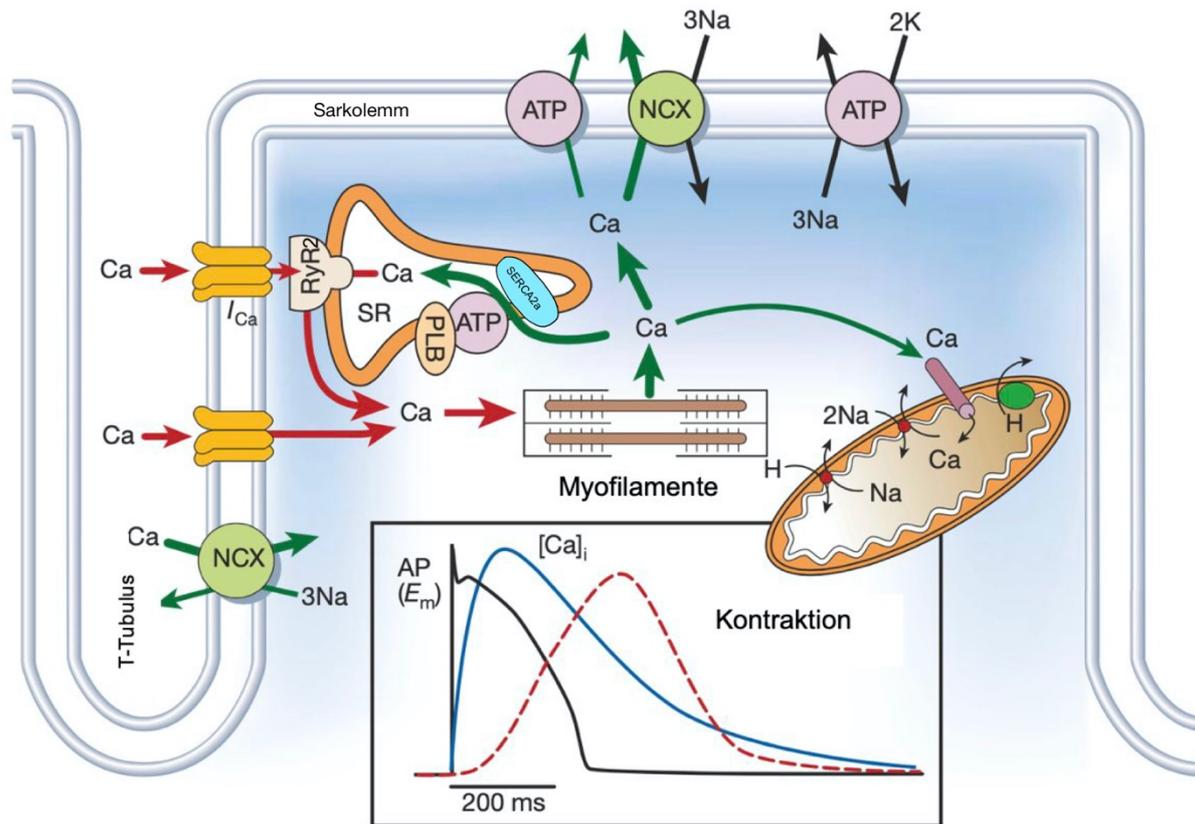


Abbildung 4: Schema der elektromechanischen Kopplung im Herzmuskel. In Folge eines AP strömt während der Plateauphase Ca^{2+} über die LTCC in die Zelle. Das $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induziert mittels RyR2 eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Der Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt zu einer Aktivierung der Myofilamente mit anschließender Kontraktion der Herzmuskelzelle. In dem Kasten ist der zeitliche Verlauf des AP, sowie $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (blaue Kurve) und die Kontraktion (rote Kurve) dargestellt. Während der Diastole kommt es v.a. mittels der hier dargestellten SERCA2a (kardiale SERCA) und NCX zur Senkung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und somit zur Relaxation, modifiziert nach (39).

1.4 Elektrophysiologische Mechanismen zur Entstehung des VHF

Im gesunden Herzen ist der Sinusknoten als Impulsgeber für die Entstehung eines elektrischen Signals verantwortlich, was zu einer regelmäßigen Kontraktion der Vorhöfe und Ventrikel führt. Bei VHF ist eine unkoordinierte Vorhoferregung durch zugrunde liegende Reentry-Mechanismen für eine asynchrone Vorhofkontraktion und somit für eine unregelmäßigen Ventrikelregung ursächlich (40). Die Voraussetzung für die Entstehung von Reentry-Mechanismen ist ein abnormes atriales Substrat, welches durch modifizierte elektrische Eigenschaften oder durch strukturelle Veränderungen, wie z.B. fibrotische Umbauprozesse, entsteht (41). Zur Erklärung der

Reentry-Mechanismen dienen u.a. das Modell des „leading circle“ und der „spiral wave“. Beim „leading circle“-Modell erfolgt ein Reentry in einem Kreis um einen zentralen, kontinuierlich refraktären Kern, während beim „spiral wave“-Modell die Erregung um einen Zentrum aus erregbarem, jedoch noch nicht erregten Gewebe verläuft (42).

1.5 Pathophysiologische Veränderungen bei VHF

1.5.1 Fibrotische Umbauprozesse

VHF führt zu strukturellen Remodeling-Prozessen im Vorhof, wobei hierbei fibrotische Umbauprozesse einen Hauptfaktor darstellen und wesentlich zur Aufrechterhaltung des VHF beitragen. Neben einer Vielzahl regulatorischer Faktoren, die zur Fibroseentstehung führen, sind Angiotensin II und transforming growth factor β (TGF- β 1) hervorzuheben, die die Kollagensynthese durch kardiale Fibroblasten stimulieren. Angiotensin II steigert die Fibrose durch die Expression von profibrotischen Faktoren wie Endothelin-1. TGF- β 1 aktiviert die Kollagensynthese, indem es durch die Rezeptorbindung im Extrazellulärraum Phosphorylierungsprozesse auslöst, die wiederum zur Bildung eines SMAD-Komplexes führen. Dieser reguliert die Expression von Genen, die an der Fibrogenese beteiligt sind. Dies induziert die Produktion eines profibrotischen Proteins, welches wiederum in die Extrazellulärmatrix sezerniert wird. Neben der Stimulation der Kollagensynthese kann TGF- β 1 auch zur Apoptose von Kardiomyozyten führen. Des Weiteren sind auch Mikroribonukleinsäuren über Regulationsmechanismen der Genexpression an der Fibrogenese beteiligt (43). Insgesamt ist die Entstehung einer atrialen Fibrose ein komplexer Prozess, der multifaktoriell verursacht wird und auch neurohumorale und zelluläre Mechanismen beinhaltet (43,44).

Die fibrotischen Veränderungen bleiben jedoch nicht nur auf den Vorhof beschränkt. In einer Studie an Hunden führte die Induktion von VHF durch eine tachykarde atriale Stimulation mit einer schnellen ventrikulären Reaktion zu einer Zunahme der atrialen sowie ventrikulären Fibrose (45). In einer weiteren Studie wurde ebenfalls in einem Hundemodell eine tachykarde atriale Stimulation angelegt und gleichzeitig mit Digoxin und Metoprolol behandelt, um die ventrikuläre Frequenz auf <180 bpm zu halten und die Auswirkungen von HI zu begrenzen (46). Nach 6 Monaten VHF-Simulation nahm

die Fibrose in den Vorhöfen sowie Ventrikeln zu. In derselben Studie wurde VHF auch bei Ziegen und Schweinen mittels einer schnellen atrialen Stimulation ausgelöst. Das Ziegenmodell zeigte nur eine Zunahme der Vorhoffibrose und das Schweinemodell stellte sich als nicht geeignet dar, da durch Abkapselung der Schrittmacherelektroden keine chronische VHF-Stimulation erreicht werden konnte (46).

Neben Tiermodellen wurden auch Studien an Patienten zu ventrikulären myokardialen Veränderungen bei VHF durchgeführt. In einer Studie von Ling et al. wurden Patienten mit VHF mithilfe einer kardialen Magnetresonanztomographie (Kardio-MRT) auf diffuse ventrikuläre Fibrose im linken Ventrikel (LV) untersucht. Es wurden insgesamt 90 Patienten eingeschlossen. Dabei gab es eine VHF-Gruppe mit Patienten, die an symptomatischen paroxysmalen oder persistierenden VHF erkrankt waren und die gegen mindestens ein Antiarrhythmikum resistent waren bzw. es nicht vertragen haben. Als Kontrollgruppe diente eine gesunde Patientenkohorte. Patienten mit persistierenden VHF hatten eine signifikant niedrigere Ejektionsfraktion (EF) als die gesunde Kontrollgruppe und die Patienten mit paroxysmalen VHF ($p < 0,05$). Es konnte beobachtet werden, dass VHF zusammen mit fortschreitendem Lebensalter und abnehmender LVEF unabhängig voneinander mit einer zunehmenden diffusen Fibrose einhergeht. Als wichtigstes Resultat der Studie wiesen die bildgebende Daten der untersuchten Patienten somit daraufhin, dass VHF mit einer fortschreitenden diffusen Fibrose im LV verbunden ist (47).

In der Studie von Pabel et al. wurde histologisch die Entstehung einer Fibrose als mögliche Auswirkung von normofrequenten VHF auf den humanen Ventrikel untersucht. Dabei wurde LV-Myokard von Patienten mit Aortenstenose (AS) und erhaltener LV-Funktion mit SR bzw. normofrequenten VHF verwendet. Es war kein statistischer Unterschied in der Fibrose bei Patienten mit VHF im Vergleich zu Patienten mit erhaltenen SR vorzufinden (48). Da hier jedoch im Gegensatz zu den vorherigen erwähnten Studien die Patienten an normofrequenten VHF erkrankt waren, könnte möglicherweise eher die tachykarde Komponente des VHF eine Rolle bei der Entwicklung der Fibrose spielen.

1.5.2 Molekulare und zelluläre Veränderungen bei VHF

Als oxidativer Stress wird das Ungleichgewicht zwischen der Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS, engl. *reactive oxygen species*) und den zellulären Abwehrmechanismen bezeichnet (49). ROS werden physiologischerweise gebildet und dienen als second messenger in diversen Signalwegen. Zur ROS-Gruppe gehören einerseits freie Radikale wie das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) oder das Hydroxyl-Radikal ($HO\cdot$), andererseits nicht-radikalische Verbindungen wie z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2), die zur Produktion von freien Radikalen in der Lage sind. ROS-Radikale können Oxidationsprozesse auslösen und zu Schäden in der DNA, Membranen oder Proteinen führen. Antioxidative Systeme wie Glutathion-Peroxidasen und NADH/NAD⁺ können die ROS inaktivieren. Sie wirken somit als „Radikalfänger“ und sind essenziell für die Erhaltung der zellulären Homöostase (50). Wird die physiologische Menge an ROS überschritten, entsteht oxidativer Stress. Dieser wird durch die Tachyarrhythmie bei VHF erzeugt und trägt entscheidend zur Entstehung sowie Aufrechterhaltung von VHF bei (6).

Bislang sind die Auswirkungen von VHF auf zellulärer Ebene hauptsächlich im Tiermodell untersucht. So wurden in einer Studie von Ling et al. ventrikuläre Rattenkardiomyozyten verwendet und unter elektrischen Feldstimulation von 120 bpm für 24 h arrhythmisch bzw. in der Kontrollgruppe rhythmisch stimuliert. Neben den Rattenkardiomyozyten wurden in dieser Studie auch humanes LV-Myokard untersucht, welches im Rahmen von Herztransplantationen bei Patienten mit terminaler HI mit einer LV-Funktion <35% gewonnen wurde. Dabei wurden 6 Patienten mit VHF und 6 Patienten als Kontrollgruppe mit SR eingeschlossen. Sowohl in den humanen LV-Myokardproben mit VHF als auch in den arrhythmisch stimulierten Ventrikelzellen der Ratten war festzustellen, dass die SERCA-mRNA und Proteinkonzentrationen signifikant verringert waren und es zu einer signifikanten Abnahme der Phosphorylierung von Phospholamban (PLB) im Vergleich zur Kontrollgruppe kam. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde der Ca^{2+} -Haushalt der Rattenkardiomyozyten analysiert. Die arrhythmisch stimulierten Zellen wiesen eine 59%ige Reduktion der Ca^{2+} -Transientenamplitude und eine erhöhte time-to-peak auf. Die Arrhythmie scheint also einen deutlichen Einfluss auf die Expression und die Aktivität der im Ca^{2+} -Haushalt beteiligten Proteine zu haben (51).

In der bereits zitierten Studie von Pabel et al. zur Auswirkung von normofrequenten VHF auf den Ventrikel wurden auch die Rolle von oxidativem Stress sowie das elektrische Remodeling untersucht. Die LV-Proben von AS-Patienten mit erhaltender LV-Funktion und VHF zeigten im Vergleich zu denen mit SR reduzierte systolische Ca^{2+} -Transienten, während das diastolische Ca^{2+} und die Ca^{2+} -Transientenkinetik nicht verändert waren. Zudem war bei den Patienten mit VHF eine gesteigerte ROS-Produktion nachweisbar. Durch den oxidativen Stress wurde die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) vermehrt oxidiert, was zu einer erhöhten CaMKII-Aktivität und somit zu einer erhöhten RyR2-Phosphorylierung führte. Eine Hyperphosphorylierung von RyR2 induzierte eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals, was wiederum eine Erklärung für das beobachtete erhöhte diastolische Ca^{2+} -Leck sein könnte.

Um die Erkenntnisse der primären Humanzellen zu verifizieren, wurden humane ventrikuläre induzierte pluripotente stammzellabgeleitete Kardiomyozyten (iPSC-KM) 7 d lang arrhythmisch (VHF-Simulation) bzw. rhythmisch (Kontrollgruppe) stimuliert. Auch hier zeigten die arrhythmisch stimulierten iPSC-KM reduzierte systolische Ca^{2+} -Transienten.

Des Weiteren wurden bei den iPSC-KM, die einer 7-tägigen VHF-Simulation unterlagen, ROS durch den „Radikalfänger“ N-Acetylcystein inhibiert und die CaMKII-Aktivität inhibiert. Dies führte zu einer Normalisierung des Ca^{2+} -Haushalts.

Zusätzlich konnte bei den iPSC-KM nach arrhythmischer Stimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe eine reduzierte Ca^{2+} -Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums und ein erhöhtes Auftreten diastolischer Ca^{2+} -Sparks beobachtet werden. Des Weiteren wurde eine reduzierte Funktion und Expression des SERCA2a-Proteins festgestellt (48). Das erhöhte diastolische Ca^{2+} -Leck sowie die reduzierte SERCA2a-Expression könnten ein Erklärungsansatz für die reduzierte systolische Ca^{2+} -Transientenamplitude sein (52).

Somit scheinen die durch den oxidativen Stress bedingte Aktivierung der CaMKII sowie die beeinträchtigte Ca^{2+} -Homöostase eine wesentliche Rolle bei der Störung der elektromechanischen Kopplung im Ventrikel bei VHF einzunehmen.

Zusammenfassend wurden Veränderungen bei VHF im atrialen Myokard bereits intensiv untersucht. Im Kontrast dazu ist die Studienlage zu den Auswirkungen von

VHF auf den Ventrikel spärlich. Jedoch können die beschriebenen Veränderungen im Ventrikel für die beeinträchtigte kontraktile LV-Funktion bei VHF mitursächlich sein.

1.6 Ziele und Fragestellungen der Dissertation

Die Studienlage zu den Auswirkungen von VHF auf den Ventrikel ist limitiert und es besteht weiterer Forschungsbedarf, um festzustellen, wie die Rhythmusstörung zur LVSD und somit zu einer Verschlechterung der Prognose bei Patienten, bei denen eine Koexistenz von VHF und LVSD besteht, führt. Aufgrund der klinischen Relevanz des VHF ist es von Bedeutung, die Effekte von VHF auf den Ventrikel besser zu verstehen, um diese möglicherweise auch in den klinischen Alltag in Hinblick auf angepasste Therapiestrategien zu übertragen. Das Ziel der Dissertation war es, angelehnt an die Resultate der CASTLE-AF Studie, die Relevanz unterschiedlicher VHF-Lasten auf zellulärer Ebene zu untersuchen, um einen möglichen Erklärungsansatz für die klinische Beobachtung, dass erhöhte VHF-Lasten mit einer Verschlechterung des klinischen Outcomes assoziiert sind, aufzudecken. Daher wurden in einem „back to bench“-Ansatz die iPSC-KM einer VHF-Simulation mit verschiedenen VHF-Lasten ausgesetzt und im Anschluss der Ca^{2+} -Haushalt und die Sarkomerorganisation durch Immunfluoreszenzfärbungen von α -Actinin und Titin analysiert. Die Hypothese lautete, dass iPSC-KM bei einer VHF-Last von $>50\%$ im Vergleich zu Zellen, die mit einer VHF-Last $<50\%$ stimuliert wurden, ein elektrisches und strukturelles Remodeling aufweisen.

Entsprechend ergeben sich folgende Fragestellungen in diesem Zusammenhang:

1. Wie ändert sich der Ca^{2+} -Haushalt bei verschiedenen VHF-Lasten?
2. Wie ändert sich die Sarkomerorganisation bei verschiedenen VHF-Lasten?
3. Kann der in der Subanalyse der CASTLE-AF Studie klinische Cut-Off Wert von 50% der VHF-Last in einem „back to bench“-Ansatz bestätigt werden?
4. Spielt die zeitliche Dauer der VHF-Simulation eine Rolle, d.h. unterscheiden sich die Ergebnisse abhängig von der Stimulationsdauer (48 h Simulation vs. 7 d Simulation)?

2 Methoden

2.1 Verwendete Medien und Substanzen

In den folgenden Tabellen findet sich eine Zusammenstellung der verwendeten Medien bzw. Substanzen. Zum Schutz vor Kontamination wurden diese steril unter der Werkbank hergestellt.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Grundsubstanzen

Substanz	Menge	Hersteller
0,25% Trypsin-EDTA	100 mL	Gibco™
Dimethylsulfoxid (DMSO)	100 mL	Carl Roth
0,1% Gelatine aus Schweinehaut, Gelstärke 300, Typ A	Je 100 mL H ₂ O 0,1 g Gelatine	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	500 g	VWR Chemicals
HEPES	1 kg	Carl Roth
Kaliumchlorid (KCl)	500 g	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	100 g	Carl Roth
Glucose	1 kg	Carl Roth
Calciumchlorid (CaCl ₂)	250 mL	Sigma

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Medien

Lösung	Substanz	Menge	Hersteller
Kulturmedium	RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement, HEPES	500 mL	Gibco™
	B27 Supplement	10 mL	Gibco™
Verdaumedium	Kulturmedium	40 mL	
	Fetales Rinderserum (FBS), 20% final	10 mL	Gibco™
	Thiazovivin (10 mg in 16,06 mL DMSO gelöst)	50 µL	Merck

Tabelle 3: Zusammensetzung der Messtyrode für iPSC-KM, pH 7,40 bei Raumtemperatur

Reagenzien		10 fach Stocklösung		1 fach Lösung
	Molare Masse [g/mol]	Konzentration [mmol/L]	Menge [g]	Menge [g]
NaCl	58,44	140	81,82	8,182
HEPES	238,31	10	23,83	2,383
KCl	74,56	4	2,98	0,298
MgCl₂	95,21	1	0,95	0,095
Glucose	180,16	10		1,802
			Auf 1000 mL mit ddH ₂ O auffüllen	100 mL 10 fach Stock ad 1000 mL ddH ₂ O
			pH Wert mit NaOH auf ca. 7,0 einstellen	pH Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen
CaCl ₂	238,31	1,25		1,25 µl 1M CaCl ₂ pro mL

Tabelle 4: Zusammensetzung der Farbstofflösung für die Epifluoreszenzmessung

Reagenzien	Menge	Hersteller
Fura-2, AM	1 Cup (50 µg) in 44,4 µL DMSO gelöst	Invitrogen
Messtyrode	1000 µL	

Tabelle 5: Lösungen für die Immunfluoreszenzfärbung

Lösung	Substanz	Menge	Hersteller
BD Cytotfix/ Cytoperm™	Fixierlösung	125 mL	Thermo Fisher
Fixation/ Permeabilization Solution	FBS	Konzentriert in 10 Ampullen	Scientific
Kit	Saponin	100 mL	
	Waschpuffer	125 mL	
	Fluoromount-G mit DAPI	25 mL	Invitrogen

Tabelle 6: Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

Antikörper- Lösungen	Name	Verdünnung	Spezies	Hersteller
Primäre Antikörper- Lösungen	Monoklonales anti- α-Actinin in Maus hergestellte AK (IgG1)	1:500 in Waschpuffer gelöst	Maus	Sigma Aldrich
	Titin M8/M9 (polyklonal, IgG)	1:500 in Waschpuffer gelöst	Kaninchen	Myomedix
Sekundäre Antikörper- Lösungen	Donkey-anti-mouse IgG (H+L), AlexaFluor568	1:500 in Waschpuffer gelöst	Esel	Invitrogen
	Goat-anti-rabbit IgG (H+L), AlexaFluor488	1:500 in Waschpuffer gelöst	Ziege	Invitrogen

2.2 Isolation von iPSC-KM

2.2.1 Gewinnung von iPSC-KM

Zur Durchführung der Versuche wurden iPSC-KM verwendet. Diese wurden in Göttingen in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Katrin Streckfuß-Bömeke generiert und anhand eines etablierten Shuttlesystems nach Regensburg transferiert. Der Vorteil der iPSC-KM besteht in der langen Kultivierbarkeit der Zellen (53,54). Dadurch können beispielsweise die Auswirkungen von Arrhythmien über einen längeren Zeitraum analysiert werden. In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die iPSC-KM hinsichtlich ihrer molekularen und elektrophysiologischen Eigenschaften vergleichbar mit adulten Kardiomyozyten sind. Dies ermöglicht es, iPSC-KM-Modelle zur Untersuchung von kardialen Erkrankungen in vitro zu nutzen (53,54). Zur Herstellung der iPSC-KM wurden zunächst u.a. Hautfibroblasten von ausgewählten Spendern ohne vorbekannte kardiovaskuläre Erkrankung anhand eines nicht-integrativen Sendaivirussystems durch Überexpression von Transkriptionsfaktoren wie Oct3/4, Klf4, Sox2 und c-Myc umprogrammiert (55–58). Die Differenzierung der iPSC-KM in Kardiomyozyten erfolgte durch Wnt-Modulation sowie darauffolgender metabolischer Selektion (59,60). Nach der Differenzierung sind die iPSC-KM durch Expression von kardialen Markern wie kardiales Troponin T oder α -Actinin charakterisiert (57,61). Vor der Entnahme der Gewebeproben musste ein schriftliches Einverständnis der Spender vorliegen. Die lokale Ethikkommission der Universität Göttingen genehmigte die Gewebeentnahme und Generierung der iPSC-KM (10/9/15, 21/1/11). Zudem erfolgte eine entsprechende ethische Beaufsichtigung der Studie. Es wurden für die Versuche Zellen von mindestens 5 kardialen Differenzierungen (insgesamt 13 verschiedenen kardiale Differenzierungen) verwendet.

2.2.2 Verdau von iPSC-KM

Nach Erhalt wurden die Zellen unter dem Mikroskop hinsichtlich morphologischer Maßstäbe kontrolliert. Zum Schutz vor Kontamination erfolgten alle Arbeiten mit iPSC-KM steril unter der Werkbank. Zunächst wurden die in den T25-Flaschen befindlichen Zellen mittels Zugabe von 2 ml Trypsin für einige Minuten bei 37°C im Brutschrank verdaut. Nach Abstoppen der Reaktion mit 2 ml Verdaumedium wurde die Zellsuspension für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Zum Ausplattieren der iPSC-KM wurde auf 6-Well-Platten je Dish 1 mL der 0,1%igen Gelatine hinzugegeben. Auf die mit Gelatine beschichteten 6-Well-Platten wurde pro Dish 1,5 mL Verdaumedium hinzugefügt. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet resuspendiert. Zur Kontrolle wurde die Anzahl der Zellen in einer Neubauer Improved-Zählkammer am Mikroskop bestimmt. Entsprachen die Zellen den qualitativen und quantitativen Ansprüchen, wurden diese auf die vorbereiteten 6-Well-Platten ausplattiert und in den Inkubator überführt (37°C, 5% CO₂). Pro Dish wurden ca. 30.000 Zellen ausplattiert. Nach zwei Tagen erfolgte der Medienwechsel auf das Kulturmedium unter Hinzugabe von 1,5 mL pro Dish. Der Medienwechsel wurde drei Mal wöchentlich (Montag, Mittwoch, Freitag) durchgeführt.

2.2.3 Stimulation von iPSC-KM

Die iPSC-KM wurden mit Hilfe des C-Pace EM System der Firma Ion Optix stimuliert. Durch eine Verbindung des Stimulationssystems mit einem C-Dish Elektrodensystem konnte eine Stimulation der Zellen in den 6-Well-Platten sichergestellt werden. Mittels Multimode-Mehrkanal-Stimulators konnten verschiedene Stimulationsarten programmiert werden, wodurch z.B. Arrhythmien nachgestellt wurden. Durch lichtmikroskopische Kontrolle wurde die suffiziente Stimulation der iPSC-KM sichergestellt. Die Versuche wurden ca. 90 d nach Beginn der Differenzierung der iPSC-KM durchgeführt. Um die Auswirkungen verschiedener VHF-Lasten auf die zelluläre ventrikuläre Elektrophysiologie zu untersuchen, wurden die iPSC-KM in vier Gruppen eingeteilt. Alle Gruppen wurden jeweils für 48 h und 7 d mit einer Frequenz von 90 Schlägen pro Minute (bpm, engl. *beats per minute*) stimuliert. Um die Beobachtungen aus der CASTLE-AF Studie nachvollziehen zu können, wurde ein

VHF-Simulationsmodell etabliert, bei der die Arrhythmiebelastung bei je zwei Gruppen unter bzw. über dem klinisch relevanten Cut-Off-Wert von 50% lag. Gruppe 1 hatte als Kontrollgruppe keine Arrhythmiekomponente (SR-Gruppe), Gruppe 2 eine VHF-Last von 30% (geringe VHF-Last), Gruppe 3 von 60% (hohe VHF-Last) und Gruppe 4 von 90% (sehr hohe VHF-Last). Entsprechend des Stimulationsprotokolls wurde Gruppe 1 durchgehend rhythmisch stimuliert, Gruppe 2 42 min rhythmisch und 18 min arrhythmisch, Gruppe 3 24 min rhythmisch und 36 min arrhythmisch und Gruppe 4 6 min rhythmisch und 54 min arrhythmisch. Nach einer Stunde wiederholte sich das Stimulationsprotokoll von vorne. Das Protokoll zur Simulation der arrhythmischen Komponente wurde basierend auf 20 EKGs von Patienten mit VHF etabliert. In den arrhythmisch stimulierten Gruppen lag die Frequenzvariabilität jeweils bei 40%. Eine grafische Darstellung der iPSC-KM Simulation ist in Abbildung 5 dargestellt.

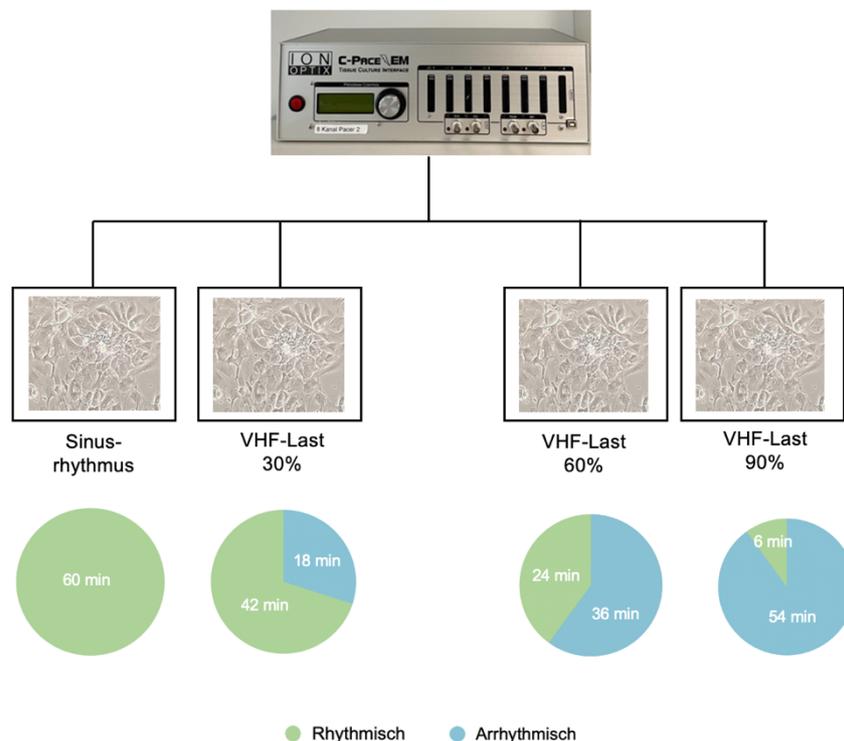


Abbildung 5: Übersicht der iPSC-KM Simulation. Die 4 verschiedenen Gruppen wurden 48 h und 7 d mit einer unterschiedlichen VHF-Last stimuliert. Die Stimulationsfrequenz lag bei allen Gruppen bei 90 bpm, die Frequenzvariabilität während der arrhythmischen Stimulationsphasen betrug 40%.

2.3 Fluoreszenzmikroskopie

2.3.1 Grundlagen der fluoreszenzmikroskopischen Messung

Die Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Verwendung von Farbstoffen mit fluoreszierenden Eigenschaften. Wenn diese Farbstoffe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden (sog. Anregungslicht), emittieren sie spontan innerhalb von Nanosekunden nach der Absorption Licht einer anderen Wellenlänge (sog. Emissionslicht). In der Regel ist dabei das Anregungslicht energiereicher (kurzwelliger) und das Emissionslicht energieärmer (langwelliger). Die strukturelle Voraussetzung der Fluoreszenzfarbstoffe sind aromatische Ringstrukturen mit delokalisierten Elektronen, die mit der Umgebung in Wechselwirkungen treten können. Da die Energieunterschiede zwischen Grund- und Anregungszustand bei diesen Verbindungen sehr klein sind, reichen für die Anregung niederenergetische Photonen im sichtbaren Teil des elektromagnetischen Spektrums aus. Je mehr konjugierte Bindungen in einem Molekül vorhanden sind, desto geringer ist die Anregungsenergie und desto langwelliger kann das Anregungslicht sein (62).

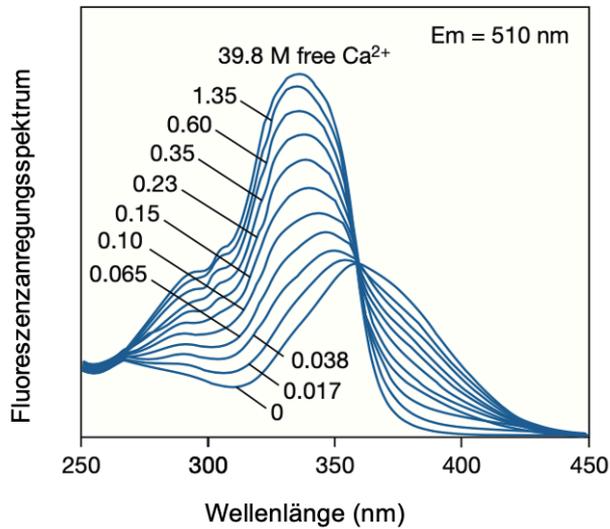
Moleküle mit fluoreszierenden Eigenschaften werden Fluorophore genannt. Bei Anregung durch Licht können Fluorophore Photonen absorbieren, wodurch Elektronen auf ein höheres Energieniveau gelangen. Sie werden also von ihrem Grundzustand in ein energetisch höheres Energieniveau überführt. Dieser Anregungsprozess erfolgt in einer Zeitspanne von Femtosekunden (62). Da der erregte Zustand jedoch instabil ist und stets ein stabilerer niederenergetischer Zustand angestrebt wird, fallen die Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Dabei wird die absorbierte Energie nun in Form des Emissionslicht freigesetzt. Das Emissionslicht ist jedoch energieärmer als das Anregungslicht, da nicht die gesamte Energie in Form von Lichtenergie wieder abgegeben wird. Dieses Phänomen der Verschiebung der Wellenlänge zwischen Absorption und Emission wird als Stokes-Shift bezeichnet (63). Mithilfe eines geeigneten Set-Ups wird das Anregungslicht vollständig herausgefiltert und es kann das reine Emissionslicht gemessen werden (62).

2.3.2 Fluoreszenzfarbstoffe

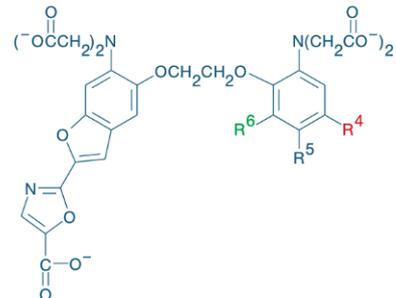
Das Prinzip von Ca^{2+} -empfindlichen Farbstoffen als Ca^{2+} -Indikatoren beruht auf der Fähigkeit, dass ihre Fluoreszenzintensität abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration ist und somit Ca^{2+} -Veränderungen detektiert werden können (64). Bei den verwendeten Doppelwellenlängen-Indikatoren (ratiometrische Ca^{2+} -Indikatoren) kommt es zu einer Verschiebung der Anregungswellenlänge (z.B. Fura-2) oder der Emissionswellenlänge (z.B. Indo-1) (65). Der Vorteil der ratiometrischen Farbstoffe liegt darin, dass diese durch die Verhältnisbildung der zwei Fluoreszenzsignale die Auswirkungen ungleichmäßiger Farbstoffbeladung, des Auslaufens von Farbstoff und Unterschiede in der Zelldicke sowie des Photo-Ausbleichens ausgleichen und sich somit gut zur Messung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eignen (73,74). Die Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (66,67).

Für die Messungen dieser Arbeit wurde der ratiometrische Farbstoff Fura-2, AM verwendet, der mit Licht der Wellenlängen 340/380 nm angeregt wurde. Dabei erfolgte die Anregung von Ca^{2+} -gesättigtem Fura bei 380 nm bzw. von Ca^{2+} -freiem Fura bei 340 nm. Die Emission war bei 510 nm unverändert. In Abbildung 6 ist das Fluoreszenzanregungsspektrum von Fura-2 in Bezug zu der entsprechenden Ca^{2+} -Konzentrationen, die Strukturformel des Farbstoffs sowie die Summenformeln der Analoga dargestellt.

A



B



Indicator	$K_d(\text{Ca}^{2+})$	R ⁴	R ⁵	R ⁶
Fura-2	0.14 M	H	CH ₃	H
Fura-5F	0.40 M	H	F	H
Fura-4F	0.77 M	F	H	H
Fura-6F	5.30 M	H	H	F
Fura-FF	5.50 M	H	F	F

Abbildung 6: Fluoreszenzanregungsspektrum von Fura-2 in Lösung (A) und Strukturformel von Fura-2 und Summenformeln der Analoga (B).

A: Die Abbildung zeigt das Fluoreszenzanregungsspektrum von Fura-2 in Lösung. Die Emission (E_m) liegt bei 510 nm. Die Zahlen an den Kurven stehen für die jeweilige freie Ca^{2+} -Konzentration (0 - 39,8) in μM . Auf der X-Achse des Diagramms ist die Wellenlänge in nm angegeben. Die Y-Achse gibt die Intensität der Fluoreszenzanregung an.

B: Dargestellt sind die Strukturformel von Fura-2 und die Summenformeln der Analoga, modifiziert nach (68).

Zur Berechnung der Ca^{2+} -Konzentration wurde das Verhältnis der bei den beiden verschiedenen Anregungswellenlängen emittierten Fluoreszenz verwendet, indem die beiden Fluoreszenzintensitäten nach Anregung bei 340 nm und 380 nm miteinander verglichen wurden. Der Zusammenhang zwischen den ermittelten Ratiowerten und der Ca^{2+} -Konzentration wurde von Grynkiewicz durch folgende Formel erstmals beschrieben (66):

Formel 1: Formel nach Grynkiewicz:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \times \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right)$$

- R berechneter Ratiowert der aufgenommenen Fluoreszenzintensität (für Fura-2 bei $\lambda_{\text{EX}} = 340\text{nm}/380\text{ nm}$)
- R_{\min} Ratiowert der Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{EX}} = 340\text{nm}/380\text{ nm}$) im Ca^{2+} - freien Zustand ($[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-9}\text{ M}$)
- R_{\max} Ratiowert der Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{EX}} = 340\text{nm}/380\text{ nm}$) im Ca^{2+} - gebundenen Zustand ($[\text{Ca}^{2+}] \geq 10^{-4}\text{ M}$)
- K_d Dissoziationskonstante von Fura-2
- S_{f2} Fluoreszenzintensität bei Anregung mit der im Nenner stehenden Wellenlänge (380 nm) im Ca^{2+} - freien Zustand
- S_{b2} Fluoreszenzintensität bei Anregung mit der im Nenner stehenden Wellenlänge (380 nm) im Ca^{2+} - gebundenen Zustand
- (66)

Bei R_{\min} und R_{\max} handelt es sich um experimentell bestimmte Werte, die für das jeweilige Versuchsmodell erhoben werden. $\frac{S_{f2}}{S_{b2}}$ ist ein Korrekturfaktor, der die Auswirkungen von Geräteparametern und Versuchsbedingungen auf den Fluoreszenzfarbstoff mitberücksichtigt (69).

Die Dissoziationskonstante (K_d) von Fura-2 in Kardiomyozyten beträgt 312 nmol/L (70). Somit liegt der übliche Ruhegehalt von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ deutlich unter der Halbsättigung des Farbstoffs und die Messgenauigkeit daher im Bereich von 1-10 μM (71). Es sind Messungen im nanomolaren Bereich möglich, da Fura-2 bereits in geringen Konzentrationen von 10-50 $\mu\text{mol/L}$ Fluoreszenzsignale emittiert. Aufgrund der Kinetik liegt die maximale zeitliche Auflösung einer intrazellulären Ca^{2+} -Messung bei ca. 5 ms (64,71).

Fura-2 besitzt vier negativ geladene Carboxygruppen, die mit einem Ca^{2+} -Ion einen Chelatkomplex bilden, wodurch sich die spektralen Eigenschaften des Fura-2 verändern (64). Die entsprechende Strukturformel ist in Abbildung 6 sichtbar. In seiner gelösten Form ist aufgrund der Ladung und Polarität kein Durchtritt durch die lipophilen Zellmembranen möglich. Durch Veresterung der Carboxygruppen zu einem Acetoxymethylester (AM) kann das Fura-Derivat nun die Zellmembran diffundieren. In der Zelle werden die Esterbindungen durch cytosolische Esterasen gespalten. Der Farbstoff liegt nun als Salz vor und kann die Zelle nicht mehr passieren (65,67).

2.3.3 Epifluoreszenzmikroskop

Durch Messungen am Epifluoreszenzmikroskop konnten Änderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ermittelt werden. Verwendet wurde ein invertiertes Epifluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE2000-U mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektionssystem der Firma IonOptix Corp, wodurch unter Feldstimulation die Ca^{2+} -Transienten und -Kinetik sowie die diastolische Ca^{2+} -Konzentration untersucht werden konnten.

2.3.3.1 Versuchsaufbau

Als Setup wurde das invertierte Epifluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE2000-U mit einem 40-fach vergrößernden Ölimmersionsobjektiv der Firma Ion Optix verwendet. Als Lichtquelle diente das HyperSwitch Dual Excitation Light Source mit einer 75-W-Xenon-Lampe. Bei dualen Anregungsindikatorfarbstoffen wie Fura-2, AM muss die Anregungslichtquelle mit hoher Geschwindigkeit adäquat zwischen den zwei Anregungswellenlängen wechseln. Die Wellenlängenumschaltung erfolgt in weniger als 1 ms und ermöglicht bis zu 250 Wellenlängenpaare pro Sekunde (72).

Dabei wurde das Licht auf einen galvanometrischen Spiegel gelenkt, der zwischen zwei getrennten Pfaden wechselt. In Pfad 1 (Abbildung 7, blauer Pfeil) wurde das nun divergierende Xenonlicht von einer Quarzlinse gesammelt und dann in den „Seiteneingang“ des Excitation Dichroic Cube (EDC) geleitet. In Pfad 2 (Abbildung 7, grüner Pfeil) sammelte eine zweite Linse das Xenon-Licht vor Eintritt in den „Vordereingang“ des EDC. An jedem Eingang des EDC wurde die adäquate Wellenlänge gefiltert. Ein dichroitischer Spiegel im EDC leitete das gefilterte Licht von

Pfad 2 zum „Hinterausgang“ des EDC und reflektierte das gefilterte Licht von Pfad 1 an denselben Ausgang. Gemeinsam wurde der Lichtstrahl nun auf das Ende des Flüssigkeitslichtleiters fokussiert, welches mit dem Mikroskop gekoppelt war. Das Licht wurde weiter auf einen dichroitischen Spiegel geleitet, welcher zwischen Anregungs- und Emissionsspektrum des Farbstoffs unterschied. Dadurch wurde das kurzwellige Anregungslicht reflektiert und durch das Objektiv auf das zu beleuchtende Präparat geleitet, worauf dieses zu fluoreszieren begann. Das langwelligere Emissionslicht des Farbstoffs konnte dagegen den Spiegel passieren und wurde zum Photomultiplier geleitet. Dem Photomultiplier war ein Filter mit der Wellenlänge des entsprechenden Emissionsmaximum von Fura-2, AM bei 510 nm vorgeschaltet, dieser konvertierte das optische Ca^{2+} -Fluoreszenzsignal in ein elektrisches Signal (72,73). Der Analog-Digital-Wandler (Fluoreszenz System Interface, Ion Optix Milton, USA) wandelte das elektrische Signal in für den Computer verwertbare Daten um, welche dann digital mittels IonWizard Software 6.4 (Ion Optix) dargestellt werden konnten (74). Während der Messungen wurden die iPSC-KM mithilfe des Myopacers Field Stimulator (Ion Optix, USA) stimuliert (73). Zur Stimulation wurde hierbei eine Einstellung von 20 V und 2 ms verwendet.

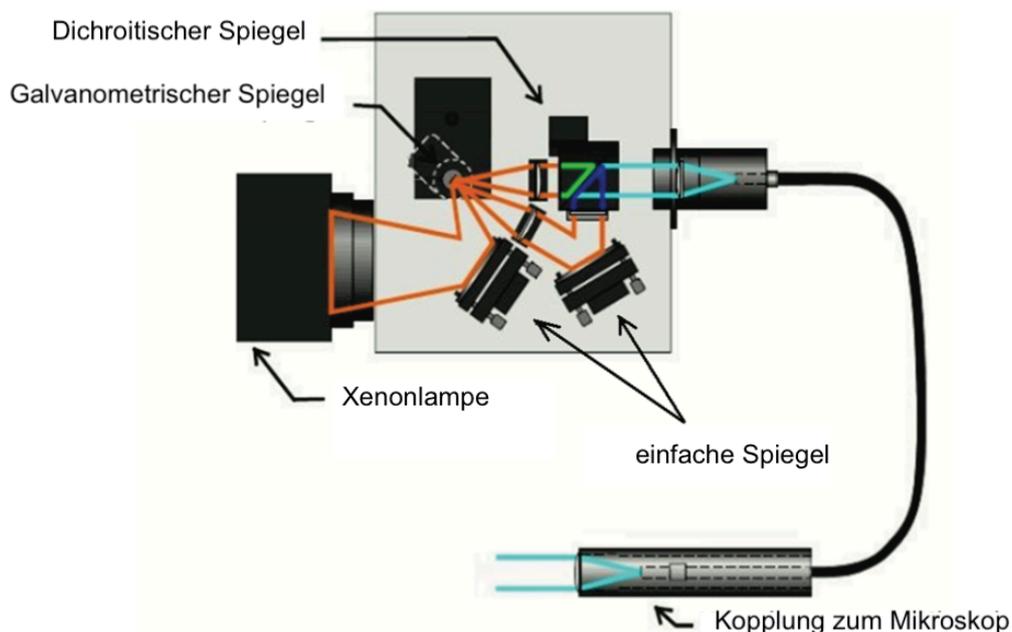


Abbildung 7: Optischer Pfad und die Komponenten des Hyperswitch Dual Excitation Light Source, modifiziert nach (75).

2.3.3.2 Versuchsdurchführung

Zur Herstellung der Farbstofflösung wurde lichtgeschützt 1 Cup (50 µg) des gefrorenen Fura-2, AM in 44,4 µL DMSO gelöst und 1000 µL der Messtyrode hinzugefügt. Daraufhin wurden die iPSC-KM mit 1000 µL der Farbstofflösung für 15 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Farbstofflösung abgenommen und durch 1500 µL der Messtyrode ersetzt. Es folgte eine weitere Inkubationszeit von 15 Minuten. Nach Montage des Dishes auf den Objektisch des Epifluoreszenzmikroskops wurden die iPSC-KM mit zwei unterschiedlichen Frequenzen während der Messungen von 30 bpm und 60 bpm stimuliert. Nach Abschluss der Messung einer Zelle wurde die Hintergrundfluoreszenz miterfasst.

2.3.3.3 Auswertung

Die Analyse der Daten erfolgte mithilfe der Software IonWizard 6.4 (Ion Optix).

Die Bestimmung der Ca²⁺-Konzentration erfolgte anhand der Berechnung der Ratio der emittierten Fluoreszenzsignale nach alternierender Anregung bei 340 und 380 nm. Wie in 2.3.2 in Formel 1 dargestellt, wurde mit Hilfe der Formel nach Grynkiewicz die Ca²⁺-Konzentration bestimmt.

Um die Veränderung der Ca²⁺-Konzentration zu analysieren, wurde folgende Exponentialfunktion verwendet, die den Abfall des Ca²⁺-Transienten darstellt:

$$\tau_{Ca} = A * e^{-\tau/t}$$

Formel 2: Exponentialfunktion zur Darstellung der Ca²⁺-Konzentration. A = Amplitude des abfallenden Signals, τ_{Ca} = Abfall des Ca²⁺-Transienten, t = Zeit

Mittels der Transientenanalyse konnte die Geschwindigkeit und das Ausmaß der intrazellulären Ca²⁺-Veränderungen bestimmt werden. Ein Beispiel einer Ca²⁺-Transientenamplitude ist in Abbildung 8 illustriert, bei der die Zeit bis zur 80%igen Relaxation (RT 80%) grafisch markiert ist.

Bei den Messungen wurde die gemessene Hintergrundfluoreszenz vom Messwert subtrahiert.

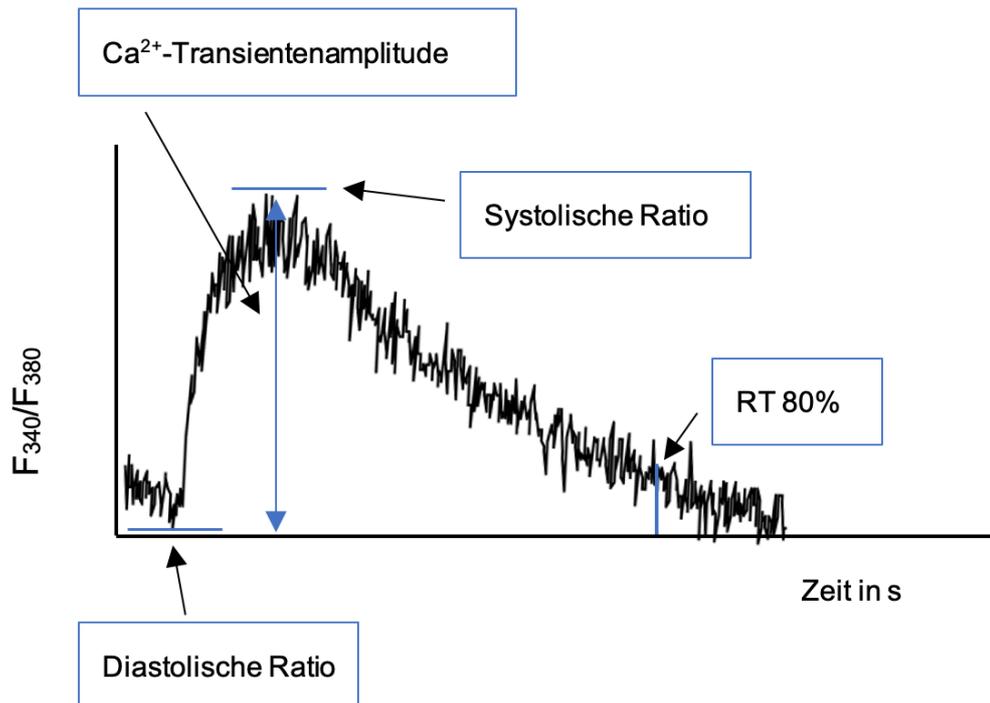


Abbildung 8: Eigene Aufzeichnung eines beispielhaften Ca²⁺-Transients gemessen mit Fura-2, AM. Dabei sind grafisch die Ca²⁺-Transientenamplitude, die systolische Ratio, die diastolische Ratio sowie die RT 80% markiert, welche als Analyseparameter dienen.

2.4 Immunfluoreszenzfärbung

2.4.1 Grundlagen der Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode zum Nachweis von zellulären Proteinen sowie zur Untersuchung der Proteinexpression in fixierten Proben. Das Prinzip der Methode beruht auf der Antikörper/Antigen-spezifischen Bindung. Bei der indirekten Immunfärbung ist ein sekundärer Antikörper mit einem Fluorophor konjugiert. Dieser ist gegen einen nicht konjugierten primären Antikörper gerichtet und weist somit das Zielantigen indirekt nach (76). Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden an in Kultur fixierten Zellen durchgeführt. Das Prinzip der Immunfluoreszenz ist in Abbildung 9 bildlich dargestellt.

Bei den sekundären Antikörpern werden insgesamt 3 verschiedene Formen unterschieden. Neben den für die hier durchgeführten Färbungen ganzen IgG gibt es zudem divalente $(Fab')_2$ Antikörper-Fragmente und monovalente Antikörper-Fragmente.

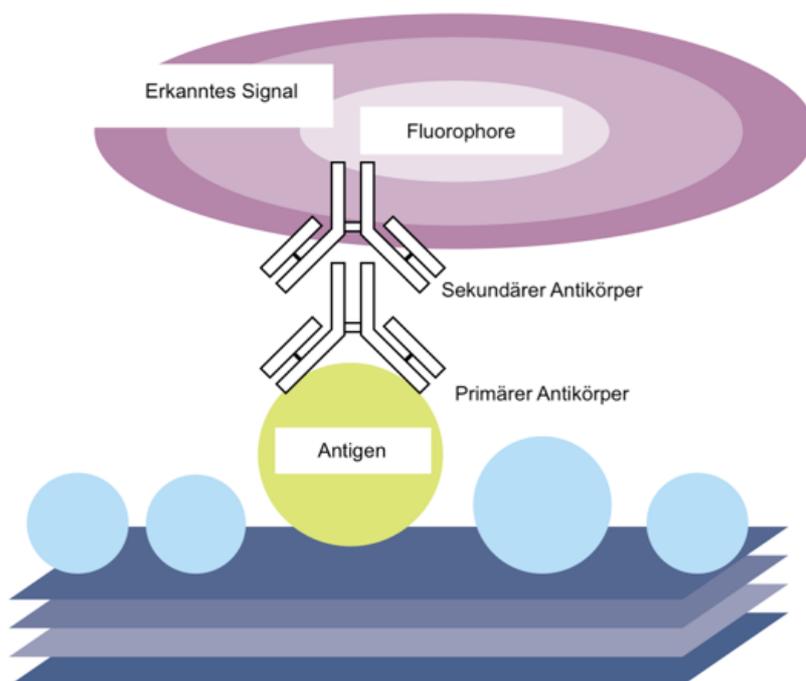


Abbildung 9: Grafische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenzfärbung. Das Prinzip beruht auf einer Antikörper/Antigen-spezifischen Bindung, modifiziert nach (68).

Die verwendeten Farbstoffe sind Alexa-Farbstoffe. Ein Vorteil dieser ist, dass sie photostabile und helle Konjugate erzeugen. Zudem zeichnen sich die Alexa-Farbstoffe durch gute Wasserlöslichkeit aus, weshalb die Reaktivfarbstoffe leicht konjugiert werden können (68). Die beiden verwendeten AlexaFluor-Farbstoffe waren AlexaFluor 488 und AlexaFluor 568. Die jeweiligen Anregungsspektren sind der Abbildung 10 zu entnehmen. Der Name der Alexa-Farbstoffe beruht auf der optimalen Anregungswellenlänge in nm. Ihre entsprechende Absorptions-, Emissionswellenlänge und Emissionsfarbe sind in Tabelle 7 dargestellt. Die jeweilige Emissionsfarbe wurde am Mikroskop ausgewählt.

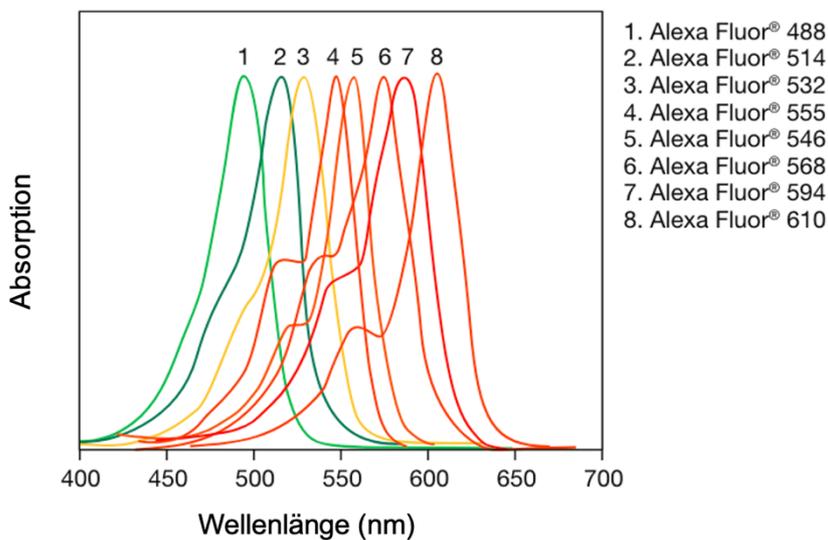


Abbildung 10: Absorptionsspektren verschiedener Alexa-Farbstoffe. Für die Messungen wurden AlexaFluor 488 (1.) und AlexaFluor 568 (6.) verwendet, modifiziert nach (76)

Tabelle 7: Übersicht der Alexa-Farbstoffe mit entsprechender Absorptions-, Emissionswellenlänge und Emissionsfarbe (68).

Fluorophor	Absorption (nm)	Emission (nm)	Emissionsfarbe
AlexaFluor 488	495	519	grün
AlexaFluor 568	578	603	rot/pink

2.4.2 Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurde das BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit verwendet, welches die zur Färbung notwendige Fixierung der Zellen ermöglicht. Dieses enthält die Fixierlösung sowie das Waschpuffer.

Zunächst wurden die zu messenden Zellen mit 1 mL PBS gewaschen und nach Hinzugabe von 500 µL Fixierlösung für 20 min im Kühlschrank inkubiert. Nach Inkubationsende wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 500 µL der primären Antikörper-Lösung je Dish hinzugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und 500 µL der sekundären Antikörper-Lösung hinzugegeben. Es erfolgte ein weiterer Inkubations- und Waschschrift, danach wurde Fluoromount-G hinzugefügt. Die Bilder wurden mittels des Mikroskop Axio Observer Z.1 der Firma Zeiss und der Kamera AxioCam MRm der Firma Zeiss aufgenommen.

Die Auswahl der aufgenommenen iPSC-KM entsprach den gleichen Kriterien wie der Auswahl der iPSC-KM für die Epifluoreszenzmessungen. Es wurden die iPSC-KM ausgewählt, welche die quantitativen und qualitativen Ansprüchen erfüllten. Dabei wurde darauf geachtet, dass nur einzelne iPSC-KM gemessen wurden, die kein Konglomerat bildeten. Insgesamt wurden pro Gruppe mehrere Bilder aufgenommen.

2.4.3 Auswertung

Das Prinzip der Auswertung beruhte auf einer computergestützten quantitativen Analyse der Sarkomeranordnung. Dafür wurde eine benutzerdefinierte Routine mit dem Plugin „Tubeness“ in Image J verwendet, welche durch die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Katrin Streckfuß-Bömeke etabliert wurde. Bilder einzelner, angefärbter iPSC-KMs wurden mit einer benutzerdefinierten Routine in ImageJ (Version 2.0) für die quantitative Analyse der Sarkomerorganisation verarbeitet. Um eine adäquate Messung der Sarkomerorganisation zu erhalten, wurde das Streifenmuster der α -Actinin- und Titin-Färbung zunächst optimal im Sichtfeld ausgerichtet. Die Sarkomerorganisation wurde anhand eines vom Benutzer definierten „Region of Interest“ quantifiziert. Danach wurden die Bilder mittels 2D-Fourier-Transformation

(FFT) zu einem repräsentativen 1D-Radialprofil verarbeitet. Dafür wurden die radialen Profile der 2D-FFT aufsummiert, was zu einer Reihe von Peaks führte (56). Das radiale Profil wurde mit Labchart 8 (ADInstruments) geblottet. Als Parameter zur Analyse der Regelmäßigkeit der Sarkomeranordnung diente die Amplitude des Peaks erster Ordnung. Eine regelmäßige Anordnung der Sarkomere korreliert dabei mit höheren Amplitudenwerten, wohingegen niedrigere Werte auf eine unregelmäßige Organisation der Sarkomere hindeuten (56,77,78).

2.5 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der erhobenen Daten, die Berechnung der Statistik und die graphischen Abbildungen dienten Microsoft Excel (Microsoft Excel 2019) und GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, USA). Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM). Die entsprechende Formel zur Berechnung des SEM lautet:

$$SEM = \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Formel 3: Formel zur Berechnung des SEM. σ^2 = Varianz, σ = Standardabweichung, n = Stichprobengröße.

Die Auswertung der Ca^{2+} -Messungen wurde mit einer Zwei-Wege-ANOVA (Tukey's post hoc Test) durchgeführt. Zur Analyse der Sarkomere wurde ein Ein-Wege-ANOVA (Šidák's post-hoc-test) verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Illustration der zentralen Ergebnisse

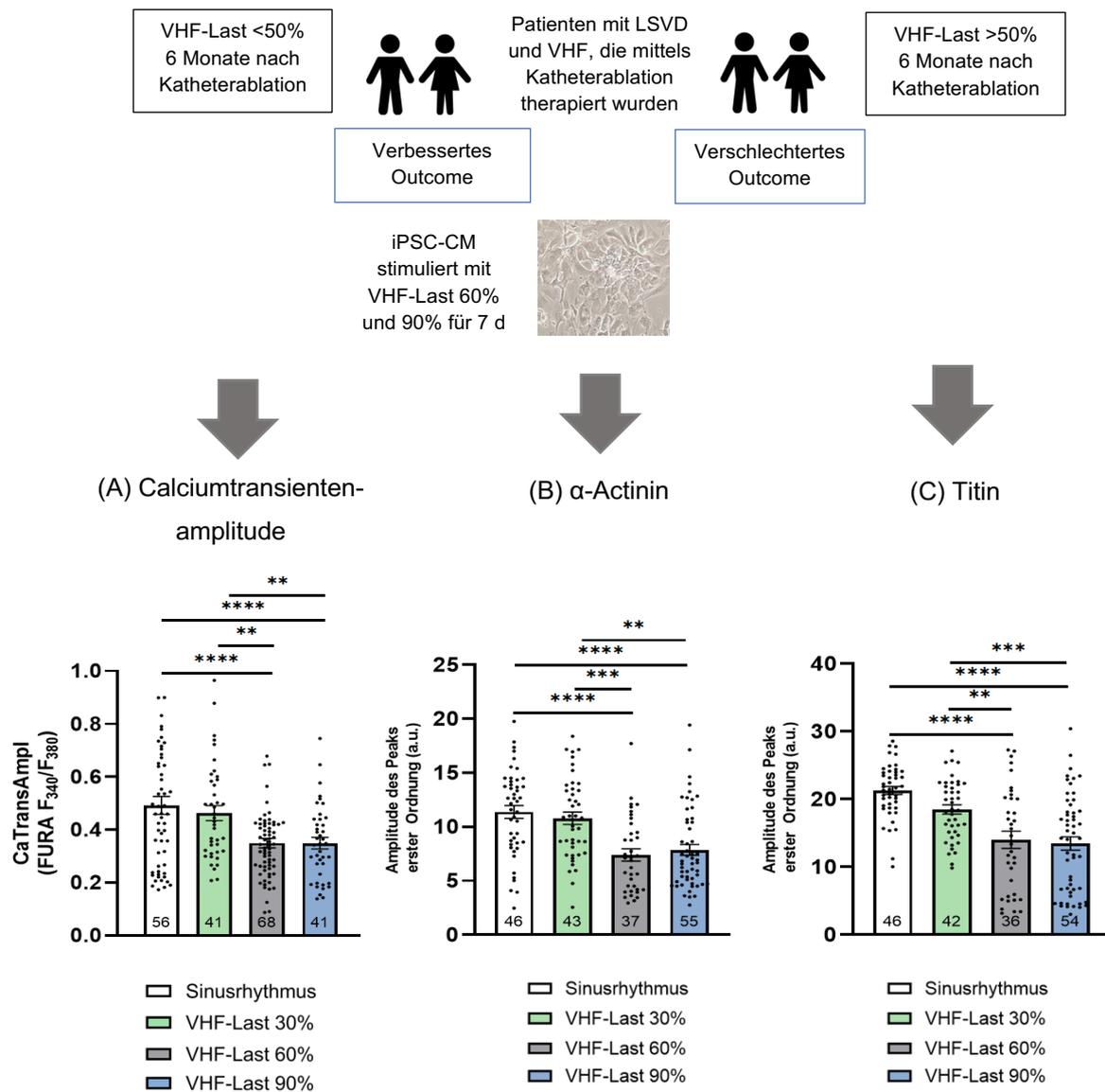


Abbildung 11: Illustration der zentralen Ergebnisse. Ab einer VHF-Last von >50% sind signifikante Veränderungen der ventrikulären zellulären Funktion mit einer (A) verringerten Ca^{2+} -Transientenamplitude sowie einer Abnahme der Sarkomerregularität von (B) α -Actinin und (C) Titin festzustellen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente sind in der Abbildung 11 zusammenfassend dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte herausgefunden werden, dass hohe VHF-Lasten (60% und 90%) in einem in vitro VHF-Simulationsmodell signifikante Veränderungen der ventrikulären myokardialen Funktion mit einer verringerten Ca^{2+} -Transientenamplitude sowie einer Abnahme der Sarkomerregularität von α -Actinin und Titin induzieren. Die erhobenen Daten konnten bereits erfolgreich publiziert werden (79). Im Folgenden werden die einzelnen Ergebnisse analysiert.

3.2 Effekte verschiedener VHF-Lasten auf die Ca^{2+} -Homöostase

Die Ca^{2+} -Homöostase in den Kardiomyozyten ist für die Herzkontraktion von entscheidender Bedeutung (80). Der Einfluss zunehmender VHF-Lasten auf den Ca^{2+} -Haushalt wurde mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Zur Charakterisierung der Ca^{2+} -Homöostase wurden die Ca^{2+} -Transientenamplitude, die diastolische Ca^{2+} -Konzentration und die Zeit bis zur 80%igen Relaxation (RT 80%) untersucht.

3.2.1 Auswirkungen verschiedener VHF-Lasten auf die Ca^{2+} -Transientenamplitude

Zunächst wurden die Ca^{2+} -Transientenamplituden der 4 verschiedenen Gruppen untersucht, nachdem die Zellen mit unterschiedlicher VHF-Last stimuliert wurden. Wie bereits unter 2.2.3 beschrieben, wurde ein VHF-Simulationsmodell etabliert, bei dem die Arrhythmiebelastung bei je 2 Gruppen unter bzw. über dem klinisch relevanten Cut-Off-Wert von 50% lag. Gruppe 1 hatte als Kontrollgruppe keine Arrhythmiekomponente (SR-Gruppe), Gruppe 2 eine VHF-Last von 30% (geringe VHF-Last), Gruppe 3 von 60% (hohe VHF-Last) und Gruppe 4 von 90% (sehr hohe VHF-Last). Zur Generierung von Transienten wurden die Zellen nach 48 h bzw. 7 d VHF-Simulation während der Messungen mit 30 bpm und 60 bpm stimuliert.

Die Originalabbildungen der Ca^{2+} -Transientenamplitude sind in der Abbildung 12 A illustriert. Nach 48 h Stimulation zeigte sich bei 30 bpm kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit niedriger und hoher VHF-Last hinsichtlich der Ca^{2+} -Transientenamplitude (Abbildung 12 C). Die entsprechenden p-Werte sind der Tabelle 8 zu entnehmen.

Im Gegensatz dazu konnte festgestellt werden, dass bei 30 bpm nach einer 7-tägigen VHF-Simulation die Ca^{2+} -Transientenamplitude bei den Gruppen mit einer hohen VHF-Last von 60% und 90% signifikant abnahm, was die Originalabbildungen der Ca^{2+} -Transientenamplitude veranschaulichen (Abbildung 12 B).

Die Ca^{2+} -Transientenamplitude lag bei der SR-Gruppe bei $0,50 \pm 0,062$ bzw. bei der Gruppe mit einer VHF-Last von 30% bei $0,46 \pm 0,039$ und somit in diesen beiden Gruppen signifikant höher als bei den Gruppen mit einer VHF-Last von 60% ($0,34 \pm 0,044$) und 90% ($0,34 \pm 0,047$) (Abbildung 12 C). Die entsprechenden p-Werte sind in der Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 8: Darstellung der p-Werte der Ca^{2+} -Transientenamplituden (48 h, 30 bpm). In der Tabelle sind die p-Werte dargestellt, welche mithilfe der Werte der Ca^{2+} -Transientenamplituden zwischen 2 Gruppen berechnet wurden. Die p-Werte zeigten sich als nicht statistisch signifikant.

Gruppe 1	Gruppe 2	p-Wert
B0 (n=46)	B60 (n=56)	0,53
B0 (n=46)	B90 (n=22)	0,99
B30 (n=55)	B60 (n=56)	0,74
B30 (n=55)	B90 (n=22)	0,42

Tabelle 9: Darstellung der p-Werte der Ca^{2+} -Transientenamplituden (7 d, 30 bpm). Die p-Werte waren statistisch signifikant.

Gruppe 1	Gruppe 2	p-Wert
B0 (n=56)	B60 (n=68)	<0,0001
B0 (n=56)	B90 (n=41)	<0,0001
B30 (n=41)	B60 (n=68)	<0,01
B30 (n=41)	B90 (n=41)	<0,01

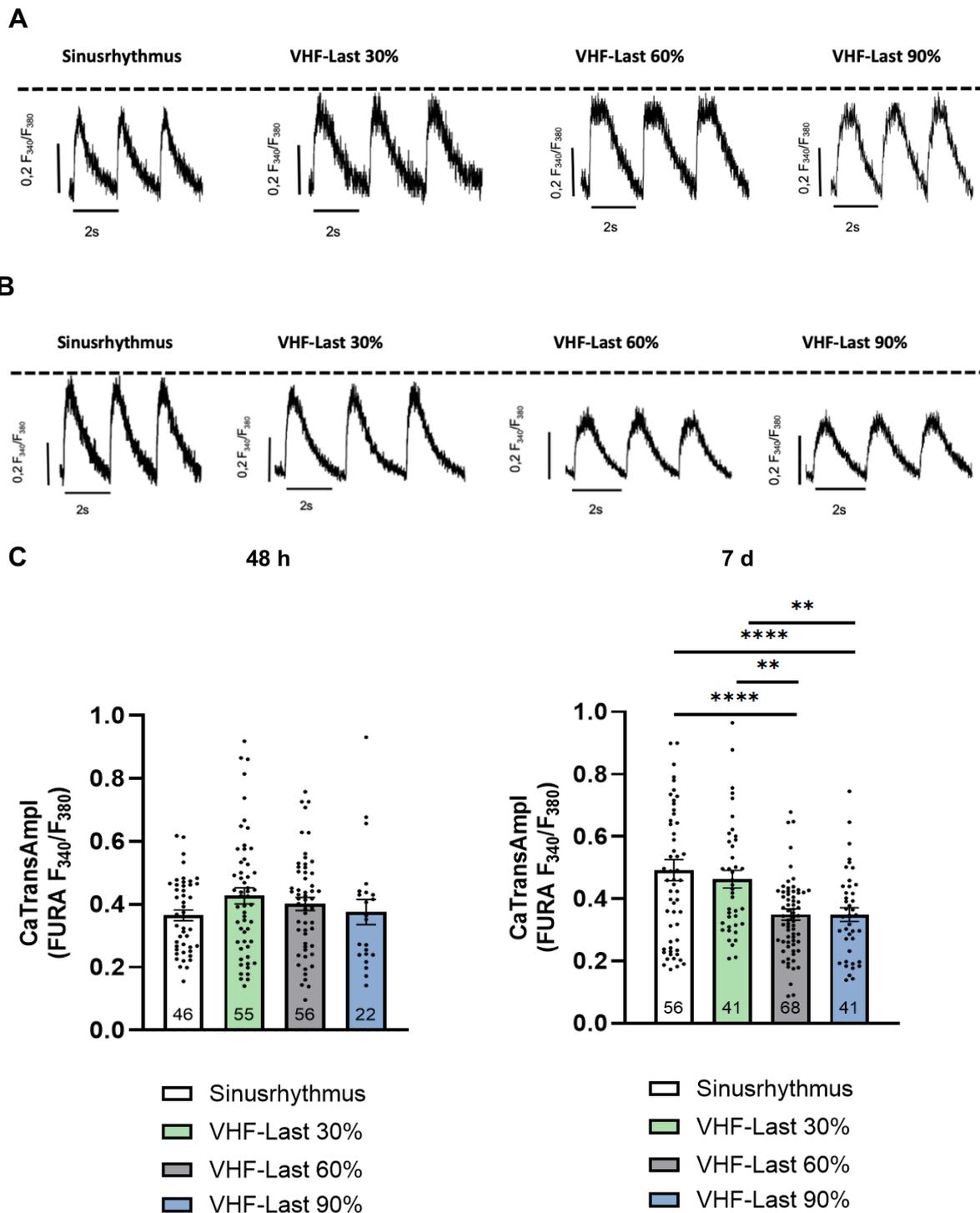


Abbildung 12: (A) Originalabbildungen der Ca²⁺-Transientenamplituden (48 h, 30 bpm). (B) Originalabbildungen der Ca²⁺-Transientenamplituden (7 d, 30 bpm). (C) Darstellung der Ca²⁺-Transientenamplitude bei 30 bpm nach 48 h VHF-Simulation und 7 d VHF-Simulation. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bzgl. der Ca²⁺-Transientenamplitude nach 48 h, wohingegen ein signifikanter Unterschied nach 7 d festgestellt werden konnte. (**p<0,01, ****p<0,0001); Zellen pro Gruppe (48 h): 46/55/56/22; Zellen pro Gruppe (7 d): 56/41/68/41.

Zur weiteren Untersuchung der Ca^{2+} -Transientenamplitude wurde eine zweite Stimulationsfrequenz von 60 bpm während den Messungen verwendet.

Bei 60 bpm nach 48 h VHF-Simulation ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der Ca^{2+} -Transientenamplitude (Abbildung 13 C). Dies veranschaulichen die Originalabbildungen der Ca^{2+} -Transientenamplituden, welche in der Abbildung 13 A aufgetragen sind. Entsprechend dieser Beobachtung waren die Werte zwischen den Gruppen nicht signifikant verändert (Tabelle 10).

Nach 7 d VHF-Simulation bei 60 bpm konnte hingegen ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Ca^{2+} -Transientenamplitude zwischen den Gruppen beobachtet werden. Bei einer höheren VHF-Last nach 7 d Stimulation bei 60 bpm nahm die Ca^{2+} -Transientenamplitude signifikant ab. Die Originalabbildungen der Ca^{2+} -Transientenamplituden sind in der Abbildung 13 B aufgetragen. Die Absolutwerte der Ca^{2+} -Transientenamplituden betragen in der SR-Gruppe $0,33 \pm 0,030$ sowie bei der Gruppe mit einer VHF-Last von 30% $0,34 \pm 0,026$. Verglichen dazu waren die Werte der Ca^{2+} -Transientenamplitude bei einer VHF-Last von 60% mit $0,24 \pm 0,013$ und bei einer VHF-Last von 90% mit $0,23 \pm 0,015$ deutlich reduziert (Abbildung 13 C). Die p-Werte zwischen 2 Gruppen sind in der Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 10: Darstellung der p-Werte der Ca^{2+} -Transientenamplituden (48 h, 60 bpm). Die p-Werte zwischen 2 Gruppen waren nicht statistisch signifikant.

Gruppe 1	Gruppe 2	p-Wert
B0 (n=39)	B60 (n=50)	0,69
B0 (n=39)	B90 (n=19)	0,97
B30 (n=47)	B60 (n=50)	0,87
B30 (n=47)	B90 (n=19)	0,77

Tabelle 11: Darstellung der p-Werte der Ca²⁺-Transientenamplituden (7 d, 60 bpm). Durch Berechnung der p-Werte zwischen 2 Gruppen konnte ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Gruppe 1	Gruppe 2	p-Wert
B0 (n=48)	B60 (n=64)	<0,05
B0 (n=48)	B90 (n=29)	<0,05
B30 (n=40)	B60 (n=64)	<0,05
B30 (n=40)	B90 (n=29)	<0,05

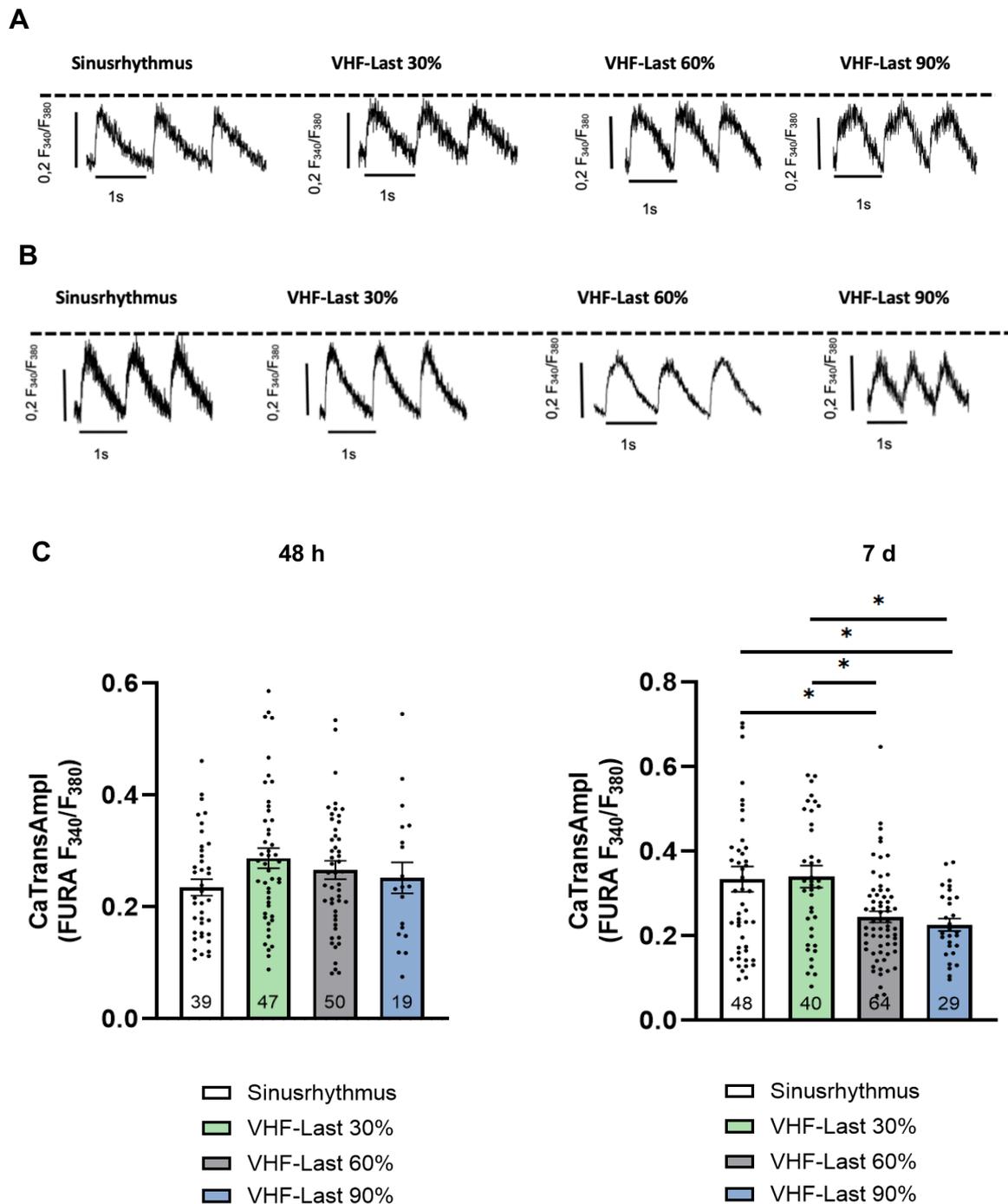


Abbildung 13: (A) Originalabbildungen der Ca²⁺-Transientenamplituden (48 h, 60 bpm). (B) Originalabbildungen der Ca²⁺-Transientenamplituden (7 d, 60 bpm). (C) Darstellung der Ca²⁺-Transientenamplitude bei 60 bpm nach 48 h und 7 d VHF-Simulation. Nach 48 h unterschieden sich die Ca²⁺-Transientenamplituden nicht, während es nach 7 d es zu einer signifikanten Reduktion der Ca²⁺-Transientenamplituden kam. (*p<0,05); Zellen pro Gruppe (48 h): 39/47/50/19; Zellen pro Gruppe (7 d): 48/40/64/29.

Somit konnte bei beiden Messfrequenzen eine signifikante Reduktion der Ca^{2+} -Transientenamplitude bei einer VHF-Last von 60% und 90% festgestellt werden. Insgesamt waren die Effekte der VHF-Simulation bei 30 bpm ausgeprägter als bei 60 bpm.

Sowohl bei 30 bpm als auch bei 60 bpm konnte nach 48 h noch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Ca^{2+} -Transientenamplitude beobachtet werden. Bei beiden Frequenzen kam es erst nach 7 d VHF-Simulation bei den Gruppen mit hohen VHF-Lasten zu einer signifikanten Abnahme der Ca^{2+} -Transientenamplitude. Somit fand sich ab dem klinisch relevanten Cut-off-Wert von >50% ein relevanter Unterschied im Ca^{2+} -Haushalt.

3.2.2 Auswirkungen verschiedener VHF-Lasten auf die diastolische Ca^{2+} -Konzentration

Zur Analyse der diastolischen Ca^{2+} -Level wurden die Auswirkungen verschiedener VHF-Lasten analog zu den Untersuchungen der Ca^{2+} -Transientenamplitude nach einer VHF-Simulation von 48 h und 7 d mit Frequenzen von 30 bpm und 60 bpm während der Messungen untersucht. Dabei war das diastolische Ca^{2+} zwischen den 4 unterschiedlichen Gruppen nicht relevant verändert.

Nach 48 h VHF-Simulation unter Anwendung einer Messfrequenz von 30 bpm lag in der SR-Gruppe die diastolische Ca^{2+} -Konzentration bei $1,05 \pm 0,031$ und in der Gruppe mit einer VHF-Last von 90% bei $0,90 \pm 0,043$. Somit war eine Tendenz zur Abnahme der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration bei sehr hoher VHF-Last erkennbar, die allerdings nicht signifikant war (Abbildung 14). Die p-Werte sind in der Tabelle 12 dargestellt.

Auch nach 7 d VHF-Simulation waren zwischen den Gruppen keine wesentlichen Veränderungen zu beobachten, wenn die Zellen während der Messungen mit 30 bpm stimuliert wurden (Abbildung 14). Dementsprechend zeigten sich die p-Werte statistisch nicht signifikant (Tabelle 13).

Unabhängig von der VHF-Last war die diastolische Ca^{2+} -Konzentration auch bei einer Messfrequenz von 60 bpm zu beiden Zeitpunkten nicht wesentlich verändert. Nach 48 h konnte eine diastolische Ca^{2+} -Konzentration in der SR-Gruppe von $1,19 \pm 0,037$ und in der Gruppe mit einer VHF-Last von 90% von $1,11 \pm 0,065$ gemessen werden (Abbildung 15). Die einzelnen p-Werte sind in der Tabelle 14 aufgeführt. Nach 7 d ergab sich eine Tendenz zu einem niedrigeren diastolische Ca^{2+} -Level beim Vergleich der SR-Gruppe ($1,16 \pm 0,028$) zu der Gruppe mit sehr hoher VHF-Last ($1,053 \pm 0,032$) (Abbildung 15). Diese waren jedoch erneut nicht signifikant (Tabelle 15).

Tabelle 12: Darstellung der p-Werte der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration (48 h, 30 bpm). Die Analyse der p-Werte ließen keinen statistisch signifikanten Unterschied feststellen.

Gruppe 1	Gruppe 2	p-Wert
B0 (n=46)	B60 (n=56)	0,23
B0 (n=46)	B90 (n=22)	0,088
B30 (n=55)	B60 (n=56)	0,49
B30 (n=55)	B90 (n=22)	0,19

Tabelle 13: Darstellung der p-Werte der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration (7 d, 30 bpm). Die p-Werte waren nicht statistisch signifikant.

Gruppe 1	Gruppe 2	p-Wert
B0 (n=56)	B60 (n=68)	0,89
B0 (n=56)	B90 (n=41)	1,0
B30 (n=41)	B60 (n=68)	1,0
B30 (n=41)	B90 (n=41)	0,94

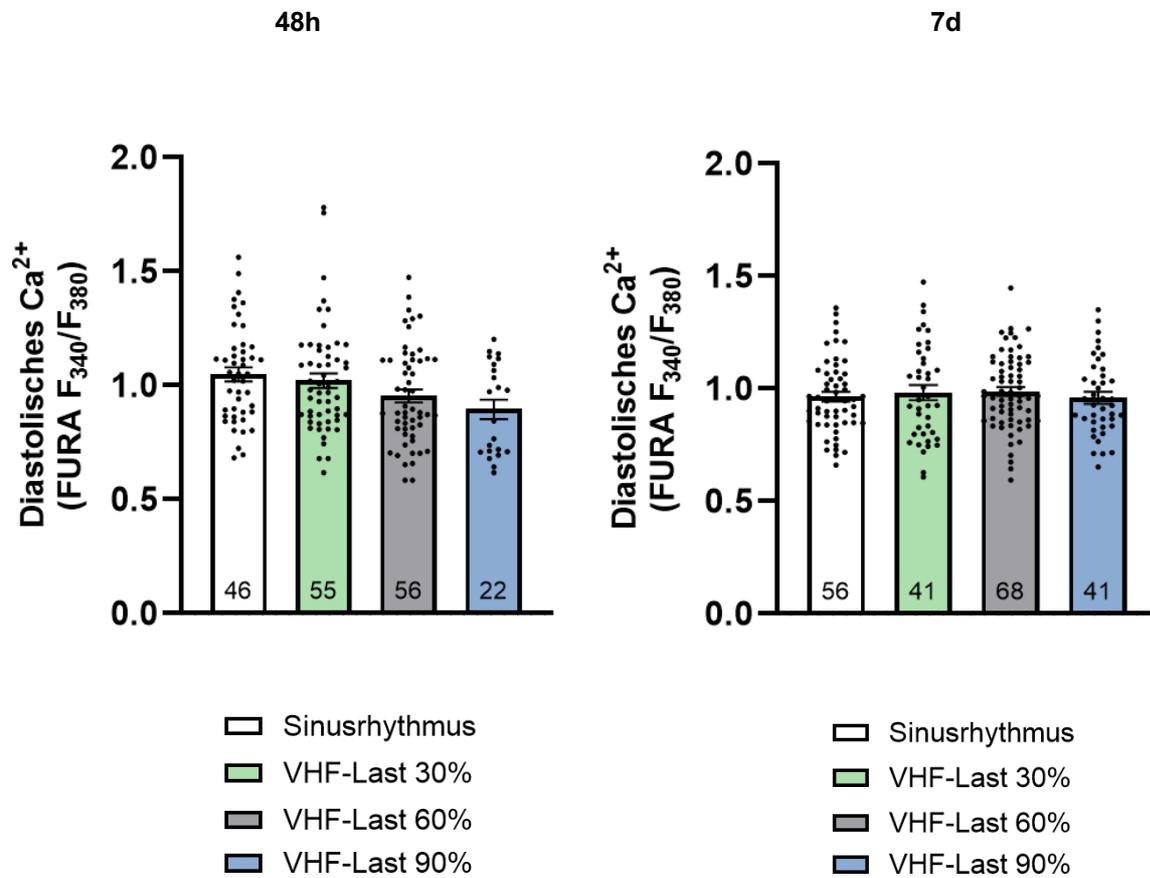


Abbildung 14: Darstellung der diastolischen Ca²⁺-Konzentration bei 30 bpm nach 48 h und 7 d VHF-Simulation. Bei beiden Zeitpunkten war kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die diastolische Ca²⁺-Konzentration festzustellen. Zellen pro Gruppe (48 h): 46/55/56/22; Zellen pro Gruppe (7 d): 56/41/68/41.

Tabelle 14: Darstellung der p-Werte der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration (48 h, 60 bpm). Die Analyse der p-Werte zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Gruppe 1	Gruppe 2	p-Wert
B0 (n=39)	B60 (n=50)	0,14
B0 (n=39)	B90 (n=19)	0,82
B30 (n=47)	B60 (n=50)	0,14
B30 (n=47)	B90 (n=19)	0,82

Tabelle 15: Darstellung der p-Werte der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration (7 d, 60 bpm). Die p-Werte ergaben keine statistisch signifikante Veränderung.

Gruppe 1	Gruppe 2	p-Wert
B0 (n=48)	B60 (n=64)	0,91
B0 (n=48)	B90 (n=29)	0,074
B30 (n=40)	B60 (n=64)	0,82
B30 (n=40)	B90 (n=29)	0,057

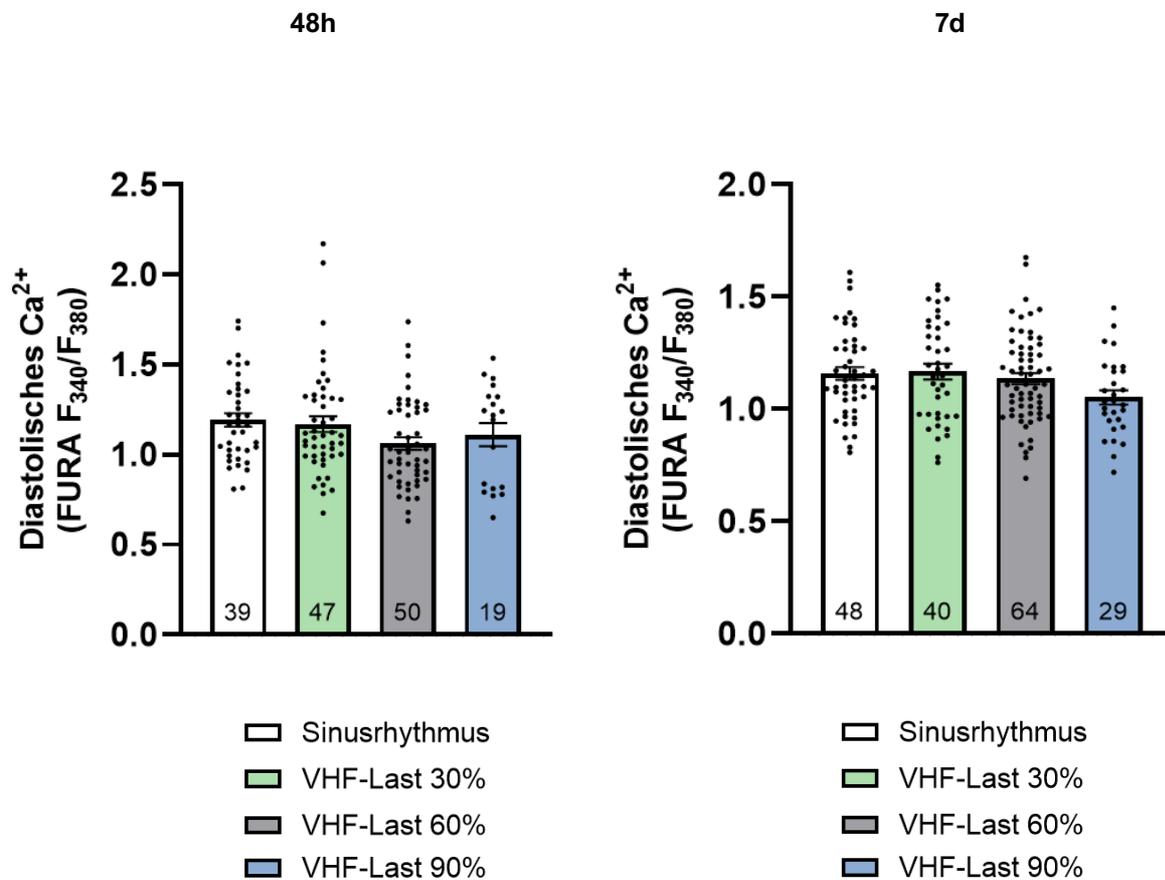


Abbildung 15: Darstellung der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration bei 60 bpm nach 48 h und 7 d VHF-Simulation. Eine höhere VHF-Last führte zu keiner signifikanten Veränderung der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration. Zellen pro Gruppe (48 h): 39/47/50/19; Zellen pro Gruppe (7 d): 48/40/64/29.

3.2.3 Auswirkungen verschiedener VHF-Lasten auf die RT 80%

Als letzter Parameter der Ca^{2+} -Homöostase wurde die RT 80% untersucht. Die RT 80% zeigte bei einer Messfrequenz von 30 bpm nach 48 h bei unterschiedlichen VHF-Lasten keine relevanten Veränderungen (Abbildung 16, Tabelle 16). Ähnliche Resultate fanden sich auch nach einer VHF-Simulation über 7 d (Abbildung 16, Tabelle 17).

Ebenso konnte auch für die zweite Messfrequenz von 60 bpm sowohl nach 48 h (Abbildung 17, Tabelle 18) als auch nach 7 d (Abbildung 17, Tabelle 19) kein signifikanter Effekt hinsichtlich der RT 80% in Abhängigkeit von der VHF-Last detektiert werden. Die entsprechenden Ergebnisse sind in der Abbildung 17 und in den Tabellen 18 und 19 dargestellt.

Tabelle 16: Darstellung der p-Werte der RT 80% (48 h, 30 bpm). Die p-Werte stellten sich als nicht statistisch signifikant dar.

Gruppe 1	Gruppe 2	p-Wert
B0 (n=46)	B60 (n=56)	0,83
B0 (n=46)	B90 (n=21)	0,51
B30 (n=55)	B60 (n=56)	0,86
B30 (n=55)	B90 (n=21)	0,53

Tabelle 17: Darstellung der p-Werte der RT 80% (7 d, 30 bpm). Die Analyse der p-Werte ergab keine statistisch signifikante Veränderung.

Gruppe 1	Gruppe 2	p-Wert
B0 (n=56)	B60 (n=68)	0,21
B0 (n=56)	B90 (n=41)	0,94
B30 (n=41)	B60 (n=68)	0,096
B30 (n=41)	B90 (n=41)	0,74

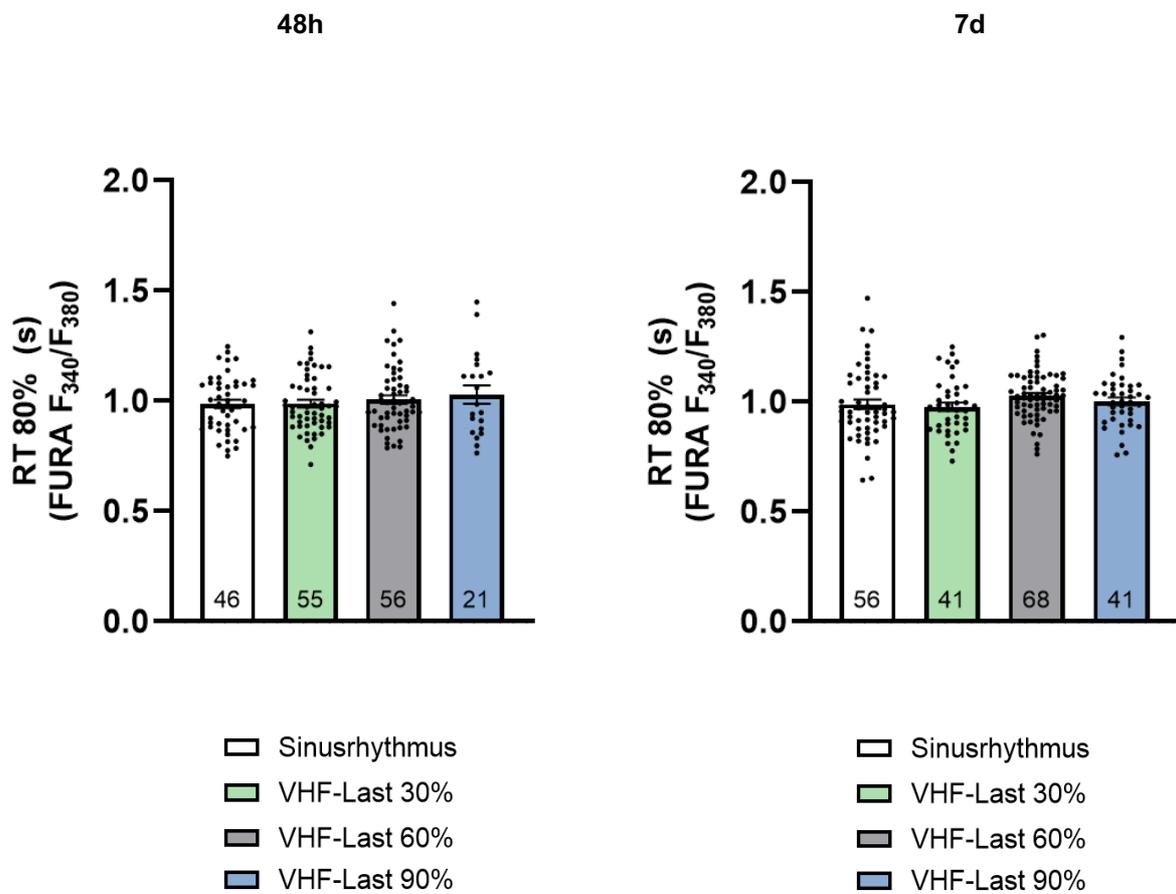


Abbildung 16: Darstellung der RT 80% bei 30 bpm nach 48 h und 7 d VHF-Simulation. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der RT 80% bei höherer VHF-Last. Zellen pro Gruppe (48 h): 46/55/56/21; Zellen pro Gruppe (7 d): 56/41/68/41.

Tabelle 18: Darstellung der p-Werte der RT 80% (48h, 60 bpm). Die p-Werte führten zu keiner statistisch signifikanten Veränderung.

Gruppe 1	Gruppe 2	p-Wert
B0 (n=39)	B60 (n=50)	0,90
B0 (n=39)	B90 (n=19)	0,56
B30 (n=47)	B60 (n=50)	1,0
B30 (n=47)	B90 (n=19)	0,79

Tabelle 19: Darstellung der p-Werte der RT 80% (7 d, 60 bpm). Die p-Werte waren nicht statistisch signifikant.

Gruppe 1	Gruppe 2	p-Wert
B0 (n=48)	B60 (n=64)	0,76
B0 (n=48)	B90 (n=29)	0,80
B30 (n=40)	B60 (n=64)	1,0
B30 (n=40)	B90 (n=29)	1,0

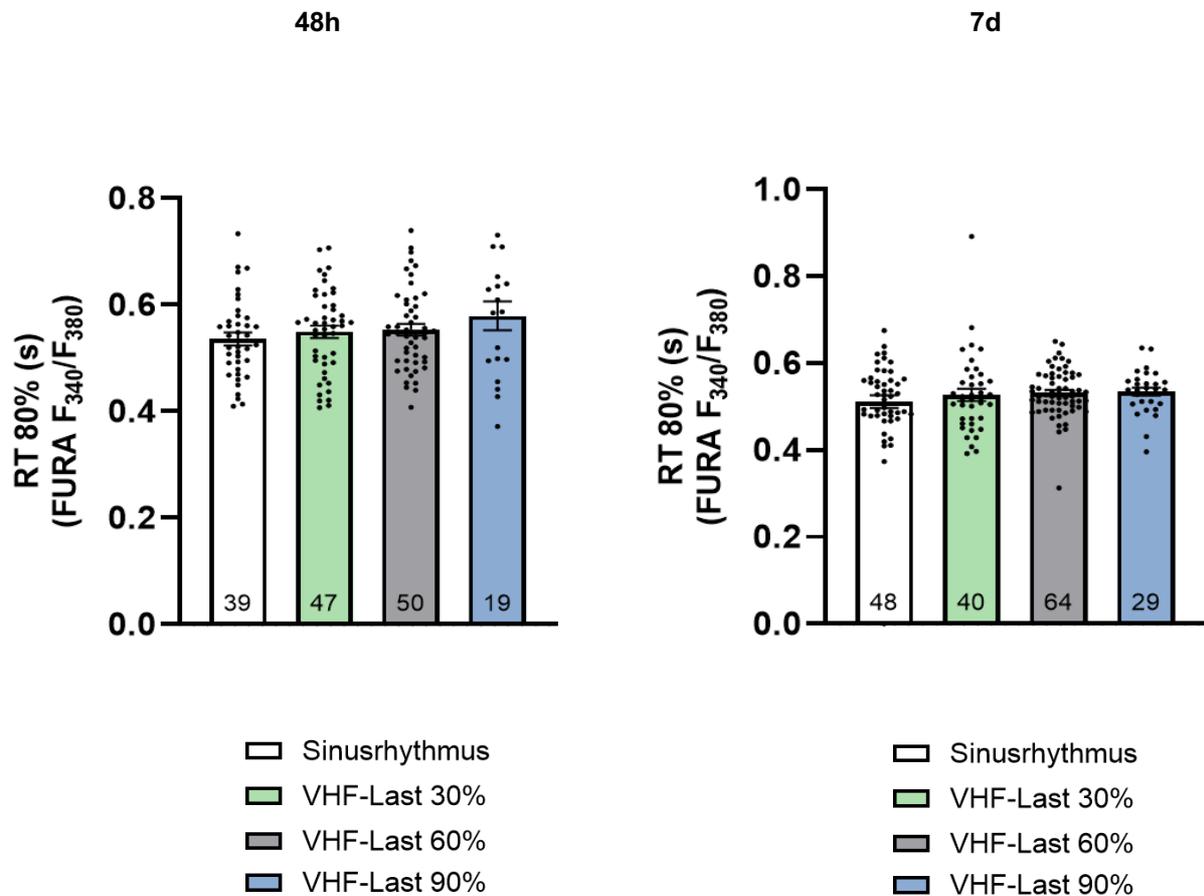


Abbildung 17: Darstellung der RT 80% bei 60 bpm nach 48 h und 7 d VHF-Simulation. Unterschiedliche VHF-Lasten führten zu keiner signifikanten Änderung der RT 80%. Zellen pro Gruppe (48 h): 39/47/50/19; Zellen pro Gruppe (7 d): 48/40/64/29.

3.3 Effekte verschiedener VHF-Lasten auf die Sarkomerorganisation

Zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher VHF-Lasten auf die Sarkomerorganisation wurden exemplarisch Immunfluoreszenzfärbungen der Myofilamente α -Actinin und Titin durchgeführt. Die kardiale Kontraktilität wird wesentlich durch diese Myofilamente bestimmt, deren Funktion bei pathologischen Zuständen wie HI beeinträchtigt sein und sich wiederum auf die Kontraktionsfähigkeit des Herzens auswirken kann (81).

Um zu analysieren, ob ein Zusammenhang zwischen den oben beschriebenen Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase und der Sarkomerorganisation vorliegt, wurde dabei, wie im Methodenteil erwähnt, die Amplitude des Peaks erster Ordnung ausgewertet, welche mit der Regelmäßigkeit der Sarkomeranordnung korreliert. Je höher diese ist, desto regelmäßiger ist die Sarkomeranordnung. Dagegen weisen niedrigere Werte auf eine unregelmäßige Sarkomerorganisation hin. Die Zellen wurden nach 7 d VHF-Simulation mit den jeweiligen Antikörpern für α -Actinin bzw. Titin gefärbt.

3.3.1 Auswirkungen verschiedener VHF-Lasten auf α -Actinin

Höhere VHF-Lasten (60% und 90%) führten nach 7 d im Vergleich zur SR-Gruppe bzw. zur Gruppe mit 30% VHF-Last zu einer signifikanten Abnahme der Sarkomerorganisation. In der Abbildung 18 sind repräsentative Originalabbildungen der iPSC-KM nach Anfärbung von α -Actinin dargestellt. Bereits optisch war zu erkennen, dass bei höherer VHF-Last die Regelmäßigkeit der Sarkomeranordnung abnimmt (Abbildung 18).

Die Amplitude des Peaks erster Ordnung lag bei der SR-Gruppe bei $11,38 \pm 0,59$ sowie bei der Gruppe mit einer VHF-Last von 30% bei $10,79 \pm 0,58$, wohingegen der Wert bei der Gruppe mit einer VHF-Last von 60% $7,4 \pm 0,57$ und bei der Gruppe mit einer VHF-Last von 90% $7,9 \pm 0,50$ betrug (Abbildung 19). Die statistisch signifikanten p-Werte können der Tabelle 20 entnommen werden. Die Resultate sind in der Abbildung 19 illustriert.

Bei zunehmender VHF-Last nahm die Amplitude des Peaks erster Ordnung und somit die Regelmäßigkeit der Sarkomerorganisation signifikant ab.

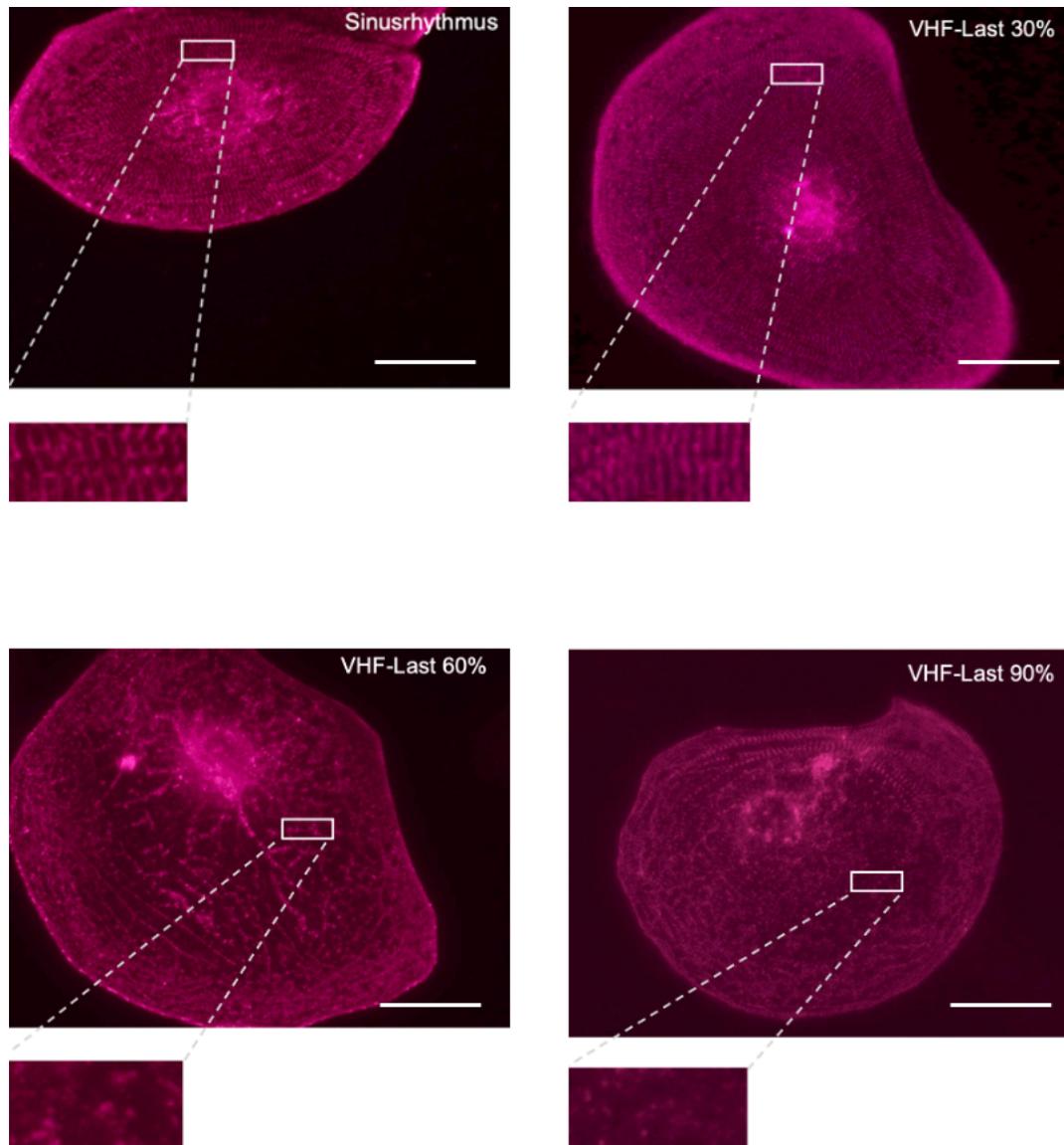


Abbildung 18: Repräsentative Originalabbildungen von iPSC-KM mit Anfärbung von α -Actinin nach 7 d VHF-Simulation (Maßstabsbalken 50 μ m). Die dargestellten Originalabbildungen zeigten eine Abnahme in der Sarkomerregelmäßigkeit bei höherer VHF-Last.

Tabelle 20: Darstellung der p-Werte von α -Actinin (7 d). Die p-Werte zeigten sich statistisch signifikant.

Gruppe 1	Gruppe 2	p-Wert
B0 (n=46)	B60 (n=37)	<0,0001
B0 (n=46)	B90 (n=55)	<0,0001
B30 (n=43)	B60 (n=37)	<0,001
B30 (n=43)	B90 (n=55)	<0,01

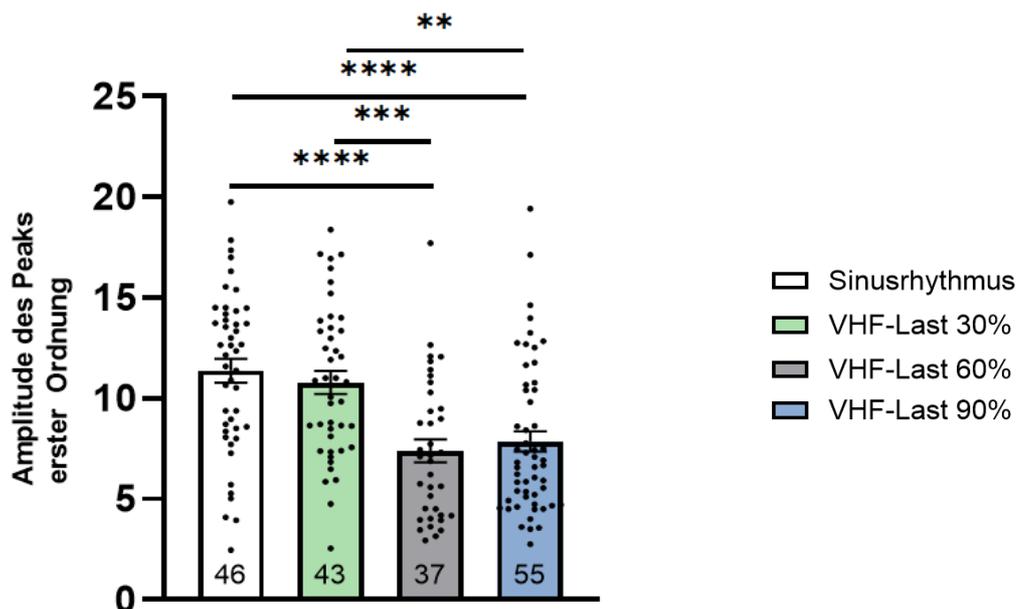


Abbildung 19: Darstellung der Amplitude des Peaks erster Ordnung von α -Actinin nach 7 d VHF-Simulation. Eine höhere VHF-Last führte zu einer signifikanten Abnahme in der Sarkomerorganisation. (**p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001); Zellen pro Gruppe: 46/43/37/55.

3.3.2 Auswirkungen verschiedener VHF-Lasten auf Titin

Die Immunfluoreszenzfärbung von Titin zeigte ebenfalls ab einer VHF-Last von >50% eine signifikante Reduktion der Sarkomerorganisation. Repräsentative Originalaufnahmen der Färbungen sind in Abbildung 19 dargestellt. Aus diesen ist bereits optisch ersichtlich, dass eine höhere VHF-Last mit einer Abnahme der Regelmäßigkeit der Sarkomeranordnung korreliert (Abbildung 20).

Die Amplitude des Peaks erster Ordnung lag bei der SR-Gruppe bei $21,31 \pm 0,59$, bei der Gruppe mit einer VHF-Last von 30% bei $18,49 \pm 0,68$, bei der Gruppe mit einer VHF-Last von 60% bei $14,02 \pm 1,3$ und bei der Gruppe mit einer VHF-Last von 90% bei $13,46 \pm 0,98$ (Abbildung 21). Auch hier geht eine Zunahme der VHF-Last mit einer signifikanten Abnahme der Amplitude des Peaks erster Ordnung und damit der Regelmäßigkeit der Sarkomeranordnung einher. Die Darstellung der Ergebnisse sind der Abbildung 21 sowie die p-Werte der Tabelle 21 zu entnehmen.

Somit lässt sich festhalten, dass elektrophysiologische Veränderungen des Ca^{2+} -Haushalts mit strukturellen Veränderungen korrelieren. Die erhobenen Daten veranschaulichen, dass eine arrhythmische Stimulation, die länger als 50% der Zeit besteht, nachteilige strukturelle Effekte auf die Kardiomyozyten zur Folge hat.

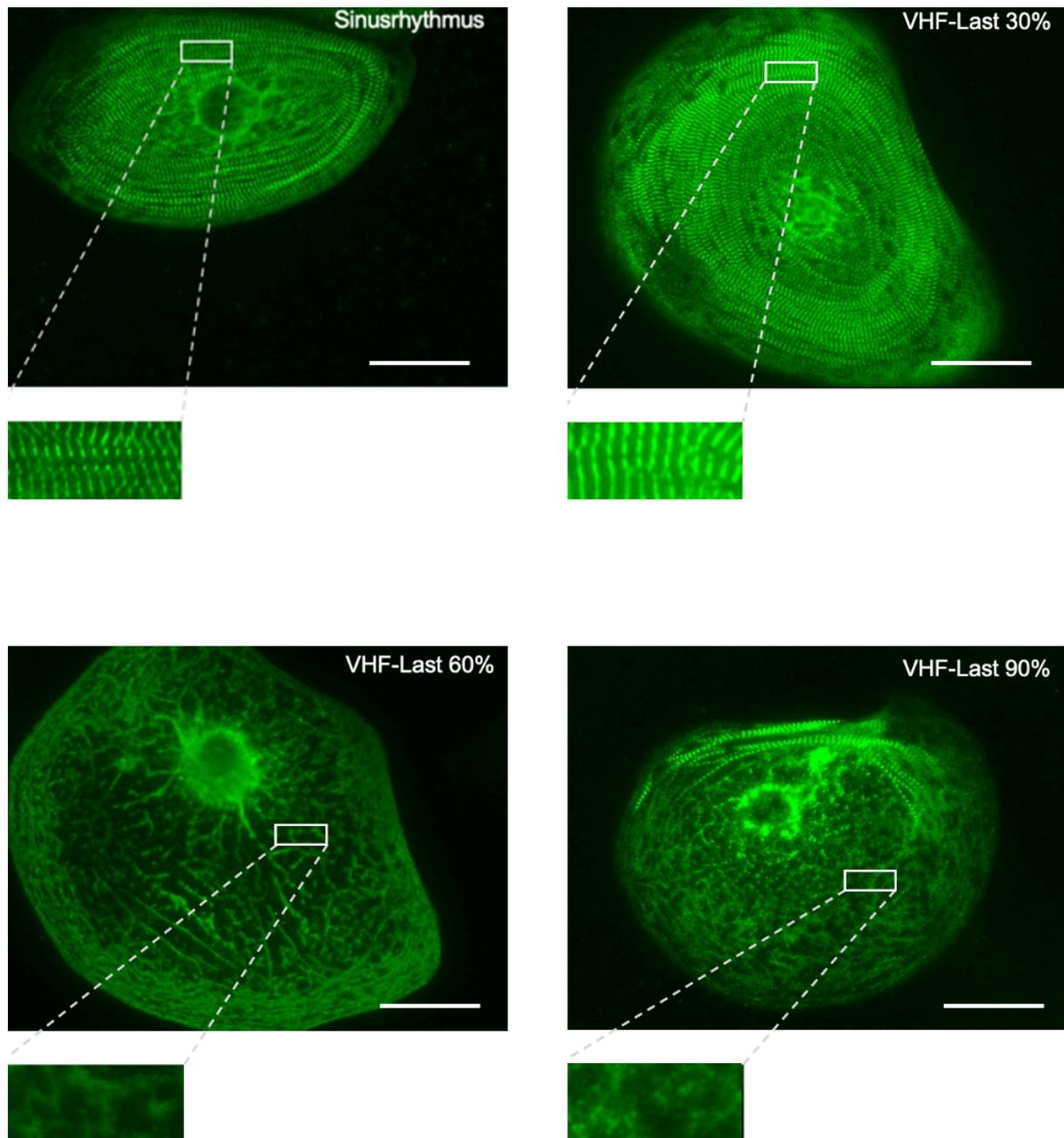


Abbildung 20: Repräsentative Originalabbildungen von iPSC-KM mit Anfärbung von Titin nach 7 d VHF-Simulation (Maßstabsbalken 50 μm). Den Originalabbildungen ist zu entnehmen, dass eine höhere VHF-Last zu einer Abnahme in der Sarkomerregelmäßigkeit führte.

Tabelle 21: Darstellung der p-Werte von Titin (7 d). Es zeigten sich statistisch signifikante p-Werte.

Gruppe 1	Gruppe 2	p-Wert
B0 (n=46)	B60 (n=36)	<0,0001
B0 (n=46)	B90 (n=54)	<0,0001
B30 (n=42)	B60 (n=36)	<0,01
B30 (n=42)	B90 (n=54)	<0,001

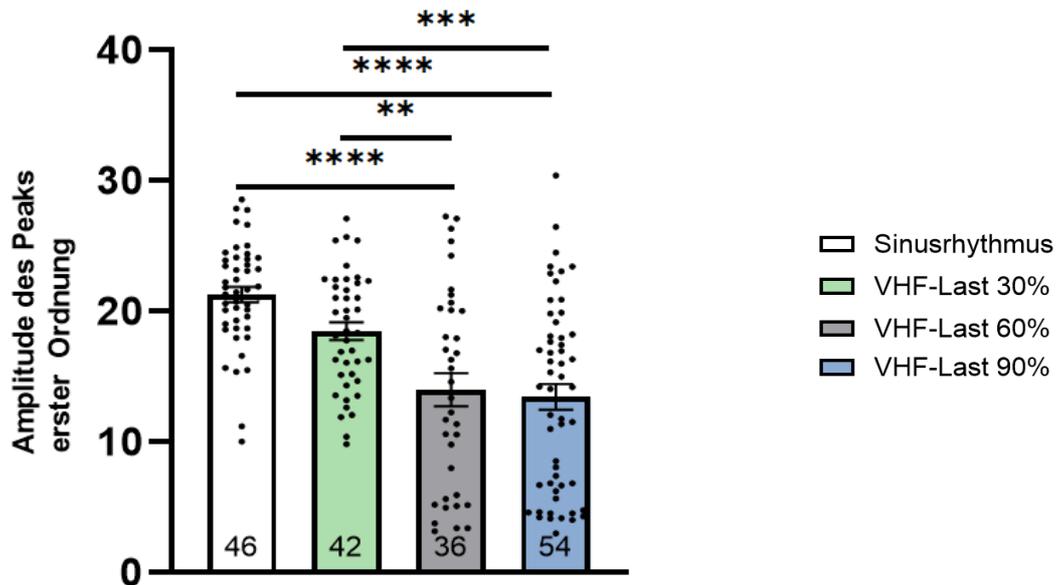


Abbildung 21: Darstellung der Amplitude des Peaks erster Ordnung von Titin nach 7 d VHF-Simulation. Bei höherer VHF-Last kam es zu einer signifikanten Reduktion in der Sarkomerorganisation. (**p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001); Zellen pro Gruppe: 46/42/36/54.

4 Diskussion

4.1 Ergebnisse als möglicher Erklärungsansatz der CASTLE-AF Studie

Das Ziel dieser Arbeit war es, die grundlegenden Aspekte der CASTLE-AF Studie hinsichtlich der Relevanz unterschiedlicher VHF-Lasten auf ventrikuläre myokardiale Zellen zu untersuchen, um einen möglichen Erklärungsansatz für die klinischen Resultate der CASTLE-AF Studie aufzudecken und somit die Effekte von VHF auf den Ventrikel besser zu verstehen. Dafür wurde ein ex vivo VHF-Simulationssystem etabliert, welches die Auswirkungen verschiedener VHF-Lasten auf die ventrikuläre Kardiomyozyten untersuchte. Für das Versuchsprotokoll der durchgeführten Experimente war die Subanalyse der CASTLE-AF entscheidend, welche bei Patienten mit VHF und LVSD eine Verbesserung des klinischen Outcomes bei einer VHF-Last <50% 6 Monate nach Ablationstherapie feststellen konnte (17). Entsprechend dieser klinischen Resultate wurden jeweils 2 Gruppen mit einer VHF-Last >50% und 2 Gruppen mit einer VHF-Last <50% untersucht. Die Gruppen mit einer VHF-Last von 60% und 90% zeigten im Vergleich zu der SR-Gruppe und der Gruppe mit einer VHF-Last von 30% strukturelle und funktionelle Änderungen. Als Effekte einer Simulation mit hoher VHF-Last konnte eine signifikante Abnahme der Ca^{2+} -Transientenamplitude sowie eine signifikante Reduktion der Sarkomerregularität von α -Actinin und Titin beobachtet werden. Die gezeigten pathologischen Veränderungen stellen typische Charakteristika der HI dar (82–85).

Durch die vorliegende Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Höhe der VHF-Last in vitro mit dem Ausmaß der elektrischen und zellulären Remodelingprozesse korreliert. Die Erkenntnisse dieses „back to bench“-Ansatzes könnten somit als Erklärungsmöglichkeiten für die klinischen Befunde der CASTLE-AF Studie dienen.

4.2 Verwendung von iPSC-KM als repräsentative Zellen

Eine Vielzahl der Studien zur Untersuchung des Effekts von VHF bzw. Tachykardien auf den LV beschränkt sich auf Tiermodelle. Beispielsweise gibt es Studien, die hierbei die Auswirkung durch eine künstliche rechtsventrikuläre Stimulation im Tiermodell analysieren (4). In einer Studie von Wiedmann et al. wurde bei Schweinen nach Schrittmacherimplantation eine VHF-Simulation durchgeführt, um die Auswirkungen

von Doxapram auf das VHF zu analysieren. Hierbei wurde bei diesen durch eine Vorhofstimulation persistierendes VHF erzeugt (86). Neben in vivo Modellen wurden auch der Einfluss von VHF in vitro anhand von Rattenkardiomyozyten untersucht. Hierbei wurde ein Teil der Rattenkardiomyozyten mit einem Mehrkanal-Zellstimulator mit einer Frequenz von 3 Hz regelmäßig stimuliert, ein weiterer Teil wurde jeweils über 12 h unregelmäßig stimuliert (pseudo-zufällige Variation innerhalb der angegebenen Frequenz). Zudem gab es eine Kontrollgruppe ohne Stimulation. Mittels Epifluoreszenzmikroskop konnte in der Gruppe mit einer unregelmäßiger Stimulation herausgefunden werden, dass es zu einer Reduktion der Ca^{2+} -Transientenamplitude kam, die mit einer Erhöhung des diastolischen Ca^{2+} einherging (87).

Die artifizielle rechtsventrikuläre Stimulation kann jedoch per se zur HI führen, was eine entscheidende Limitation dieser Modelle darstellt (88). Zudem unterscheidet sich die elektromechanische Kopplung zwischen den verschiedenen Spezies, sodass Ergebnisse aus Tierversuchen nur eingeschränkt auf humanes Gewebe übertragbar sind (48). Daher sind für einen translationalen Ansatz humane Kardiomyozyten erforderlich. Nur wenige Studien verwendeten hierbei für einen VHF-Simulationsansatz isolierte humane Zellen. So wurden in einer Studie von Simmers et al. an primären humanen Endothelzellen geforscht und ein Modell zur Hämodynamik von VHF entwickelt, welches prothrombotische Veränderungen feststellte (89). Mittlerweile gibt es auch Computersimulationen, die VHF-Modelle reproduzieren und dabei kein menschliches Gewebe oder Tiergewebe verwenden (90). Insgesamt erfordert die Simulation von VHF die Verfügbarkeit geeigneter Zellen und ein adäquates Simulationsprotokoll. Somit bietet das hier eigens etablierte, auf iPSC-KM basierende ex vivo VHF-Simulationsmodell eine entsprechende Möglichkeit, die Effekte verschiedener VHF-Lasten zu analysieren. Messungen an iPSC-KM stellen eine etablierte und anerkannte Methode zur Erforschung kardiovaskulärer Erkrankungen dar, da die Zellen eine hohe Ähnlichkeit zu primären humanen Kardiomyozyten aufweisen (57,91). Ein Vorteil der iPSC-KM ist insbesondere, dass sie für eine Langzeitkultur geeignet sind und daher über einen längeren Zeitraum stimuliert werden können, wohingegen primäre humane Kardiomyozyten nur für kurze Zeit funktionsfähig in Kultur erhalten werden können (56).

4.3 Mechanistische Erklärungsansätze der Veränderungen im Ca^{2+} -Haushalt

In den durchgeführten Experimenten konnte im Hinblick auf den Ca^{2+} -Haushalt der Zellen beobachtet werden, dass nach einer 7 d VHF-Simulation die Ca^{2+} -Transientenamplitude in den Gruppen mit einer VHF-Last von 60% und 90% im Vergleich zur SR-Gruppe und der Gruppe mit einer VHF-Last von 30% signifikant abnahm. Dieser Effekt konnte noch nicht nach einer VHF-Simulation von 48 h festgestellt werden. Zudem zeigten sich zu beiden Zeitpunkten keine signifikanten Veränderungen in Bezug auf die diastolische Ca^{2+} -Konzentration und die RT 80%. Mithilfe der Erkenntnisse aus der Studie von Pabel et al. können für die hier festgestellte reduzierte Ca^{2+} -Transientenamplitude mögliche Schlussfolgerungen gezogen werden.

Ein Erklärungsansatz für die reduzierte Ca^{2+} -Transientenamplitude ist einerseits eine durch oxidativen Stress induzierte Aktivitätszunahme der CaMKII. Dies wiederum führt zu einer gesteigerten RyR2-Phosphorylierung, was ein erhöhtes diastolisches Ca^{2+} -Leck bewirkt. Andererseits wird aufgrund einer Veränderung der Expression der SERCA 2a und einer hiermit verbundenen gestörten Ca^{2+} -Wiederaufnahme ins Sarkoplasmatische Retikulum eine Reduktion der Ca^{2+} -Transientenamplitude verursacht (48).

Da es im Rahmen der elektromechanischen Kopplung durch die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an Troponin C zur Myofilamentaktivierung kommt, wird die systolische Kontraktionskraft auch durch die Höhe der Ca^{2+} -Transientenamplitude bestimmt (48). Eine reduzierte Ca^{2+} -Transientenamplitude führt somit zu einer Beeinträchtigung der Kontraktilität mit verringerter kontraktile Kraft. Die beschriebenen Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase sind bereits bekannte Charakteristika, die an der Entstehung von HI-Remodelingprozessen mit systolischer Dysfunktion beteiligt sind (52,82,92). Zusammenfassend könnten diese Mechanismen als Erklärungsansatz für die hier festgestellte reduzierte Ca^{2+} -Transientenamplitude dienen.

Im Gegensatz dazu war die diastolische Ca^{2+} -Konzentration und die RT 80% unter verschiedener VHF-Lasten nicht relevant verändert. In früheren Studien an neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte festgestellt werden, dass eine arrhythmische Stimulation mit einer Reduktion der Ca^{2+} -Transientenamplitude und einer Zunahme des diastolischen Ca^{2+} einherging (87). Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass diese

Mechanismen der EC-Kopplung speziesabhängig sind. Um translationale Schlussfolgerungen ziehen zu können, ist die Verwendung von humanen Gewebe erforderlich (48). In einer weiteren Studie wurden humane rechtsatriale Kardiomyozyten mit VHF im Vergleich zum SR analysiert (93). In der Elektronenmikroskopie zeigte das VHF-Gewebe im Vergleich zum SR-Gewebe erhöhte diastolische Ca^{2+} -Level. Hierbei erfolgte die Analyse jedoch am atrialen und nicht an ventrikulärem Gewebe. Die oben erwähnte Analyse aus unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass bei LV-Proben von AS-Patienten mit erhaltener LV-Funktion und VHF im Vergleich zu Patienten im SR die diastolischen Ca^{2+} -Level und die Ca^{2+} -Transientenkinetik nicht beeinträchtigt waren (48).

4.4 Durch das VHF-Simulationsmodell induzierte Sarkomerirregularität

Zur Analyse der Auswirkung verschiedener VHF-Lasten wurden neben den Untersuchungen des Ca^{2+} -Haushalts zusätzlich Immunfluoreszenzfärbungen von Myofilamenten durchgeführt, welche entscheidend die kardiale Kontraktilität beeinflussen (94,95). Myofilamente können bei pathologischen Zuständen wie der HI verändert sein, was zu einer Beeinträchtigung der Kontraktilität führt. Diese Sarkomerdysfunktion nimmt bei der eingeschränkten systolischen Pumpfunktion des Herzens im Rahmen einer HI eine Schlüsselrolle ein (81). In der vorliegenden Arbeit wurden als repräsentative Bestandteile der kardialen Myofilamente α -Actinin und Titin untersucht und durch deren Anfärbung die Sarkomerorganisation analysiert. Es wurden Experimente an iPSC-KM durchgeführt, bei denen die Zellen auf die beiden Myofilamente angefärbt und für 7 d mit unterschiedlicher VHF-Last stimuliert wurden. Dabei kam es zu einer signifikanten Abnahme der Sarkomerorganisation bei einer VHF-Last von 60% und 90%. Somit korrelierte eine Zunahme der VHF-Last mit einer Abnahme der Regelmäßigkeit der Sarkomeranordnung.

Veränderungen in der Anordnung von α -Actinin wurden bereits bei anderen Erkrankungen wie der hypertrophen Kardiomyopathie festgestellt. Hierbei wurde mittels Genomanalyse bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie eine Mutation im Gen für α -Actinin 2 (ACTN2-Gen) nachgewiesen (94).

Ferner konnte durch eine weitere Studie, bei der eine immunhistochemische Analyse von humanem Myokard von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie oder AS und

gleichzeitig vorliegender LSVD erfolgte, eine Unregelmäßigkeit in der Anordnung von α -Actinin gezeigt werden. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass sich die Expression von α -Actinin im Western und Northern-Blot zwischen normalen und erkranktem Myokard nicht signifikant veränderte. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass nicht eine Störung der Transkription sowie Translation des Proteins im geschädigten Myokard, sondern eine Desorganisation von Bedeutung ist (96).

Neben Veränderungen der Anordnung von α -Actinin bei kardialen Erkrankungen konnten andere Studien dies auch für Titin belegen. Entgegen der früheren Annahme, dass die Rolle von Titin sich v.a. auf die Elastizität der Myofibrillen beschränkt, ist das Protein auch als Stresssensor relevant, da Titin sowie Titin-basierte Proteinkomplexe eine entscheidende Rolle bei der mechano-sensitiven Kopplung einnehmen (97). Integrale Bestandteile der Mechanosensorik in den Kardiomyozyten befinden sich u.a. in Z-Scheiben, welche durch das Titinfilament verknüpft werden. Dementsprechend kann eine Beeinträchtigung von Titin in der mechano-sensitiven Kopplung zu einer mechanischen Dysregulation und konsekutiv zu einer HI führen (97).

Es konnte bereits belegt werden, dass ein Rückgang des Titingehalts bei HI zu verzeichnen ist, was zu der beeinträchtigten Kontraktionsfähigkeit des Herzens mitführen könnte. Dies beobachtete eine Studie von Morano et al. Verwendet wurde einerseits Myokard, welches im Rahmen von Herztransplantationen von Patienten mit NYHA-Stadium IV gewonnen wurde, und andererseits Myokard von hirntoten Patienten nach traumatischen Verletzungen ohne bekannte kardiale Erkrankung. Im Western Blot war der totale Gehalt an Titin im erkrankten Gewebe signifikant niedriger als im gesunden Gewebe (98).

Die Rolle von Titin im Kontext von Herzhypertrophie und -versagen wurde auch in einer Studie von Collins et al. bei Meerschweinchen analysiert. Das Ziel bestand darin, Veränderungen der Genexpression zu untersuchen, die eine Assoziation mit der Entstehung einer HI aus einer LV-Hypertrophie aufweisen. Um die LV-Hypertrophie zu induzieren, wurde bei den Meerschweinchen operativ ein thorakales Aortenbanding durchgeführt. Die Kontrollgruppe bestand aus scheinoperierten Tieren. Nach einem Beobachtungszeitraum von 4 und 8 Wochen konnte mittels Expressionsanalysen detektiert werden, dass die Menge der Titin-mRNA bei linksventrikulärer Hypertrophie zwar zunächst anstieg, danach jedoch bei dekompensierter HI abnahm (99). Zudem wurden in einer Studie von Hein et al. Untersuchungen an humanem LV-Gewebe, das

im Rahmen von Herztransplantationen von Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie und NYHA-Stadium III oder IV gewonnen wurde, durchgeführt und mit gesundem humanen Myokard von Patienten, bei denen das Herz nicht für eine Organtransplantation in Frage kam, bzw. Ratten- und Schweinemyokard verglichen. Mittels Immunhistochemie wurde das Gewebe mit Antikörper gegen Titin untersucht. Gesundes Herzgewebe wies eine regelmäßige Titinanordnung auf, während erkranktes Gewebe hingegen eine reduzierte Intensität der Titinfluoreszenz sowie Desorganisation und einen partiellen Verlust von Titin zeigte. Dabei kann die festgestellte Veränderung der Titinexpression auf einen verstärkten Abbau des Proteins oder auf eine Störung der Transkription zurückgeführt werden (95).

Somit konnten verschiedene Studien bereits pathologische Veränderungen von α -Actinin und Titin bei unterschiedlichen kardialen Krankheitsentitäten aufzeigen. Unsere Arbeit konnte nun erstmals nachweisen, dass in Abhängigkeit der VHF-Last in einem in vitro Modell eine Abnahme der Sarkomerregularität von α -Actinin und Titin induziert wird, wenn VHF mehr als die Hälfte der Zeit vorliegt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass VHF zu ähnlichen strukturellen Remodelingprozessen führt, die bereits aus der Forschung zu anderen kardialen Erkrankungen wie der HI oder hypertrophen Kardiomyopathie bekannt sind. Somit wird durch diese Resultate unterstrichen, dass eine Rhythmuskontrolle bei Patienten mit VHF von großer Relevanz ist, da selbst bei der hier gewählten Frequenz im VHF-Simulationsmodell ohne relevante Tachykardiekomponente Veränderungen auftreten, die über eine nachteilige Beeinträchtigung der kardialen Myofilamente eine Verschlechterung der Kontraktilität zur Folge haben können.

4.5 Korrelation zellulärer Veränderungen mit der Höhe der VHF-Last

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits nachweisen, dass sich selbst normofrequentes VHF ohne Tachykardiekomponente negativ auf die myokardiale zelluläre Funktion auswirkt (48).

Bisher wurde laut Definition der aktuellen Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) - Leitlinie das Ausbleiben eines VHF-Rezidivs >30 s nach interventionellem rhythmuserhaltenden Regime als Therapieerfolg gewertet (100). Allerdings scheint diese Definition nur eine eingeschränkte klinische Relevanz zu haben, da das alleinige

Auftreten eines VHF-Rezidivs in der CASTLE-AF Studie nicht mit einer schlechteren Prognose verbunden war, solange VHF weniger als die Hälfte der Zeit auftrat (17). Die Korrelation der Höhe der VHF-Last und negativen kardiovaskulären sowie zerebrovaskulären Folgen wurde auch in einem Review untersucht. Eine Zunahme der VHF-Last war mit einem höheren Risiko für thromboembolische Ereignisse und kognitiver Beeinträchtigungen vergesellschaftet. Zudem war eine höhere VHF-Last mit einer Zunahme der Hospitalisierung, Morbidität und Mortalität verbunden (101).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit, dass bei einem Cut-Off von >50% VHF-Last negative Auswirkungen auf die zelluläre Funktion zu beobachten waren, scheint die VHF-Last im klinischen sowie im experimentellen Kontext einen wesentlichen Stellenwert zu haben. Translational betrachtet könnte die VHF-Last ein entscheidender Parameter für den Erfolg der Rhythmuskontrolle sein und sollte daher in die Definition des Therapieerfolgs mitberücksichtigt werden. Somit können die klinischen Erkenntnisse der CASTLE-AF Studie in Korrelation mit unseren experimentellen Daten zu einer Neubewertung der Definition des Erfolgs einer VHF-Ablationstherapie führen.

4.6 Rhythmuskontrolle als vorteilhafter Therapieansatz bei VHF

Die CASTLE-AF Studie als Grundlage dieser Arbeit zeigte, dass die Rhythmuskontrolle durch VHF-Ablation mit einem verbesserten Patientenoutcome verbunden ist. Der kombinierte primäre Endpunkt aus Mortalität und Hospitalisierung aufgrund einer Verschlechterung der HF sowie die LV-Funktion wurde mittels Katheterablation verbessert (16). Eine Subanalyse dieser Studie wies ebenfalls die Bedeutung der rhythmuserhaltenden Therapie nach, da eine VHF-Last von <50% nach 6 Monaten nach Ablationstherapie mit einem besseren Outcome verbunden war (17). Auch die aktuelle Leitlinie der ESC zur Behandlung von VHF hebt die Bedeutung der Rhythmuskontrolle hervor (102). Hierbei wird bei symptomatischen VHF-Patienten die Therapie zur Rhythmuskontrolle zur Verbesserung der Symptome und der Lebensqualität mit dem Empfehlungsgrad (Klasse I, Level A) empfohlen.

Die VHF-Last als entscheidender Parameter konnte in dieser Arbeit experimentell bestätigt werden. Höhere VHF-Lasten ab einem Schwellenwert >50% korrelierten im Gegensatz zu niedrigeren VHF-Lasten <50% mit Veränderungen im Ca^{2+} -Haushalt

und in der Sarkomerorganisation. Überträgt man translational betrachtet diese Ergebnisse auf den klinischen Alltag, wird der Stellenwert des Rhythmuserhalts in der Therapie des VHF erneuert unterstrichen.

Auch andere Untersuchungen wie die CAMERA-MRI Studie bestätigen die positiven Auswirkungen einer rhythmuserhaltenden Therapie bei Patienten mit VHF und LVEF $\leq 45\%$ auf das Patientenoutcome. Dabei wurde ein interessantes Studiendesign gewählt. Es wurden Patienten mit persistierendem VHF und einer LVEF $\leq 45\%$ eingeschlossen, bei denen eine andere Ursache der HI ausgeschlossen werden konnte. Alle Patienten erhielten vor Randomisierung u.a. eine Echokardiographie sowie ein Kardio-MRT und zunächst eine medikamentöse optimierte Frequenzkontrolle. Danach erfolgte die Zuteilung in eine Ablationsgruppe oder in eine Kontrollgruppe, bei der das medikamentöse Regime der Frequenzkontrolle fortgeführt wurde. Der primäre Endpunkt bestand aus der Änderung der LVEF, die durch ein erneutes Kardio-MRT nach 6 Monaten bestimmt wurde. Die mit einer Katheterablation behandelten Patienten wiesen verglichen zur medikamentösen Kontrolle eine signifikante Verbesserung der LVEF auf. Zusätzlich kam es u.a. zu einer Reduktion der Vorhof- und Kammergröße und des BNP-Spiegels.

In der Ablationsgruppe zeigten Patienten, die zu Studienbeginn keine ventrikuläre Fibrose im Kardio-MRT aufwiesen, eine ausgeprägtere Erholung der LVEF im Kardio-MRT nach 6 Monaten im Vergleich zu Patienten mit ventrikulärer Fibrose. Zudem hatten Patienten ohne Fibrosenachweis eine höhere Wahrscheinlichkeit einer Normalisierung der LV-Funktion. Da alle eingeschlossenen Patienten zunächst eine medizinische Frequenzkontrolle erhielten, konnten die Ergebnisse durch eine Tachykardie nicht beeinflusst werden (103).

Die Bedeutung der Rhythmuskontrolle konnte auch in einer Metaanalyse von Kotecha et al. demonstriert werden. Es wurden dabei Patientendaten aus 11 randomisierten, kontrollierten Doppelblindstudien untersucht und als primärer Endpunkt die Gesamtmortalität bestimmt. Hierbei war eine medikamentöse Behandlung mit Beta-Blockern nur bei den Patienten mit einer besseren Prognose verbunden, die sich im SR befanden. Bei Vorliegen eines frequenzkontrollierten VHF konnte hingegen keine positive Wirkung der Beta-Blocker auf die Mortalität von Patienten festgestellt werden.

Somit weisen auch diese Resultate auf die Vorteile des Erhalts eines SR hin, um das Patientenoutcome günstig zu beeinflussen (104).

Dagegen scheint die RAFT-Studie zunächst im Kontrast zu den Ergebnissen der bisher erwähnten Untersuchungen zu stehen. Hierbei wurden Patienten in die Studie eingeschlossen, die paroxysmales oder persistierendes VHF mit Symptomen der HI entsprechend NYHA II-III und erhöhte NT-proBNP-Spiegel aufwiesen und entweder in eine Ablationsgruppe oder eine Frequenzkontrollgruppe randomisiert wurden. Der kombinierte primäre Endpunkt bestand aus der Gesamtmortalität und allen HI-Ereignissen in einem Nachbeobachtungszeitraum von mind. 2 Jahren. Hierbei waren HI-Ereignisse definiert als Einweisung in eine Gesundheitseinrichtung für >24h oder eine klinisch signifikante Verschlechterung der HI, die zur Verabreichung eines intravenösen Diuretikums in einer Notaufnahme führte. Die sekundären Endpunkte bestanden aus der LVEF, 6-Minuten-Gehtest und NT-proBNP. Als Ergebnis zeigte sich, dass der kombinierte primäre Endpunkt bei der Patientengruppe mit Katheterablation im Vergleich zur medikamentösen Frequenzkontrolle keinen relevanten Unterschied aufwies, allerdings eine Tendenz zu einem besseren Outcome in der Ablationsgruppe festgestellt werden konnte ($p=0,066$). Zudem zeigten alle sekundären Endpunkte eine signifikante Verbesserung in der Ablationsgruppe (105). Im diesem Kontext ist als Limitation der RAFT-AF Studie zu erwähnen, dass nur 2/3 der ursprünglich geplanten Patientenzahlen rekrutiert wurden. Das Ergebnis der Studie wäre möglicherweise mit einer größeren Patientenzahl und einem längeren Nachbeobachtungszeitraum anders ausgefallen (106).

Um die Ergebnisse der RAFT-Studie weiter beurteilen zu können, muss in diesem Kontext die APAF-CRT Studie erwähnt werden. Dabei wurden Patienten untersucht, die an permanenten VHF mit schmalen QRS-Komplex erkrankt und bezüglich einer HI im letzten Jahr hospitalisiert waren. Nach dem Zufallsprinzip erhielten die Patienten eine Therapie mit Ablation des atrioventrikulären Übergangs und eine Implantation eines biventrikulären Schrittmachers, d.h. eines Devices zur kardialen Resynchronisationstherapie (CRT, engl. *Cardiac Resynchronization Therapy*) oder eine pharmakologische Frequenzkontrolle. Der primäre Endpunkt bestand aus der Gesamtmortalität und trat in der Interventionsgruppe signifikant weniger häufig auf als in der pharmakologischen Frequenzkontrollgruppe. Dementsprechend war die

Patientengruppe mit Ablation des atrioventrikulären Übergangs und CRT-Implantation der medikamentösen Gruppe in Bezug auf die Senkung der Mortalität überlegen (107). Vergleicht man diese Ergebnisse mit der RAFT-Studie, sollte hierbei kritisch angemerkt werden, dass 19% der Patienten mit einer LVEF \leq 45% CRT-Träger waren und insgesamt 60 Patienten in der Frequenzkontrollgruppe eine AV-Knoten-Ablation und vermutlich eine CRT-Implantation (nicht berichtet) erhielten (105,108). Möglicherweise könnten diese Patienten in der medikamentösen Frequenzkontrolle die grenzwertige Signifikanz des primären Endpunkts beeinflusst haben (108). Im Anbetracht der Resultate der APAF-CRT Studie ergeben sich bezogen auf die RAFT-Studie weitere Limitationen, weswegen die Ergebnisse somit kritisch hinterfragt werden sollten.

Somit finden sich in Zusammenschau aktueller Studien klare Vorteile für eine rhythmuserhaltende Therapie bei Patienten mit VHF und LVSD. Es konnte sowohl in klinischen als auch in experimentellen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass auch ein normofrequentes VHF mit einem eingeschränkten Patientenoutcome assoziiert ist und negative zelluläre Veränderungen induziert. Wie bereits erwähnt, empfiehlt die aktuelle Leitlinie der ESC eine Ablation bei Patienten mit VHF und HI zur Verbesserung der EF (102). Auch die Resultate unserer Arbeit unterstützen die Argumentation für einen Rhythmuserhalt, da ein VHF-Simulationsmodell mit einer Stimulationsfrequenz von 90 bpm verwendet wurde, welche innerhalb des Ziels der Frequenzkontrolle bei VHF laut aktueller Leitlinie der ESC liegt und trotzdem nachteilige elektrische und strukturelle Veränderungen indiziert (102). Damit helfen unsere Ergebnisse die klinischen Befunden besser zu verstehen und weisen ein translationales Potential auf. Zudem könnten sie dazu beitragen, neue Therapiestrategien bei der Behandlung von VHF und HI zu definieren. Dabei sollte das Ziel der Wiederherstellung des SR, primär durch Katheterablation, hervorgehoben werden.

4.7 Translationale Relevanz eines frühen Rhythmuserhalt bei VHF

Zur Untersuchung der kurzfristigen sowie langfristigen Effekte der VHF-Simulation wurden die Zellen in unserer Arbeit für 48 h und 7 d stimuliert.

Wir konnten feststellen, dass Veränderungen der Ca^{2+} -Transientenamplitude erst nach einer 7-tägigen Stimulation auftraten, während nach 48 h noch keine signifikanten Auswirkungen beobachtet werden konnten. Passend dazu zeigte sich bei der Untersuchung der Myofilamente eine Abnahme der Sarkomeranordnung nach einer VHF-Simulation über 7 d.

Somit traten die Veränderungen der Ca^{2+} -Transientenamplitude erst auf, sobald die arrhythmische Simulation über einen längeren Zeitraum stattgefunden hat. Es scheint also eine gewisse Zeit zu dauern, bis elektrophysiologische und zelluläre Veränderungen induzierbar sind.

Überträgt man diese Ergebnisse auf den klinischen Alltag, könnte somit eine frühzeitige Therapie des VHF relevant sein, um mögliche Folgepathologien durch VHF zu verhindern. Klinisch konnte der Benefit eines frühen Rhythmuserhalts in der EAST-AFNET 4 Studie demonstriert werden. Hierbei wurden Patienten mit neu diagnostiziertem VHF innerhalb des letzten Jahres vor Studieneinschluss untersucht. Es erfolgte eine Randomisierung in zwei Gruppen, wobei die Patienten eine frühe Rhythmuskontrolle oder eine medikamentöse Standardtherapie gemäß den aktuellen Leitlinien erhielten. Dabei umfasste die frühe Rhythmuskontrolle die Therapie mit Antiarrhythmika oder Katheterablation. Die Standardtherapie bestand primär aus einer frequenzkontrollierenden Therapie ohne Rhythmuskontrolle. Traten unter diesem Regime schwere, VHF-assoziierte Symptome auf, wurde ein Rhythmuserhalt angestrebt. Der erste primäre Endpunkt setzte sich aus Tod durch kardiovaskuläre Ursachen, Schlaganfall, Hospitalisierungen aufgrund von HI oder akutem Koronarsyndroms zusammen. Der zweite primäre Endpunkt umfasste die Anzahl der Krankenhausaufenthalte pro Jahr. Bei der Patientengruppe mit einer frühen Rhythmuskontrolle traten signifikant seltener Ereignisse des ersten primären Endpunkts im Gegensatz zur Gruppe mit einer Standardtherapie auf ($p=0,005$). Der zweite primäre Endpunkt unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Schlussendlich wies also die Patientengruppe mit einer frühen Rhythmuskontrolle ein geringeres Risiko für ein negatives kardiovaskuläres Outcome auf (109). Die in unserer

Arbeit festgestellten Erkenntnisse weisen in Übereinstimmung mit den klinischen Daten von EAST-AFNET 4 auf die Vorteile eines frühen Rhythmuserhalts bei VHF hin.

4.8 Limitationen der Arbeit

Für die Versuche wurden jeweils pro Versuchsreihe 13 verschiedene kardiale Differenzierungen verwendet. Eine größere Anzahl an Differenzierungen würde mögliche Unterschiede hinsichtlich des genetischen Hintergrunds, Alter oder Geschlecht der Spender besser ausgleichen.

Des Weiteren ist anzumerken, dass für die Experimente iPSC-KM verwendet wurden, jedoch im humanen Herzen Kardiomyozyten von verschiedenen Zelltypen wie Fibroblasten, Endothelzellen etc. umgeben sind. Daher wäre eine Untersuchung an Gewebe besser, welches neben den iPSC-KM noch weitere Zelltypen enthalten würde (56).

Schließlich wurden für unsere Versuche iPSC-KM von Spendern ohne bekannte kardiale Erkrankung verwendet, während die Probanden der CASTLE-AF Studie eine reduzierte LVEF <35% und eine NYHA Stadium von II, III oder IV aufwiesen (16). Somit bleibt neben der Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse offen, ob dieselben experimentellen Resultate auch bei iPSC-KM von Spendern mit LVSD reproduziert werden könnten.

4.9 Ausblick

Um die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse bestätigen zu können, ist eine Übertragung des etablierten iPSC-KM-VHF-Simulationsmodells auf humanes Gewebe geplant. Hierfür sollen Untersuchungen an primärem ventrikulären Myokard aus explantierten Herzen im Endstadium der HI durchgeführt werden, da die Forschung an diesem Gewebe entscheidend für das Verständnis der Pathomechanismen des VHF's ist. Durch eine neu etablierte Methode besteht nun die Möglichkeit, humane Myokardslices in einer Kulturkammer über mehrere Wochen lang zu stimulieren (110). Die Slices sollen analog zu den iPSC-KM mit den entsprechenden Arrhythmiekomponenten für einen längeren Zeitraum von mehreren Wochen stimuliert und die kontraktile Funktion gemessen werden. Da das myokardiale Gewebe von

Patienten mit reduzierter LV-Funktion gewonnen wird, ist eine gute Übertragbarkeit der Resultate im Hinblick auf die CASTLE-AF Studie gegeben.

Des Weiteren soll auch auf molekularbiologischer Ebene geforscht werden, um die erhobenen funktionellen Befunde zu erklären. Dazu werden Gefrierproben von iPSC-KM und Slices gewonnen und zellulären Remodelingvorgänge mit einem Fokus auf die Ca^{2+} -Homöostase-regulierende Proteine analysiert (z.B. SERCA, Ryanodinrezeptor, CaMKII, PLB usw.).

5 Zusammenfassung

Das grundlegende Ziel dieser Arbeit war es, Erklärungsansätze für die CASTLE-AF Studie auf zellulärer Ebene aufzudecken und die Auswirkungen verschiedener VHF-Lasten auf die ventrikuläre Funktion zu untersuchen. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das VHF-Simulationsmodell mit niedrigen und hohen VHF-Lasten Veränderungen in der Ca^{2+} -Transientenamplitude und in der Sarkomerorganisation von α -Actinin und Titin bewirkt, wobei zwischen einer VHF-Last 30% und 60% ein Schwellenwert zu liegen scheint, ab dem eine Beeinträchtigung der zellulären Funktion induziert wird. Während in den Gruppen mit einer VHF-Last von 60% und 90% diese zellulären Veränderungen festgestellt werden konnten, zeigten sich in der SR-Gruppe sowie in der Gruppe mit einer VHF-Last von 30% die oben beschriebenen negativen Auswirkungen nicht. Somit bieten unsere Daten eine Erklärungsmöglichkeit für die klinischen Erkenntnisse der CASTLE-AF Studie und stimmen mit der Subanalyse der CASTLE-AF Studie überein, bei der Patienten ein besseres Outcome aufwiesen, wenn ihre VHF-Last nach 6 Monaten nach Katheterablation auf $< 50\%$ reduziert war.

Die Ergebnisse zeigen erstmalig, dass die veränderte Zellfunktion von der Höhe der VHF-Last abhängig ist und eine Beeinträchtigung der zellulären Funktion ab einer VHF-Last $>50\%$ induziert wird. Somit unterstreichen die Resultate translational betrachtet die klinische Relevanz der Rhythmuskontrolle bei VHF. Da die Veränderungen in der Ca^{2+} -Transientenamplitude erst nach einer VHF-Simulation über 7 d und nicht bereits nach 48 h sichtbar waren, scheinen die zellulären ventrikulären Veränderungen erst bei einer Simulation über einen längeren Zeitraum zu entstehen.

Daher könnte bereits mittels frühzeitiger Rhythmuskontrolle bei VHF ein besseres klinisches Outcome erreicht werden. Zusammenfassend könnten die experimentell erhobenen Resultate in diesem „back to bench“-Ansatz als ein möglicher Erklärungsansatz für die klinischen Ergebnisse der CASTLE-AF Studie dienen.

6 Literaturverzeichnis

1. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Vasan RS, Leip EP, Wolf PA, u. a. Temporal Relations of Atrial Fibrillation and Congestive Heart Failure and Their Joint Influence on Mortality: The Framingham Heart Study. *Circulation*. Mai 2003;107(23):2920–5.
2. Benjamin EJ, Wolf PA, D’Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D. Impact of Atrial Fibrillation on the Risk of Death: The Framingham Heart Study. *Circulation*. September 1998;98(10):946–52.
3. Anter E, Jessup M, Callans DJ. Atrial Fibrillation and Heart Failure: Treatment Considerations for a Dual Epidemic. *Circulation*. 12. Mai 2009;119(18):2516–25.
4. Sossalla S, Vollmann D. Arrhythmia-Induced Cardiomyopathy. *Dtsch Arzteblatt Online*. 11. Mai 2018;115(19):335–41.
5. Oladiran O, Nwosu I. Stroke risk stratification in atrial fibrillation: a review of common risk factors. *J Community Hosp Intern Med Perspect*. 4. März 2019;9(2):113–20.
6. Wijesurendra RS, Casadei B. Atrial fibrillation: effects beyond the atrium? *März 2015*;105(3):10.
7. Marini C, De Santis F, Sacco S, Russo T, Olivieri L, Totaro R, u. a. Contribution of Atrial Fibrillation to Incidence and Outcome of Ischemic Stroke: Results From a Population-Based Study. *Stroke*. Juni 2005;36(6):1115–9.
8. Ott A, Breteler MMB, de Bruyne MC, van Harskamp F, Grobbee DE, Hofman A. Atrial Fibrillation and Dementia in a Population-Based Study: The Rotterdam Study. *Stroke*. Februar 1997;28(2):316–21.
9. Krijthe BP, Kunst A, Benjamin EJ, Lip GYH, Franco OH, Hofman A, u. a. Projections on the number of individuals with atrial fibrillation in the European Union, from 2000 to 2060. *Juli 2013*;34(35):2746–51.
10. Maisel WH, Stevenson LW. Atrial fibrillation in heart failure: epidemiology, pathophysiology, and rationale for therapy. *Am J Cardiol*. März 2003;91(6):2–8.
11. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson A, Atar D, Casadei B, u. a. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur Heart J*. 7. Oktober 2016;37(38):2893–962.
12. Jeong YH, Choi KJ, Song JM, Hwang ES, Park KM, Nam GB, u. a. Diagnostic Approach and Treatment Strategy in Tachycardia-induced Cardiomyopathy. *Clin*

Cardiol. April 2008;31(4):172–8.

13. Nerheim P, Birger-Botkin S, Piracha L, Olshansky B. Heart Failure and Sudden Death in Patients With Tachycardia-Induced Cardiomyopathy and Recurrent Tachycardia. *Circulation*. Juni 2004;110(3):247–52.
14. Pinto YM, Elliott PM, Arbustini E, Adler Y, Anastasakis A, Böhm M, u. a. Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J*. Januar 2016;37(23):1850–8.
15. Santangeli P, Marzo F, Camporeale A, Bellocchi F, Crea F, Pieroni M. What do tachycardiomyopathy belong to? *Eur Heart J*. März 2008;29(8):1073–4.
16. Marrouche NF, Brachmann J, Andresen D, Siebels J, Boersma L, Jordaens L, u. a. Catheter Ablation for Atrial Fibrillation with Heart Failure. *N Engl J Med*. Februar 2018;378(5):417–27.
17. Brachmann J, Sohns C, Andresen D, Siebels J, Sehner S, Boersma L, u. a. Atrial Fibrillation Burden and Clinical Outcomes in Heart Failure. *JACC Clin Electrophysiol*. Mai 2021;7(5):594–603.
18. Bers DM. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2001 [zitiert 13. Juli 2021]. (Developments in Cardiovascular Medicine; Bd. 237). Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-010-0658-3>
19. Sjöblom B, Salmazo A, Djinoić-Carugo K. α -Actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci*. September 2008;65(17):2688–701.
20. Gautel M, Goulding D. A molecular map of titin/connectin elasticity reveals two different mechanisms acting in series. *FEBS Lett*. 29. April 1996;385(1–2):11–4.
21. Welsch U, Kummer W, Deller T. *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie: das Lehrbuch*. 5. Auflage. München: Elsevier; 2018. 734 S.
22. Linke WA, Kulke M, Li H, Fujita-Becker S, Neagoe C, Manstein DJ, u. a. PEVK Domain of Titin: An Entropic Spring with Actin-Binding Properties. *J Struct Biol*. Januar 2002;137(1–2):194–205.
23. Freiburg A, Gautel M. A Molecular Map of the Interactions between Titin and Myosin-Binding Protein C. Implications for Sarcomeric Assembly in Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Eur J Biochem*. Januar 1996;235(1–2):317–23.

24. Linke WA, Hamdani N. Gigantic Business: Titin Properties and Function Through Thick and Thin. *Circ Res.* 14. März 2014;114(6):1052–68.
25. Sjöstrand FS, Andersson-Cedergren E, Dewey MM. The ultrastructure of the intercalated discs of frog, mouse and guinea pig cardiac muscle. *J Ultrastruct Res.* April 1958;1(3):271–87.
26. Unwin PNT, Zampighi G. Structure of the junction between communicating cells. *Nature.* Februar 1980;283(5747):545–9.
27. Sobotta J. Atlas Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. 6., neu bearb. Aufl. Welsch U, Herausgeber. München Jena: Urban & Fischer; 2002. 262 S.
28. Irisawa H, Brown HF, Giles W. Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. *Physiol Rev.* 1. Januar 1993;73(1):197–227.
29. Brandes R, Lang F, Schmidt RF, Herausgeber. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie: mit 850 Farbabbildungen.* 32. Auflage. Berlin [Heidelberg]: Springer; 2019. 1057 S. (Lehrbuch).
30. Bean BP. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol.* 1. Juli 1985;86(1):1–30.
31. Bean BP. Classes of Calcium Channels in Vertebrate Cells. *Annu Rev Physiol.* März 1989;51(1):367–84.
32. Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Biomed Biochim Acta.* 1986;45(1–2):S167-170.
33. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 1983;245:C1-14.
34. Fabiato A, Fabiato F. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol.* 1. August 1975;249(3):469–95.
35. Kirschenlohr HL, Grace AA, Vandenberg JI, Metcalfe JC, Smith GA. Estimation of systolic and diastolic free intracellular Ca^{2+} by titration of Ca^{2+} buffering in the ferret heart. *Biochem J.* 1. März 2000;346 Pt 2:385–91.
36. Huxley HE. Muscular Contraction and Cell Motility. *Nature.* Juni 1973;243(5408):445–9.
37. Bassani RA, Bassani JW, Bers DM. Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduce $[Ca^{2+}]_i$ during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J*

Physiol. 1. Juli 1992;453(1):591–608.

38. Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol.* 15. April 1994;476(2):279–93.

39. Bers - 2002 - Cardiac excitation–contraction coupling.pdf.

40. Wakili R, Voigt N, Kääh S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest.* 1. August 2011;121(8):2955–68.

41. Iwasaki Y ki, Nishida K, Kato T, Nattel S. Atrial Fibrillation Pathophysiology: Implications for Management. *Circulation.* 15. November 2011;124(20):2264–74.

42. Heijman J, Voigt N, Nattel S, Dobrev D. Cellular and Molecular Electrophysiology of Atrial Fibrillation Initiation, Maintenance, and Progression. *Circ Res.* 25. April 2014;114(9):1483–99.

43. Dzeshka MS, Lip GYH, Snezhitskiy V, Shantsila E. Cardiac Fibrosis in Patients With Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* August 2015;66(8):943–59.

44. Sohns C, Marrouche NF. Atrial fibrillation and cardiac fibrosis. *Eur Heart J.* 7. März 2020;41(10):1123–31.

45. Avitall B, Bi J, Mykytsey A, Chicco A. Atrial and ventricular fibrosis induced by atrial fibrillation: Evidence to support early rhythm control. *Heart Rhythm.* Juni 2008;5(6):839–45.

46. Dossall DJ, Ranjan R, Higuchi K, Kholmovski E, Angel N, Li L, u. a. Chronic atrial fibrillation causes left ventricular dysfunction in dogs but not goats: experience with dogs, goats, and pigs. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 1. September 2013;305(5):H725–31.

47. Ling L han, Kistler PM, Ellims AH, Iles LM, Lee G, Hughes GL, u. a. Diffuse Ventricular Fibrosis in Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* Dezember 2012;60(23):2402–8.

48. Pabel S, Knierim M, Stehle T, Alebrand F, Paulus M, Sieme M, u. a. Effects of Atrial Fibrillation on the Human Ventricle. *Circ Res.* 23. Februar 2022;CIRCRESAHA.121.319718.

49. Cadenas E, Wefers H, Müller A, Brigelius R, Sies H. Active oxygen metabolites and their action in the hepatocyte. Studies on chemiluminescence responses and alkane production. *Agents Actions Suppl.* 1982;11:203–16.

50. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. November 2004;287(5):R1014–30.
51. Ling L han, Khammy O, Byrne M, Amirahmadi F, Foster A, Li G, u. a. Irregular Rhythm Adversely Influences Calcium Handling in Ventricular Myocardium: Implications for the Interaction Between Heart Failure and Atrial Fibrillation. *Circ Heart Fail*. November 2012;5(6):786–93.
52. Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, u. a. Inhibition of Elevated Ca²⁺ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Improves Contractility in Human Failing Myocardium. *Circ Res*. 29. Oktober 2010;107(9):1150–61.
53. van Mil A, Balk GM, Neef K, Buikema JW, Asselbergs FW, Wu SM, u. a. Modelling inherited cardiac disease using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: progress, pitfalls, and potential. *Cardiovasc Res*. 1. Dezember 2018;114(14):1828–42.
54. Zhang XH, Morad M. Calcium signaling in human stem cell-derived cardiomyocytes: Evidence from normal subjects and CPVT afflicted patients. *Cell Calcium*. März 2016;59(2–3):98–107.
55. Borchert T, Hübscher D, Guessoum CI, Lam TDD, Ghadri JR, Schellinger IN, u. a. Catecholamine-Dependent β -Adrenergic Signaling in a Pluripotent Stem Cell Model of Takotsubo Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. August 2017;70(8):975–91.
56. Streckfuss-Bömeke K, Tiburcy M, Fomin A, Luo X, Li W, Fischer C, u. a. Severe DCM phenotype of patient harboring RBM20 mutation S635A can be modeled by patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. Dezember 2017;113:9–21.
57. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, u. a. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. November 2007;131(5):861–72.
58. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, u. a. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*. 21. Dezember 2007;318(5858):1917–20.
59. Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, u. a. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc*. Januar 2013;8(1):162–75.

60. Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, u. a. Distinct Metabolic Flow Enables Large-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Cell Stem Cell*. Januar 2013;12(1):127–37.
61. Streckfuss-Bömeke K, Wolf F, Azizian A, Stauske M, Tiburcy M, Wagner S, u. a. Comparative study of human-induced pluripotent stem cells derived from bone marrow cells, hair keratinocytes, and skin fibroblasts. *Eur Heart J*. 1. September 2013;34(33):2618–29.
62. Lichtman JW, Conchello JA. Fluorescence microscopy. *Nat Methods*. 1. Dezember 2005;2(12):910–9.
63. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer; 2006. 954 S.
64. Kao JP, Tsien RY. Ca²⁺ binding kinetics of fura-2 and azo-1 from temperature-jump relaxation measurements. *Biophys J*. April 1988;53(4):635–9.
65. Raffaello A, Vecellio Reane D, Herausgeber. Calcium Signalling: Methods and Protocols [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2019 [zitiert 14. Juni 2021]. (Methods in Molecular Biology; Bd. 1925). Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9018-4>
66. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. März 1985;260(6):3440–50.
67. IonOptix. Loading Fura-2 into cardiomyocytes [Internet]. [zitiert 30. August 2021]. Verfügbar unter: <https://www.ionoptix.com/resource/loading-fura-2-into-cardiomyocytes/>
68. The Molecular Probes handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies [Internet]. Life Technologies; 2010. (Chapter 19: Indicators for Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ and Other Metal Ions). Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/technical-reference-library/Molecular%20Probes%20Handbook/chapter-pdfs/Ch-19-Ca-Mg-Zn-Ion-Indicators.pdf?icid=WE216841>
69. Q L, Altschuld RA, Stokes BT. Quantitation of intracellular free calcium in single adult cardiomyocytes by fura-2 fluorescence microscopy: Calibration of fura-2 ratios. *Biochem Biophys Res Commun*. August 1987;147(1):120–6.
70. Ladilov YV, Siegmund B, Balsler C, Piper HM. Simulated Ischemia Increases the Susceptibility of Rat Cardiomyocytes to Hypercontracture. *Circ Res*. Januar

1997;80(1):69–75.

71. Cobbold PH, Rink TJ. Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem J.* 1. Dezember 1987;248(2):313–28.
72. IonOptix. HyperSwitch Light Source [Internet]. [zitiert 26. Juli 2021]. Verfügbar unter: <https://www.ionoptix.com/products/components/light-sources/hyperswitch-light-source/>
73. IonOptix. MyoPacer Cell Stimulator [Internet]. [zitiert 26. Juli 2021]. Verfügbar unter: <https://www.ionoptix.com/products/components/stimulators/myopacer-cell-stimulator/>
74. Andy Henton. HyperSwitch Light Source [Internet]. IonOptix. [zitiert 17. Juni 2021]. Verfügbar unter: <https://www.ionoptix.com/products/components/light-sources/hyperswitch-light-source/>
75. HyperSwitch Light Source - IonOptix [Internet]. [zitiert 26. Juli 2021]. Verfügbar unter: <https://www.ionoptix.com/products/components/light-sources/hyperswitch-light-source/>
76. Niedenberger BA, Geyer CB. Advanced immunostaining approaches to study early male germ cell development. *Stem Cell Res.* März 2018;27:162–8.
77. Boeckel JN, Möbius-Winkler M, Müller M, Rebs S, Eger N, Schoppe L, u. a. SLM2 Is A Novel Cardiac Splicing Factor Involved in Heart Failure due to Dilated Cardiomyopathy. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* Juli 2021;S1672022921001467.
78. Weiwad WKK, Linke WA, Wussling MHP. Sarcomere Length–tension Relationship of Rat Cardiac Myocytes at Lengths Greater than Optimum. *J Mol Cell Cardiol.* Februar 2000;32(2):247–59.
79. Körtl T, Stehle T, Riedl D, Trausel J, Rebs S, Pabel S, u. a. Atrial Fibrillation Burden Specifically Determines Human Ventricular Cellular Remodeling. *JACC Clin Electrophysiol* [Internet]. September 2022 [zitiert 11. Oktober 2022]; Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405500X22006466>
80. Shinbane JS, Wood MA, Jensen DN, Ellenbogen KA, Fitzpatrick AP, Scheinman MM. Tachycardia-Induced Cardiomyopathy: A Review of Animal Models and Clinical Studies. *J Am Coll Cardiol.* März 1997;29(4):709–15.
81. Hamdani N, Kooij V, van Dijk S, Merkus D, Paulus WJ, Remedios C d., u. a. Sarcomeric dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res.* 12. Dezember

2007;77(4):649–58.

82. Hasenfuss G, Pieske B. Calcium Cycling in Congestive Heart Failure. *J Mol Cell Cardiol.* August 2002;34(8):951–69.

83. Marks AR. Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. *J Clin Invest.* 2. Januar 2013;123(1):46–52.

84. Kostin, M.D. S, Hein, M.D. S, Arnon, M.D. E, Scholz, Ph.D. D, Schaper, M.D. J. The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. *Heart Fail Rev.* 2000;5(3):271–80.

85. Wickenden A. The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure. *Cardiovasc Res.* Februar 1998;37(2):312–23.

86. Wiedmann F, Beyersdorf C, Zhou XB, Kraft M, Paasche A, Jávorszky N, u. a. Treatment of atrial fibrillation with doxapram: TASK-1 potassium channel inhibition as a novel pharmacological strategy. *Cardiovasc Res.* 22. Juni 2022;118(7):1728–41.

87. Lenski M, Schleider G, Kohlhaas M, Adrian L, Adam O, Tian Q, u. a. Arrhythmia causes lipid accumulation and reduced glucose uptake. *Basic Res Cardiol.* Juli 2015;110(4):40.

88. Brenyo A, Goldenberg I, Barsheshet A. The Downside of Right Ventricular Apical Pacing. *Indian Pacing Electrophysiol J.* Mai 2012;12(3):102–13.

89. Simmers MB, Cole BK, Ogletree ML, Chen Z, Xu Y, Kong L jie, u. a. Hemodynamics associated with atrial fibrillation directly alters thrombotic potential of endothelial cells. *Thromb Res.* Juli 2016;143:34–9.

90. Rotter M, Dang L, Jacquemet V, Virag N, Kappenberger L, Haïssaguerre M. Impact of Varying Ablation Patterns in a Simulation Model of Persistent Atrial Fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol.* März 2007;30(3):314–21.

91. Dudek J, Cheng I, Chowdhury A, Wozny K, Balleininger M, Reinhold R, u. a. Cardiac-specific succinate dehydrogenase deficiency in Barth syndrome. *EMBO Mol Med.* Februar 2016;8(2):139–54.

92. Fischer TH, Maier LS, Sossalla S. The ryanodine receptor leak: how a tattered receptor plunges the failing heart into crisis. *Heart Fail Rev.* Juli 2013;18(4):475–83.

93. Neef S, Dybkova N, Sossalla S, Ort KR, Fluschnik N, Neumann K, u. a. CaMKII-Dependent Diastolic SR Ca²⁺ Leak and Elevated Diastolic Ca²⁺ Levels in Right Atrial Myocardium of Patients With Atrial Fibrillation. *Circ Res.* 2. April 2010;106(6):1134–

44.

94. Chiu C, Bagnall RD, Ingles J, Yeates L, Kennerson M, Donald JA, u. a. Mutations in Alpha-Actinin-2 Cause Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* März 2010;55(11):1127–35.

95. Hein S, Scholz D, Fujitani N, Rennollet H, Brand T, Friedl A, u. a. Altered Expression of Titin and Contractile Proteins in Failing Human Myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* Oktober 1994;26(10):1291–306.

96. Hein S, Block T, Zimmermann R, Kostin S, Scheffold T, Kubin T, u. a. Deposition of nonsarcomeric alpha-actinin in cardiomyocytes from patients with dilated cardiomyopathy or chronic pressure overload. *Exp Clin Cardiol.* 2009;14(3):e68-75.

97. Linke W. Sense and stretchability: The role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res.* 6. April 2007;S0008636307001551.

98. Morano I, Hädicke K, Grom S, Koch A, Schwinger RHG, Böhm M, u. a. Titin, Myosin Light Chains and C-Protein in the Developing and Failing Human Heart. *J Mol Cell Cardiol.* März 1994;26(3):361–8.

99. Collins J. The Role of the Cytoskeleton in Left Ventricular Pressure Overload Hypertrophy and Failure. *J Mol Cell Cardiol.* Juli 1996;28(7):1435–43.

100. Calkins H, Hindricks G, Cappato R, Kim YH, Saad EB, Aguinaga L, u. a. 2017 HRS/EHRA/ECAS/APHRS/SOLAECE expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation. *EP Eur.* 1. Januar 2018;20(1):e1–160.

101. Schwennesen HT, Andrade JG, Wood KA, Piccini JP. Ablation to Reduce Atrial Fibrillation Burden and Improve Outcomes. *J Am Coll Cardiol.* September 2023;82(10):1039–50.

102. Hindricks G, Potpara T, Dagres N, Arbelo E, Bax JJ, Blomström-Lundqvist C, u. a. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J.* 1. Februar 2021;42(5):373–498.

103. Prabhu S, Taylor AJ, Costello BT, Kaye DM, McLellan AJA, Voskoboinik A, u. a. Catheter Ablation Versus Medical Rate Control in Atrial Fibrillation and Systolic Dysfunction: The CAMERA-MRI Study. *J Am Coll Cardiol.* Oktober 2017;70(16):1949–61.

104. Kotecha D, Flather MD, Altman DG, Holmes J, Rosano G, Wikstrand J, u. a.

Heart Rate and Rhythm and the Benefit of Beta-Blockers in Patients With Heart Failure. *J Am Coll Cardiol.* Juni 2017;69(24):2885–96.

105. Parkash R, Wells GA, Rouleau J, Talajic M, Essebag V, Skanes A, u. a. Randomized Ablation-Based Rhythm-Control Versus Rate-Control Trial in Patients With Heart Failure and Atrial Fibrillation: Results from the RAFT-AF trial. *Circulation.* 7. Juni 2022;145(23):1693–704.

106. RAFT-AF: No Benefit of AF Ablation for Heart Failure Patients | tctmd.com [Internet]. [zitiert 10. Januar 2024]. Verfügbar unter: <https://www.tctmd.com/news/raft-af-no-benefit-af-ablation-heart-failure-patients>

107. Brignole M, Pentimalli F, Palmisano P, Landolina M, Quartieri F, Occhetta E, u. a. AV junction ablation and cardiac resynchronization for patients with permanent atrial fibrillation and narrow QRS: the APAF-CRT mortality trial. *Eur Heart J.* 7. Dezember 2021;42(46):4731–9.

108. Bergau L, Bengel P, Sciacca V, Fink T, Sohns C, Sommer P. Atrial Fibrillation and Heart Failure. *J Clin Med.* 29. April 2022;11(9):2510.

109. Kirchhof P, Camm AJ, Goette A, Brandes A, Eckardt L, Elvan A, u. a. EAST-AFNET 4 Trial Investigators, Early Rhythm-Control Therapy in Patients with Atrial Fibrillation. *N Engl J Med.* 1. Oktober 2020;383(14):1305–16.

110. Fischer C, Milting H, Fein E, Reiser E, Lu K, Seidel T, u. a. Long-term functional and structural preservation of precision-cut human myocardium under continuous electromechanical stimulation in vitro. *Nat Commun.* Dezember 2019;10(1):117.

Veröffentlichung und Förderung

Die vorliegende Dissertationsschrift war Grundlage für folgende Publikation:

Atrial Fibrillation Burden Specifically Determines Human Ventricular Cellular Remodeling.

Thomas Körtl¹, Thea Stehle¹, Dominic Riedl¹, Johanna Trausel¹, Sabine Rebs^{2,3,4}, Steffen Pabel¹, Michael Paulus¹, Andreas Holzamer⁵, Nassir Marrouche⁶, Lars S. Maier¹, Christian Sohns⁷, Katrin Streckfuss-Bömeke^{2,3,4} und Samuel Sossalla^{1,2,3}

¹Department of Internal Medicine II, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany

²Clinic for Cardiology and Pneumology, Georg-August University Göttingen, Göttingen, Germany

³German Center of Cardiovascular Research, partner site Göttingen, Göttingen, Germany

⁴Institute of Pharmacology and Toxicology, University of Würzburg, Würzburg, Germany

⁵Department of Cardiothoracic Surgery, University of Regensburg Medical Center, Regensburg, Germany

⁶Tulane Research and Innovation for Arrhythmia Discoveries Center, Tulane University School of Medicine, New Orleans, Louisiana, USA

⁷Clinic for Electrophysiology, Herz- und Diabeteszentrum NRW, Ruhr-Universität Bochum, Bad Zenhausern, Germany

JACC: Clinical Electrophysiology

Online publiziert am 28.09.2022

Epublished DOI: 10.1016/j.jacep.2022.07.016

Diese Arbeit wurde durch das Otto-Hess-Promotionsstipendium der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) unterstützt.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Samuel Sossalla und meinem wissenschaftlichen Betreuer Dr. Thomas Körtl. Nur mithilfe ihrer engagierten und stetigen Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente sowie bei der Verschriftlichung der Ergebnisse konnte diese Arbeit entstehen. Bei Problemen jeglicher Art waren sie jeder Zeit erreichbar und ermöglichten eine exzellente Unterstützung. Durch das individuelle Mentoringkonzept unserer Arbeitsgruppe konnte ich mich persönlich sowie wissenschaftlich weiterentwickeln, was ich äußerst schätze.

Zudem möchte ich mich herzlich bei allen im Labor tätigen Mitarbeiter*innen bedanken. Ein besonderer Dank geht an Dominic Riedl, der mir mit großer Geduld und Zuverlässigkeit das Arbeiten im Labor beigebracht hat. Ohne seine Unterstützung und seine Fähigkeiten wäre es nicht möglich gewesen meine Experimente durchzuführen. Zudem bin ich Thomas Sowa zu großem Dank für seine Hilfe im Labor verpflichtet. Auch möchte ich mich bei Dr. Sabine Rebs bedanken, die mich bei der Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung unterstützte und bei Fragen stetig erreichbar war.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitdoktorand*innen und allen weiteren „Postdocs“ für ihre Geduld, Hilfsbereitschaft, Vermittlung von experimentellen Fähigkeiten und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken.

Außerhalb des Labors möchte ich herzlich meinen Eltern, meinen Schwestern und meinen Freund*innen danken, die mir die ganze Zeit zur Seite standen und mich unterstützt haben.