

Der Einfluss von Vorhofflimmern auf die zelluläre Elektrophysiologie im Ventrikelmyokard



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Thea Bommer (geb. Stehle)
aus
Augsburg

im Jahr
2024

Der Einfluss von Vorhofflimmern auf die zelluläre Elektrophysiologie im Ventrikelmyokard



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Thea Bommer (geb. Stehle)
aus
Augsburg

im Jahr
2024

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

Betreuer: Prof. Dr. Samuel T. Sossalla

Tag der mündlichen Prüfung: 08.04.2025

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	11
Formelverzeichnis	12
Abkürzungsverzeichnis	13
1 Einleitung	15
1.1 Die Arrhythmie-induzierte Kardiomyopathie	15
1.2 Das Myokard	17
1.3 Die elektromechanische Kopplung	18
1.4 Der L-Typ Calcium Kanal	20
1.5 Der Ryanodinrezeptor 2	21
1.5.1 Struktur und Aufbau	21
1.5.2 Regulation	22
1.6 Die Calcium-ATPase Typ 2a des sarkoplasmatischen Retikulums	22
1.7 Die Calcium/ Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ	23
1.7.1 Struktur und Aktivierung	23
1.7.2 Phosphorylierungsfunktion	24
1.8 Kardiale Arrhythmien	25
1.9 Vorhofflimmern	28
1.10 Zelluläre Arrhythmogenese	30
1.10.1 Oxidativer Stress und Aktivierung der Calcium/ Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II δ	30
1.10.2 Der späte Natriumstrom	32
1.10.3 Frühe und späte Nachdepolarisationen	33
1.10.4 Pathologie der Elektromechanischen Kopplung bei Tachykardie- induzierter Kardiomyopathie	34
1.11 Fragestellung und Hypothesen	35

2. Material und Methoden	36
2.1 Isolation humaner ventrikulärer Kardiomyozyten.....	36
2.1.1 Gewinnung der Gewebeproben	36
2.1.2 Isolation der einzelnen Kardiomyozyten.....	37
2.2 Gewinnung von humanen induzierten pluripotenten Stammzell-Kardiomyozyten	38
2.3 Modell der Kulturstimulation	38
2.4 Patch Clamp Messungen	42
2.4.1 Grundlagen der Patch Clamp Methode	42
2.4.2 Aufbau der Messanlage	43
2.4.3 Messungen der Aktionspotentiale	44
2.4.4 Messungen des späten Natriumstroms	47
2.5 Epifluoreszenzmessungen	48
2.5.1 Grundprinzip der Epifluoreszenzmikroskopie	48
2.5.2 Aufbau der Messanlage	49
2.5.3 Messung der Calciumtransienten und des Calciumgehalts des sarkoplasmatischen Retikulums	50
2.6 Statistik der Auswertungen.....	51
3 Ergebnisse.....	52
3.1 Das Kulturstimulationsmodell	52
3.1.1 Stimulationspuls-Parameter und Stimulations-Frequenzen.....	52
3.1.2 Simulation kardialer Arrhythmien	55
3.2 Einfluss von Vorhofflimmern auf die Elektrophysiologie von adulten humanen ventrikulären und atrialen Kardiomyozyten.....	58
3.2.1 Reduzierte Calcium-Transientenamplitude bei ventrikulären humanen Stammzell-Kardiomyozyten nach Vorhofflimmer-Simulation	58
3.2.2 Reduzierte Calcium-Transientenamplitude bei atrialen humanen Stammzell-Kardiomyozyten nach Vorhofflimmer-Simulation	60

3.2.3	Reduzierte Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums bei ventrikulären humanen Stammzell-Kardiomyozyten nach Vorhofflimmer-Simulation	61
3.2.4	Vorhofflimmer-(Simulation) erhöht späten Natriumstrom und verlängert ventrikuläres Aktionspotential in humanen Stammzell-Kardiomyozyten	63
3.2.5	Vorhofflimmern verlängert das ventrikuläre Aktionspotential im humanen Myokard.....	65
3.3	Einfluss unterschiedlicher Vorhofflimmer-Arrhythmie-Lasten auf die zelluläre Funktion im Ventrikel	68
3.4	Inhibition der Calcium/ Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ und antioxidative Therapie reduzieren die Auswirkungen von Vorhofflimmern.....	76
4	Diskussion	81
4.1	Neues Modell für die Langzeitsimulation von Arrhythmien	82
4.2	Einfluss von Vorhofflimmern auf die Calciumhomöostase und Elektrophysiologie des Ventrikels	83
4.2.1	Effekte von Vorhofflimmern auf die Calciumhomöostase im Vorhof und Ventrikel.....	83
4.2.2	Einfluss von Vorhofflimmern auf den späten Natriumstrom im Ventrikel ..	85
4.2.3	Einfluss von Vorhofflimmern auf das ventrikuläre Aktionspotential	86
4.3	Auswirkungen des Schwellenwertes von 50% Vorhofflimmer-Last auf den Ventrikel.....	86
4.4	Translationale Relevanz	88
5	Zusammenfassung	90
	Literatur	92
	Veröffentlichungen.....	106
	Selbstständigkeitserklärung.....	108

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die elektromechanische Kopplung des Myokards.	19
Abbildung 2: Phosphorylierungsstellen der CaMKII in dem Prozess der elektromechanischen Kopplung.....	25
Abbildung 3: Mechanismen der supraventrikulären Tachykardien.	28
Abbildung 4: Verteilung von Na^+ und Ca^{2+} im Normalzustand und bei erhöhtem Late I_{Na}	33
Abbildung 5: Isolierter ventrikulärer Kardiomyozyt.....	38
Abbildung 6: Protokoll für die in vitro Arrhythmie-Simulation an hiPSC-KM.	39
Abbildung 7: Setup für die Kulturstimulation von hiPSC-KM.	41
Abbildung 8: Einstellen der Stimulationspulse.	42
Abbildung 9: Blick auf die Herstellung eines Gigaseals am Kardiomyozyten	43
Abbildung 10: Aufnahme eines Aktionspotentials einer Stammzelle.	46
Abbildung 11: Aufnahme des späten Na^+ -Stroms einer Stammzelle.....	48
Abbildung 12: Elektrische Erregbarkeit der ventrikulären iPSC-KM.	54
Abbildung 13: Elektrische Erregbarkeit der atrialen iPSC-KM.	54
Abbildung 14: Originale Ca^{2+} Transienten von ventrikulären iPSC-KM während der Simulation von kardialen Arrhythmien.	56
Abbildung 15: Originale Ca^{2+} Transienten von atrialen iPSC-KM während der Simulation von kardialen Arrhythmien.	57
Abbildung 16: Originale Ca^{2+} -Transienten in ventrikulären hiPSC-KM nach VHF-Simulation.....	58
Abbildung 17: Ca^{2+} -Homöostase in ventrikulären hiPSC-KM nach VHF-Simulation.	59
Abbildung 18: Originale Ca^{2+} -Transienten in atrialen hiPSC-KM nach VHF-Simulation.....	60
Abbildung 19: Ca^{2+} -Homöostase in atrialen hiPSC-KM nach VHF-Simulation.	61
Abbildung 20: Originale Coffein-induzierte Ca^{2+} -Transienten in ventrikulären hiPSC-KM nach VHF-Simulation.	62
Abbildung 21: Ca^{2+} -Beladung des SR und SERCA Aktivität in ventrikulären hiPSC-KM nach VHF-Simulation.	62
Abbildung 22: Originalabbildungen des späten Na^+ -Stroms in ventrikulären hiPSC-KM nach VHF-Simulation.	63
Abbildung 23: Später Na^+ -Strom in ventrikulären hiPSC-KM nach VHF-Simulation.	64

Abbildung 24: Originale Aktionspotential-Messungen in ventrikulären hIPSC-KM nach VHF-Simulation.	64
Abbildung 25: Aktionspotential-Parameter in ventrikulären hIPSC-KM nach VHF-Simulation.....	65
Abbildung 26 Originale Aktionspotential-Messungen in ventrikulären KM von Patienten mit VHF oder Sinus Rhythmus.	67
Abbildung 27: Einfluss von VHF auf die Aktionspotential-Parameter in humanen ventrikulären Kardiomyozyten.	68
Abbildung 28: Originale Aktionspotential-Messungen in hIPSC-KM nach Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten.....	71
Abbildung 29: Aktionspotentialdauer (bei akuter Stimulation mit 30bpm) in ventrikulären hIPSC-KM nach Kultur-Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten.....	72
Abbildung 30: Ruhemembranpotential (bei akuter Stimulation mit 30bpm) in ventrikulären hIPSC-KM nach Kultur-Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten.....	72
Abbildung 31: Aktionspotentialamplitude (bei akuter Stimulation mit 30bpm) in ventrikulären hIPSC-KM nach Kultur-Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten.....	73
Abbildung 32: Aufstrichgeschwindigkeit (bei akuter Stimulation mit 30bpm) in ventrikulären hIPSC-KM nach Kultur-Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten.....	73
Abbildung 33: Aktionspotentialdauer (bei akuter Stimulation mit 60bpm) in ventrikulären hIPSC-KM nach Kultur-Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten.....	74
Abbildung 34: Ruhemembranpotential (bei akuter Stimulation mit 60bpm) in ventrikulären hIPSC-KM nach Kultur-Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten.....	74
Abbildung 35: Aktionspotentialamplitude (bei akuter Stimulation mit 60bpm) in ventrikulären hIPSC-KM nach Kultur-Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten.....	75
Abbildung 36: Aufstrichgeschwindigkeit (bei akuter Stimulation mit 60bpm) in ventrikulären hIPSC-KM nach Kultur-Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten.....	75

Abbildung 37: Originale Ca^{2+} -Transienten in ventrikulären hIPSC-KM bei CaMKII-Inhibition und Reduktion des oxidativen Stress nach VHF-Simulation.	77
Abbildung 38: Ca^{2+} -Homöostase in ventrikulären hIPSC-KM bei CaMKII-Inhibition und Reduktion des oxidativen Stress nach VHF-Simulation.....	78
Abbildung 39: Originale Caffein-induzierte Ca^{2+} -Transienten bei CaMKII-Inhibition und Reduktion des oxidativen Stress nach VHF-Simulation.....	79
Abbildung 40: Ca^{2+} -Beladung des SR bei CaMKII-Inhibition und Reduktion des oxidativen Stress nach VHF-Simulation.....	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Badlösung für die Messung von Aktionspotentialen.....	44
Tabelle 2: Pipettenlösung für die Messung von Aktionspotentialen.....	45
Tabelle 3: Badlösung für Messungen des späten Na^+ -Stroms	47
Tabelle 4: Pipettenlösung für die Messung des späten Na^+ -Stroms.....	47
Tabelle 5: Badlösung für die Messungen am Epifluoreszenzmikroskop	50
Tabelle 6: Koffeinlösung zur Bestimmung des SR Ca^{2+} Gehalts	51
Tabelle 7: Charakterisierung der Aortenklappenstenose-Patienten.....	66

Formelverzeichnis

Formel 1: Formel für das Ohmsche Gesetz	45
Formel 2: Berechnung des Standardfehlers (SEM)	50

Abkürzungsverzeichnis

AIC	Arrhythmie-induzierte Kardiomyopathie
AIP	Autocamtide-2-related inhibitory peptide
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APA	Aktionspotentialamplitude
APD	Aktionspotentialdauer
BNP	Brain-natriuretisches Peptid
Bpm	Beats per minute, Schläge pro Minute
Ca ²⁺	Calcium
CaMKII	Ca ²⁺ / Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ
Cav	Spannungsabhängiger Calciumkanal
Da	Dalton
DAD	Späte Nachdepolarisation
EAD	Frühe Nachdepolarisation
HIPSC-KM	Humane induzierte pluripotente Stammzell-Kardiomyozyten
I _{ti}	Transienter Einwärtsstrom
K ⁺	Kalium
KM	Kardiomyozyt
Late I _{Na}	Später Natriumstrom
LTCC	Spannungsabhängiger L-Typ Calcium-Kanal
LVSD	Linksventrikuläre systolische Dysfunktion
NAC	N-Acetylcystein
Na ⁺	Natrium
NCX	Natrium/Calcium Austauscher
PLB	Phospholamban

PKA	Proteinkinase A
RMP	Ruhemembranpotential
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RYR	Ryanodinrezeptor
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SVT	Supraventrikuläre Tachykardie
T-Tubuli	Transversaltubuli
VHF	Vorhofflimmern
VT	Ventrikuläre Tachykardie

1 Einleitung

Die Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten Gesundheitsbelastungen der heutigen Gesellschaft, da die Prävalenz und Mortalität der Erkrankung enorm hoch sind. Insgesamt wird die Prävalenz auf 2% geschätzt [1]. Mit dem demographischen Wandel und der steigenden Lebenserwartung wird die Prävalenz in den nächsten Jahren voraussichtlich weiter steigen [2]. Das macht die Herzinsuffizienz zur großen medizinischen und sozioökonomischen Herausforderung [3, 4].

Das Krankheitsbild ist durch eine progressive Verschlechterung der Herzfunktion gekennzeichnet [5]. Die Erkrankung äußert sich dabei in Form einer Einschränkung der systolischen und/oder diastolischen Herzfunktion [5]. Der Patient leidet unter Symptomen wie Atemnot (Dyspnoe), Ödembildungen, Herzrhythmusstörungen und niedrigem Blutdruck. Die Ursachen der Herzinsuffizienz können tachykarde und bradykarde Herzrhythmusstörungen, wie zum Beispiel Vorhofflimmern (VHF) sein. Die Therapie kann zum einen medikamentös durch den Einsatz von Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Systems, Betablockern, Mineralokortikoidrezeptorantagonisten und Inhibitoren des natriumabhängigen Glukose-Cotransporter 2 erfolgen [6]. Zum anderen kann je nach Typ der Herzinsuffizienz gegebenenfalls operativ mit interventionellen oder chirurgischen Verfahren eine (Kausal)-therapie erfolgen. Die Prognose der Erkrankung ist nach wie vor sehr schlecht. Die 1-Jahres-Mortalität beträgt 17% bei akuter Herzinsuffizienz und 7% bei chronischer Herzinsuffizienz [7]. Kardiomyopathien können im Verlauf zum klinischen Bild einer Herzinsuffizienz führen. Bei einer Kardiomyopathie verändern sich Struktur und Funktionalität des Herzmuskels, seine Leistungsfähigkeit nimmt ab und es kann zur Entstehung einer Herzinsuffizienz kommen.

1.1 Die Arrhythmie-induzierte Kardiomyopathie

Die Arrhythmie-induzierte Kardiomyopathie (AIC) ist eine Unterform der dilatativen Kardiomyopathien [8, 9]. Obwohl das Krankheitsbild an sich seit Langem bekannt ist, gibt es aufgrund fehlender prospektiver und belastbarer epidemiologischer Daten keine genaue Kenntnis über die Prävalenz [10]. „[Die AIC] ist charakterisiert durch eine linksventrikuläre systolische Dysfunktion (LVSD), welche durch hohe und/oder unregelmäßige Kammerfrequenzen kausal bedingt und durch Elimination beziehungsweise effektive Behandlung der ursächlichen Rhythmusstörung heilbar ist“ ([10] Seite 335). Bei Patienten, die von der klassischen Form betroffen sind, stellt

die Arrhythmie die einzige Ursache dar und die LVSD ist vollständig reversibel. Bei Patienten mit vorbestehender struktureller Herzerkrankung kann die AIC eine LVSD aggravieren und die LVSD ist durch die Behandlung der Rhythmusstörung nur partiell reversibel [11, 12]. Für die Diagnose AIC fokussiert man sich in der Klinik auf die Identifikation einer Rhythmusstörung bei sonst nicht erklärbarer LVSD. Wenn dann im Rahmen der Therapie die Rhythmusstörung behandelt wird (medikamentös oder interventionell) und sich in den folgenden Wochen und Monaten die Pumpfunktion verbessert, gilt die Diagnose AIC als gesichert [11]. Zur Untersuchung der Pathophysiologie gibt es Tiermodelle, bei denen mit persistierender Tachykardie (Schrittmacherstimulation) der Herzinsuffizienz-Phänotyp [13-15] mit Abnahme der systolischen Kontraktilität und des Herzminutenvolumens, Erhöhung der Wandspannung und linksventrikulärer Dilatation induziert wird [14, 16]. Dabei kommt es zur typischen neurohumoralen Aktivierung mit Anstieg der BNP (Brain-natriuretisches Peptid) und ANP (atriales natriuretisches Peptid) Plasmakonzentrationen, der Sympathikus-Aktivität und der Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems [11, 14, 16-19]. Nach Beendigung der Tachykardie kommt es im Tiermodell innerhalb von Tagen und Wochen zur Revision dieser Veränderungen [20]. Verschiedene supraventrikuläre und ventrikuläre Arrhythmien können zu einer AIC führen [11]. VHF ist die häufigste Ursache einer AIC, und beim Erwachsenen die häufigste anhaltende Rhythmusstörung [21, 22]. Bei 20-30% aller Patienten mit VHF findet sich eine LVSD [23] und 10-50% der Patienten mit Herzinsuffizienz haben VHF [24]. Aus aktuelleren Therapiestudien ist bekannt, dass ca. 1/3 der Patienten mit VHF und systolischer Herzinsuffizienz eine primär idiopathische LVSD aufweisen, und dass in 58-88% dieser Fälle eine AIC oder eine relevante AIC-Komponente nachweisbar ist [25, 26]. Trotzdem wird in der klinischen Praxis häufig eine Arrhythmie ausschließlich als Folge und nicht als mögliche Ursache einer Kardiomyopathie in Betracht gezogen und daher die Bedeutung der AIC wahrscheinlich unterschätzt [10].

Die beschriebenen Studienergebnisse zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen VHF und beeinträchtigter Ventrikelfunktion gibt. Da VHF bisher nur als Erkrankung des Vorhofs erforscht wurde, soll in dieser Arbeit der Einfluss von VHF auf die zelluläre Elektrophysiologie im Ventrikelmyokard untersucht werden. Im Folgenden soll nun der theoretische Hintergrund für ein gutes Verständnis der behandelten Fragestellung in dieser Arbeit gegeben werden.

1.2 Das Myokard

Das Myokard ist das Muskelgewebe des Herzens und ist, abhängig von seiner Beanspruchung, unterschiedlich stark ausgebildet. Im Bereich der Vorhöfe ist es dünner als in den Ventrikeln und im linken Ventrikel stärker ausgebildet als im rechten Ventrikel. Das Herzmuskelgewebe stellt eine besondere Form der quergestreiften Muskulatur dar. Die Zellen sind über *disci intercalares* (Glanzstreifen) miteinander verbunden. Die darin enthaltenen Adhäsionskontakte und Desmosomen verleihen dem Zellverband besondere Stabilität und ermöglichen die Kraftübertragung zwischen den Zellen [27]. Durch den Zellkontakt über *gap junctions* sind die Zellen außerdem elektrisch gekoppelt, wodurch Ionenströme von einer zur nächsten Zelle weitergeleitet werden können [28]. Die Kardiomyozyten (KM) sind somit ein funktionelles Synzytium und besitzen meist einen oder gelegentlich auch mehrere Zellkerne. Dabei liegen die Kerne im Gegensatz zur Skelettmuskulatur nicht randständig sondern meist zentral. Das Sarkolemm (die Zellmembran der Muskelzellen) besitzt röhrenförmige Einfaltungen, die als Transversaltubuli (T-Tubuli) bezeichnet werden. Die T-Tubuli grenzen an die Terminalzisternen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Diese Konstellation wird als *Diade* bezeichnet und befindet sich auf Höhe des Glanzstreifens. Über die *Diaden* wird die Depolarisation der Zellmembran sehr schnell auf das Zellinnere übertragen. Das SR ist ein segmental gegliedertes Netzwerk von Tubuli, welches die Myofibrillen in der Herzmuskelzelle manschettenartig umhüllt. Die Terminalzisternen sind zirkulär um die Myofibrille angeordnet. Die Hauptaufgabe des SR ist die Speicherung von Calcium (Ca^{2+}). Die Myofibrillen in den Herzmuskelzellen bestehen aus Aktin- und Myosinfilamenten. Die Herzmuskelfasern sind als Sarkomere angeordnet, die durch Z-Streifen voneinander abgegrenzt werden [29]. Bei der Kontraktion und Relaxation verkürzen oder verlängern sich diese Sarkomere und bilden somit den kontraktile Apparat des Herzmuskels. Energetisch betrachtet wird bei der Kontraktion des Herzmuskels elektrische Energie in mechanische Energie umgewandelt. Dieser Prozess wird im folgenden Kapitel beschrieben.

1.3 Die elektromechanische Kopplung

Der Prozess der elektromechanischen Kopplung am Herzen beschreibt die Umwandlung der elektrischen Erregung in eine mechanische Reaktion der Herzmuskelzellen (siehe Abbildung 1).

Auslöser des Prozesses ist eine Abweichung des elektrischen Potentials an der Zellmembran, das sogenannte Aktionspotential. Das Ruhemembranpotential der Herzmuskelzellen beträgt zwischen -60 und -80 mV und wird hauptsächlich durch die hohe Kalium (K^+)-Leitfähigkeit der Membran bestimmt. Die Na^+ (Natrium)/ K^+ ATPase erzeugt eine hohe intrazelluläre K^+ Konzentration und wegen der Durchlässigkeit für K^+ strömt K^+ entlang des Konzentrationsgradienten nach außen, bis der Strom aufgrund der entstehenden elektrischen Spannung zum Erliegen kommt („Gleichgewichtspotential“ für K^+). Da die Leitfähigkeit der Membran im Ruhezustand für Na^+ sehr gering ist, leistet das Gleichgewichtspotential von Na^+ nur einen sehr geringen Beitrag zum Ruhemembranpotential. In der ersten Phase (Phase 0) des Aktionspotentials öffnen sich durch die Depolarisation auf mindestens -55 mV die spannungsgesteuerten Na^+ -Kanäle. Dadurch wird die Na^+ -Leitfähigkeit der Membran erhöht und es erfolgt ein explosionsartiger Na^+ -Einstrom in die Zelle (Aufstrich des Aktionspotentials) in Richtung des Na^+ -Gleichgewichtspotentials. Durch die starke Depolarisation der Zelle nimmt der elektrochemische Gradient für Na^+ ab und die spannungsgesteuerten Na^+ -Kanäle werden inaktiviert. Der elektrochemische Gradient für einen repolarisierenden K^+ Ausstrom steigt dagegen (entlang des Konzentrations- und elektrochemischen Gradienten für K^+). Der entstehende, transiente K^+ -Auswärtsstrom bewirkt eine geringe Depolarisation des Membranpotentials (Phase 1). Etwas verzögert öffnen die spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (LTCC) (Dihydropyridinrezeptoren), wodurch Ca^{2+} entlang des elektrochemischen Gradienten in die Zelle einströmt [29]. Durch gleichzeitigen Einstrom von Ca^{2+} durch die LTCC und anhaltenden Ausstrom von K^+ erfolgt die charakteristische Plateauphase des Aktionspotentials (Phase 2). Die Dauer des Aktionspotentials sowie die Kontraktion selbst hängen wesentlich vom langsamen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle ab. Schließlich kommt es zu verstärktem K^+ Ausstrom durch die spannungsgesteuerten K^+ Kanäle (vor allem HERG-Kanäle (human ether-a-go-go-related gene) und IKr (rapid delayed rectifier potassium current)) und gleichzeitig zu versiegender Ca^{2+} -Einstrom. Hierdurch wird die Membran repolarisiert ("Abstrich"), die Na^+/K^+ ATPase stellt das Ruhemembranpotential her und die Zelle ist wieder erregbar. [30]

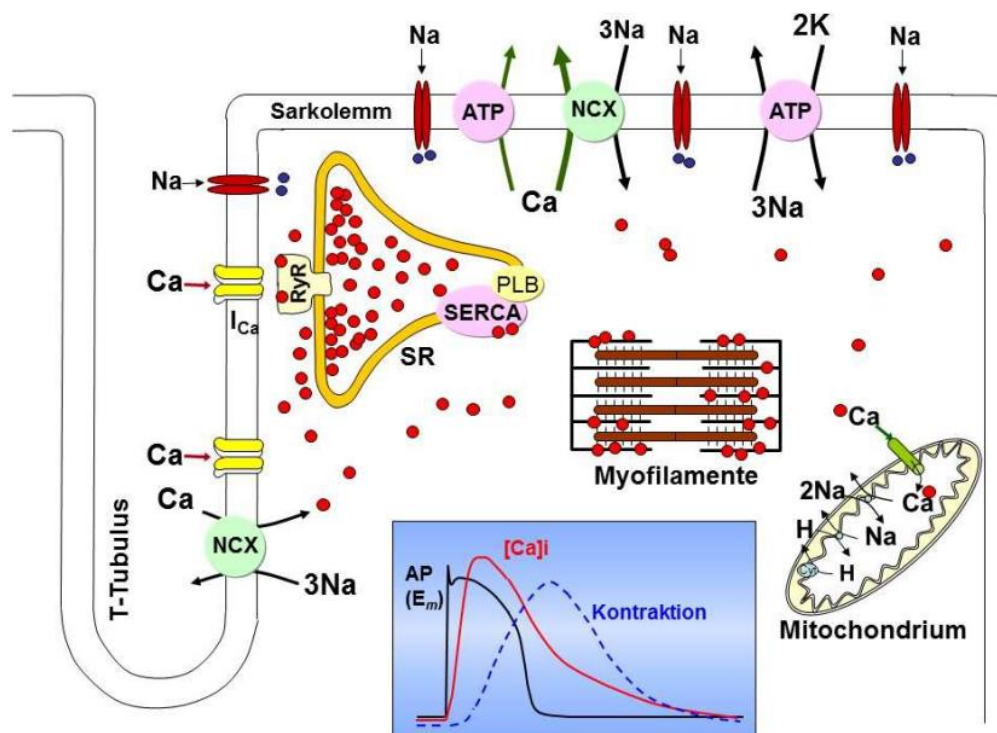


Abbildung 1: Die elektromechanische Kopplung des Myokards. Blau hinterlegt ist die Darstellung des Zeitverlaufes des Aktionspotentials, sowie der Ca²⁺-Transient und die Kontraktion zu sehen; Ablauf der elektromechanischen Kopplung: Durch initiale elektrische Erregung strömt Na⁺ durch spannungsabhängige Na⁺-Kanäle (Nav, rot im Sarkolemm und in den T-Tubuli) in die Zelle. Durch fortschreitende Depolarisation der Membran öffnen spannungsabhängige L-Typ-Ca²⁺-Kanäle (gelb in den T-Tubuli). Das einströmende Ca²⁺ triggert die Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR (gelb umrandet,) indem es an den RYR2 bindet. Die zytosolische Ca²⁺-Konzentration steigt an. Das freigesetzte Ca²⁺ bindet über Troponin C an die Myofilamente und initiiert die Kontraktion. Die Eliminierung des zytosolischen Ca²⁺ erfolgt über verschiedene Systeme: Die SERCA (Ca²⁺ ATPase Typ 2a des sarkoplasmatischen Retikulums) pumpt Ca²⁺ aktiv zurück in das SR, der NCX (Na⁺/Ca²⁺ Austauscher) transportiert Ca²⁺ in den Extrazellulärraum, Ca²⁺ wird von den Mitochondrien aufgenommen und von der Ca²⁺ ATPase in die Plasmamembran transportiert, modifiziert nach [30]

Der wichtigste *second messenger* bei der elektromechanischen Kopplung ist Ca²⁺. Bei der Öffnung der LTCC gelangt Ca²⁺ in den engen Spalt zwischen T-Tubulus des Sarkolemm und Terminalzisterne des SR. Die Ionen binden an den Ryanodinrezeptor 2 (RYR2) auf der Oberfläche des SR und triggern dadurch die Freisetzung des im SR gespeicherten Ca²⁺ [29]. Diese Ca²⁺ getriggerte Ca²⁺-Freisetzung bewirkt eine starke Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration um das 100 bis 1000 fache, von ca. 100 nM bis 1 µM auf ca. 100 µM [30]. Das freigesetzte Ca²⁺ bindet an Troponin C, sodass sich die Konformation des Troponin-Komplexes ändert und die Myosinbindungsstelle freigegeben wird. Dadurch wird eine Interaktion zwischen Aktin und Myosin ermöglicht und es kommt zur Kontraktion der Muskelzelle. Nachdem die Kontraktion während der Systole stattgefunden hat, muss anschließend in der Diastole die Relaxation des Herzmuskels erfolgen. Ca²⁺ muss dementsprechend

aus dem Cytosol entfernt werden [29]. Der größte Teil wird über aktive Wiederaufnahme des Ca^{2+} in das SR über die SERCA (*sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} - ATPase Type 2a*) entfernt. Die Aktivität der SERCA wird dabei durch das Protein Phospholamban (PLB) reguliert, das im dephosphorylierten Zustand hemmend auf die SERCA wirkt. Der Anteil der SERCA macht ca. 70% der Ca^{2+} -Eliminierung aus dem Cytosol aus [31]. Weitere 28% werden über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher (NCX) in den Extrazellularraum transportiert [32]. Dabei dienen die elektrochemischen Gradienten von Na^+ und Ca^{2+} als treibende Kraft für den Austauscher. Bei dem Transport werden drei Na^+ -Ionen gegen ein Ca^{2+} -Ion getauscht, wodurch ein steter, depolarisierender elektrischer Strom entsteht [5]. Ein geringer Teil von ca. 2% des Ca^{2+} wird in die Mitochondrien aufgenommen und von der Ca^{2+} -ATPase nach Extrazellulär transportiert.

Das System der elektromechanischen Kopplung muss an die wechselnden körperlichen Anforderungen angepasst werden. Das bedeutet die zyklische Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration muss reguliert werden. Wie bereits dargestellt ist die SERCA das wichtigste Element bei der Eliminierung des cytosolischen Ca^{2+} . Bei der β -adrenergen Stimulation wird sie über PLB reguliert. Das Protein PLB kann durch die Kinasen Proteinkinase A (PKA) und Ca^{2+} / Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ (CaMKII) phosphoryliert werden und verliert damit seine inhibierende Wirkung auf die SERCA. Die beiden Kinasen können außerdem den RYR2 Komplex phosphorylieren und damit die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und die diastolische Schließung des RYR2 regulieren. [5]

1.4 Der L-Typ Calcium Kanal

Bei der Erläuterung zur elektromechanischen Kopplung wird beschrieben, dass die spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanäle (LTCC) entscheidend zum Ablauf der Plateauphase der Aktionspotentiale beitragen. Aufgrund der langen Öffnungszeit werden sie als L-Typ (long-lasting) Kanal bezeichnet [33].

Der LTCC gehört zu den spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (Cav), die durch hohe Spannung aktiviert werden. Von den Unterfamilien Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3, Cav1.4 ist der LTCC Cav1.2 der wichtigste im Herzmuskel [34]. Der Cav1.2 Kanal besteht aus vier homologen Untereinheiten, die durch cytosolische Linker verbunden sind. Jede Einheit besteht aus sechs transmembranen α -Helices, einer β -Faltblatt Poren-Region

und dem Spannungs-Sensor [35]. Der Kanal liegt an der Oberflächenmembran der Herzmuskelzelle und ist besonders häufig in den T-Tubuli vertreten.

Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration reguliert, über Bindung an Calmodulin, die LTCC-Aktivität. Einerseits kann Ca^{2+} an Calmodulin binden, welches bereits an den α -C Terminus des LTCC gebunden ist [35], der unter niedriger Ca^{2+} / Calmodulin Aktivität den LTCC aktiviert [36]. Bei Bindung des Komplexes an den Terminus wird also die LTCC-Aktivität inhibiert. Andererseits bindet der Ca^{2+} / Calmodulin-Komplex auch an die CaMKII und aktiviert sie, welche wiederum über Phosphorylierung die LTCC-Offenwahrscheinlichkeit erhöht und die Inaktivierung verlangsamt [36]. Während der Plateauphase des Aktionspotentials kann exzessive CaMKII Aktivität zur verstärkten Neuöffnung der LTCC-Kanäle führen und damit Arrhythmien triggern [36]. Auch erhöhter oxidativer Stress führt zu verstärkter Aktivierung des LTCC und damit erhöhtem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle [37, 38]. Insgesamt triggert die Dysregulation des LTCC das vermehrte Auftreten von Arrhythmien [39-41] und ist verbunden mit der Entstehung diverser Herzerkrankungen [42, 43]. Es sind außerdem mehrere *gain/loss-of-function* Mutationen des LTCC-Kanals bekannt, die zu kardialen Arrhythmien führen [44]. Elektrisches Remodeling durch beispielsweise VHF ist mit Änderungen der mRNA Expression des Cav1.2 assoziiert und eine pharmakologische Blockade des LTCC Kanals in vivo führt zu einer kompensatorischen Hochregulierung von Cav1.2 [45]. Bei Untersuchungen zum antiarrhythmischen Potential einer Reduzierung des späten LTCC-Stroms, wurden weniger Nachdepolarisationen (EADs) (durch oxidativen Stress oder Hypokaliämie induziert) beobachtet [46]. LTCC-Kanal Blocker (Verapamil und Nifedipin) reduzierten Arrhythmien bei genetisch veränderten Mäusen [47]. Der LTCC ist also bereits ein wichtiges Ziel für pharmakologische Therapieansätze [36].

1.5 Der Ryanodinrezeptor 2

1.5.1 Struktur und Aufbau

Ryanodinrezeptoren (RyR) sind ligandenabhängige Ca^{2+} -Kanäle. Bei der Muskelkontraktion bindet Ca^{2+} an den Rezeptor, wodurch die Offenwahrscheinlichkeit des RyR erhöht wird und das im SR gespeicherte Ca^{2+} freigesetzt wird. Es existieren drei Isoformen des RyR: Der RyR1 ist in den Skelettmuskeln lokalisiert und ist dort Teil der Triade des T-Tubulus und zwei Terminalzisternen des SR. Der RyR3 wurde ursprünglich als neuronaler Kanal entdeckt [48]. Der RyR2 wird, wie bereits

beschrieben, im Herz exprimiert und spielt dabei eine zentrale Rolle bei der elektromechanischen Kopplung. Der RYR2 ist ein Makromolekül mit einem Molekulargewicht von 2 MDa [5]. Er besteht aus vier identischen Untereinheiten zu je 5000 Aminosäuren [49]. Der N-Terminus jeder Untereinheit liegt außerhalb der Membran in Richtung des diadischen Spaltes, während der C-Terminus den membranständigen Teil des Proteins darstellt [50].

1.5.2 Regulation

Die Funktion des Kanals kann durch verschiedene Proteine reguliert werden. Calsequestrin bindet über Junctin und Triadin an den RYR2 [51] und reguliert seine Funktion indem es als Ca^{2+} -Puffer fungiert [5]. Calmodulin kann sowohl aktivierend als auch inaktivierend auf den RYR2 wirken. Im Normalfall überwiegt jedoch die inaktivierende Funktion [52]. Neben der Bindung regulatorischer Proteine, spielt posttranslationale Phosphorylierung eine zentrale Rolle bei der Regulation des Kanals. Insbesondere die Interaktion der zellulären Kinasen PKA und CaMKII mit dem RYR2 sind dabei von Bedeutung [53]. Eine Phosphorylierung des Rezeptors durch PKA oder CaMKII führt zur Aktivierung des Kanals und es wird mehr Ca^{2+} ausgeschüttet [54]. Die Phosphorylierung des RYR2 durch beta-adrenerge Stimulation ist PKA-abhängig [55]. Auf die Phosphorylierung des Rezeptors durch die CaMKII wird in 1.7.2 näher eingegangen. In Konkurrenz mit den beiden phosphorylierenden Kinasen stehen die dephosphorylierenden Proteinphosphatasen PP1 und PP2a. [53]. Der Phosphorylierungszustand des Rezeptors führt zu Konformationsänderungen. Dadurch wird die Ca^{2+} -Sensitivität und damit die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals während der Diastole beeinflusst [5]. Mit der variierenden Ca^{2+} -Sensitivität passt der Kanal die Ca^{2+} -Freisetzung an die Bedürfnisse der Zelle an [5].

1.6 Die Calcium-ATPase Typ 2a des sarkoplasmatischen Retikulums

Die SERCA ist ein Membran-Transport-Protein, welches Ca^{2+} pumpt und im endoplasmatischen Retikulum aller eukaryotischen Zellen vorkommt. Die Pumpe nutzt ATP, um die Ionen durch die Membran zu transportieren. In den Herzmuskelzellen ist die SERCA am Prozess der Relaxation beteiligt und pumpt dabei Ca^{2+} vom Zytosol in das Lumen des SR. Die SERCA-Paralogue der Wirbeltiere werden von einer Familie von drei Genen codiert- SERCA1, SERCA2 und SERCA3. Die verschiedenen Isoformen der SERCA werden durch alternatives Splicing erzeugt. Es sind bisher 13 Isoformen bekannt, nämlich die SERCA1a-b, SERCA2a-d und SERCA3a-f [56, 57].

Die SERCA2 hat sowohl ubiquitäre als auch spezifisch kardiale Isoformen [58]. Die Isoform SERCA2a existiert nur im Herzmuskel, slow-twitch Skelettmuskeln und Zellen der glatten Muskulatur. In Herzmuskeln wurden 4 Isoformen der SERCA gefunden: SERCA2a, SERCA2b, SERCA2c und SERCA3b. Die SERCA besteht aus 10 Transmembranhelices, die den Transport von zwei Ca^{2+} -Ionen in das Lumen des SR und 2-3 Protonen als Gegentransport in das Zytoplasma koordinieren. Vier der zehn Helices bilden die Ca^{2+} -Bindestelle und zwei dieser Helices sind ungewunden, um die Bindung des Ca^{2+} zu ermöglichen. Ein wichtiger Regulator der SERCA ist PLB. Das Modell der SERCA-Regulation durch PLB beinhaltet eine reversible eins-zu-eins Assoziation, die die Ca^{2+} -Affinität der SERCA reduziert [59]. Diese SERCA-Inhibierung ist am höchsten bei niedriger physiologischer Ca^{2+} -Konzentration ($\sim 0,1 \mu\text{M}$ zytosolisches Ca^{2+}) und am niedrigsten bei hoher Ca^{2+} -Konzentration ($>1 \mu\text{M}$). PLN ist ein reversibler, Ca^{2+} abhängiger Inhibitor der SERCA, der die kardiale Kontraktilität als Reaktion auf physiologische Reize moduliert [60-63]. Beim Prozess der SERCA-Inhibierung interagiert und inhibiert PLB zunächst die SERCA bei Ca^{2+} -Konzentrationen $<1 \mu\text{M}$ und bei Ca^{2+} -Konzentrationen $>1 \mu\text{M}$ wird die Inhibierung umgekehrt [64]. Als nächstes wird PLB über einen Mechanismus der β -adrenergen Stimulation und PKA Aktivität phosphoryliert [65]. Als drittes formt PLB ein Homopentamer, das in dynamischem Gleichgewicht mit dem inhibierenden Monomer ist [66]. Das Pentamer ist eine Art inaktive Speicherform des PLB.

1.7 Die Calcium/ Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ

1.7.1 Struktur und Aktivierung

Die CaMKII ist eine Serin/Threonin-Kinase und kann in den vier verschiedenen Isoformen α , β , γ und δ vorkommen. Die vier Formen sind zu 80-90% identisch. Im Herz wird fast ausschließlich die δ -Isoform exprimiert [67]. Die δ -Isoform wird durch alternatives *splicen* in den Subformen δ_B und δ_C exprimiert [68]. Die CaMKII formt ein homo- oder hetero Multimer, das aus 12 Untereinheiten mit je drei konservierten Domänen besteht: die N-terminale katalytische Domäne, die zentrale autoregulatorische Domäne und die C-terminale Verbindungsdomäne. In der katalytischen Domäne befinden sich die Bindestellen für ATP und Substrate. Die autoregulatorische Domäne hat eine inhibitorische pseudosubstrat-Sequenz, verschiedene Stellen für posttranslationale Modifikation und die Calmodulin-Bindestelle. Die Verbindungsdomäne ist bei der Bildung des Holoenzym

verantwortlich für die Oligomerisierung der Untereinheiten und hat variable Regionen, durch die mittels alternativem *splicen* verschiedene Varianten der CaMKII entstehen können [69]. An der regulatorischen Domäne bindet der Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex und aktiviert damit die CaMKII. Der Komplex besteht aus einem Calmodulin-Molekül und vier Ca^{2+} -Ionen. Die Bindung des Komplexes ersetzt die Pseudosubstrat-Region, wodurch das Substrat und ATP an die katalytische Domäne gelangen können. Bleibt die Aktivierung der Kinase in Anwesenheit von ATP länger bestehen, kommt es an den Untereinheiten zur Autophosphorylierung an Thr287 [70]. Die Affinität für Calmodulin wird dadurch um das 1000-fache gesteigert, die Reassoziierung der katalytischen Domäne verhindert und die Kinase bleibt auch ohne Anwesenheit von Calmodulin aktiv [71]. Zusätzlich führt der Austausch von aktiven Untereinheiten zur weiteren Aktivierung von inaktiven Holoenzymen über Phosphorylierung von benachbarten Untereinheiten [72]. Normalerweise unterliegt die Aktivität der CaMKII einer Autoregulation. Dabei bindet die autoregulatorische Domäne an der katalytischen Domäne und blockiert die Bindestellen für Substrate und ATP [73, 74]. Verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder erhöhter Glucose-Gehalt können jedoch die Aktivität erhöhen [75]. Für eine vollständige Inaktivierung der CaMKII muss die Dephosphorylierung durch die Proteinphosphatasen 1, 2a und 2c erfolgen. [67, 76]

1.7.2 Phosphorylierungsfunktion

Die CaMKII ist eine Proteinkinase, die wesentlich in die Ca^{2+} -Homöostase der Herzmuskelzellen eingreift. Die Funktionsweise der CaMKII ist die Phosphorylierung unterschiedlicher Zielstrukturen (siehe Abbildung 2), die an der Ca^{2+} -Homöostase beteiligt sind. Eine Zielstruktur stellen die LTCC dar, deren Aktivität durch die Phosphorylierung zunimmt, während die Inaktivierung verzögert wird. Insgesamt strömt somit nach der Erregung der Zelle mehr Ca^{2+} von außen in die Zelle ein [77]. Des Weiteren wird beschrieben, dass die CaMKII Na^+ - und K^+ -Kanäle phosphoryliert [77, 78]. CaMKII Aktivität wird zum Beispiel durch die Phosphorylierung des Nav1.5 (spannungsabhängiger Na^+ -Kanal) mit einem erhöhten späten Na^+ -Einstrom und damit einer erhöhten intrazellulären Na^+ -Konzentration in Verbindung gebracht [78]. Durch erhöhte Na^+ -Konzentration wird die Aktivität des NCX und damit die Ca^{2+} -Homöostase beeinflusst. Der RYR2 wird an den Aminoesten Ser-2809 und Ser-2815 phosphoryliert. Ser-2815 ist ausschließlich Zielstruktur der CaMKII, wogegen Ser-2809 zugleich Zielstruktur der PKA ist [67, 77]. Durch die Hyperphosphorylierung des RYR2

wird mehr Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt, wobei auch während der Diastole spontan Ca^{2+} aus dem SR austreten kann [75]. Weiterhin phosphoryliert die CaMKII das Protein PLB, welches die Aktivität der SERCA steuert. Wird das PLB an Thr-17 phosphoryliert, verringert sich dessen Dissoziation von der SERCA und die Aktivität der SERCA wird gesteigert [75]. Der Effekt scheint jedoch sehr gering zu sein [79]. Insgesamt betrachtet bewirkt die Aktivität der CaMKII eine Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.

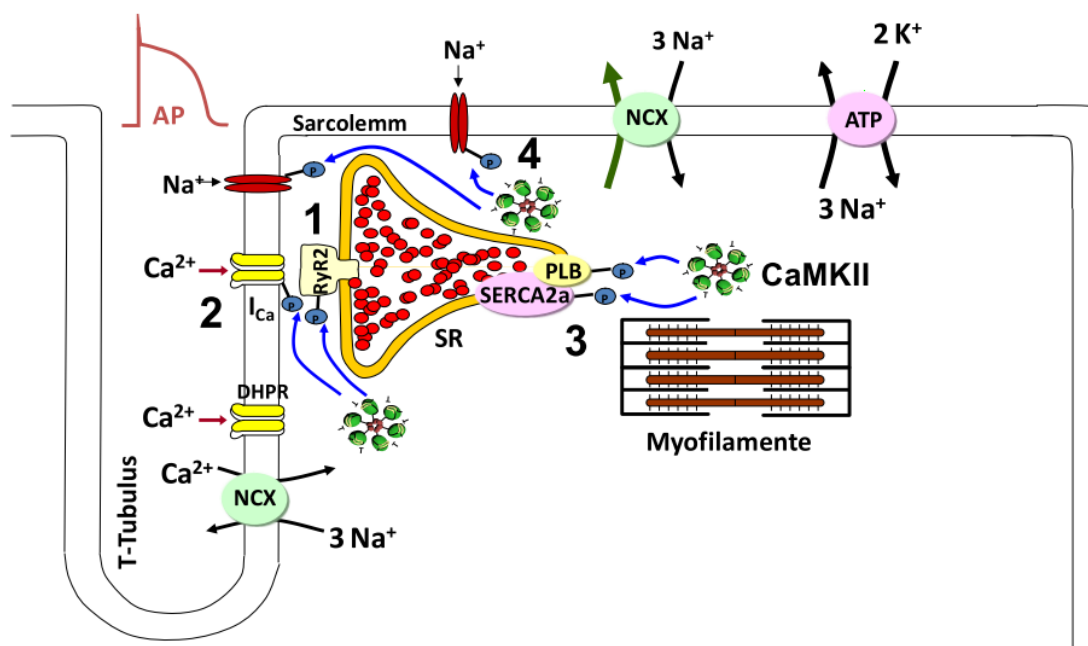


Abbildung 2: Phosphorylierungsstellen der CaMKII in dem Prozess der elektromechanischen Kopplung. Zielstrukturen der CaMKII sind der RYR2, die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, die SERCA, das Protein Phospholamban und Na^{+} -Kanäle, Phosphatgruppen sind in blau gekennzeichnet, die Phosphorylierungsaktivität der CaMKII führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, modifiziert nach [77]

1.8 Kardiale Arrhythmien

Kardiale Arrhythmien werden eingeteilt in bradykarde Herzrhythmusstörungen einerseits und ventrikuläre bzw. supraventrikuläre Tachykardien andererseits. Bei Bradyarrhythmien erhöht sich mit zunehmendem Alter die Inzidenz, wobei eine Therapie häufig nur über die Implantation eines Schrittmachers erfolgen kann. Die bradykarden Herzrhythmusstörungen können ihren Ursprung oberhalb des AV-Knotens (Sinusknotensyndrom, Karotissinussyndrom) oder an diesem Knoten (AV-Block) bzw. unterhalb davon (intraventrikuläre Leistungsstörungen) haben. [80]

Den meisten ventrikulären Tachykardien (VT) liegt eine akute oder chronische Grunderkrankung zugrunde. Meist ist eine strukturelle Veränderung des Myokards, z. Bsp. durch Myokardinfarkt, Myokarditis, ischämische- oder nicht-ischämische Kardiomyopathie, andere strukturelle Veränderungen wie z. Bsp. bei ARVD (Arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie), Basis für die VT. Eine idiopathische VT liegt vor, wenn keine strukturelle Veränderung des Myokards oder Ionenkanalerkrankung diagnostiziert wird. Bei der Entstehung von VTs können zwei Hauptmechanismen unterschieden werden: Reentry-Mechanismen und getriggerte Aktivität bzw. fokale Automatie. Insgesamt werden die VTs eingeteilt in die Narben-Reentry-VT, die Bundle Branch Reentry-VT, getriggerte Automatie/Aktivität, idiopathische VT und idiopathisches Kammerflimmern. Meist findet sich pathophysiologisch jedoch eine Mischform. Narben-Reentrys treten sowohl bei der ischämischen Kardiomyopathie und der nichtischämischen Kardiomyopathie, als auch bei Patienten mit Herz-OPs auf [81, 82]. Die im fibrotischen Narbenmyokard eingebetteten intakten Myozyten-Bündel schaffen die elektrischen Voraussetzungen für die Entstehung und Aufrechterhaltung eines Reentry: Durch die Einbettung von Narbenmyokard in das umgebende vitale Myokard entsteht eine Zone mit langsamer Erregungsleitung und einem unidirektionalen Block, der die Erregung in eine kreisende Bewegung zwingt. [83, 84]. Die Bundle Branch-Reentry Tachykardie bezieht His Bündel, den rechten und den linken Tawara-Schenkel und das septale Myokard mit ein. Meist verläuft der Reentry-Kreislauf antegrad über den rechten Schenkel und retrograd mit langsamerer Leitung über den linken Schenkel. Ursache für die getriggerte Aktivität sind frühe und späte Nachdepolarisationen. Diese werden in Kapitel 1.10.3 detailliert behandelt. Auch bei der idiopathischen VT liegen spontane Nachdepolarisationen als Mechanismus zugrunde (im Gegensatz zur getriggerten Automatie/Aktivität ist jedoch keine strukturelle Herzerkrankung diagnostiziert). Bei VTs füllen sich die Ventrikel nicht mehr ausreichend mit Blut und es kann zu niedrigem Blutdruck und Herzinsuffizienz kommen [85]. Das Kammerflimmern ist die gefährlichste tachykarde Rhythmusstörung und kann aus einer VT hervorgehen. Unbehandeltes Kammerflimmern ist immer tödlich [80]. Die Ursachen für Kammerflimmern können z. Bsp. akute Ischämie durch einen Infarkt sein, oder auch kurz angekoppelte ventrikuläre Extrasystolen, die ihren Ursprung häufig in den Purkinje-Fasern und/oder den Papillarmuskeln im linken Ventrikel (die ein eng

verknüpftes Faserwerk mit den Purkinje-Fasern bilden) haben [86]. Falls der VT eine gesteigerte Automatie zugrunde liegt, dann können die Extrasystolen jedoch auch aus anderen Bereichen der Ventrikel stammen. Darüber hinaus gibt es noch einen weiteren Mechanismus, der zu Kammerflimmern führen kann: Falls der Patient gleichzeitig VHF und eine akzessorische Leitungsbahn hat, kann es zur tachykarden, nicht-dekrementalen (Wegfall der bremsenden AV-Knotenleitung) ventrikulären Aktivierung kommen, die in Kammerflimmern enden kann. Diese Ursache ist durch Ablation der akzessorischen Leitungsbahn reversibel. Für idiopathisches Kammerflimmern können Ionenkanalerkrankungen oder genetische Mutationen ursächlich sein. [80]

Im Gegensatz zu den VTs sind supraventrikuläre Tachykardien (SVTs) Herzrhythmusstörungen, die in den Vorhöfen entstehen. Die meisten SVTs können mit einer Katheterablation kurativ behandelt werden. Sie werden unterschieden in Tachykardien mit Reentrymechanismus (AV-Knoten-Reentrytachykardie, WPW-Syndrom, Vorhofflattern) und Tachykardien mit abnormer Automatie oder getriggelter Aktivität (fokale atriale Tachykardien). In Abbildung 3 sind die Ursprungsorte und Mechanismen der SVTs dargestellt. Ein Teil dieser Arrhythmien ist auf den Vorhof (Sinustachykardie, VHF, Vorhofflattern, fokale atriale Tachykardie) beschränkt, während andere im Sinus- oder AV-Knoten kreisen (AV-Knoten-Reentrytachykardie, Sinusknoten-Reentrytachykardie) und manche Vorhöfe und Kammern über ein akzessorisches Bündel (WPW-Syndrom) involvieren. Das VHF ist eine Sonderform der SVTs, da es normalerweise durch Automatismen aus den Pulmonalvenen entsteht, dann jedoch auf die Vorhöfe übergreift und dort strukturelle Substrate mit Mikro-Reentries bilden kann. VHF ist außerdem die häufigste SVT und nimmt auch in dieser Arbeit eine besondere Rolle ein. Aus diesem Grund wird es im Folgenden detaillierter behandelt. [80]

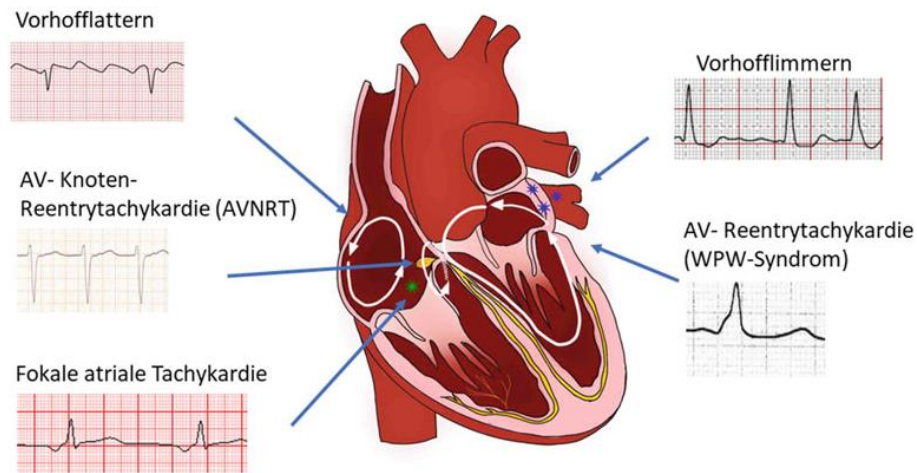


Abbildung 3: Mechanismen der supraventrikulären Tachykardien. Unterschieden werden Tachykardien mit Reentrymechanismus (AV-Knoten-Reentrytachykardie [AVNRT], WPW-Syndrom, Vorhofflattern) und Tachykardien mit abnormer Automatie (fokale atriale Tachykardien). VHF ist ein Spezialfall, da es zunächst durch Automatismen aus den Pulmonalvenen entsteht, später aber auf die Vorhöfe übergreift und dort strukturelle Substrate mit Mikro-Reentrys bilden kann. Modifiziert nach [80]

1.9 Vorhofflimmern

VHF ist eine der häufigsten Rhythmusstörungen, die bei 1-2% der deutschen Bevölkerung auftritt [87]. Das Lebenszeitrisko an VHF zu erkranken beträgt ca. 25% mit steigender Tendenz [80]. Dabei entsteht in den Vorhöfen eine ungerichtete elektrische Erregung, die teilweise auch über das Reiz-Leitungssystem in die Kammern weitergeleitet wird. VHF kann paroxysmal (VHF tritt anfallartig auf, dauert nicht länger als sieben Tage und hört spontan auf), persistierend (VHF dauert länger als sieben Tage und hört nicht von selbst auf, kann aber durch Behandlung in einen normalen Rhythmus überführt werden) oder permanent (VHF bleibt dauerhaft und es kann kein normaler Rhythmus erreicht werden) auftreten. Beim VHF kommt es zur unkontrollierten Kontraktion des Vorhofes, wodurch die Beteiligung der Vorhöfe an der Ventrikelfüllung wegfällt. Patienten mit VHF haben ein erhöhtes Risiko für Schlaganfälle, Herzinsuffizienz und Demenzentwicklung. Dadurch ist die Lebenserwartung dieser Patienten reduziert. Die Diagnose VHF wird mit einem 12-Kanal-Ruhe-EKG gestellt. Dabei sind unregelmäßige QRS-Komplexe („absolute Arrhythmie“) ohne abgrenzbare P-Wellen und eine „unruhige“ Isoelektrische als Kriterien ausschlaggebend. Außerdem kann die Diagnose mithilfe einer Langzeit Beobachtung gestellt werden, wenn hierbei über einen Zeitraum von mindestens 30 s VHF identifiziert wird. Die Therapie von VHF setzt sich aus verschiedenen Bausteinen zusammen. Aufgrund des deutlich erhöhten Schlaganfallrisikos wird in fast allen Fällen eine orale Antikoagulation (Dabigatran, Apixaban, Rivaroxaban oder Edoxaban)

vorgenommen. In Ausnahmefällen kann zusätzlich ein Vitamin-K-Antagonist empfohlen werden. Die Symptome des VHF an sich können entweder mit einer reinen Frequenzkontrolle (Betablocker, Kalziumkanalantagonist oder Digitalispräparaten) oder einer dauerhaften Wiederherstellung des Sinusrhythmus (elektrische oder medikamentöse Kardioversion) therapiert werden. Bei der Frequenzkontrolle wird lediglich die Anzahl der Schläge pro Minute durch Medikamente auf den gewünschten Wert eingestellt. Die Abstände zwischen den einzelnen Schlägen können jedoch weiterhin variieren. Bei der Rhythmuskontrolle mit Wiederherstellung des Sinusrhythmus wird nicht nur die Frequenz korrigiert, sondern auch ein regelmäßiges aufeinanderfolgen der Schläge gewährleistet. Da die Rezidivrate nach Kardioversion sehr hoch ist muss häufig eine dauerhafte rhythmusstabilisierende Maßnahme mittels medikamentöser antiarrhythmischer Therapie oder einer Katheterablation induziert werden. Bei der Katheterablation werden über einen Zugang an der Leiste über die Blutgefäße Katheter in das Herz vorgeschoben und die Bereiche des Vorhofmyokards verödet, die für die Entstehung des VHF verantwortlich sind. Zusätzlich sind viele Patienten von Komorbiditäten wie Adipositas, Hypertonus, Herzklappenvitien, Herzinsuffizienz, Alkoholabusus, koronare Herzerkrankung oder Hyperthyreose betroffen und müssen auch hinsichtlich dieser Erkrankungen behandelt werden. [80] Insbesondere die medikamentöse Therapie weist starke Mängel durch eine begrenzte Indikation und belastende Nebenwirkungen auf. Bei vielen Patienten tritt VHF in Kombination mit Herzinsuffizienz auf und die Patienten weisen ein schlechteres kardiovaskuläres *Outcome* auf [10, 88-90]. Demgegenüber wird in der CASTLE-AF-Studie gezeigt, dass die Rhythmuskontrolle mittels Katheterablation bei Patienten mit Herzinsuffizienz und VHF die Sterblichkeit sowie die Hospitalisierungsrate für Herzinsuffizienz verringern und die linksventrikuläre Funktion verbessern kann [91]. Auch andere klinische Arbeiten bei Patienten mit VHF deuteten auf positive Auswirkungen der Rhythmuskontrolltherapie auf die Herzfunktion und andere funktionelle *Outcomes* hin [92]. In der EAST-AFNET 4 Studie wurde bei Patienten, die seit 1 Jahr oder kürzer von VHF betroffen waren, ein verbessertes kardiovaskuläres *Outcome* beobachtet, wenn diese frühzeitig mit einer Rhythmuskontrolle behandelt wurden [93]. Aufgrund dieser zunehmenden klinischen Evidenz konzentrieren sich die Behandlungsstrategien für Patienten mit VHF zunehmend auf die Rhythmuskontrolle anstatt der Frequenzkontrolle [93, 94]. In der CAMERA-MRI und der CAMTAF-Studie wurde gezeigt, dass die Wiederherstellung des Sinusrhythmus im Vergleich zur reinen

Frequenzkontrolle eine bessere Erholung der ventrikulären Kontraktilität bei Patienten mit VHF und Herzinsuffizienz bewirkt [95, 96]. Scheinbar beeinflusst auch die Arrhythmie-Komponente (unregelmäßige Abstände zwischen den Herzschlägen) allein, abgesehen von der zu hohen Frequenz, die linksventrikuläre Funktion und das Remodeling negativ. Zu den Effekten einer normofrequenten Arrhythmie beim VHF ist bisher kaum etwas bekannt, obwohl eine Vielzahl von Patienten frequenzkontrolliertes VHF aufweist. Abgesehen davon sind zwar viele Mechanismen der Effekte von VHF im Vorhof bekannt, die Mechanismen hinter den Effekten von VHF auf den Ventrikel sind jedoch weitestgehend ungeklärt [10, 11, 97].

1.10 Zelluläre Arrhythmogenese

Bei pathologischen Veränderungen im Prozess der elektromechanischen Kopplung kann es zur Entstehung von Arrhythmien, wie zum Beispiel dem VHF, kommen. Dabei ist die Ca^{2+} -Homöostase von besonderer Bedeutung. Diese kann an verschiedenen Orten und Zeitpunkten des Prozesses gestört sein. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Fokus auf oxidativen Stress, die damit verbundene Aktivierung der CaMKII und weiterhin auf den späten Na^{+} -Strom gelegt werden.

1.10.1 Oxidativer Stress und Aktivierung der Calcium/ Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II δ

Bei Patienten mit VHF ist die Expression der CaMKII im Vorhof erhöht, im Vergleich zu Patienten mit Sinusrhythmus [98]. Damit wird der Kinase eine Bedeutung beim Auftreten von Arrhythmien zugeschrieben. Zudem ist erhöhte CaMKII Aktivität durch Oxidation assoziiert mit vielen weiteren kardialen Erkrankungen wie zum Beispiel Herzinfarkten oder Ischämie-Reperfusionen Erkrankungen [99-101].

Die Anwesenheit von ROS kann dazu führen, dass die CaMKII in Abwesenheit von Ca^{2+} /Calmodulin aktiv ist. Dabei wird die CaMKII an Methionin 281 und 282 oxidiert [69]. Bei einer Mutation der Methioninreste zu Valin-Resten (welche nicht oxidiert werden können) wird die Kinase in Anwesenheit von ROS nicht mehr dauerhaft aktiviert. Die Oxidierung der CaMKII an Meth281/282 scheint ein Sensor für ROS und kein Indikator für zelluläre Schäden und Proteindegradierung zu sein [69]. Erhöhte CaMKII Oxidation korreliert nicht mit niedrigerer Proteinexpression [102, 103] sondern mit erhöhter Kinase-Aktivität [104]. Die ROS, welche für die Oxidation der CaMKII verantwortlich sind, stammen von unterschiedlichen Quellen (NADPH Oxidase, Mitochondrien u. a.) und die Eliminierung eines dieser Signalwege führt zur Reduktion

der CaMKII Oxidation [104, 105]. Die Oxidation der CaMKII ist prinzipiell reversibel. Dabei reduziert die Methionin Sulfoxid Reduktase A (MsrA) die oxidierten Methionin Reste [104]. Wenn jedoch das Gleichgewicht zwischen autonom aktiver und auto-inhibierter CaMKII in Richtung aktiver CaMKII verschoben wird, kommt es zur chronischen Aktivierung der CaMKII [69]. In diesem Fall kann das reduzierende Mittel die Oxidation durch zu viel ROS nicht mehr ausgleichen und der Prozess ist nicht mehr reversibel.

Wie bereits unter 1.7.2 beschrieben ist, kann die Hyperphosphorylierung des RYR2 durch die CaMKII zur spontanen Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR führen. In der Literatur wird beschrieben, dass beim VHF eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des RYR2 und ein erhöhtes Ca^{2+} -Leck bestehen [106]. Der zugrunde liegende Mechanismus ist die Hyperphosphorylierung des RYR2, die damit verbundene Abdissoziation des Calstabin (stabilisiert normalerweise den RYR2) und schließlich die Instabilität des RYR2 [107]. Physiologisch betrachtet sollte Ca^{2+} quantitativ nur während der Systole und nicht während der Diastole aus dem SR freigesetzt werden. Bei Pathologien, wie zum Beispiel der Herzinsuffizienz, kommt es jedoch zu einer verminderten Freisetzung während der Systole aufgrund reduzierter Ca^{2+} -Beladung des SR und gleichzeitig zur pathologischen Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR während der Diastole [5]. Die pathologisch reduzierte Beladung des SR mit Ca^{2+} entsteht durch zwei unterschiedliche Mechanismen: Die SERCA ist für die Wiederaufnahme des cytosolischen Ca^{2+} in das SR verantwortlich. Bei reduzierter Aktivität bzw. Funktion der SERCA wird das freigesetzte Ca^{2+} nicht adäquat in das SR zurückgeführt [31]. Ein Grund dafür ist die reduzierte Phosphorylierung des PLB [108]. Der zweite Mechanismus ist die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR während der Diastole. Verantwortlich dafür sind die RYR2 Rezeptoren. Bei mangelhafter Schließung des Rezeptors während der Diastole kann Ca^{2+} aus dem SR austreten. Die Schließung des RYR2 während der Diastole ist entscheidend für die ausreichende Beladung des SR und führt in reduzierter Form zur Entstehung eines SR Ca^{2+} -Lecks. Das Leck ist unter anderem beim VHF erhöht [109] und somit für die Entstehung von zellulären Arrhythmien von entscheidender Bedeutung. Durch die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration beim SR Ca^{2+} -Leck kann ein weiterer proarrhythmogener Trigger begünstigt werden: Der transiente Na^+ Einstrom [110]. Hauptverantwortlich für den transienten Na^+ -Einstrom ist die gesteigerte Aktivität des NCX. Der Kanal transportiert ein Ca^{2+} -Ion aus der Zelle heraus und drei Na^+ -Ionen in die Zelle hinein. Dadurch

entsteht netto ein Einstrom von positiven Ladungen. Beim humanen VHF ist die Aktivität des Kanals erhöht [111]. Durch die erhöhte Aktivität des NCX und den damit verbundenen transienten Na^+ -Einstrom kann es zu Nachdepolarisationen der Zellmembran nach dem Aktionspotential kommen. Die Nachdepolarisationen werden in 1.10.3 genauer beschrieben.

1.10.2 Der späte Natriumstrom

Die intrazelluläre Na^+ -Konzentration (5–15 mM) ist unter physiologischen Bedingungen deutlich niedriger als im Extrazellularraum [112]. Ein vermehrtes Auftreten zum Beispiel von Metaboliten und reaktiven Sauerstoffspezies kann die Aktivität der kardialen Na^+ -Kanäle beeinflussen und den Einstrom von Na^+ erhöhen [113] (siehe Abbildung 4). Beim Na^+ -Einstrom über die kardialen Na^+ -Kanäle spielt der schnelle Na^+ -Einstrom (Peak I_{Na}), der am steilen Aufstrich des Aktionspotentials beteiligt ist und innerhalb weniger Millisekunden inaktiviert wird, eine geringere Rolle als der späte Na^+ -Strom (Late I_{Na}). Der Late I_{Na} entspricht zwar normalerweise nur 1% der Amplitude des Peak I_{Na} , wird aber während des Aktionspotentials nicht inaktiviert [114-117]. Unter pathologischen Bedingungen (z. Bsp.: Herzinsuffizienz, Ischämie) kann er bis auf 5% des peak I_{Na} ansteigen und über die gesamte Dauer des Aktionspotentials hinweg aktiv bleiben [78, 118]. Zudem kann es über vermehrten Na^+ -Einstrom über die Na^+/H^+ -Pumpe und reduzierter Na^+ -Eliminierung über die Na^+/K^+ -ATPase zu einem starken Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration (> 30 mM) kommen [30]. Der sarkolemmale NCX leitet unter physiologischen Bedingungen während der diastolischen Relaxation des Herzens Na^+ in die Zelle hinein und dafür im Austausch Ca^{2+} aus der Zelle hinaus. Bei erhöhter intrazellulärer Na^+ -Konzentration ist der chemische Gradient für Na^+ über diesen Kanal reduziert und es wird weniger Na^+ in die Zelle hineingeleitet. Im Umkehrschluss bedeutet dies jedoch, dass auch weniger Ca^{2+} aus der Zelle hinausgeleitet wird und es kommt zu einer Ca^{2+} -Überladung der Zelle. Bei sehr hoher intrazellulärer Na^+ -Konzentration, kann es sogar zu einer Umkehrung der NCX-Funktion kommen und es strömt Na^+ aus der Zelle hinaus und Ca^{2+} hinein. Die resultierende Ca^{2+} -Überladung ist ein Mechanismus der gestörten Relaxation, bei dem durch die erhöhte Ca^{2+} -Bindung an den Myofilamenten, diese stärker und länger aktiviert sind [119].

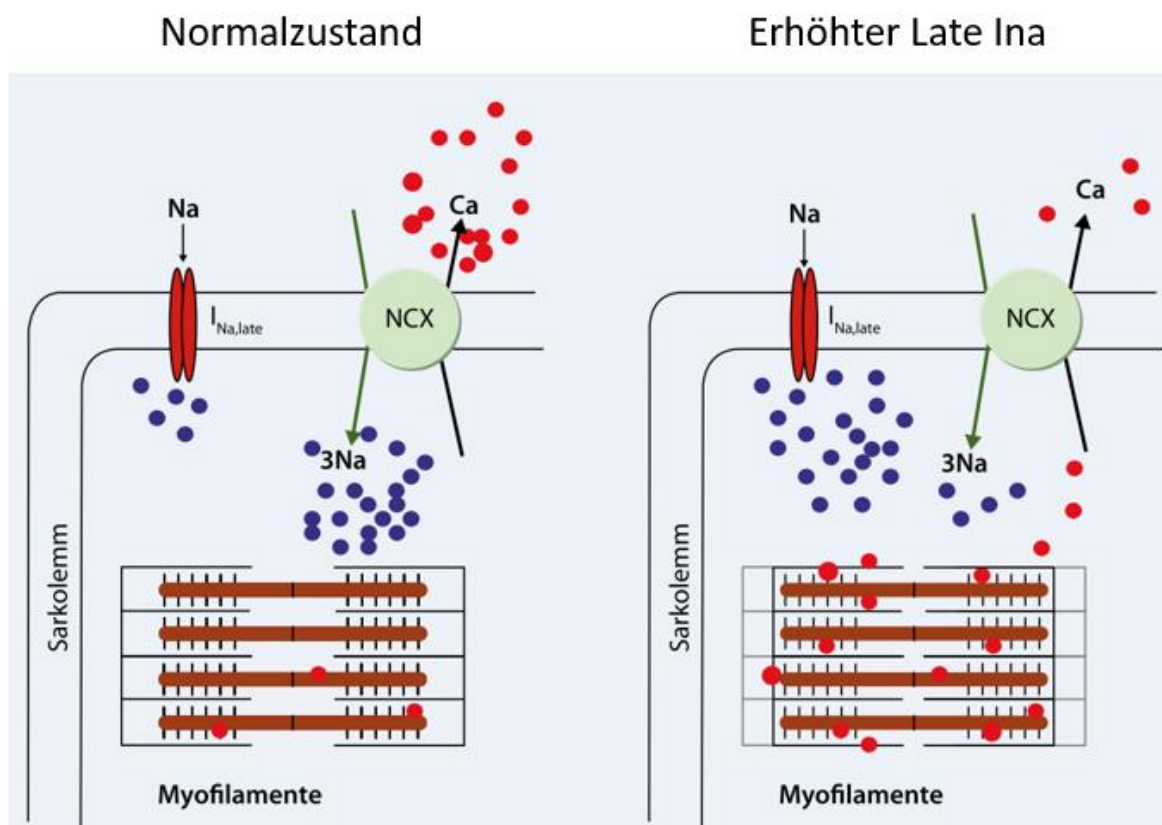


Abbildung 4: Verteilung von Na^+ (blau) und Ca^{2+} (rot) im Normalzustand und bei erhöhtem Late I_{Na} . Bei erhöhtem Late I_{Na} wird die Ca^{2+} -Elimination über den Na^+/Ca^{2+} -Austauscher (NCX) reduziert, daraus folgt eine verstärkte diastolische Myofilamentaktivierung, aus [113]

Außerdem ist die Na^+ induzierte Ca^{2+} -Überladung mit einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer [113] und dem häufigeren Auftreten von Nachdepolarisationen assoziiert [30].

1.10.3 Frühe und späte Nachdepolarisationen

Es gibt zwei Arten von spontanen Nachdepolarisationen: Die frühen Nachdepolarisationen treten noch während dem Ablauf des Aktionspotentials auf, wogegen die späten Nachdepolarisationen nach dem Ablauf des Aktionspotentials auftreten. Nachdepolarisationen sind ursächlich für die getriggerte Aktivität und ein häufiger Mechanismus der kardialen Arrhythmien zugrunde liegt. Frühe Nachdepolarisationen treten häufig bei verlängerten Aktionspotentialen auf. Bei einer Verlängerung des Aktionspotentials kann es zur Wiederöffnung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle und Na^+ -Kanäle kommen und die Membran depolarisiert vor Ende der Repolarisationsphase [80]. Dadurch entsteht eine erneute Nachdepolarisation. Die frühen Nachdepolarisationen sind z. Bsp. ursächlich für Torsades des pointes Tachykardien oder für ventrikuläre Tachykardien im Rahmen eines hereditären oder erworbenen Long-QT Syndroms [120, 121]. Späte Nachdepolarisationen treten erst

nach vollständiger Repolarisation auf und entstehen durch einen transienten Anstieg des zytoplasmatischen Ca^{2+} bei Ca^{2+} -Überladung der Zelle. Die Membran depolarisiert aufgrund des hohen intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Die späten Nachdepolarisationen sind mechanistisch ursächlich z. Bsp. bei der Entstehung von ventrikulären Tachykardien bei myokardialer Ischämie, Tachykardie, Digitalisintoxikationen und hereditären Arrhythmie-Syndromen (z. Bsp. katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie) [122, 123].

1.10.4 Pathologie der Elektromechanischen Kopplung bei Tachykardie-induzierter Kardiomyopathie

In verschiedenen Tiermodellen wurden bereits Untersuchungen zu pathologischen Veränderungen der elektromechanischen Kopplung durch tachykardes Pacing und damit erzeugte Phänotypen von Herzinsuffizienz vorgenommen. Tachypacing mit 400 Schlägen pro Minute über 3-5 Wochen führte in einem Kaninchenmodell zu erhöhter intrazellulärer Na^{+} -Konzentration und reduzierten SERCA Expressionsleveln in den KM [15]. Mit steigender Frequenz der Herzrate wird eine Zunahme der funktionalen Defekte bei der Herzinsuffizienz in Säugetieren beobachtet [124]. Allgemein wird beim Tachy-induzierten Phänotyp der Herzinsuffizienz beobachtet, dass das Ca^{2+} -handling beeinträchtigt wird [17]. Die Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase sind eine Folge von gestörter Ca^{2+} -Beladung des SR [15]. Die veränderte Ca^{2+} -Beladung des SR kann durch veränderte Aktivität oder Expression der SERCA, einem erhöhten Ca^{2+} -Leck des SR und einer reduzierten Ca^{2+} -Verfügbarkeit für die SERCA bedingt sein [124-126]. Letzteres kann Ergebnis einer veränderten Expression oder Funktion des sarkolemmalen NCX sein, der zu einem großen Teil für die Eliminierung des cytosolischen Ca^{2+} in den Extrazellularraum verantwortlich ist. Eine erhöhte Expression des NCX kann dazu führen, dass vermehrt Ca^{2+} aus den Zellen eliminiert wird und weniger Ca^{2+} in das SR aufgenommen werden kann [127, 128]. Abgesehen von der Expression des NCX kann auch die Funktion des NCX beeinflusst werden [128, 129]. Abhängig von der Ca^{2+} - und Na^{+} -Konzentration innerhalb und außerhalb der Zelle kann der NCX entweder im physiologischen *forward* Modus funktionieren und Ca^{2+} aus der Zelle heraus und Na^{+} in die Zelle hineinleiten oder in den *reverse* Modus gehen und die Ionen umgekehrt leiten.

1.11 Fragestellung und Hypothesen

VHF ist bisher meist nur als Erkrankung des Vorhofs bekannt und erforscht, hat jedoch auch Einfluss auf den Ventrikel. Bisher existiert noch kaum ein Modell, das erlaubt den Einfluss von VHF auf den Ventrikel zu untersuchen. In dieser Arbeit sollte zum einen im humanen Herz von Patienten mit VHF evaluiert werden, was die Erkrankung für einen Einfluss auf die Elektrophysiologie der Ventrikelzellen hat. Außerdem wurde im Rahmen der Arbeit ein Modell mittels hPSC-KM (humane induzierte pluripotente Stammzell-Kardiomyozyten) etabliert, mit dem an humanen ventrikulären Zellen elektrische Erregung wie beim VHF simuliert werden kann. Mit diesem Modell wurden verschiedene Aspekte der Elektrophysiologie an den Zellen nach der VHF-Simulation untersucht. In einem „back-to-bench“ Ansatz sollte zudem der mechanistische Hintergrund zu den Ergebnissen der CASTLE-AF Studie aufgedeckt werden: Warum haben Patienten bei einer Senkung der VHF-Last auf unter 50% ein besseres klinisches *Outcome*? Weiterhin sollten die Mechanismen des Arrhythmie-vermittelten Remodelings aufgedeckt und dazu die Rolle der CaMKII und damit verbunden des oxidativen Stresses (ROS aktivieren die CaMKII) untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Isolation humaner ventrikulärer Kardiomyozyten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Messungen mit humanen KM von Patienten, die am offenen Herzen operiert werden mussten, durchgeführt. In diesem Kapitel wird beschrieben, wie die Generierung der Proben und die weitere Verarbeitung des Gewebes stattfand.

2.1.1 Gewinnung der Gewebeproben

Bei Vorliegen einer schweren Aortenklappenstenose oder -insuffizienz muss häufig die Klappe operativ entfernt und ersetzt werden. Ein chirurgischer Aortenklappenersatz kann entweder über eine komplette Brustbeineröffnung oder minimalinvasiv durch eine partielle Brustbeineröffnung oder einen seitlichen Zugang am vorderen rechten Brustkorb durchgeführt werden. Dieser Eingriff findet am ruhenden Herzen statt. Dazu müssen die Patienten an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen werden, die während der OP die Pumpfunktion, den Gasaustausch und die Temperaturregelung, übernimmt. Bei Patienten mit fortgeschrittener Aortenklappenstenose kann es durch die erhöhte mechanische Belastung am Septum unterhalb der Aortenklappe zu einer Verdickung des Herzmuskelgewebes kommen. Das Blut kann während der Kontraktion nicht ausreichend durch die Klappe ausströmen. Diese Verdickung wird während dem operativen Eingriff mit der Morrow-Resektion abgetragen. Die Morrow-Resektion bezeichnet den chirurgischen Eingriff, bei dem zur Behandlung einer hypertrophen obstruktiven Kardiomyopathie das verdickte Herzgewebe entfernt wird.

In Kooperation mit der Herz-Thorax-Chirurgie der Universitätsklinik Regensburg konnten diese ventrikulären Proben bei Vorliegen des schriftlichen Einverständnisses des Patienten nach Aufklärung durch den Herzchirurgen für die experimentelle Forschung akquiriert werden. Direkt nach Entnahme der Gewebeprobe mit einem Gewicht zwischen 20 und 150 mg im Operationssaal, wurde diese in gekühltem Custodiol (4°C) zügig in das Labor transportiert. Die Forschung erfolgte entsprechend der Deklaration von Helsinki. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Regensburg (Ref. Nr. 20-1776-101) und der Universität Göttingen (Ref. Nr. 10/9/15, 21/10/00 und 21/2/11) lag für alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Septumproben vor.

2.1.2 Isolation der einzelnen Kardiomyozyten

Die Gewebeprobe aus dem OP wurde in eine Petrischale mit 20 mL 4°C gekühltem Custodiol gegeben. Die Petrischale wurde zur Präparation des Gewebestückes auf Eis gestellt. Die Probe wurde von Fibrose gereinigt und anschließend in ca. 0,1 cm x 0,1 cm große Stücke geschnitten. Die Zellisolation wurde in Joklik-MEM Medium (Pan Biotech; pH 7,4 bei 37 °C) durchgeführt. Die Stücke wurden in ein Becherglas mit 10 mL vorgelegter Enzymlösung mit 0,9 bis 0,95 mg/mL Kollagenase (Worthington Typ I, 315 U/mg), 0,23 mg/mL Proteinase (Sigma-Aldrich, 7–14 U/mg) und 2 mg/mL BSA (BSA, Sigma-Aldrich), gelöst in Joklik-MEM Medium, gegeben. Die Menge an Kollagenase wurde abhängig von der Menge und Qualität des Gewebes eingesetzt. Die Enzymlösung mit den Gewebestückchen wurde in ein Rührgefäß übertragen und 23 Minuten bei 37 °C und 100-150 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Gewebestücke mit einem Zellsieb gesammelt und die Enzymlösung verworfen. Das Gewebe wurde direkt in 7 mL vorgelegter Joklik-MEM Lösung mit 5 mg/mL BSA zum Abstoppen des Enzymverdaus in ein 15 mL Falcon gegeben. In dieser Lösung wurden die Stücke mit Hilfe einer Pasteurpipette 2 bis 3 min mechanisch durch auf- und abpipettieren geschert, um erste Zellen aus dem Gewebeverband zu lösen. Im Rührgefäß wurden 5 mL neue Enzymlösung mit 0,58 mg/mL Kollagenase und 2,67 mg/mL BSA gelöst in Joklik-MEM Medium gegeben und 5 bis 10 min unter Rühren bei 37 °C und 100-150 rpm inkubiert. Danach wurden die Gewebestücke wieder mit dem Zellsieb gesammelt und in der BSA-Lösung geschert, um Zellen zu lösen, während die Enzymlösung mit den enthaltenen gelösten Zellen zentrifugiert wurde (RCF: 81,63 g, 5 min). Die überstehende Enzymlösung wurde verworfen und die Zellen in BSA-Lösung resuspendiert. Die gescherten Gewebestücke wurden in neue Enzymlösung gegeben und im Rührgefäß weiter verdaut. Nach jedem Verdauschnitt wurden die gelösten Zellen unter dem Mikroskop geprüft. Nur Zelllösungen mit morphologisch guten KM wurden für die Messungen verwendet (Beispiel für einen isolierten KM in Abbildung 5). Die Verdauschnitte wurden mehrmals wiederholt, bis das Gewebe vollständig verdaut wurde. Die isolierten Zellen wurden gesammelt, in dem gewünschten Volumen gelöst und die Ca^{2+} -Konzentration zunächst auf 0,2 mM, dann auf 0,4 mM und letztendlich auf 0,8 mM Ca^{2+} erhöht. Für die Messungen wurden die entsprechenden Messkammern mit Laminin beschichtet und die Zellen darauf ausplattiert.



Abbildung 5: Isolierter humaner ventrikulärer Kardiomyozyt. Aus der enzymatischen Isolation einer Probe aus dem OP

2.2 Gewinnung von humanen induzierten pluripotenten Stammzell-Kardiomyozyten

Die hiPSC wurden von gesunden Donoren ohne bekannte kardiovaskuläre Erkrankungen gewonnen. Von allen Spendern wurde vorher die Einwilligung eingeholt. Unser Team arbeitet in Kooperation mit einer Gruppe in Göttingen, welche die Differenzierung der hiPSC zu KM seit langem etabliert hat. Die differenzierten Zellen werden nach Regensburg geschickt und von uns in die Zellkultur genommen. Experimente mit den differenzierten Zellen wurden ca. ab Tag 90 nach Start der Differenzierung begonnen. Dazu wurden die Zellen in Glas Dishes ausplattiert und kultiviert.

2.3 Modell der Kulturstimulation

Wir entwickelten ein Modell zur Simulation von VHF, um die Mechanismen bei chronischer arrhythmischer Stimulation auf ventrikuläre KM zu untersuchen. Bei Patienten mit VHF sind die RR Intervalle (Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden R-Zacken) im EKG unregelmäßig und die Ventrikel werden dementsprechend unregelmäßig erregt. In dem Modell zur VHF-Simulation wurden die ventrikulären Zellen, vergleichbar wie bei den VHF-Patienten, ebenso unregelmäßig stimuliert. Dazu wurden die hiPSC-KM im Kulturschrank über längere Zeit mit dem C-pace EM System von Ion Optix mit diversen Protokollen zwischen einem und sieben Tagen stimuliert. Damit erlaubte uns das Modell verschiedene klinisch relevante Arrhythmien, wie zum Beispiel VHF nachzuahmen und deren Einfluss auf den Ventrikel zu untersuchen.

Die konfluenten, kultivierten hiPSC-KM wurden zunächst verdaut und in der gewünschten Zellzahl in 6 well Multiwellplatten ausplattiert (Abbildung 6). Für molekulare Analysen wie Western Blots wurden 100 000 bis 500 000 Zellen pro well

ausplattiert. Für Messungen an Einzelzellen wurden in die Wells Fluoro Dishes platziert und in diese 30 000 Zellen ausplattiert. Die Dishes können nach der Kulturstimulation direkt entnommen und ohne zusätzlichen Verdau für die jeweilige Messung direkt verwendet werden. Dies ist wichtig, da nach Arrhythmie Simulation der Phänotyp ohne Unterbrechung direkt untersucht werden soll.

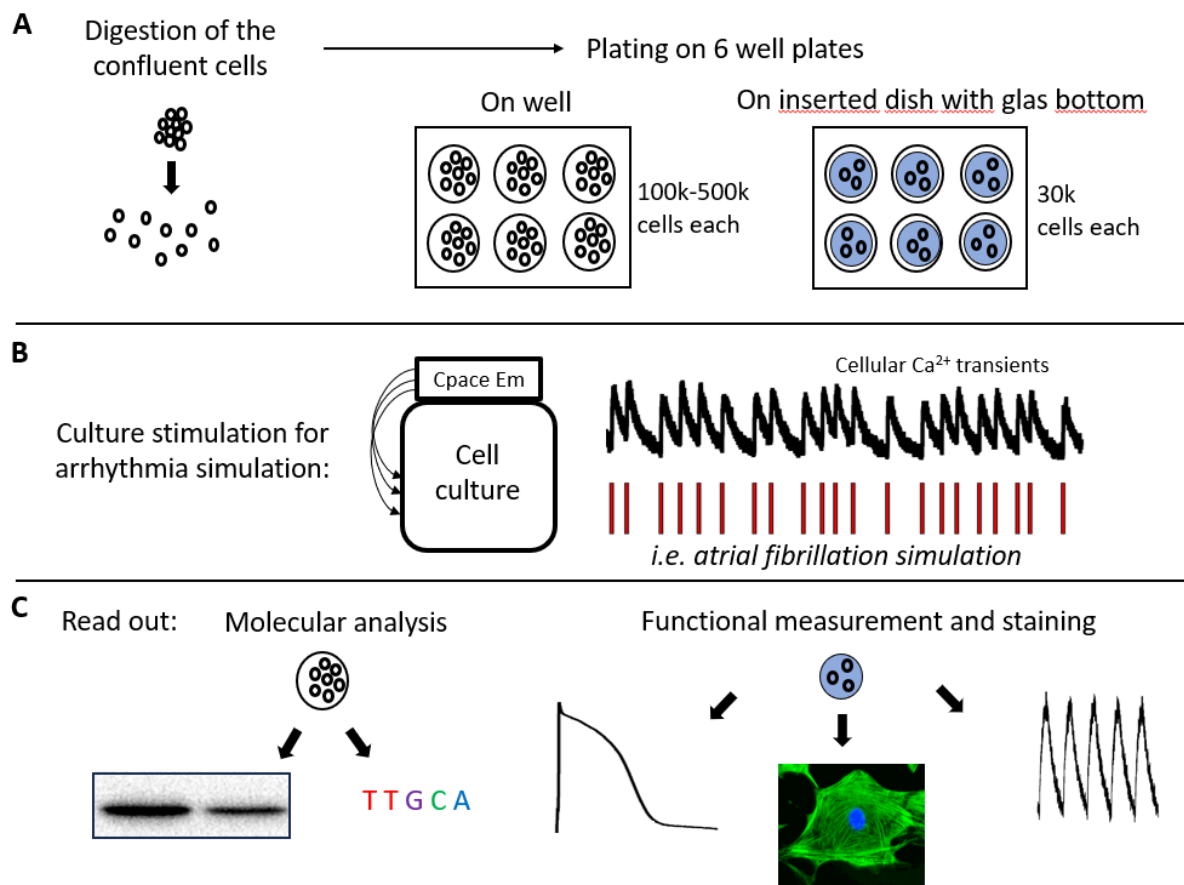


Abbildung 6: Protokoll für die in vitro Arrhythmie-Simulation an hiPSC-KM. (A) Konfluente hiPSC-KM werden verdaut und abhängig von den geplanten Experimenten auf 6 well Platten (100 000-500 000 Zellen pro well z. Bsp. für die Analyse von Zellpellets) oder auf inserierten fluo dishes mit Glasboden (30 000 Zellen pro dish im 6 well z. Bsp. für Analysen an Einzelzellen) ausplattiert. (B) Nach dem Ausplattieren, werden die Elektroden des C-Pace EM Stimulationssystems als Deckel auf die 6 well Platten platziert und die Arrhythmie-Simulation im Brutschrank gestartet. (C) Nach der Arrhythmie-Simulation können die Zellen direkt für die jeweiligen Experimente verwendet werden, modifiziert nach [130] (Bommer et al. PLOS One 2024)

In die wells oder dishes mit den ausplattierten Zellen wurden die Stimulationselektroden platziert und mit dem Stimulator verbunden. Die fertigen Platten wurden bei 37°C und 5% CO_2 in den Kulturschrank gestellt (Abbildung 7) und die Stimulationsprotokolle für die jeweilige Simulation der klinischen Bilder am Stimulator programmiert:

VHF zeichnet sich durch irreguläre RR-Intervalle aus, die zu unregelmäßiger Erregung im Ventrikel führen. Dabei kann die Arrhythmie normofrequent oder tachykard auftreten. Für die Simulation wurden die hiPSC-KM in zwei Gruppen aufgeteilt. Die

Kontrollgruppe wurde mit 60 Schlägen pro Minute (bpm, beats per minute) und regelmäßigen Abständen zwischen den Schlägen stimuliert (analog des Sinusrhythmus). Für die Gruppe der normofrequenten VHF-Simulation wurde am Stimulator dieselbe Frequenz 60 bpm und zusätzlich eine Schlag-zu-Schlag Varianz von 40% (analog der in der Klinik häufig beobachteten RR-Varianz bei VHF-Patienten) eingestellt.

Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluss chronisch tachykarde Erregung auf die Zellen hat. Dazu wurde die Kontrollgruppe wieder mit 60 bpm stimuliert und die Tachykardie-Gruppe mit 120 bpm für 24 Stunden oder 7 Tage.

Das Modell wurde weiterhin verwendet, um zu evaluieren welchen Einfluss die Arrhythmie-Last auf ventrikuläre Kardiomyozyten hat. Dazu wurden die Zellen in vier Gruppen eingeteilt. Alle vier Gruppen wurden entweder 48 Stunden oder 7 Tage lang mit 90 bpm stimuliert. Gruppe 1 wurde als Kontrollgruppe mit einer Arrhythmie-Last von 0% (Sinus Gruppe) stimuliert. In Gruppe 2 betrug die Arrhythmie-Last 30%, in Gruppe 3 60% und in Gruppe 4 90%. Die Simulation wurde erstellt indem jede Stunde der Stimulation in Sequenzen mit rhythmischer Stimulation und Sequenzen mit arrhythmischer Stimulation aufgeteilt wurde. In Gruppe 1 wurde jede Stunde rhythmisch stimuliert, in Gruppe 2 42 Minuten jeder Stunde rhythmisch und die verbleibenden 18 Minuten arrhythmisch, in Gruppe 3 24 Minuten rhythmisch und 36 Minuten arrhythmisch und in Gruppe 4 6 Minuten rhythmisch und 54 Minuten arrhythmisch. Die Schlag-zu-Schlag-Varianz während der Arrhythmie Sequenzen betrug 40%.

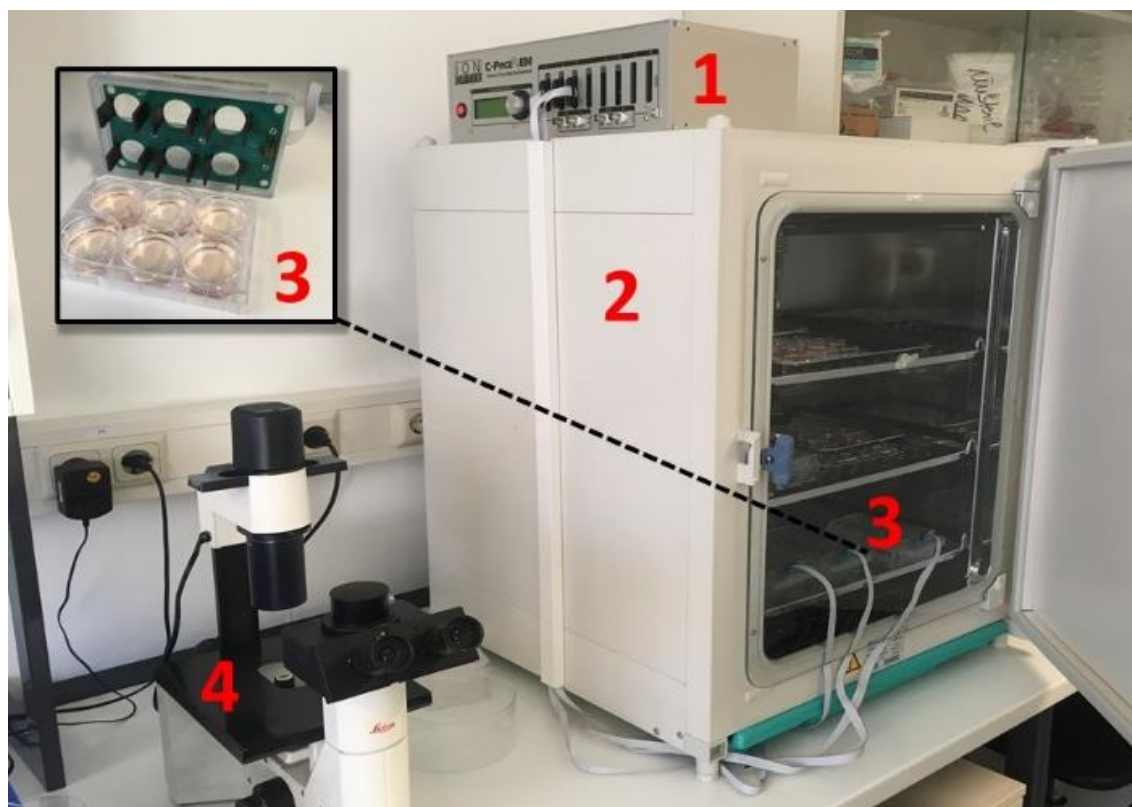


Abbildung 7: Setup für die Kulturstimulation von hiPSC-KM. Das C-Pace EM System (Ion Optix) (1) auf dem Inkubator (2) mit output über Bandkabel, die den Stimulator mit den Elektroden in den 6 well Multiwell Platten mit den hiPSC-KM verbinden (3). Ausreichende Erregung und Kontraktion der Zellen wurden im Mikroskop kontrolliert (4). modifiziert nach [130] (Bommer et al. PLOS One 2024)

Bei der Programmierung des Stimulators wurden außerdem die Dauer und Amplitude der einzelnen Stimulationspulse (Abbildung 8) eingestellt. Die Stimulationspulse sind rechteckige Pulse bestehend aus der Pulsamplitude (V) und Pulsdauer (ms). Die Pulse mussten einerseits stark genug sein, um die Zellen zur Kontraktion anzuregen, andererseits jedoch nicht so stark, dass die Zellen gestresst und beschädigt werden. Besonders die Dauer war hierbei ausschlaggebend. Um die richtige Dauer und Amplitude einzustellen kontrollierten wir die Zellen beim Stimulationsbeginn engmaschig mittels optischer Kontrolle unter dem Mikroskop: Direkt zu Beginn der Stimulation, in den ersten zwei Stunden spätestens alle 30 Minuten, in den folgenden 6 Stunden einmal pro Stunde und in den folgenden Tagen mindestens zweimal pro Tag. Dabei achteten wir auf die sichtbare Kontraktion der Zellen und ihre Vitalität (typische Form, Anhaften an der Oberfläche).

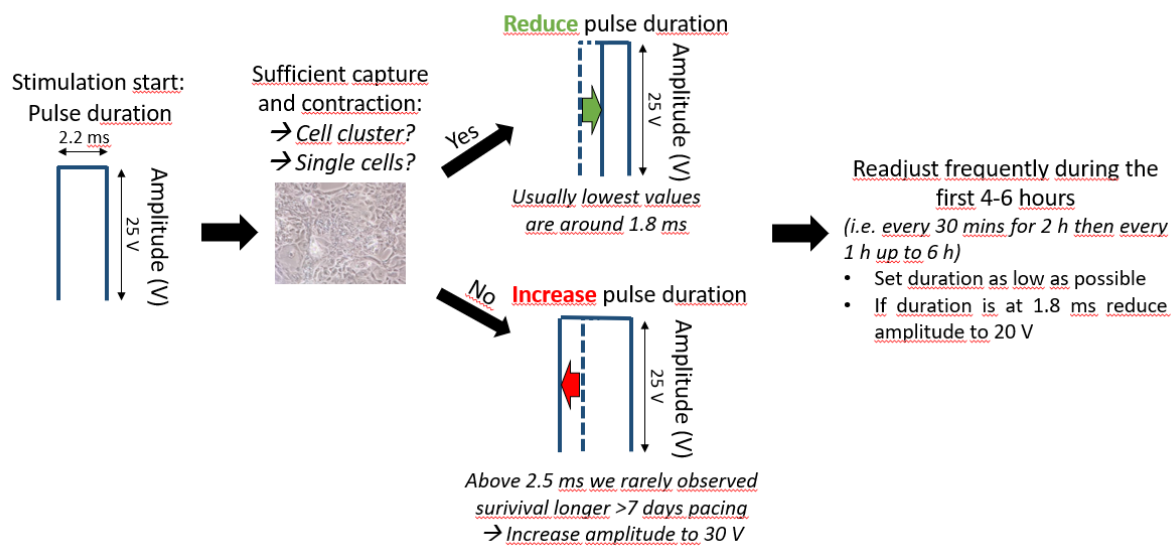


Abbildung 8: Einstellen der Stimulationspulse. Zu Beginn der Kulturstimulation wurde meist eine Dauer von 2,2 ms und eine Amplitude von 25 V eingestellt. Unter dem Mikroskop wurde regelmäßig kontrolliert ob die Zellen auf die Stimulation reagieren und sichtbar kontrahieren. Bei guter elektrischer Erregbarkeit der Zellen und sichtbarer Kontraktion konnte versucht werden, die Pulsdauer Schritt für Schritt zu reduzieren. Sollte die Stimulation nicht zu adäquater Kontraktion der Zellen führen, musste die Stimulationsdauer erhöht werden, um ausreichende Stimulation zu gewährleisten. Während der weiteren Stimulation musste regelmäßig die Kontraktion der Zellen kontrolliert und dementsprechend die Pulseinstellungen angepasst werden (besonders während den ersten 4 bis 6 Stunden). modifiziert nach [130] (Bommer et al. PLOS One 2024)

Erfahrungsgemäß waren zu Beginn der Stimulation eine Dauer von 2,2 ms und eine Amplitude von 25 V die richtige Einstellung für eine sichtbare Kontraktion der Zellen. Die Werte konnten zum Teil auf 1,8 ms und 20 V reduziert werden. Während der Kulturstimulation wurde in dishes das Medium (RPMI 1640 (1x) + GlutaMAX + HEPES mit 2% B27 Supplement) 2 mal pro Woche und in wells 3 mal pro Woche gewechselt.

2.4 Patch Clamp Messungen

2.4.1 Grundlagen der Patch Clamp Methode

Bei der Patch Clamp Methode werden elektrische Ströme oder Spannungen an der Membran lebender Zellen gemessen [131]. Dabei wird die Patch Pipette mit der darin enthaltenen Messelektrode an die Zellmembran herangefahren und an einen Membranausschnitt angesetzt (siehe Abbildung 9). In der Lösung, die die Zellen umgibt, befindet sich eine Erdungselektrode. Zur Reduktion von Leckströmen muss die Verbindung zwischen der Patch Pipette und der Zellmembran möglichst eng sein. Der Widerstand zwischen Patch Pipette und Extrazellarraum soll mindestens 1 Giga-Ohm betragen [132]. Durch Anlegen eines Unterdrucks kann das Membranstück an der Pipettenspitze eingerissen werden und ein Zugang zur Zelle geschaffen

werden. Damit können über die Pipettenlösung beispielsweise auch Kanalblocker oder andere Substanzen in die Zelle gespült werden. Ein Verstärker ermöglicht es selbst kleinste Ströme zu messen.



Abbildung 9: Blick auf die Herstellung eines Gigaseals am humanen Kardiomyozyten. Zu sehen ist die Patch Pipette und der darunterliegende Kardiomyozyt, an dem das Gigaseal hergestellt wurde

2.4.2 Aufbau der Messanlage

Das Setup für die Patch Clamp Messungen beinhaltet ein invertiertes Lichtmikroskop (Olympus IX73), auf dem die Messkammer mit den Zellen platziert wird. Um elektrische Interferenzen abzuschirmen, steht das Mikroskop in einem Faraday'schen Käfig und ist zusätzlich auf einem schwingungsgedämpften Tisch (Clean Bench) montiert, um ungewollte Bewegungen/Schwingungen des Gesamtaufbaus zu verhindern. An dem Mikroskop wird ein Vorverstärker (HEKA Elektronik EPC10 USB) mit Pipettenhalter installiert, an dem die Patch-Elektrode und die Patch Pipetten befestigt werden. An dem Halterungssystem ist ein luftdichter Schlauch angeschlossen, über den mit Hilfe einer Spritze Unter- oder Überdruck an der Patch Pipette angelegt werden kann. Das Halterungssystem ist mit einem Mikromanipulator (MP225 Sutter Instruments) verbunden, über den die Position der Pipette in Feinabstufung und drei Dimensionen gesteuert werden kann. Das vom Vorverstärker gemessene Signal wird mit einem Bessel-Filter (2,9 und 10 kHz) gefiltert und an den Hauptverstärker (HEKA Elektronik patch clamp EPC 10 USB) weitergeleitet, welcher einen Analog-Digital-Wandler enthält. Das Signal wird durch die Patchmaster 2.0 Software (HEKA Elektronik) am Computer verarbeitet und am Bildschirm angezeigt.

Für die Patch Pipetten werden Rohlinge aus Borsilikatglas (WPI, Thin wall Capillary 1,5 mm) in den Pipettenpuller (DMZ Zeitz Puller) eingespannt. Auf Höhe der Mitte der Kapillare befindet sich ein Hitzefilament. Durch Erhitzen und Zug an den Enden der Kapillare werden aus dem Rohling zwei spitz zulaufende Glaspipetten gezogen. Bei dem Vorgang kann die Hitze, sowie die Zugkraft und die Dauer der Pausen zwischen den Zügen reguliert werden, um die Öffnung der Pipette einzustellen. Die Größe der Pipettenöffnung korreliert mit dem Widerstand der Pipette, welcher zwischen 3 und 5 MΩ liegen sollte. Als Patch Elektrode wird ein chlorierter Silberdraht eingesetzt, der den Vorverstärker mit der Pipettenlösung verbindet. Durch den Einsatz einer chlorierten Silberelektrode werden Offsetpotentiale (artifizielle Übergangspotentiale) zwischen der Elektrode und der elektrolythaltigen Pipettenlösung reduziert. Ebenso wird als Badelektrode ein chlorierter Silberdraht eingesetzt. Für die Messung wird die Patch Pipette über die Patch Elektrode geschoben, wodurch die Spitze der Elektrode in die Pipettenlösung eintaucht.

2.4.3 Messungen der Aktionspotentiale

Es wurden Patch Clamp Messungen mit humanen primären ventrikulären KM aus den Aortenklappenersatzverfahren und mit hiPSC-KM durchgeführt. Im Falle der humanen Primärzellen waren die Zellen in lamininbeschichteten Messkammern ausplattiert. Die hiPSC-KM konnten direkt in den dishes der Kulturstimulation zum Patch Setup gebracht werden.

Für die Messung von Aktionspotentialen wurde das jeweilige Zellmedium gegen die Badlösung (1,25 mM CaCl_2 für hiPSC-KM und 2mM CaCl_2 für humane KM) für AP-Messungen (Tabelle 1) ausgetauscht.

Substanz	Molare Masse (g/mol)	Konzentration (mmol/L)
NaCl	58,44	140
KCl	74,55	4
MgCl₂	95,21	1
Glucose	180,16	10
CaCl₂	110,98	1/1,25/2
HEPES	238,31	5

Tabelle 1: Badlösung für die Messung von Aktionspotentialen

Der pH-Wert der Lösung wurde bei Raumtemperatur auf 7,4 eingestellt. Der Elektrolytgehalt der Badlösung entsprach dem physiologischen extrazellulären Milieu. Die Zellen inkubierten 15 min mit der Badlösung, wurden anschließend auf das Patch Mikroskop gesetzt und die Badelektrode in das Zellbad gelegt. Die Patchpipette wurde

mit der Pipettenlösung (Tabelle 2) befüllt und über die Patchelektrode in die Halterung geschoben.

Substanz	Molare Masse (g/mol)	Konzentration (mmol/L)
K Asparaginsäure	171,2	122
NaCl	58,44	10
KCl	74,55	8
MgCl₂	95,21	1
Mg ATP	507,18	5
Li GTP (tetra Li)	562,98	0,3
HEPES	238,31	10

Tabelle 2: Pipettenlösung für die Messung von Aktionspotentialen

Diese Lösung entsprach dem physiologischen Elektrolytgehalt vom Zellinneren. An der Patchpipette wurde ein leichter Überdruck angelegt, um ein Verstopfen der Spitze mit Zellschrott zu verhindern. Die Pipette wurde in das Zellbad getaucht. Bei dem Kontakt zwischen Pipetten- und Badlösung entstehen Diffusionsvorgänge, die ein artifizielles elektrisches Übergangspotential (*liquid junction potential*) hervorrufen. Dieses wurde durch einen manuellen Nullabgleich durch den Verstärker korrigiert. Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde die Pipette an die Zelle angenähert. Durch visuelle Beobachtung unter dem Mikroskop und gleichzeitige Beobachtung des angelegten Kommandospannungsimpulses auf dem Bildschirm konnte man erkennen wann Kontakt zu der Zelle hergestellt wird. Mit einem leichten Sog an der Pipette wurde der sog. *Seal* zwischen Pipette und Zellmembran hergestellt. Dabei sollte der Widerstand im GΩ -Bereich liegen, um Leckströme zu verhindern. Durch etwas stärkeren Unterdruck an der Patch Pipette wurde das Membranstück unter der Pipettenspitze eingerissen (*Rupture*). Die Spannungsantwort der Zelle auf den Kommandospannungsimpuls zeigte an, ob Leckströme vorhanden sind. Der Membranwiderstand sollte weiterhin im GΩ -Bereich liegen und der serielle Widerstand gering sein, um qualitativ gute Messungen durchführen zu können. Um Aktionspotentiale messen zu können, musste ein Strom an der Zelle angelegt werden, es wurde dementsprechend im *Current-Clamp* Modus gemessen. Je nach Zellart wurde ein Strom zwischen -60 und -80 mV angelegt, um die Zelle entsprechend des Ohmschen Gesetzes (Formel 1) auf das Ruhemembranpotential einzustellen. Dabei sollte der geringst-mögliche Strom angelegt werden, der nötig war, um das erforderliche Potential zu erreichen.

$$U = R \times I$$

Formel 1: Formel für das Ohmsche Gesetz. U=Spannung [V], R= Widerstand [Ω], I=Strom [A]

Durch Aufladung von Zellbestandteilen können kapazitative Artefakte C_{Fast} und C_{Slow} [F] entstehen, die durch spätere Stromabgabe die Aufzeichnung beeinträchtigen können. C_{Slow} entspricht der Kapazität der Zellmembran und gibt damit auch indirekt die Größe der Zelle an. C_{Fast} umfasst die Aufladungen von flüssigen Bestandteilen. Der Verstärker kompensiert diese Artefakte während den Messungen. Wenn die Zellen das Ruhemembranpotential erreicht hatten, erfolgte die Stimulation von Aktionspotentialen. Dazu wurden Stromimpulse mit 700-1000 pA und 2,5-4,5 ms an die Zellen abgegeben. Nach einer kurzen Phase, in der die Zelle zum steady state gelangen konnte, wurden die Aktionspotentiale aufgezeichnet (Beispiel einer Aufzeichnung in Abbildung 10). Die Zellen wurden dabei in den Frequenzen 0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz und 3 Hz stimuliert.

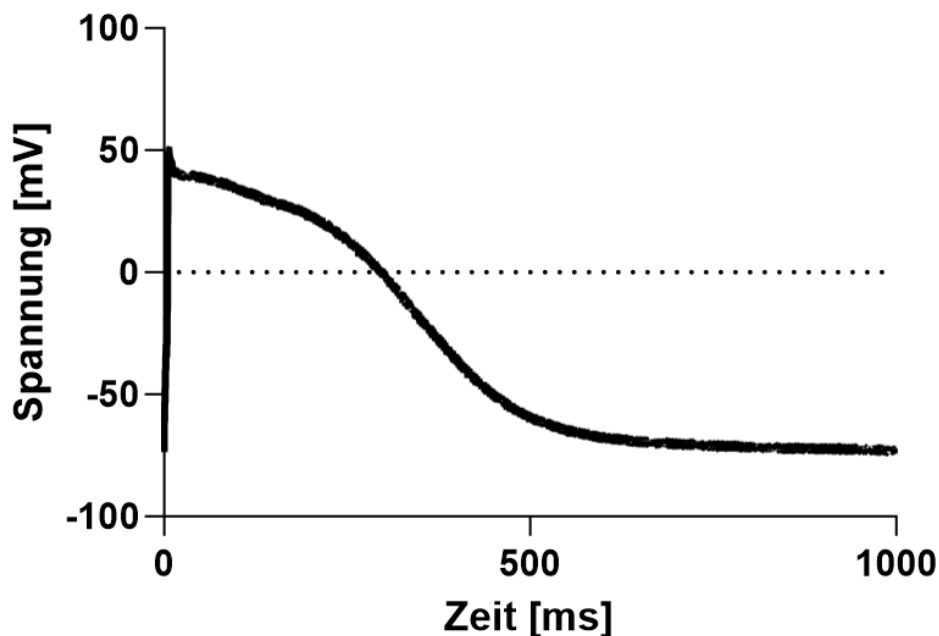


Abbildung 10: Aufnahme eines Aktionspotentials eines hIPSC-KM. Aktionspotential einer Stammzelle bei einer Stimulation von 1 Hz.

Die mit der Patchmaster Software erstellten Aktionspotentiale wurde mit der ABF-Utility (Synaptosoft Inc.) Konvertierungssoftware konvertiert und mit LabChart (AD Instruments) analysiert. Von jeder registrierten Serie wurden nur die letzten fünf Aktionspotentiale ausgewertet. Ausgewertet wurden das Ruhemembranpotential, die Aktionspotentialamplitude, die Aufstrichgeschwindigkeit des Aktionspotentials und die Dauer bis zu verschiedenen Repolarisationszeitpunkten.

2.4.4 Messungen des späten Natriumstroms

Um den späten Na^+ -Strom messen zu können, müssen die Ca^{2+} -Ströme der Zelle blockiert werden. Dementsprechend durfte die Badlösung (Tabelle 3) kein Ca^{2+} enthalten und die Pipettenlösung enthielt Ca^{2+} -Blocker.

Substanz	Molare Masse (g/mol)	Konzentration (mmol/L)
NaCL	58,44	135
Tetramethylammonium-chlorid (TMAC)	109,6	5
CsCl	168,36	4
MgCl₂	95,21	2
Glucose	180,16	10
HEPES	238,31	10

Tabelle 3: Badlösung für Messungen des späten Na^+ -Stroms

Der pH-Wert der Badlösung wurde mit CsOH bei Raumtemperatur auf 7,4 eingestellt. Vor Beginn der Messung wurden die Zellen für 15 min bei RT mit der Badlösung inkubiert.

Substanz	Molare Masse (g/mol)	Konzentration (mmol/L)
CsCl	168,36	95
Cs-Glutamat	147,1	40
NaCL	58,44	10
MgCl₂	95,21	0,92
EGTA	380,4	1
Mg-ATP	507,18	5
Li-GTP	523,18	0,3
CaCl₂	1 M Stock	0,36
Nifluminsäure	282,22	0,03
Nifedipin	346,33	0,02
Strophantidin	404,5	0,004
HEPES	238,31	5

Tabelle 4: Pipettenlösung für die Messung des späten Na^+ -Stroms

Der pH-Wert der Pipettenlösung (Tabelle 4) wurde mit CsOH bei Raumtemperatur auf 7,2 eingestellt. Der Zugang zur Zelle wurde zunächst wie bei der Messung von Aktionspotentialen über den *Seal* und anschließenden *Rupture* hergestellt. Nach dem *Rupture* musste eine Inkubationszeit von 5 Minuten eingehalten werden, um den Ausgleich zwischen Pipettenlösung und Zellinnerem zu gewährleisten und den Inhibitoren Zeit zu geben um zu wirken. Um einen Strom messen zu können, wurde im *Whole cell* Modus statt des Stromes die Spannung an der Zelle angelegt. Um alle Na^+ -

Kanäle aktivierbar zu machen, wurde die Zelle auf ein Membranpotential von -120 mV geklemmt. Bei den Messungen wurden 10 Schläge mit einem Intervall von 2 s registriert. Für jede Registrierung (Beispiel in Abbildung 11) wurde die Spannung zunächst für 49 ms bei -120 mV gehalten, danach wurde für 5 ms auf -20 mV depolarisiert, die Spannung für 1000 ms gehalten und zuletzt wieder auf -120 mV repolarisiert.

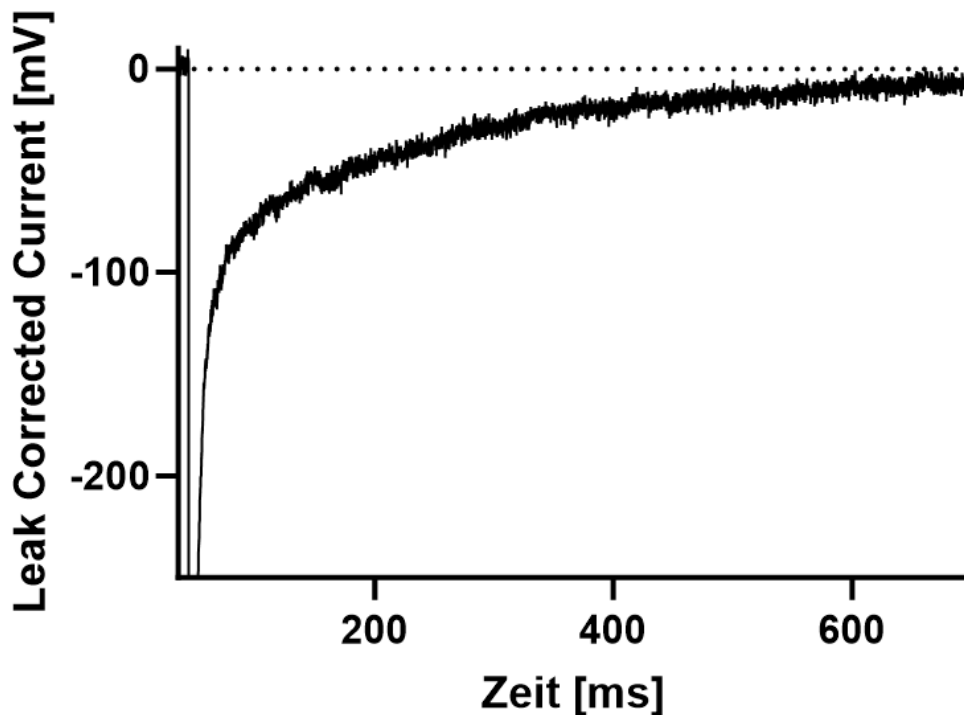


Abbildung 11: Aufnahme des späten Na⁺-Stroms eines hIPSC-KM.

Für die Auswertung wurden die Messungen im ASCII Format exportiert und das Integral des späten Na⁺-Stroms [Ams/F] im Bereich von 100-500 ms berechnet.

2.5 Epifluoreszenzmessungen

2.5.1 Grundprinzip der Epifluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenz ist ein Phänomen, bei dem ein Stoff mit Licht einer bestimmten Wellenlänge beleuchtet wird, dadurch energetisch angeregt wird und zeitlich verzögert Licht einer längeren Wellenlänge emittiert [133]. Die Fluoreszenzmikroskopie macht sich dieses Phänomen zunutze, indem Fluoreszenzfarbstoffe in eine Probe eingebracht werden, mit Anregungslicht beleuchtet werden und das längerwellige Emissionslicht registriert wird. Die Differenz der Wellenlänge von Anregungs- und Emissionslicht wird als Stokes-Shift bezeichnet [134]. Kennt man den Stokes-Shift eines Fluoreszenzfarbstoffes, kann man mit Hilfe eines Filters das Emissions- von

Anregungslicht trennen und das emittierte Licht messen. Bei den Farbstoffen wird zwischen ratiometrischen und nicht ratiometrischen Farbstoffen unterschieden. Der Begriff ratiometrisch bedeutet, dass eine unbekannte Größe aus dem Verhältnis zweier anderer Größen abgeleitet werden kann. Der in dieser Arbeit verwendete Farbstoff Fura-2AM zählt zu den ratiometrischen Farbstoffen und absorbiert bzw. emittiert daher Licht bei zwei verschiedenen Wellenlängen [134, 135]. Das Verhältnis beider Intensitäten zueinander wird nicht durch Bleichvorgänge oder die Farbstoffkonzentration bzw. Farbstoffverlust beeinflusst, da beide Intensitäten in gleichem Ausmaß von den Faktoren betroffen sind [136]. Durch das konstante Verhältnis eignen sich ratiometrische Farbstoffe für die semiquantitative Messung der Ca^{2+} -Konzentration über einen längeren Zeitraum hinweg. Fura-2AM bildet mit Ca^{2+} einen Chelat-Komplex, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 380 nm zu 340 nm verschiebt [135]. Das Emissionsmaximum bleibt unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration bei 510 nm [135]. Zur Berechnung der Ca^{2+} -Konzentration wird der Quotient der Fluoreszenz von beiden Wellenlängen ($F_{340\text{nm}}/F_{380\text{nm}}$) gebildet. Die damit berechneten Werte sind semiquantitative Daten, die immer im Vergleich zu einer Kontrollgruppe betrachtet werden. Damit die Zellen den Farbstoff aufnehmen können wird er mit einer Azetoxymethylgruppe (AM) verestert. Damit kann der Farbstoff die lipophile Zellmembran durchdringen [135] und die Esterverbindungen werden im Zellinneren von zytosolischen Esterasen gespalten. Die dabei entstehende Salzform erlaubt die Bindung von Ionen und verhindert das Austreten aus der Zelle. Bei den Messungen am Epifluoreszenzmikroskop wird die fluktuierende Ca^{2+} -Konzentration der KM als Funktion der Zeit dargestellt. Die stimulierten systolischen Ca^{2+} -Transienten werden abgebildet.

2.5.2 Aufbau der Messanlage

Das verwendete Mikroskop (Motic AE 31) ist invertiert und mit einem 40x-Ölimmersionsobjektiv ausgestattet. Das Anregungslicht aus der Lampe (Cairn research, high intensity arc lamp) fällt auf einen galvanometrischen Spiegel, der zwischen den zwei Anregungswellenlängen wechseln kann. Danach folgt ein dichroitischer Spiegel im Strahlengang, der das kurzwellige Anregungslicht reflektiert und für das langwellige Emissionslicht durchlässig ist. Dadurch wird das Anregungslicht auf das Präparat gelenkt und das Emissionslicht zum Emissionsfilter weitergeleitet. Dieser filtert das Streulicht heraus. Die bereinigte Fluoreszenz gelangt zum Photoelektronenvervielfacher (Ion Optix Fluorescence system Inetrface), der das

Licht verstärkt und in elektrische Spannung wandelt. Der Analog-Digital-Wandler (Ion Optix Hiper Switch) übersetzt die Spannung in ein digitales Signal, welches von der Ion Wizard Software (Ion Optix, Ion Wizard 5.0) weiterverarbeitet wird. Für die Messungen werden die Zellen mit dem Myopacer (Ion Optix Myopacer Field Stimulator) stimuliert.

2.5.3 Messung der Calciumtransienten und des Calciumgehalts des sarkoplasmatischen Retikulums

Vor Beginn der Messung wurden die Zellen zunächst lichtgeschützt mit dem Farbstoff Fura2-AM (Invitrogen Thermo Scientific Fisher, MW: 1001,86 g/mol) mit einer Konzentration von 10 μ M (Verdünnung in Badlösung) inkubiert. Nach 15 Minuten Beladung mit dem Farbstoff wurde die Farblösung gegen die reine Badlösung (siehe Tabelle 5) für die Messung ausgetauscht.

Substanz	Molare Masse (g/mol)	Konzentration (mmol/L)
NaCl	58,44	140
KCl	74,55	4
Glucose	180,16	10
MgCl ₂	95,22	1
HEPES	238,31	5
CaCl ₂	1 M Stock	1,25

Tabelle 5: Badlösung für die Messungen am Epifluoreszenzmikroskop

Nach 15 Minuten Inkubationszeit wurden die Messkammern mit den darauf ausplattierten Zellen auf das Mikroskop gelegt und die Elektrode des Myopacers in das Zellbad eingetaucht. Die Zellen wurden zum Einschlagen mit 30 mV 10 ms Stimulationspulsen und einer Frequenz von 30 bpm mindestens 5 Minuten stimuliert. Für die Messungen wurden die Zellen jeweils einige Schläge mit der gewünschten Frequenz stimuliert (30, 60 oder 90 bpm) bevor die Aufzeichnung der Ca²⁺-Transienten mit der eingestellten Frequenz begann. Nach jeder gemessenen Zelle wurde in unmittelbarer Nähe die Hintergrundfluoreszenz in einem zellfreien Ausschnitt bestimmt. Dieser Wert wurde später bei der Auswertung von der gemessenen Fluoreszenz an der Zelle abgezogen. Zusätzlich zu den normalen systolischen Ca²⁺-Transienten wurde außerdem der Ca²⁺-Gehalt des SR bestimmt. Dazu wird an den Zellen eine Koffeinelösung appliziert (siehe Tabelle 6). Die Koffeinelösung wird vor Beginn der Messung in einem Infusionssystem mit angeschlossener Spritze

vorbereitet. Für die Messung des SR Ca^{2+} -Gehalts werden zunächst mehrere Transienten in der ursprünglichen Badlösung aufgezeichnet und dann während der Aufzeichnung ein großer Schub der Koffeinelösung in die Badlösung eingespült.

Substanz	Molare Masse (g/mol)	Konzentration (mmol/L)
Koffein	194,19	10
NaCl	58,44	140
KCl	74,55	4
Glucose	180,16	10
MgCl_2	95,22	1
HEPES	238,31	5
CaCl_2	1 M Stock	1,25

Tabelle 6: Koffeinelösung zur Bestimmung des SR Ca^{2+} -Gehalts

Das Koffein bewirkt eine generalisierte Öffnung der RYR2 am SR und die Zelle setzt das gesamte Ca^{2+} aus dem SR frei [30, 137, 138]. Vergleicht man den vorhergehenden systolischen Ca^{2+} -Transienten mit dem Koffein-induzierten Ca^{2+} -Transienten, kann die fraktionelle Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR bezogen auf den Ca^{2+} -Gehalt des SR berechnet werden. Zudem wurden in dieser Arbeit pharmakologische Interventionen vorgenommen. Die CaMKII Inhibition erfolgte mit 1 $\mu\text{Mol/L}$ AIP (autocamtide-2 related inhibitory peptide) und Reduktion des oxidativen Stresses mit 200 $\mu\text{Mol/L}$ NAC (N-Acetylcystein). Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte mit der Ion Wizard (Ion Wizard Analyze 5.0, Ion Optix) Software.

2.6 Statistik der Auswertungen

Die graphische Darstellung und statistische Auswertung der Daten wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) erstellt. Die gezeigten Daten werden als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) präsentiert. Der Standardfehler wird mit folgender Formel berechnet:

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

Formel 2: Berechnung des Standardfehlers (SEM). σ^2 =Varianz, σ = Standardabweichung, n =Stichprobengröße

Für die statistische Auswertung beim Vergleich zweier Gruppen wurde für parametrische Daten der ungepaarte Student's T-Test verwendet, bei nicht-parametrischen Daten der Mann-Whitney Test U und für kategoriale Daten der Fisher exact Test. Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde der 1 way ANOVA Test und der nested 1 way ANOVA Test mit Holm-Sidak-Korrektur verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Das Kulturstimulationsmodell

Zum aktuellen Zeitpunkt stellt bei der Untersuchung der Effekte von VHF auf den Ventrikel die Modellbildung eine Forschungslücke dar. Translational gesehen, wäre Myokard-Gewebe von Patienten besonders interessant. Die begrenzte Verfügbarkeit, methodische Schwierigkeiten und patientenspezifische Störfaktoren stellen dabei jedoch eine große Herausforderung dar und erschweren das Erreichen aussagekräftiger Stichproben-Größen [130]. Bei Tiermodellen werden Arrhythmien häufig mittels Schrittmacher-Stimulation oder genetischer Modifikationen simuliert [139-145]. Dabei wird jedoch die translationale Relevanz durch Speziesunterschiede beim Vergleich der Elektrophysiologie im tierischen und humanen Myokard oder mögliche Nebeneffekte der genetischen Modifikationen stark eingeschränkt [146]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde an hiPSC-KM ein Modell zur Langzeit-Simulation von Arrhythmien an humanen KM entwickelt. Im Folgenden sollen zunächst die Ergebnisse des Etablierungsprozesses und im Anschluss daran die beobachteten Effekte auf die Elektrophysiologie der Zellen bei der Anwendung des Modells dargestellt werden.

3.1.1 Stimulationspuls-Parameter und Stimulations-Frequenzen

Bei der elektrischen Stimulation der hiPSC-KM während der Zellkultur ist es essentiell, die Parameter der einzelnen Stimulationspulse, mit denen die Zellen elektrisch erregt werden, richtig einzustellen. Diese elektrischen Impulse müssen einerseits stark genug sein, um bei den Zellen die Aktionspotentiale und damit den Ablauf der Elektromechanischen Kopplung zu initiieren und dürfen andererseits nicht zu stark sein und den Zellen damit schaden. Nur so kann die richtige Stimulation und Kontraktion und damit auch die Induktion von Arrhythmie-assoziierten Phänotypen gewährleistet werden. Es zeigte sich, dass die Dauer der Stimulationspulse, verglichen mit der Pulsamplitude, der kritischere Parameter ist. Eine sehr hohe Pulsdauer führt zu einem höheren Anteil an toten, beschädigten oder abgelösten Zellen. Es wurden unterschiedliche Kombinationen von der Pulsdauer und -amplitude getestet, um die Balance zwischen ausreichender Erregung der Zellen und Zellüberleben während Langzeit-Kulturen zu finden. Dazu stimulierten wir ventrikuläre und atriale hiPSC-KM bis zu 7 Tage mit unterschiedlichen Stimulationspulsdauern (1,0 ms, 1,4 ms, 2 ms, 2,6 ms, 3 ms) und zählten die Zellen, die auf den Puls reagierten und sichtbar schlugen (Abbildung 12A und 13A). Bei Stimulation mit einer Pulsdauer von 1,0 und 1,4 ms reagierten nur 3% (ventrikulär) / 23% (atrial) und 47% (ventrikulär) / 58% (atrial) der

Zellen auf die Stimulation. Bei einer Pulsdauer von 2 ms kontrahierten 90% / 97% der Zellen sichtbar im vorgegebenen Rhythmus. Höhere Pulsdauern wie 2,6 oder 3 ms führten aufgrund von vermehrter Apoptose oder Ablösen der Zellen zu einem geringeren Anteil an kontrahierenden Zellen (77% / 89% and 5% / 5%) während der Langzeit-Stimulation. Bei einer Pulsdauer von ca. 2 ms muss eine Pulsamplitude von 20-25 V angelegt werden, um die Zellen ausreichend zu stimulieren.

Zudem testeten wir, bei welchen Stimulations-Frequenzen die Zellen mitschlagen. Dafür stimulierten wir ventrikuläre und atriale hiPSC-KM für 7 Tage mit 60 bpm und zählten danach den Anteil der im vorgegebenen Rhythmus schlagenden Zellen bei den Frequenzen: 30 bpm, 60 bpm, 90 bpm und 180 bpm (Abbildung 12B und 13B). Bei jeder der Frequenzen wurden dieselben Zellen stimuliert und ausgezählt. Bei den ventrikulären Zellen schlugen bei 30 bpm 90% der Zellen entsprechend der vorgegebenen Stimulation, bei 60 bpm 88% der Zellen und bei 90 bpm 83% der Zellen im vorgegebenen Rhythmus. Bei der höchsten Frequenz von 180 bpm kontrahierte keine der Zellen in dieser Frequenz. Bei der Auszählung der atrialen Zellen berechneten wir für 30 bpm einen Anteil von 3% an Zellen, die den vorgegeben Rhythmus schlugen. Dieser deutliche Unterschied zu den ventrikulären Zellen (90%) ist auf die höhere Eigenfrequenz der atrialen Zellen zurückzuführen. Bei 60 bpm schlugen 90% der Zellen mit, bei 90 bpm 88% und bei 180 bpm 5%. Es gilt zu beachten, dass die Erregbarkeit und Kontraktion der Zellen zwischen den verschiedenen Differenzierungen variieren kann und vom Alter, der Reinheit und der Effizienz der kardialen Differenzierung beeinflusst wird. Die hiPSC-KM können im Normalfall gut anhand der sichtbaren wenn auch ungeordneten Querstreifung identifiziert werden.

Ventrikuläre iPSC

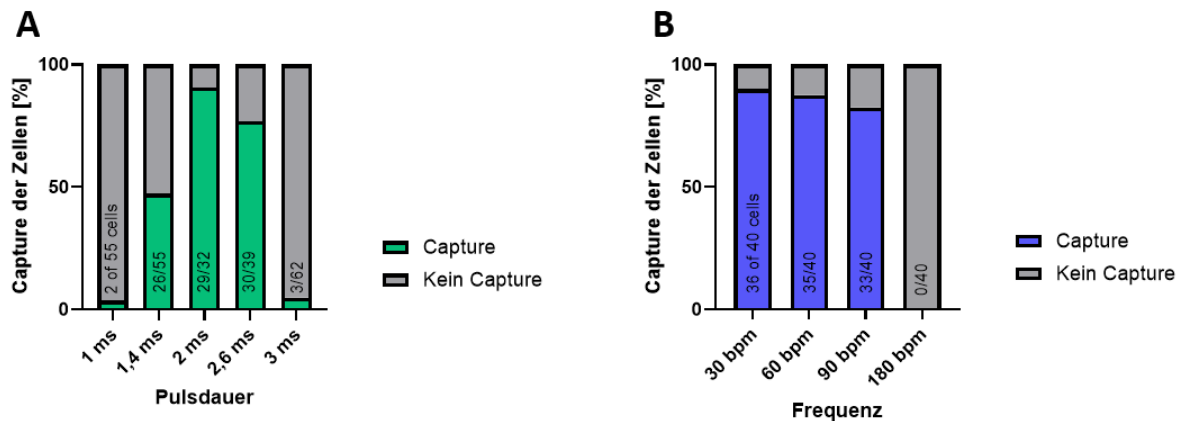


Abbildung 12: Elektrische Erregbarkeit der ventrikulären hiPSC-KM. (A) Anteil der schlagenden ventrikulären hiPSC-KM bei elektrischer Stimulation mit 1, 1,4, 2, 2,6 und 3 ms Dauer der Stimulationspulse und einer Stimulationspulsamplitude von 20 V bei 60 bpm. Die Zellen wurden bis zu 7 Tage stimuliert (insgesamt gezählte Zellen: 55 bei 1 ms, 55 bei 1,4 ms, 32 bei 2 ms, 39 bei 2,6 ms, 62 bei 3 ms). (B) Anteil der schlagenden ventrikulären Zellen bei akuter Stimulation mit 30, 60, 90 und 180 bpm nach 7 Tagen Kulturstimulation bei 60 bpm (insgesamt gezählte Zellen: jeweils 40).

Atriale iPSC

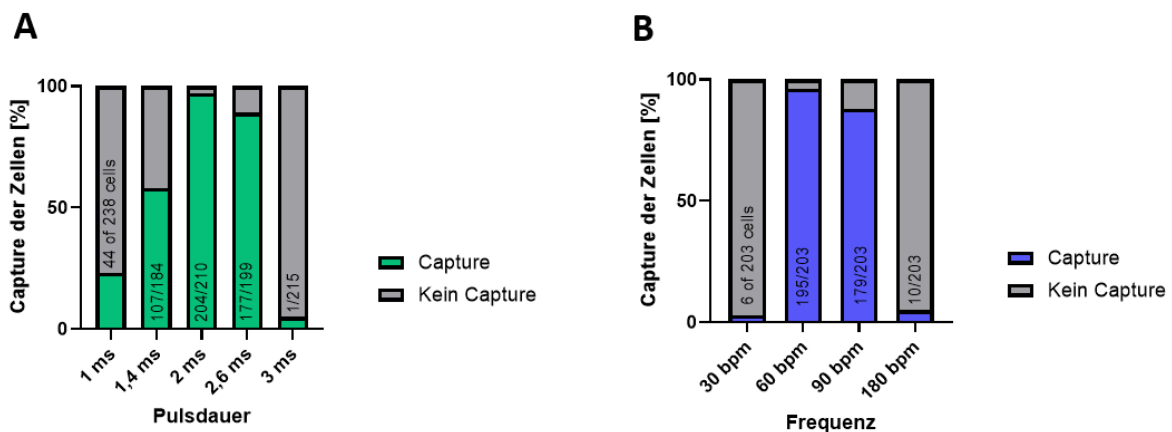


Abbildung 13: Elektrische Erregbarkeit der atrialen hiPSC-KM. (A) Anteil der schlagenden atrialen hiPSC-KM bei elektrischer Stimulation mit 1, 1,4, 2, 2,6 und 3 ms Dauer der Stimulationspulse und einer Stimulationspulsamplitude von 20 V bei 60 bpm. Die Zellen wurden bis zu 7 Tage stimuliert (insgesamt gezählte Zellen: 238 bei 1 ms, 184 bei 1,4 ms, 210 bei 2 ms, 199 bei 2,6 ms, 215 bei 3 ms). (B) Anteil der schlagenden ventrikulären Zellen bei akuter Stimulation mit 30, 60, 90 und 180 bpm nach 7 Tagen Kulturstimulation bei 60 bpm (insgesamt gezählte Zellen: jeweils 203).

Sowohl bei den atrialen als auch bei den ventrikulären hiPSC-KM wurde eine Pulsdauer von 2 ms als optimale Einstellung für die Stimulation identifiziert, da bei diesem Wert der größte Anteil der Zellen im vorgegebenen Rhythmus kontrahierte und die Zellen auch bei langanhaltender Stimulation vital blieben. Hinsichtlich des möglichen Spektrums für die Stimulationsfrequenz unterschieden sich die ventrikulären und atrialen hiPSC-KM: Das Spektrum bei den ventrikulären Zellen reichte von 30 bpm bis 90bpm, wogegen die atrialen Zellen aufgrund ihrer höheren Eigenfrequenz erst ab 60 bpm den vorgegebenen Rhythmus aufgriffen.

3.1.2 Simulation kardialer Arrhythmien

Am C-Pace EM System (Ion Optix) können Stimulationsprotokolle programmiert werden, die klinische Arrhythmien abbilden. Dafür können patientenspezifische hIPSC-KM Modelle mit atrialen oder ventrikulären hIPSC-KM, genetischen Modulationen oder pharmakologischen Interventionen angewendet werden. Hinsichtlich der Fragestellung in dieser Arbeit wurde VHF an atrialen und ventrikulären Zellen simuliert. VHF zeichnet sich durch irreguläre RR-Intervalle aus, die zu arrhythmischer Erregung im Ventrikel führen. Indem wir in der Kulturstimulation eine Schlag-zu Schlag Variation von 30-40% anlegten wurde das typische klinische Bild nachgeahmt. Am Epifluoreszenzmikroskop wurden die originalen Ca^{2+} -Transienten (Abbildungen 14A und 15A) dieser VHF-Simulation mit einer Variation von 40% bei einer Frequenz von 60 bpm aufgezeichnet.

Begleitend zur arrhythmischen Erregung des Ventrikels, kann die Rhythmusstörung außerdem tachykard sein. In den Abbildungen 14B und 15B sind die Original-Transienten einer Tachykardie-Simulation mit 120 bpm und einer arrhythmisch (40% Variation)-tachykarden Stimulation, dargestellt. Die tachykarde Stimulation konnte an den iPSC-KM bis zu 10 Tage durchgeführt werden.

Für das therapeutische Vorgehen beim VHF in der Klinik ist außerdem die VHF-Last von entscheidender Bedeutung. Für diesbezügliche Untersuchungen an den hIPSC-KM können bei der Kulturstimulation verschiedene Zeitintervalle programmiert werden. Dazu kann beispielsweise jede Stunde der Stimulation in unterschiedlich lange Zeiteile an rhythmischen und arrhythmischen Stimulationsphasen aufgeteilt werden. Wir simulierten eine steigende VHF-Last, indem wir die Gruppen mit 0%, 30%, 60% und 90% Arrhythmie-Last (Abbildungen 14C-D und 15 C-D) stimulierten und auch hiervon die Transienten aufzeichneten. Die Zellen wurden dabei mit einer Frequenz von 90 bpm und während den arrhythmischen Phasen einer Variation von 40% stimuliert.

Ventrikuläre iPSC

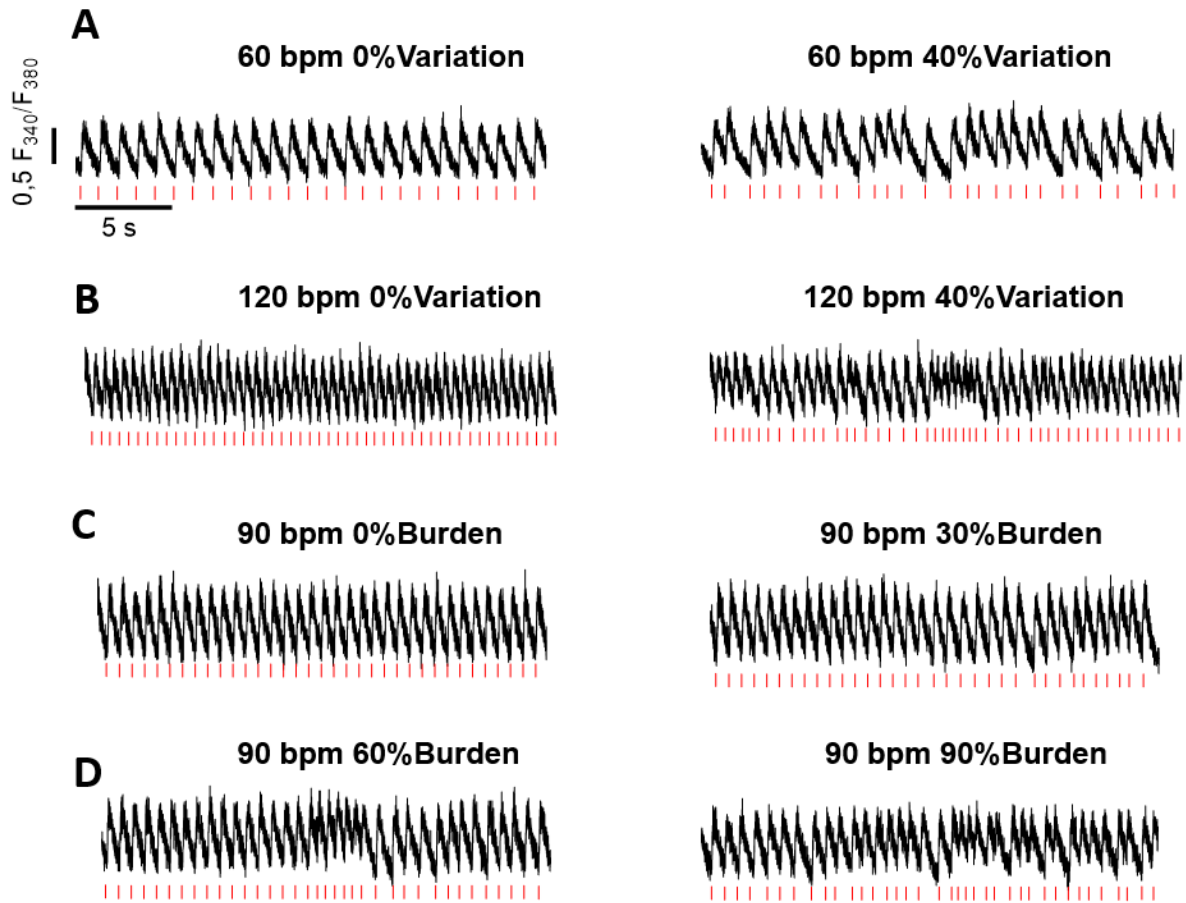


Abbildung 14: Originale Ca^{2+} -Transienten von ventrikulären hiPSC-KM während der Simulation von kardialen Arrhythmien. (A) Simulation des Sinusrhythmus (60 bpm) ohne Arrhythmien und Simulation von VHF bei 60 bpm mit einer Schlag-zu-Schlag Variation von 40%, **(B)** Tachykardie bei 120 bpm ohne Arrhythmien und Tachykardie bei 120 bpm mit Arrhythmie (40% Schlag-zu-Schlag Variation), **(C)** Simulation bei 90 bpm ohne Arrhythmie-Last (Burden) und mit 30% Burden, **(D)** Simulation von 60% Burden und 90% Burden bei 90 bpm.

Atriale iPSC

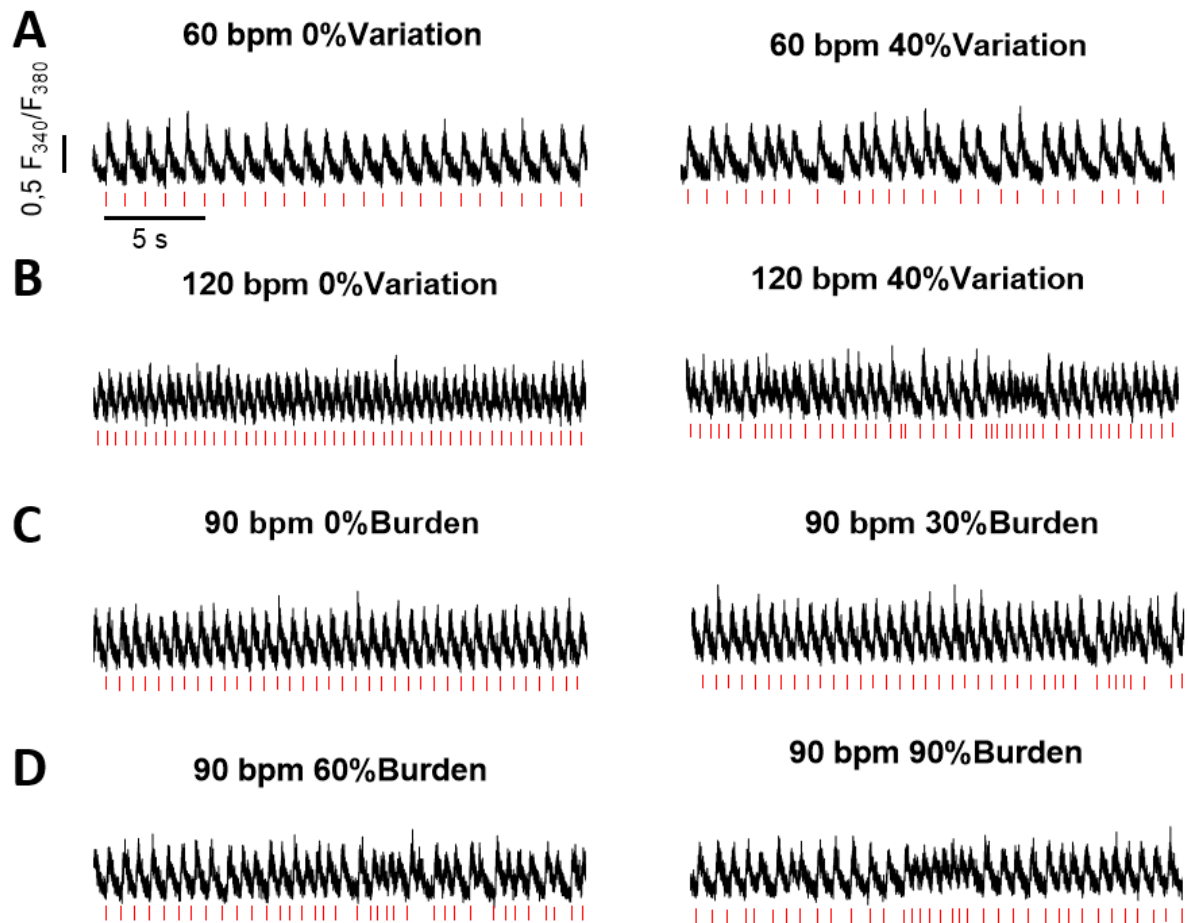


Abbildung 15: Originale Ca^{2+} -Transienten von atrialen hiPSC-KM während der Simulation von kardialen Arrhythmien. (A) Simulation des Sinusrhythmus (60 bpm) ohne Arrhythmien und Simulation von VHF bei 60 bpm mit einer Schlag-zu-Schlag Variation von 40%, (B) Tachykardie bei 120 bpm ohne Arrhythmien und Tachykardie bei 120 bpm mit Arrhythmie (40% Schlag-zu-Schlag Variation), (C) Simulation bei 90 bpm ohne Arrhythmie-Last (Burden) und mit 30% Burden, (D) Simulation von 60% Burden und 90% Burden bei 90 bpm.

Mit den angewendeten Stimulationsprotokollen war es möglich klinisch relevante kardiale Arrhythmien und deren unterschiedliche Ausprägungen an den hiPSC-KM nachzubilden.

3.2 Einfluss von Vorhofflimmern auf die Elektrophysiologie von adulten humanen ventrikulären und atrialen Kardiomyozyten

3.2.1 Reduzierte Calcium-Transientenamplitude bei ventrikulären humanen Stammzell-Kardiomyozyten nach Vorhofflimmer-Simulation

Mit dem Modell der Kulturstimulation untersuchten wir die Auswirkungen von chronischem VHF auf gesunde humane ventrikuläre hiPSC-KM. Die Zellen wurden 7 Tage lang mit der VHF-Simulation mit einer Frequenz von 60 bpm und einer Schlag-zu-Schlag Variation von 40% stimuliert. Für die Messreihe wurden insgesamt 25 Differenzierungen von 5 gesunden Spendern generiert. Die Zellen wurden jeweils in zwei Gruppen unterteilt und dabei die Arrhythmie-Gruppe mit der VHF-Simulation und die Kontrollgruppe rhythmisch mit 60 bpm (Sinusrhythmus) stimuliert. Nach 7 Tagen VHF-Simulation (Arr) (Originaltransienten Abbildung 16) zeigten die Zellen eine signifikant reduzierte Ca^{2+} -Transientenamplitude (Abbildung 17A) ($0,38 \pm 0,15$ F340/380, $n=69$ KM/6 Differenzierungen/4 Donoren) verglichen mit der Kontrolle (Ktrl) ($0,47 \pm 0,15$ F340/380, $n=71/6/4$). Das diastolische Ca^{2+} (Abbildung 17B), die Zeit bis zum Peak 80% (Abbildung 17D) und die Relaxationszeit 80% (Abbildung 17E) waren durch die VHF-Simulation nicht signifikant verändert.

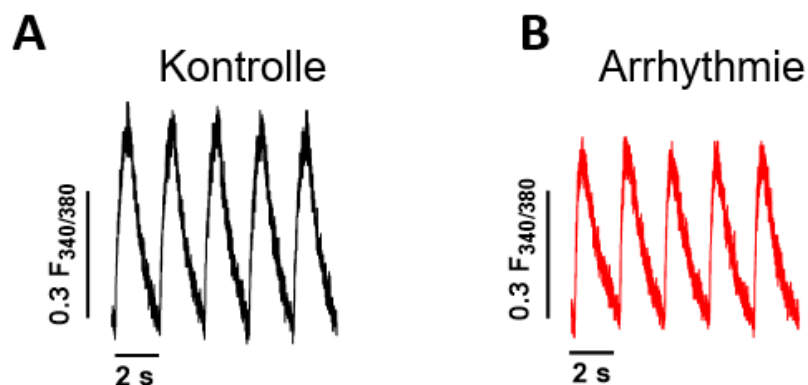


Abbildung 16: Originale Ca^{2+} -Transienten in ventrikulären hiPSC-KM nach VHF-Simulation. Ca^{2+} -Transienten am Epifluoreszenzmikroskop (Fura-2) nach chronischer Stimulation in Zellkultur, **(A)** rhythmisch stimulierte Zelle (60 bpm ohne Arrhythmie) **(B)** Arrhythmisch stimulierte Zelle (60 bpm, 40% Schlag zu Schlag Variation).

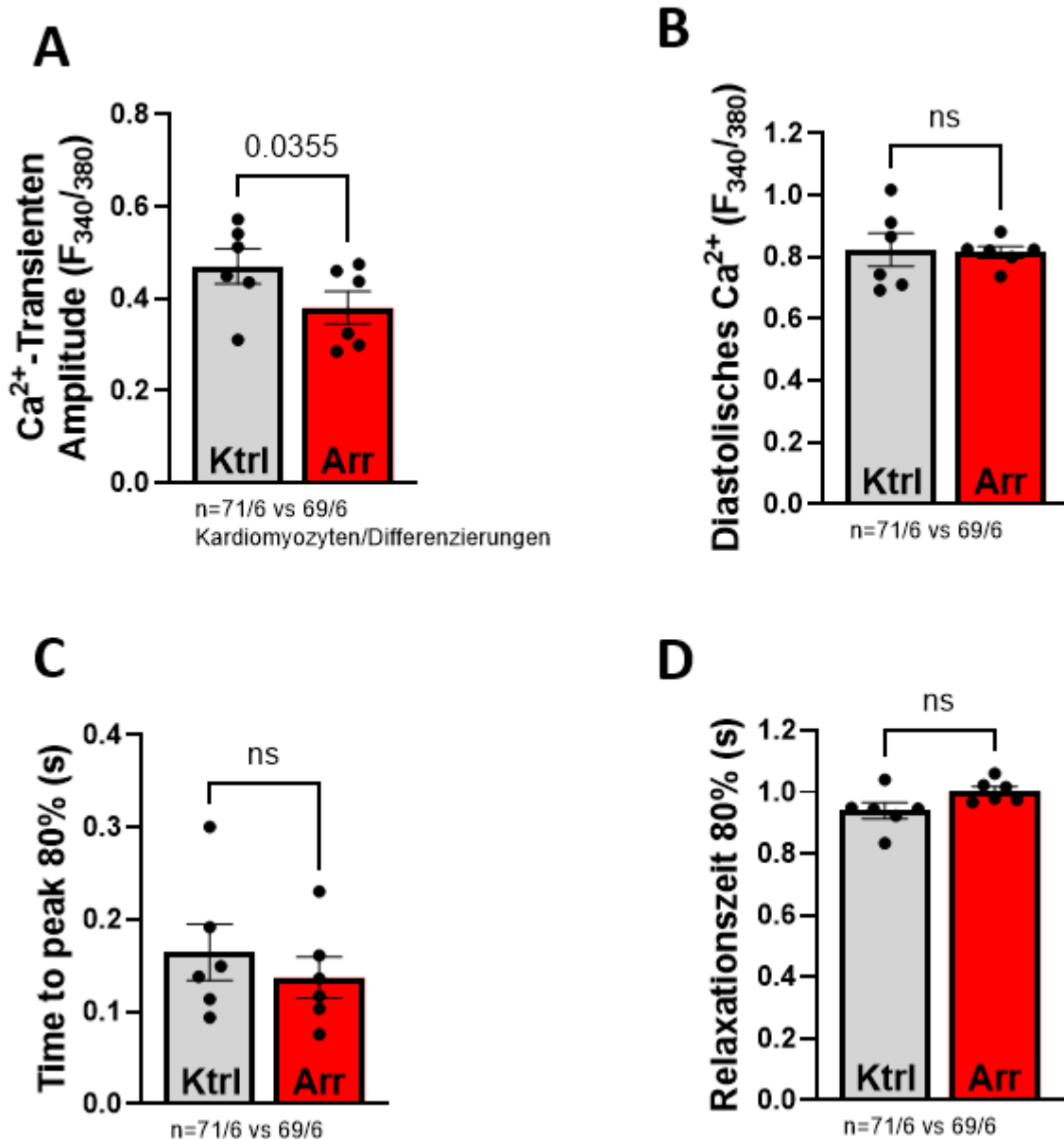


Abbildung 17: Ca²⁺-Homöostase in ventrikulären hiPSC-KM nach VHF-Simulation. Chronische Stimulation (7 Tage) der Zellen, entweder rhythmisch (Ktrl, 60 bpm) oder mit VHF-Simulation (Arr, 60 bpm, 40% Schlag zu Schlag Variation). Messung der Ca²⁺-Transienten am Epifluoreszenzmikroskop. Aufgetragen sind die Mittelwerte der **(A)** Ca²⁺-Transientenamplitude, **(B)** des diastolischen Ca²⁺, **(C)** der Time to peak und **(D)** der Relaxationszeit 80%, bei rhythmischer Stimulation (71 Kardiomyozyten/6 Differenzierungen/4 Donoren) oder Vorhofflimmer-Simulation (n=69/6/4). Die Daten werden als Scatter plot mit Mittelwerten und SEM dargestellt, jeder Datenpunkt ist als Mittelwert pro Differenzierung berechnet, p-Werte wurden mit dem Student's T-Test berechnet.

3.2.2 Reduzierte Calcium-Transientenamplitude bei atrialen humanen Stammzell-Kardiomyozyten nach Vorhofflimmer-Simulation

Zudem haben wir die VHF-Simulation an atrialen hiPSC-KM getestet. Nach sieben Tagen VHF-Simulation (60 bpm mit 40% Schlag zu Schlag Variation, Originaltransienten Abbildung 18) beobachteten wir eine reduzierte Ca^{2+} -Transientenamplitude (Abbildung 19A: Kontrolle: $0,313 \pm 0,030$ F340/380 $n=6$ Zellen vs Arrhythmie: $0,225 \pm 0,025$ $n=10$ Zellen) und verlängerte Relaxationszeit 80% (Abbildung 19B: Kontrolle: $0,641 \pm 0,022$ Arrhythmie: $0,708 \pm 0,013$). Das diastolische Ca^{2+} (Abbildung 19C) war unverändert (Kontrolle: $0,585 \pm 0,016$ Arrhythmie: $0,560 \pm 0,032$).

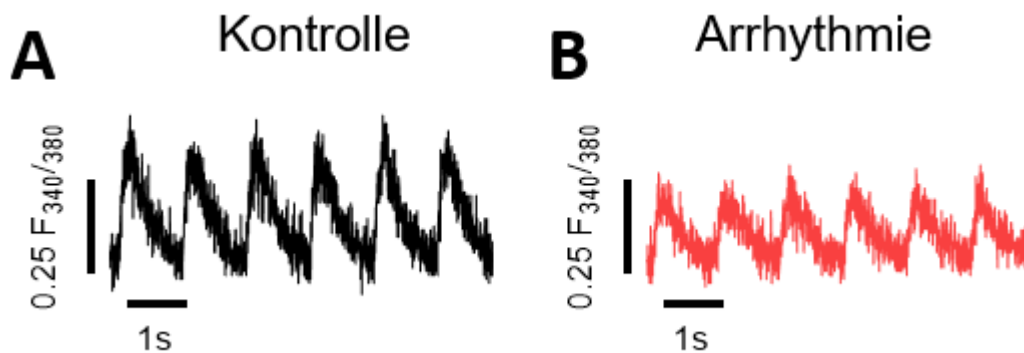


Abbildung 18: Originale Ca^{2+} -Transienten in atrialen hiPSC-KM nach VHF-Simulation. Atriale hiPSC-KM wurden 7 Tage lang chronisch entweder mit VHF-Simulation (Arrhythmische Stimulation bei 60 bpm mit einer Schlag-zu-Schlag Variation von 40%) oder rhythmisch (Kontrolle 60 bpm) stimuliert, Originale Ca^{2+} -Transienten (Epifluoreszenzmikroskopie, FURA-2) der **(A)** Kontrollgruppe und **(B)** VHF-Simulationsgruppe.

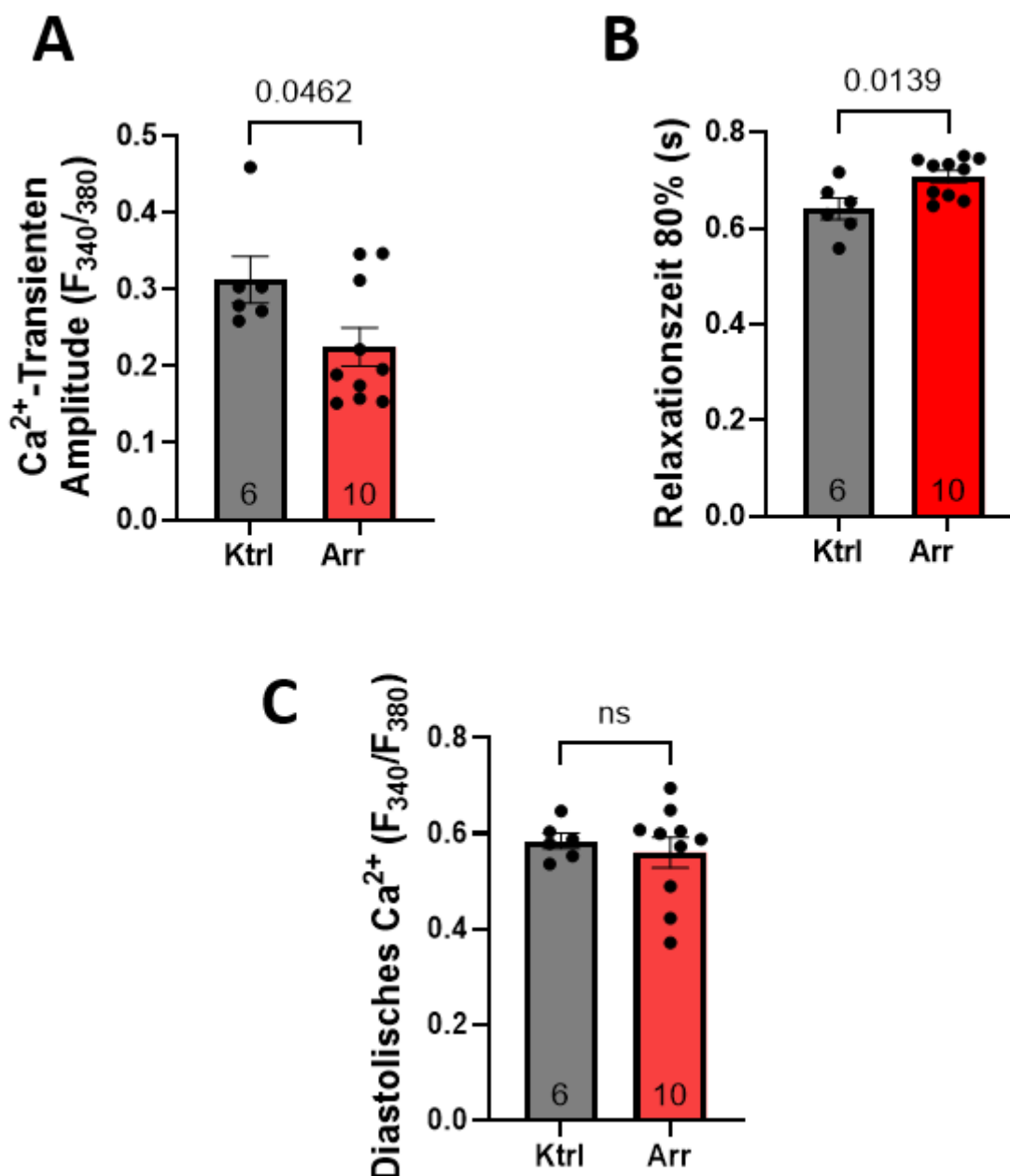


Abbildung 19: Ca²⁺-Homöostase in atrialen hiPSC-KM nach VHF-Simulation. Chronische Stimulation (7 Tage) der atrialen Zellen, entweder rhythmisch (Ktrl, 60 bpm) oder mit VHF-Simulation (Arr, 60 bpm, 40% Schlag zu Schlag Variation). Messung der Ca²⁺-Transienten am Epifluoreszenzmikroskop. Aufgetragen sind die Mittelwerte der **(A)** Ca²⁺-Transientenamplitude, **(B)** Relaxationszeit 80% und **(C)** des diastolischen Ca²⁺ von atrialen hiPSC-KM (Arr, n=10 Kardiomyozyten, Ktrl, n=6). P-Werte wurden mit dem Student t-test berechnet.

3.2.3 Reduzierte Beladung des sarkoplasmatischen Retikulums bei ventrikulären humanen Stammzell-Kardiomyozyten nach Vorhofflimmer-Simulation

Mittels Coffein Applikation untersuchten wir die Ca²⁺-Beladung des Sarkoplasmatischen Retikulums an den ventrikulären hiPSC-KM (Originaltransienten Abbildung 20). Nach der VHF-Simulation war die Beladung des SR (Abbildung 21A)

signifikant reduziert ($0,73 \pm 0,15$ $F_{340/380}$, $n=13/6/4$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($1,06 \pm 0,20$ $F_{340/380}$, $n=12/6/4$). Die Aktivität der SERCA2a (Abbildung 21B, $K_{sys-Kcaff}$) war in der VHF-Simulationsgruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe.

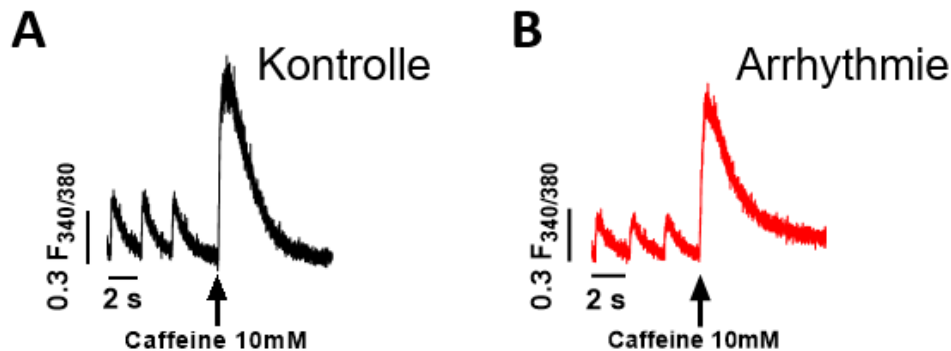


Abbildung 20: Originale Coffein-induzierte Ca^{2+} -Transienten in ventrikulären hiPSC-KM nach VHF-Simulation. Coffein-induzierte Ca^{2+} -Transienten (10 mmol/L Caffein, Epifluoreszenzmikroskop Fura-2) von chronisch stimulierten hiPSC-KM, (A) rhythmisch stimulierte Zelle (60 bpm ohne Arrhythmie) (B) Arrhythmisch stimulierte Zelle (60 bpm, 40% Schlag zu Schlag Variation).

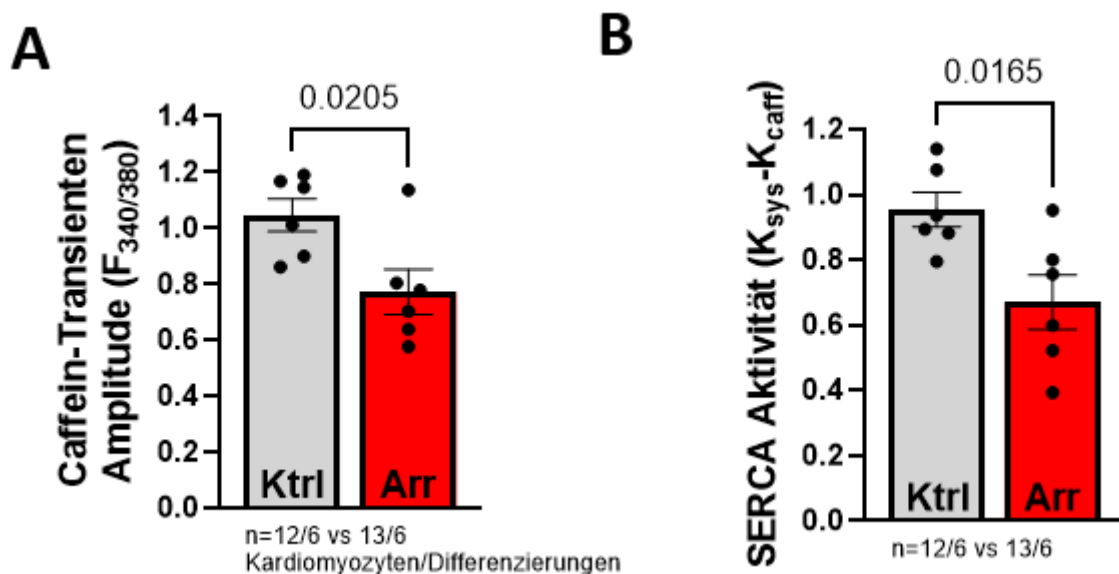


Abbildung 21: Ca^{2+} -Beladung des SR und SERCA Aktivität in ventrikulären hiPSC-KM nach VHF-Simulation. Chronische Stimulation (7 Tage) der Zellen, entweder rhythmisch (Ktrl, 60 bpm) oder mit VHF-Simulation (Arr, 60 bpm, 40% Schlag zu Schlag Variation, Messung der Coffein-Transienten am Epifluoreszenzmikroskop (Fura-2), Mittelwerte der (A) Coffein-Transientenamplitude (Indikator für die Ca^{2+} -Beladung des SR), (B) der SERCA Aktivität ($K_{sys-Kcaff}$) bei rhythmischer Stimulation (13 Kardiomyozyten/6 Differenzierungen/4 Donoren) oder VHF-Simulation ($n=12/6/4$), Daten werden als Scatter plot mit Mittelwerten und SEM dargestellt, jeder Datenpunkt ist als Mittelwert pro Differenzierung berechnet, p-Werte wurden mit dem Student's T-Test berechnet.

Diese Experimente zeigen, dass die VHF-Simulation an den ventrikulären hiPSC-KM zu einer reduzierten Ca^{2+} -Beladung des SR führte und diese Reduktion auf eine verminderte Aktivität der SERCA zurückzuführen ist.

3.2.4 Vorhofflimmer-(Simulation) erhöht späten Natriumstrom und verlängert ventrikuläres Aktionspotential in humanen Stammzell-Kardiomyozyten

Nach den Beobachtungen zur reduzierten Ca^{2+} -Transientenamplitude und Ca^{2+} -Beladung des SR sollte das elektrophysiologische Remodeling an humanen ventrikulären KM durch VHF aufgeklärt werden. Da der späte Na^+ -Strom Einfluss auf die Aktivität des NCX und damit auch auf die zelluläre Ca^{2+} -Konzentration hat [119] sollte mit der Patch Clamp Methode im Voltage Clamp Modus der späte Na^+ -Strom nach VHF-Simulation gemessen werden. Nach 24 Stunden VHF-Simulation war der späte Na^+ -Strom (Originalströme Abbildung 22) nicht signifikant verändert, wohingegen er nach 7 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht war (Abbildung 23: Arr $-192,5 \pm 61,1 \text{ A} \cdot \text{ms}/\text{F}$, $n=19/6/2$, Ktrl $-127,9 \pm 34,1 \text{ A} \cdot \text{ms}/\text{F}$, $n=21/6/2$). Da eine erhöhte intrazelluläre Na^+ -Konzentration auch eine Verlängerung des Aktionspotentials zur Folge haben kann [113], sollten zudem im Current Clamp Modus die Aktionspotentiale der hiPSC-KM nach VHF-Simulation gemessen werden. Die Aktionspotentialdauer (APD80) (Originalpotentiale Abbildung 24) war bei den VHF-Zellen erhöht ($531,2 \pm 42,6 \text{ ms}$ $n=15/4/4$) im Vergleich zu den Kontroll-Zellen ($415,8 \pm 27,1 \text{ ms}$ $n=16/4/4$) (Abbildung 25A). Das Ruhemembranpotential (RMP) und die Amplitude (APA) (Abbildung 25B-C) waren nicht signifikant verändert. Der erhöhte späte Na^+ -Strom nach VHF-Simulation könnte eine Erklärung für die verlängerte APD darstellen und deutet auf ein elektrisches Remodeling hin.

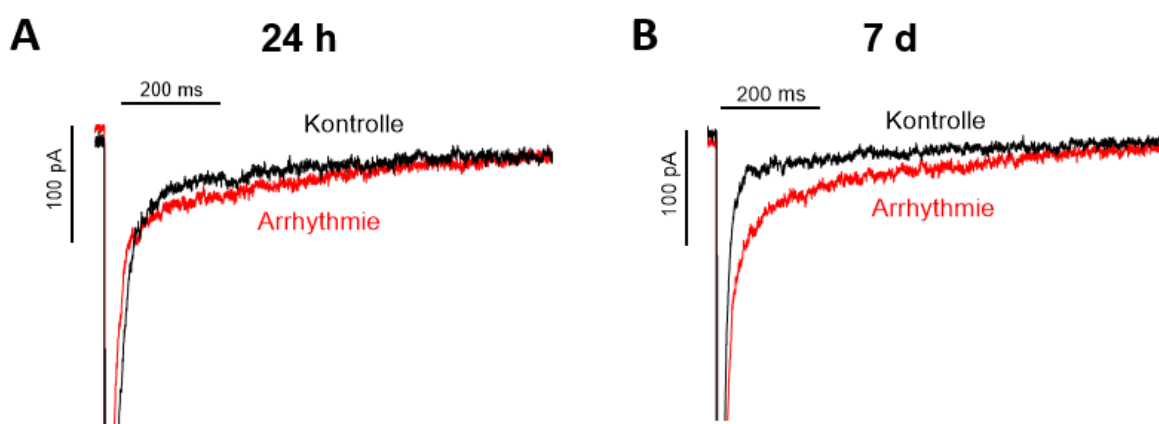


Abbildung 22: Originalabbildungen des späten Na^+ -Stroms in ventrikulären hiPSC-KM nach VHF-Simulation. Messungen des späten Na^+ -Stroms im „whole cell voltage clamp“ Modus an ventrikulären hiPSC-KM nach VHF-Simulation (Arr) und Kontrollgruppe (Ktrl), Stimulation für **(A)** 24 Stunden und **(B)** 7 Tage.

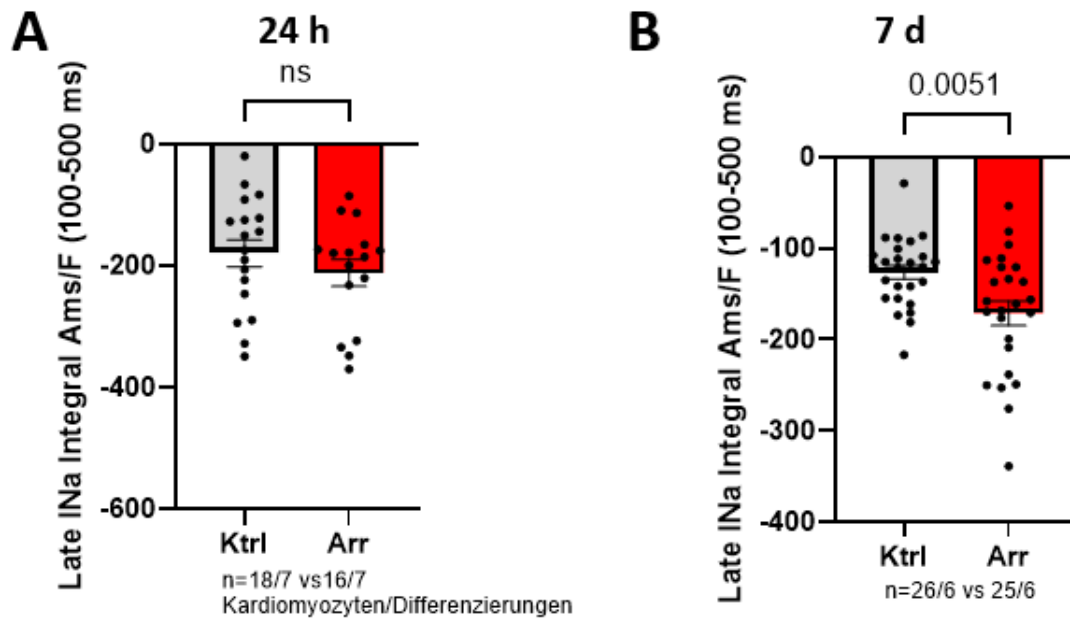


Abbildung 23: Später Na^+ -Strom in ventrikulären hiPSC-KM nach VHF-Simulation. Mittelwerte des späten Na^+ -Stroms (Integral 100-500 ms) an ventrikulären hiPSC-KM nach **(A)** 24h VHF-Simulation (Arr) und **(B)** 7 Tagen VHF-Simulation (Arr, 60 bpm 40% Schlag-zu-Schlag Variation) verglichen mit der Kontrollgruppe (Ktrl, 60 bpm), Daten werden als Scatter plot dargestellt, jeder Datenpunkt entspricht einer Zelle, P Werte wurden mit dem Student T-Test berechnet.

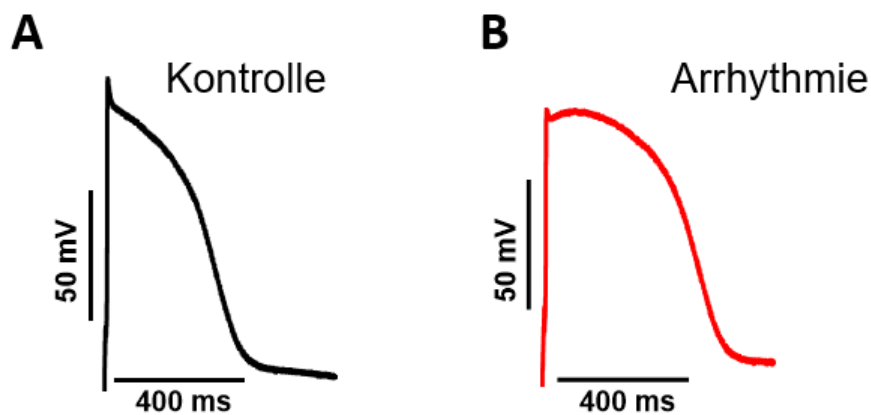


Abbildung 24: Originale Aktionspotential-Messungen in ventrikulären hiPSC-KM nach VHF-Simulation. Aktionspotential-Messungen im „whole cell current clamp“ Modus von ventrikulären hiPSC-KM nach **(B)** VHF-Simulation (Arrhythmie) und **(A)** Kontrollgruppe (Ktrl).

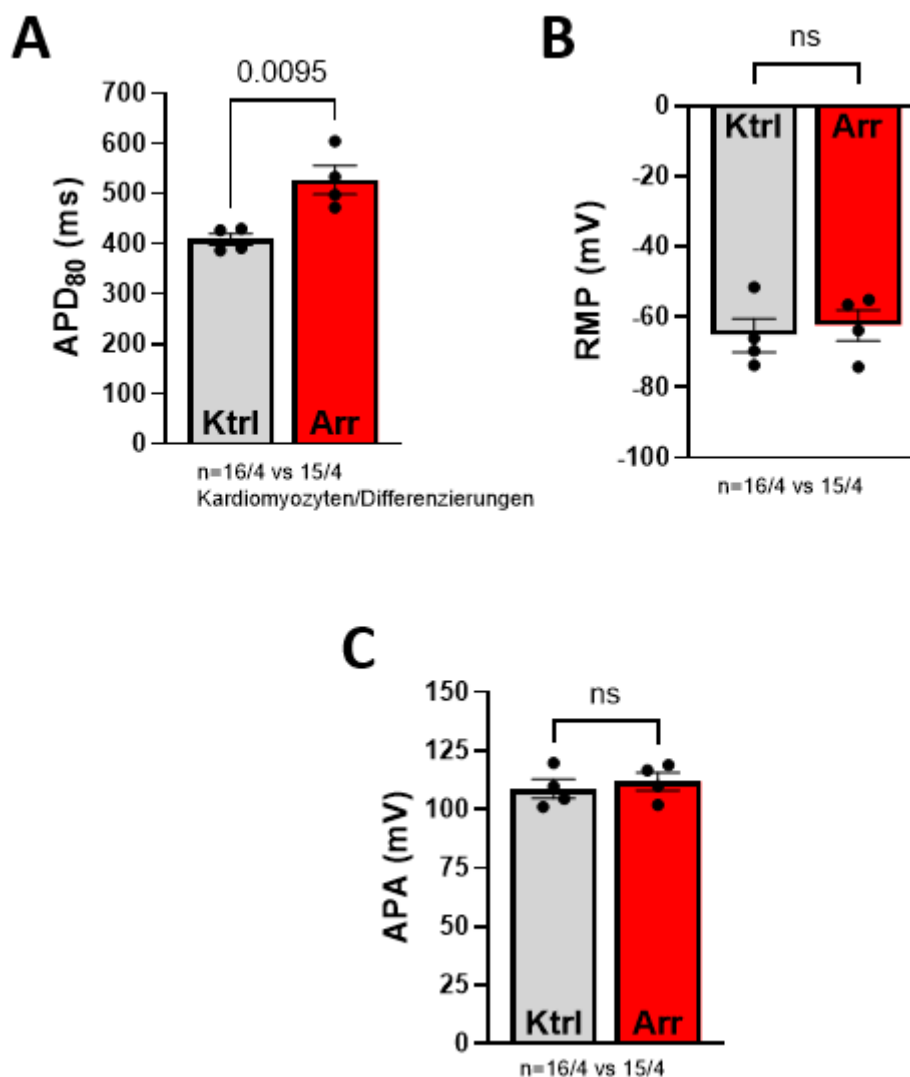


Abbildung 25: Aktionspotential-Parameter in ventrikulären hiPSC-KM nach VHF-Simulation. Mittelwerte der **(A)** Aktionspotential-Dauer (APD₈₀), des **(B)** Ruhemembranpotentials (RMP) und der **(C)** Aktionspotentialamplitude nach chronischer VHF-Simulation (Arr, 60 bpm 40% Schlag-zu Schlag Variation) (7d) verglichen mit der Kontrollgruppe (Ktrl, 60 bpm), Daten werden als Scatter plot mit Mittelwerten und SEM dargestellt, jeder Datenpunkt ist als Mittelwert pro Differenzierung berechnet, p-Werte wurden mit dem Student's T-Test berechnet.

3.2.5 Vorhofflimmern verlängert das ventrikuläre Aktionspotential im humanen Myokard

Nach der Arrhythmie-Simulation an Stammzellen wurden im nächsten Schritt an humanem Nativgewebe die elektrophysiologischen Hintergründe von VHF untersucht. Dazu erhielten wir aus Aortenklappen-Ersatz-OPs von Patienten mit Aortenklappenstenose, die von VHF mit erhaltener linksventrikulärer Pumpfunktion betroffen waren (n=10) und von Patienten, die keine Rhythmusstörung hatten (n=12) Gewebeproben. In Tabelle 7 sind die Charakteristika der Patienten aufgeführt. Mit einem Anteil von 45% männlichen Patienten, war der Anteil der männlichen Patienten in der Gruppe der Patienten mit SR signifikant niedriger als in der Gruppe der Patienten

mit VHF. Die Patienten mit VHF erhielten aufgrund der Erkrankung vermehrt medikamentöse Therapie (Beta-Blocker, Aldosteron-Antagonisten, Diuretika, Digitalis, Antiarrhythmika und Statine). Hervorzuheben ist jedoch, dass die linksventrikuläre Funktion (Ejektionsfraktion), Komorbiditäten wie Diabetes und Erkrankungen der Koronararterien, sowie das linksventrikuläre Remodeling (LVEDD) nicht signifikant verändert waren.

Patienten mit Aortenstenose Charakteristik	Sinus Rhythmus (n=12 Patienten)	Vorhofflimmern (n=10 Patienten)	P-Wert
Männliches Geschlecht (%)	45	66	0,003 _F
Alter (Mean±SD, Jahre)	67,7±5,5	72,7±8,6	0,138 _T
Weißer Herkunft (%)	100,0	100,0	0,999 _F
Herzschlag Rate (Mean±SD, bpm)	75,4±13,7	73,9±18,8	0,442 _{MW}
Diabetes (%)	36	23	0,062 _F
Erkrankung der Koronararterien (%)	46	45	0,999 _F
Ejektionsfraktion (Mean±SD,%)	57,9±2,8	55,9±4,9	0,353 _{MW}
IVS (Mean±SD, mm)	14,0±2,7	13,8±0,8	0,722 _{MW}
AVA (Mean±SD, cm ²)	0,72±0,2	0,73±0,2	0,985 _{MW}
AV mean gradient (Mean±SD, mmHg)	46,8±18,1	36,4±8,5	0,186 _T
LVEDD (Mean±SD, mm)	48,8±8	53,4±6,8	0,339 _T
ACE inhibitor oder ARB (%)	55	56	0,999 _F
B-Blocker (%)	27	77	<0,001 _F
Aldosteron-Antagonist (%)	0	13	<0,001 _F
Diuretikum (%)	33	88	<0,001 _F
Digitalis (%)	0	38	<0,001 _F
Antiarrhythmikum (%)	0	11	0,001 _F
Statine (%)	64	78	0,042 _F

Tabelle 7: Charakterisierung der Aortenklappenstenose-Patienten. Die Gewebeprobe dieser Patienten wurden für die Aktionspotentialmessungen verwendet. Für statistische Berechnungen wurden verwendet: Student t Test für parametrische Daten (_T), Mann-Whitney Test U für nicht-parametrische Daten (_{MW}), Fisher exact Test für kategoriale Daten (_F), Abkürzungen: IVS interventrikuläres Septum, AVA *aortic valve area*, AV *aortic valve*, LVEDD Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter, ACE *angiotensin-converting enzyme*, ARB Angiotensin II Rezeptorblocker.

Aus den erhaltenen Proben des humanen nativen Myokards aus den Aortenklappen-Ersatz-OPs wurden mittels enzymatischer Isolation einzelne Zellen isoliert und auf den Messkammern ausplattiert. Mit der Patch Clamp Methode wurden nur wenige Stunden nach der Proben-Entnahme im Current Clamp Modus die Aktionspotentiale der Zellen gemessen (Originalpotentiale Abbildung 26). Die Aktionspotentialdauer (APD90) von Patienten mit VHF war signifikant erhöht ($376,8 \pm 166,1$ ms $n=30$ Zellen) im Vergleich zur APD von Patienten im Sinus Rhythmus ($257,0 \pm 112,7$ ms $n=39$ Zellen) (Abbildung 27A). Das Ruhemembranpotential und die Aktionspotentialamplitude waren nicht signifikant verändert (Abbildung 27B-C).

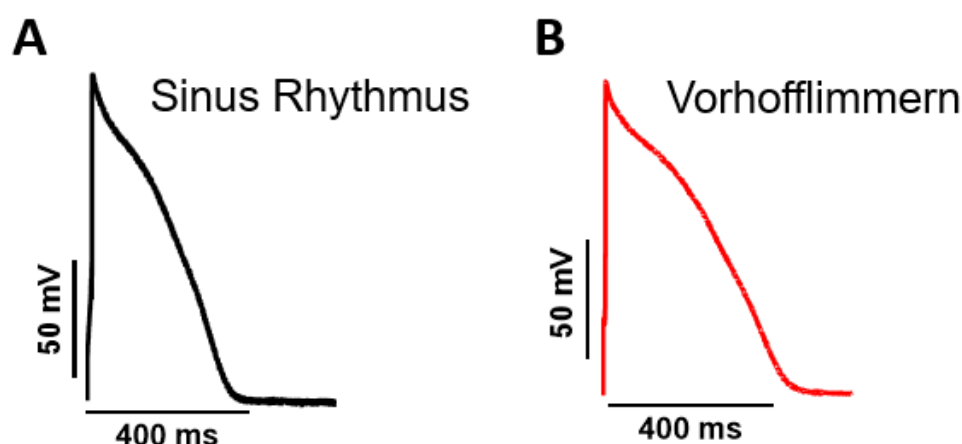


Abbildung 26: Originale Aktionspotential-Messungen in ventrikulären KM von Patienten mit VHF oder Sinus Rhythmus. Aktionspotential-Messungen im „whole cell current clamp“ Modus von humanen linksventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit Aortenstenose mit erhaltener LV-Funktion mit entweder **(A)** Sinus Rhythmus oder **(B)** VHF.

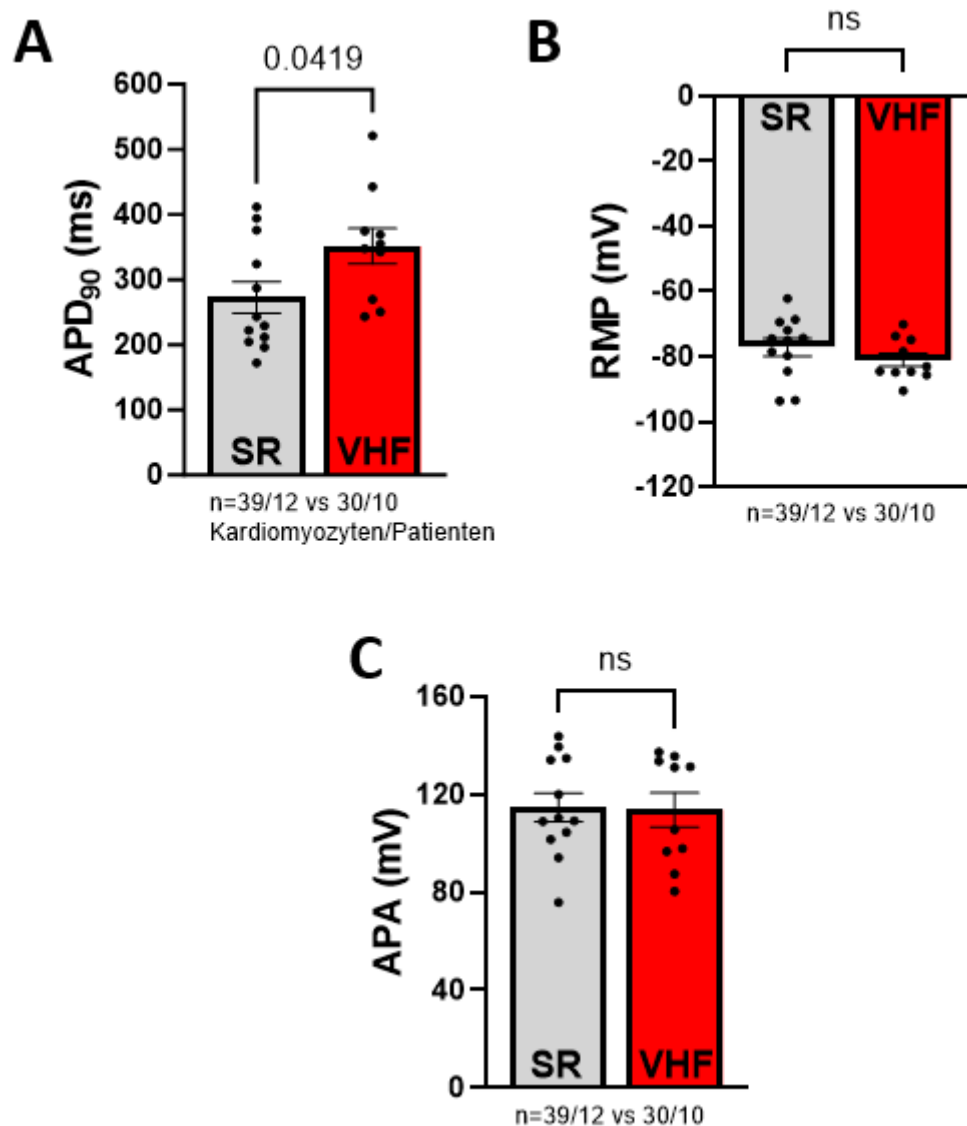


Abbildung 27: Einfluss von VHF auf die Aktionspotential-Parameter in humanen ventrikulären Kardiomyozyten. Effekte von VHF verglichen mit Sinus-Rhythmus (SR) auf die (A) Aktionspotentialdauer (APD₉₀), das (B) Ruhemembranpotential (RMP) und die (C) Aktionspotentialamplitude (APA) in isolierten humanen linksventrikulären Kardiomyozyten, Daten werden als Scatter plot mit Mittelwerten und SEM dargestellt, jeder Datenpunkt ist als Mittelwert pro Differenzierung berechnet, p-Werte wurden mit dem Student's T-Test berechnet.

3.3 Einfluss unterschiedlicher Vorhofflimmer-Arrhythmie-Lasten auf die zelluläre Funktion im Ventrikel

VHF kann entweder die Folge oder der zugrunde liegende Mechanismus für eine linksventrikuläre Dysfunktion sein. In der CASTLE-AF Studie wurde bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion und VHF der therapeutische Erfolg einer Katheterablation zur Rhythmuskontrolle und einer konventionellen medikamentösen Therapie zur Frequenzkontrolle verglichen. [147]. Patienten, die mittels Katheterablation therapiert wurden, hatten im 6 Monate langen Follow Up eine

wesentlich niedrigere VHF-Last als Patienten, die medikamentös behandelt wurden. Die VHF-Last 6 Monate nach der Katheterablation wurde als guter prognostischer Prädiktor identifiziert. Patienten, bei denen die VHF-Last 6 Monate nach der Ablation <50% war, wiesen ein verbessertes klinisches *Outcome* auf im Vergleich zu Patienten, die zu diesem Zeitpunkt eine VHF-Last >50% hatten.

Diese klinische Beobachtung der CASTLE-AF Studie übertrugen wir in einen „back-to-bench“ Ansatz, um die zugrundeliegenden Mechanismen aufzudecken. Dafür stimulierten wir 8 Differenzierungen von hIPSC-KM von gesunden Donoren mit dem beschriebenen Kulturstimulationsmodell und teilten die Zellen in vier Gruppen. Gruppe eins wurde regelmäßig, ohne Arrhythmie-Last stimuliert, Gruppe zwei wurde mit einer Arrhythmie-Last von 30% (B30), Gruppe drei mit einer Arrhythmie-Last von 60% (B60) und Gruppe vier mit einer Arrhythmie-Last von 90% (B90) stimuliert. Gruppe eins wurde dementsprechend 60 Minuten rhythmisch stimuliert, Gruppe zwei 42 Minuten rhythmisch und 18 Minuten arrhythmisch (Schlag zu Schlag Varianz 40%), Gruppe drei 24 Minuten rhythmisch und 36 Minuten arrhythmisch und Gruppe vier 6 Minuten rhythmisch und 54 Minuten arrhythmisch. Nach der Stunde wurde das Stimulationsprotokoll neu gestartet. Die Frequenz betrug in allen Gruppen 90 bpm. Insgesamt wurden die Zellen 48 Stunden bzw. 7 Tage lang mit diesem Protokoll stimuliert.

Eine verlängerte Aktionspotentialdauer ist ein bekanntes Merkmal der Herzinsuffizienz und von pathologischem Remodeling. Daher haben wir bei den Zellen nach der Simulation verschiedener VHF-Lasten mittels Patch Clamp Messungen die Aktionspotentiale bei einer akuten Stimulation mit 30 bpm und 60 bpm analysiert (Originalpotentiale Abbildung 28). Bei 30 bpm akuter Stimulation wiesen die Zellen nach 48 Stunden VHF-Simulation mit B60 ($679,8 \pm 39,7$ ms $n=26$) und B90 ($738,6 \pm 55,9$ ms $n=15$) verlängerte Aktionspotentialdauern im Vergleich zu den rhythmisch stimulierten Zellen ($490,6 \pm 34,4$ ms $n=30$) auf (Abbildung 29A). Eine Arrhythmie-Last von 30% ($562,6 \pm 38,4$ ms $n=25$) führte nicht zur signifikanten Verlängerung der Aktionspotentialdauer. Nach 7 Tagen VHF-Simulation zeichnete sich eine markante Stufe beim Anstieg der Aktionspotentialdauer ab Arrhythmie-Lasten >50% ab (Abbildung 29B). Erneut zeigte sich eine signifikante Verlängerung der APD bei B60 ($638,7 \pm 27,5$ ms $n=25$) und B90 ($646,5 \pm 35,5$ ms $n=31$) verglichen mit den rhythmisch stimulierten Kontroll-Zellen ($469,0 \pm 41,6$ ms $n=21$). Zusätzlich waren nun auch die Aktionspotentiale der Gruppen B60 und B90 im Vergleich zu der Gruppe B30

($466,9 \pm 39,0$ $n=21$) signifikant verlängert. Im Bereich des klinisch beobachteten Schwellenwertes von 50% kam es also zur signifikanten Verlängerung der APD.

Die beschriebenen Messungen wurden außerdem bei einer akuten Stimulation mit 60 bpm durchgeführt. Bei 60 bpm akuter Stimulation nach der Kultursimulation trat hinsichtlich der APD ein Unterschied im Vergleich zur akuten Stimulation mit 30 bpm auf: Nach 48 h war die Verlängerung der APD bei B90 verglichen zu B 30% nicht signifikant (Abbildung 33A). Abgesehen davon wurden die Aktionspotentiale auch bei 60 bpm akuter Stimulation durch Kulturstimulation mit B60 ($545,1 \pm 29,6$ $n=26$) und B90 ($598,4 \pm 47,1$ $n=15$) signifikant verlängert im Vergleich zur Kontrollgruppe ($417,6 \pm 26,4$ $n=30$). Vergleichbar mit den Messungen bei 30 bpm wurden diese Effekte auch bei 60 bpm nach 7 Tagen Kulturstimulation verstärkt beobachtet (Abbildung 33B). Erneut waren die APDs der Gruppen B60 ($539,3 \pm 24,9$ $n=25$) und B90 ($518,5 \pm 23,8$ $n=31$) verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant verlängert ($405,1 \pm 33,0$ $n=21$). Zudem waren die APDs dieser zwei Gruppen auch im Vergleich zur Gruppe B30 ($397,6 \pm 31,5$ $n=21$) (überschreiten des Schwellenwertes von 50%) signifikant verlängert.

Bei dem „back-to-bench“ Ansatz zeigte sich insgesamt bei VHF-Lasten über 50% eine signifikante Verlängerung der APD. Das Ruhemembranpotential (RMP), die Aktionspotential-Amplitude (APA) und die Aufstrichgeschwindigkeit (Max dV/dt) waren in keiner der Gruppen signifikant verändert (Abbildungen 30-32 und 34-36).

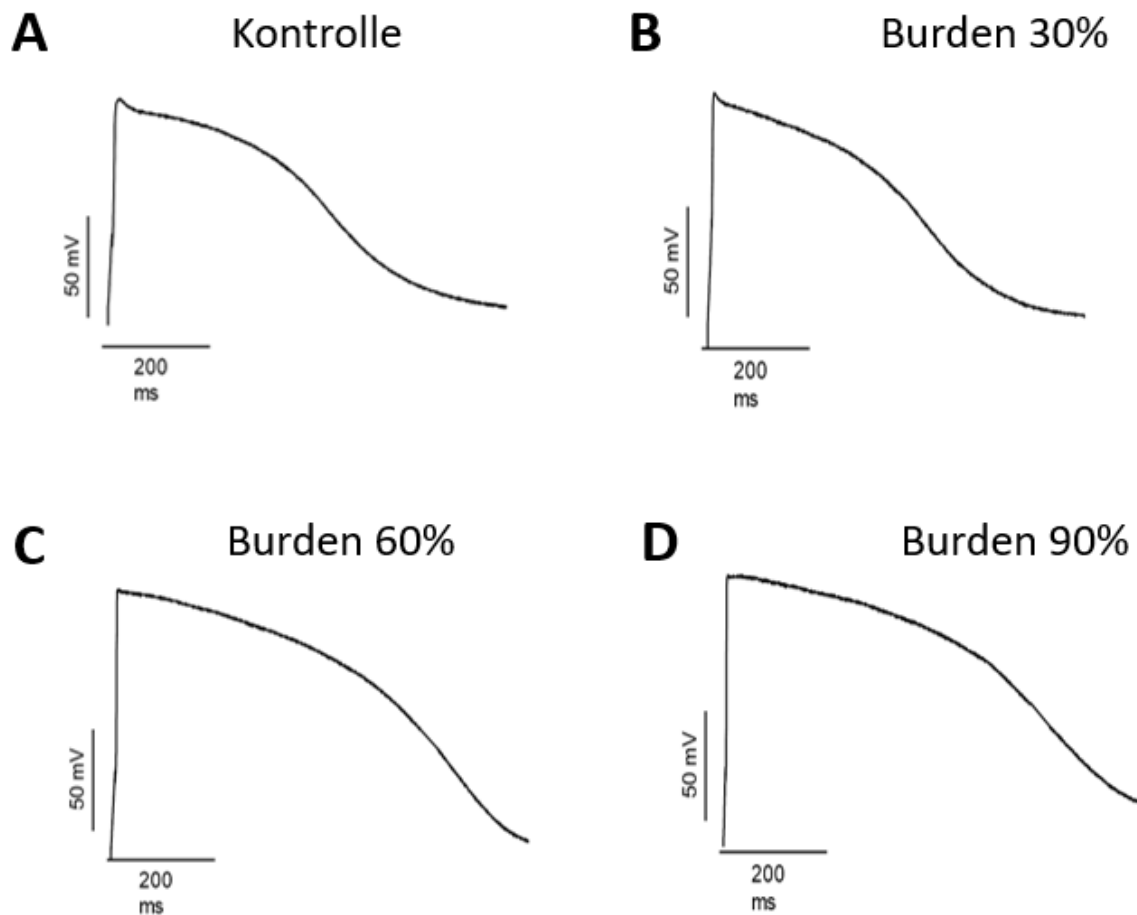


Abbildung 28: Originale Aktionspotential-Messungen in hPSC-KM nach Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten. Aktionspotential-Messungen im „whole cell current clamp“ Modus von hPSC-KM nach 7 Tagen Kulturstimulation mit verschiedenen Arrhythmie-Lasten, **(A)** Kontrolle mit 0% Burden, **(B)** Burden 30%= B30%, **(C)** B60% und **(D)** B90%, Kulturstimulation jeweils mit 90 bpm, Messung der Aktionspotentiale bei 30 bpm.

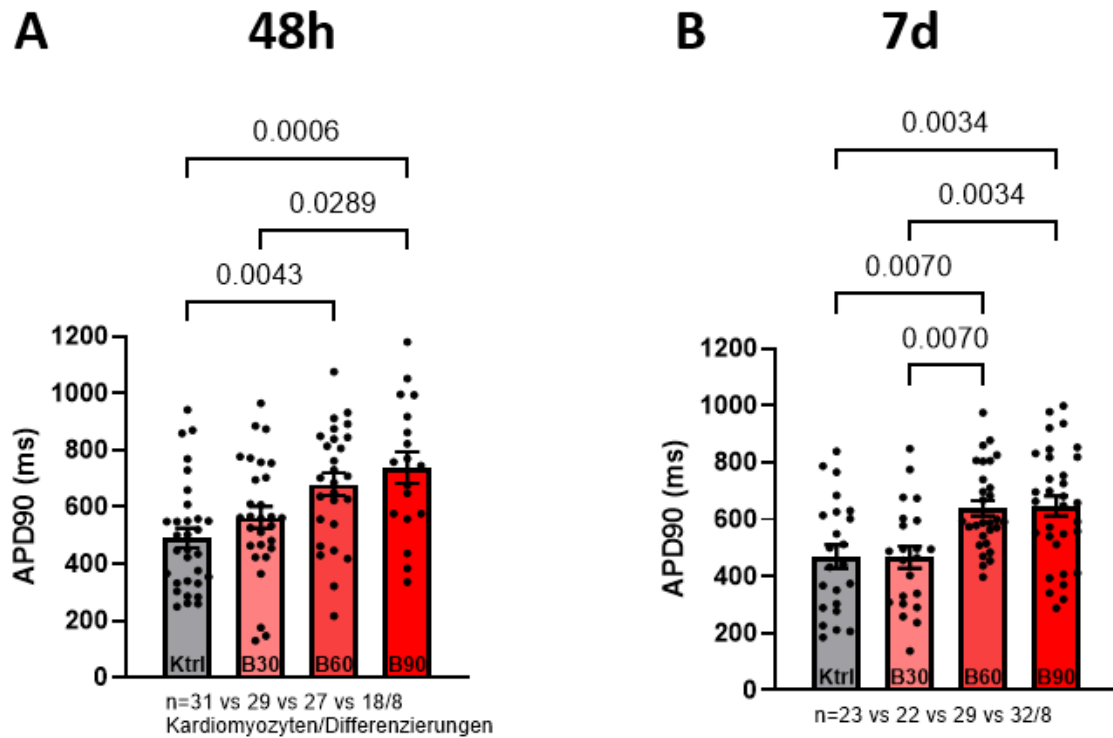


Abbildung 29: Aktionspotentialdauer (bei akuter Stimulation mit 30bpm) in ventrikulären hiPSC-KM nach Kultur-Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten. Messung der Aktionspotentialdauer (APD90) bei 30 bpm nach **(A)** 48 Stunden (n=31 vs. 29 vs. 27 vs. 18 Zellen aus 8 Differenzierungen) und **(B)** 7 Tagen (n=23 vs. 22 vs. 29 vs. 32 Zellen aus 8 Differenzierungen) Kulturstimulation mit Arrhythmie-Lasten von 0% bis 90% an ventrikulären hiPSC-KM, p-Werte wurden mit dem One-way ANOVA berechnet.

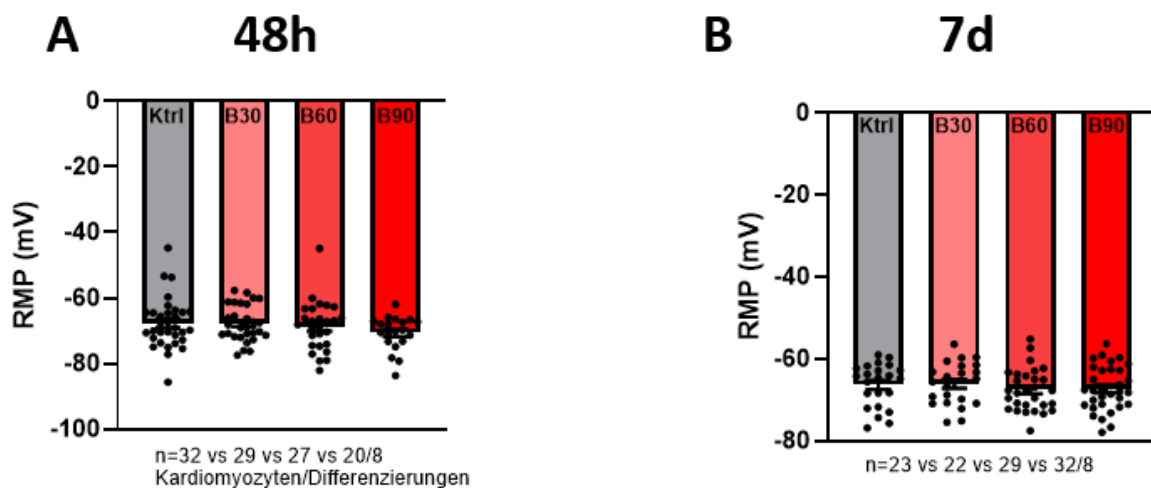


Abbildung 30: Ruhemembranpotential (bei akuter Stimulation mit 30bpm) in ventrikulären hiPSC-KM nach Kultur-Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten. Messung des Ruhemembranpotentials (RMP) bei 30 bpm nach **(A)** 48 Stunden (n=32 vs. 29 vs. 27 vs. 20 Zellen aus 8 Differenzierungen) und **(B)** 7 Tagen (n=23 vs. 22 vs. 29 vs. 32 Zellen aus 8 Differenzierungen) Kulturstimulation mit Arrhythmie-Lasten von 0% bis 90% an ventrikulären hiPSC-KM.

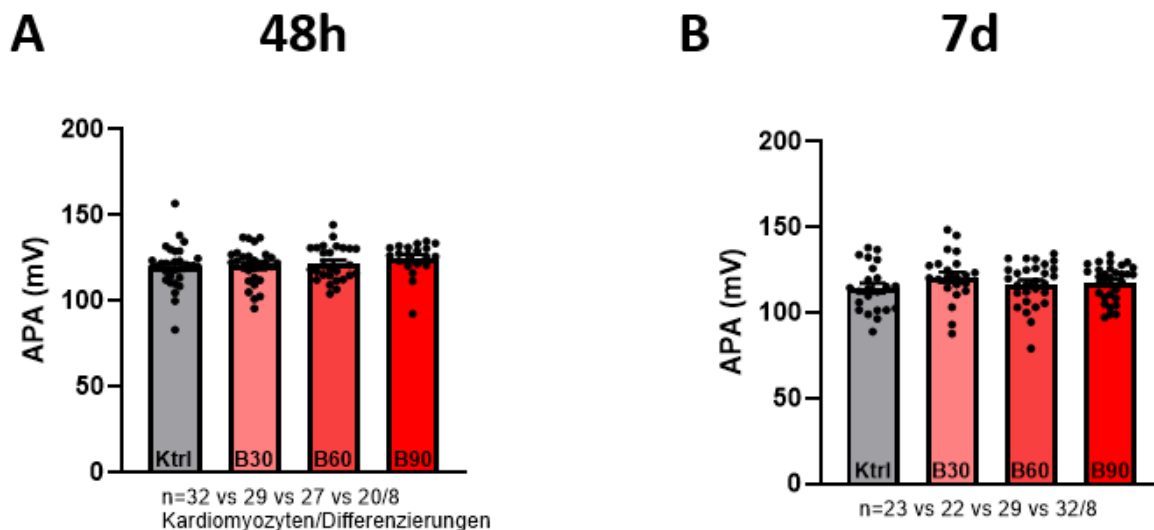


Abbildung 31: Aktionspotentialamplitude (bei akuter Stimulation mit 30bpm) in ventrikulären hiPSC-KM nach Kultur-Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten. Messung der Aktionspotentialamplitude (APA) bei 30 bpm nach **(A)** 48 Stunden (n=32 vs. 29 vs. 27 vs. 20 Zellen aus 8 Differenzierungen) und **(B)** 7 Tagen (n=23 vs. 22 vs. 29 vs. 32 Zellen aus 8 Differenzierungen) Kulturstimulation mit Arrhythmie-Lasten von 0% bis 90% an ventrikulären hiPSC-KM.

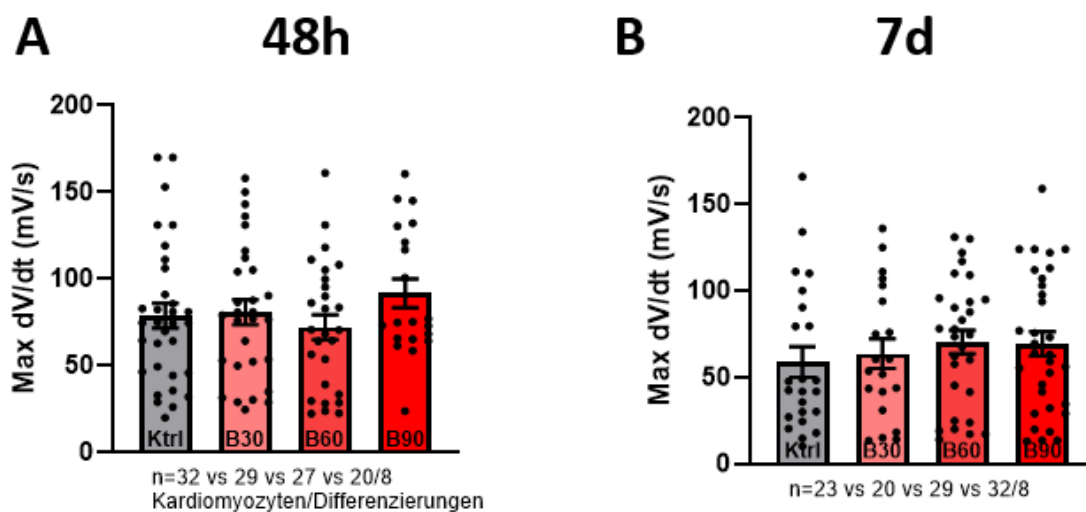


Abbildung 32: Aufstrichgeschwindigkeit (bei akuter Stimulation mit 30bpm) in ventrikulären hiPSC-KM nach Kultur-Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten. Messung der Aufstrichgeschwindigkeit (Max dV/dt) bei 30 bpm nach **(A)** 48 Stunden (n=32 vs. 29 vs. 27 vs. 20 Zellen aus 8 Differenzierungen) und **(B)** 7 Tagen (n=23 vs. 20 vs. 29 vs. 32 Zellen aus 8 Differenzierungen) Kulturstimulation mit Arrhythmie-Lasten von 0% bis 90% an ventrikulären hiPSC-KM.

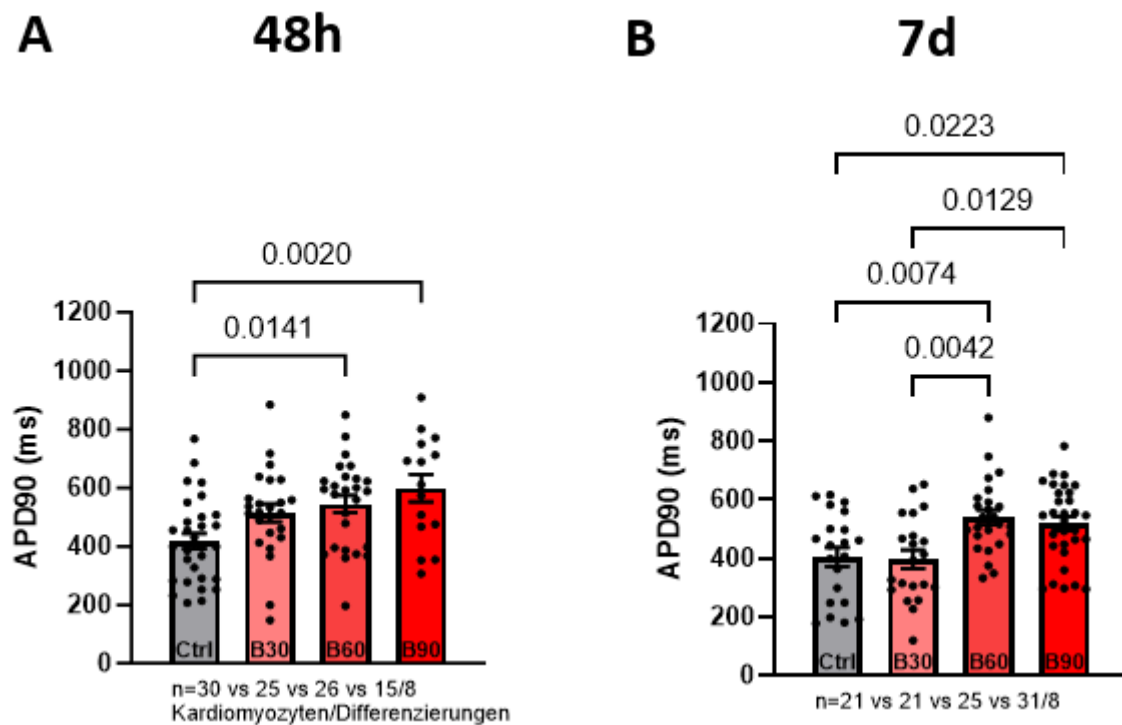


Abbildung 33: Aktionspotentialdauer (bei akuter Stimulation mit 60bpm) in ventrikulären hIPSC-KM nach Kultur-Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten. Messung der Aktionspotentialdauer (APD90) bei 60 bpm nach **(A)** 48 Stunden (n=30 vs. 25 vs. 26 vs. 15 Zellen aus 8 Differenzierungen) und **(B)** 7 Tagen (n=21 vs. 21 vs. 25 vs. 31 Zellen aus 8 Differenzierungen) Kulturstimulation mit Arrhythmie-Lasten von 0% bis 90% an ventrikulären hIPSC-KM, p-Werte wurden mit dem One-way ANOVA berechnet.

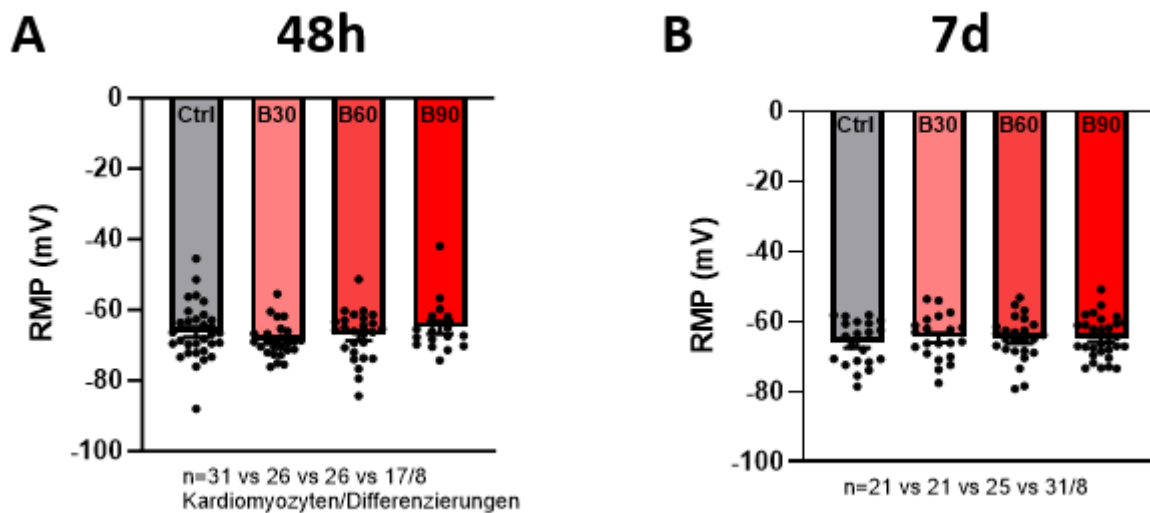


Abbildung 34: Ruhemembranpotential (bei akuter Stimulation mit 60bpm) in ventrikulären hIPSC-KM nach Kultur-Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten. Messung des Ruhemembranpotentials (RMP) bei 60 bpm nach **(A)** 48 Stunden (n=31 vs. 26 vs. 26 vs. 17 Zellen aus 8 Differenzierungen) und **(B)** 7 Tagen (n=21 vs. 21 vs. 25 vs. 31 Zellen aus 8 Differenzierungen) Kulturstimulation mit Arrhythmie-Lasten von 0% bis 90% an ventrikulären hIPSC-KM.

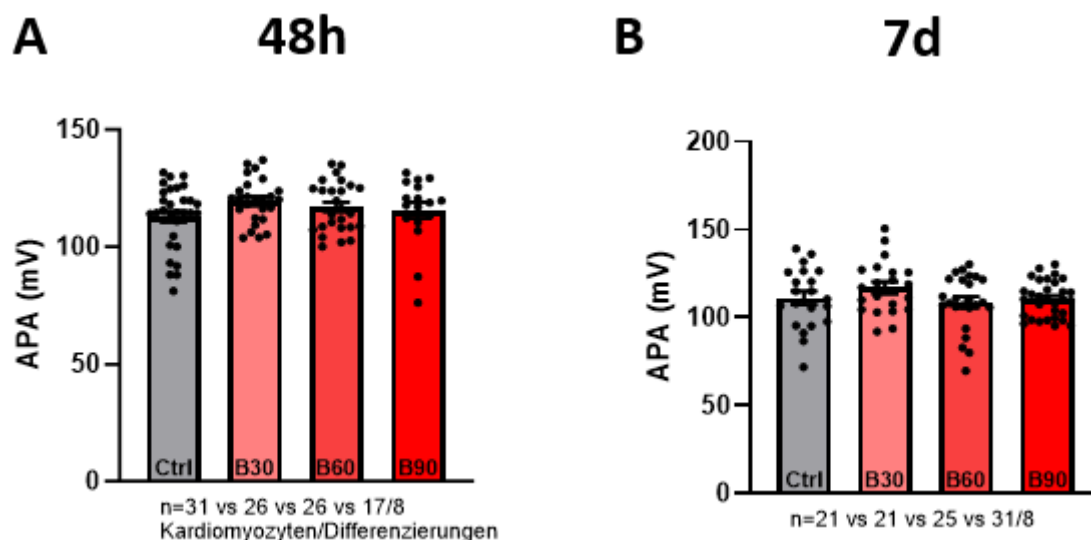


Abbildung 35: Aktionspotentialamplitude (bei akuter Stimulation mit 60bpm) in ventrikulären hiPSC-KM nach Kultur-Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten. Messung der Aktionspotentialamplitude (APA) bei 60 bpm nach **(A)** 48 Stunden (n=31 vs. 26 vs. 26 vs. 17 Zellen aus 8 Differenzierungen) und **(B)** 7 Tagen (n=21 vs. 21 vs. 25 vs. 31 Zellen aus 8 Differenzierungen) Kulturstimulation mit Arrhythmie-Lasten von 0% bis 90% an ventrikulären hiPSC-KM.

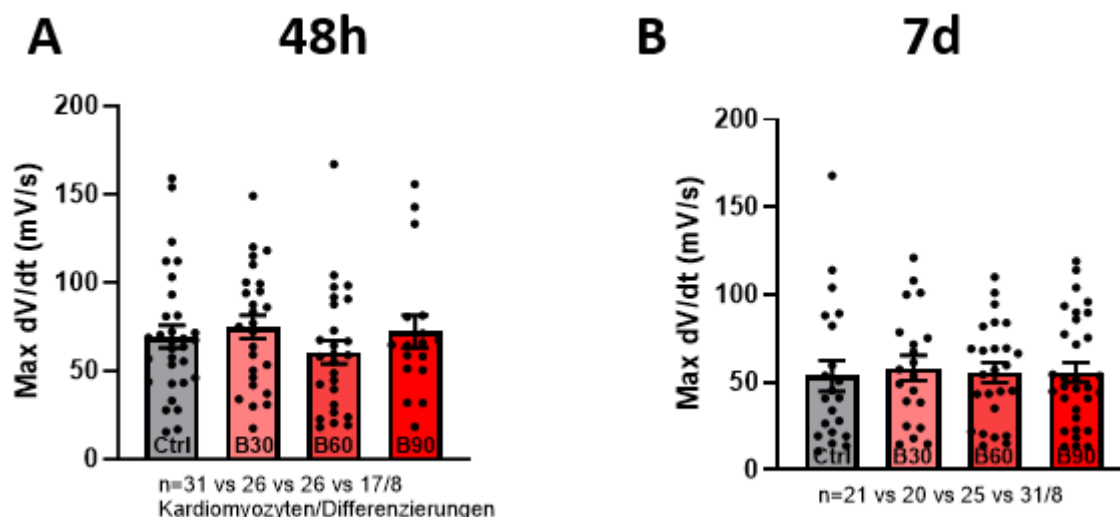


Abbildung 36: Aufstreichgeschwindigkeit (bei akuter Stimulation mit 60bpm) in ventrikulären hiPSC-KM nach Kultur-Stimulation mit unterschiedlichen Arrhythmie-Lasten. Messung der Aufstreichgeschwindigkeit (Max dV/dt) bei 60 bpm nach **(A)** 48 Stunden (n=31 vs. 26 vs. 26 vs. 17 Zellen aus 8 Differenzierungen) und **(B)** 7 Tagen (n=21 vs. 20 vs. 25 vs. 31 Zellen aus 8 Differenzierungen) Kulturstimulation mit Arrhythmie-Lasten von 0% bis 90% an ventrikulären hiPSC-KM.

3.4 Inhibition der Calcium/ Calmodulin-abhängige Proteinkinase II δ und antioxidative Therapie reduzieren die Auswirkungen von Vorhofflimmern

Im nächsten Schritt sollten die zellulären Mechanismen, die den Arrhythmie-Effekten zugrunde liegen, aufgedeckt werden. Als zwei mögliche Einflussfaktoren wurden die CaMKII und der oxidative Stress in Betracht gezogen. Der Einfluss dieser zwei Faktoren auf die Ca^{2+} -Homöostase wurde getestet, indem Messungen am Epifluoreszenzmikroskop (Fura-2) durchgeführt wurden (Originaltransienten Abbildung 37). Ventrikuläre hPSC-KM wurden vorher 7 Tage mit der VHF-Simulation stimuliert und dabei in einer Gruppe mit dem CaMKII Inhibitor AIP (Autocamtide-2-related inhibitory peptide, 1 $\mu\text{mol/L}$) die CaMKII Aktivität inhibiert und in der anderen Gruppe NAC (200 $\mu\text{mol/L}$) als ROS Scavenger eingesetzt. Nach sieben Tagen VHF-Simulation ($0,356 \pm 0,013$ F340/380 $n=67$ KM/3 Differenzierungen/2 Donoren) zeigten die hPSC-KM eine reduzierte Ca^{2+} -Transientenamplitude verglichen mit der Kontrolle ($0,465 \pm 0,014$ F340/380 $n=70/3/2$) (Abbildung 38A). Im Gegensatz dazu blieb die Ca^{2+} -Transientenamplitude nach VHF-Simulation erhalten, wenn die Zellen mit AIP ($0,453 \pm 0,047$ $n=68/3/2$) oder NAC ($0,414 \pm 0,009$ $n=80/3/2$) behandelt wurden. Die VHF-Simulation allein ($0,126 \pm 0,019$) erhöhte die Time to peak tendenziell, wohingegen eine Behandlung mit AIP ($0,113 \pm 0,009$) oder NAC ($0,114 \pm 0,004$) im Vergleich zur alleinigen VHF-Simulation zu reduzierter Time to peak führte (Abbildung 38B). Das diastolische Ca^{2+} und die Relaxationszeit 80% blieben in allen Gruppen statistisch unverändert (Abbildungen 38C-D).

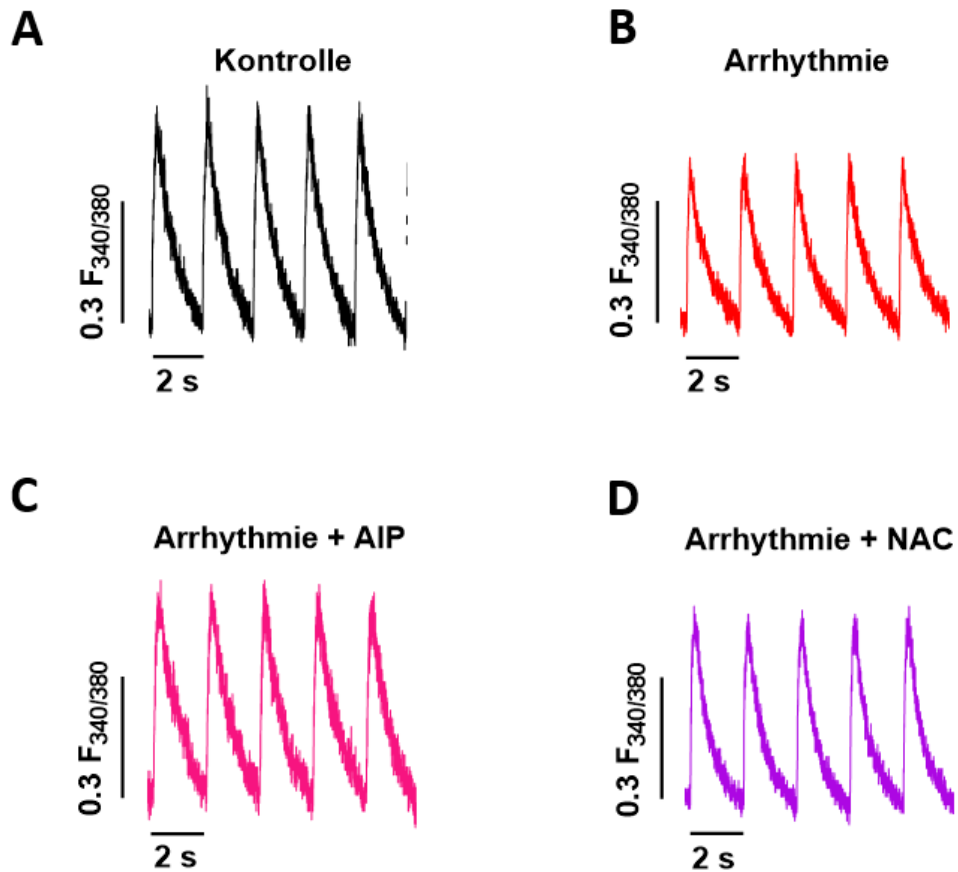


Abbildung 37: Originale Ca^{2+} -Transienten in ventrikulären hPSC-KM bei CaMKII-Inhibition und Reduktion des oxidativen Stress nach VHF-Simulation. Kulturstimulation an ventrikulären hPSC-KM mit chronischer (7d) VHF-Simulation (Arr: 60 bpm mit 40% Schlag-zu-Schlag Variation) oder rhythmischer Stimulation (Ktrl: 60 bpm) und die dabei auftretenden Effekte einer CaMKII Inhibition mittels $1\mu\text{mol/L}$ AIP (autocamtide-2-related inhibitory peptide) oder einer Reduktion des oxidativen Stress mittels $200\mu\text{mol/L}$ NAC (N-acetylcysteine), Originale Ca^{2+} -Transienten (Epifluoreszenzmikroskop, Fura2) von **(A)** rhythmisch stimulierten Zellen, **(B)** Zellen mit chronischer VHF-Simulation, **(C)** Zellen mit chronischer VHF-Simulation und CaMKII Inhibition mittels AIP und **(D)** Zellen mit chronischer VHF-Simulation und Reduktion des oxidativen Stress mittels NAC.

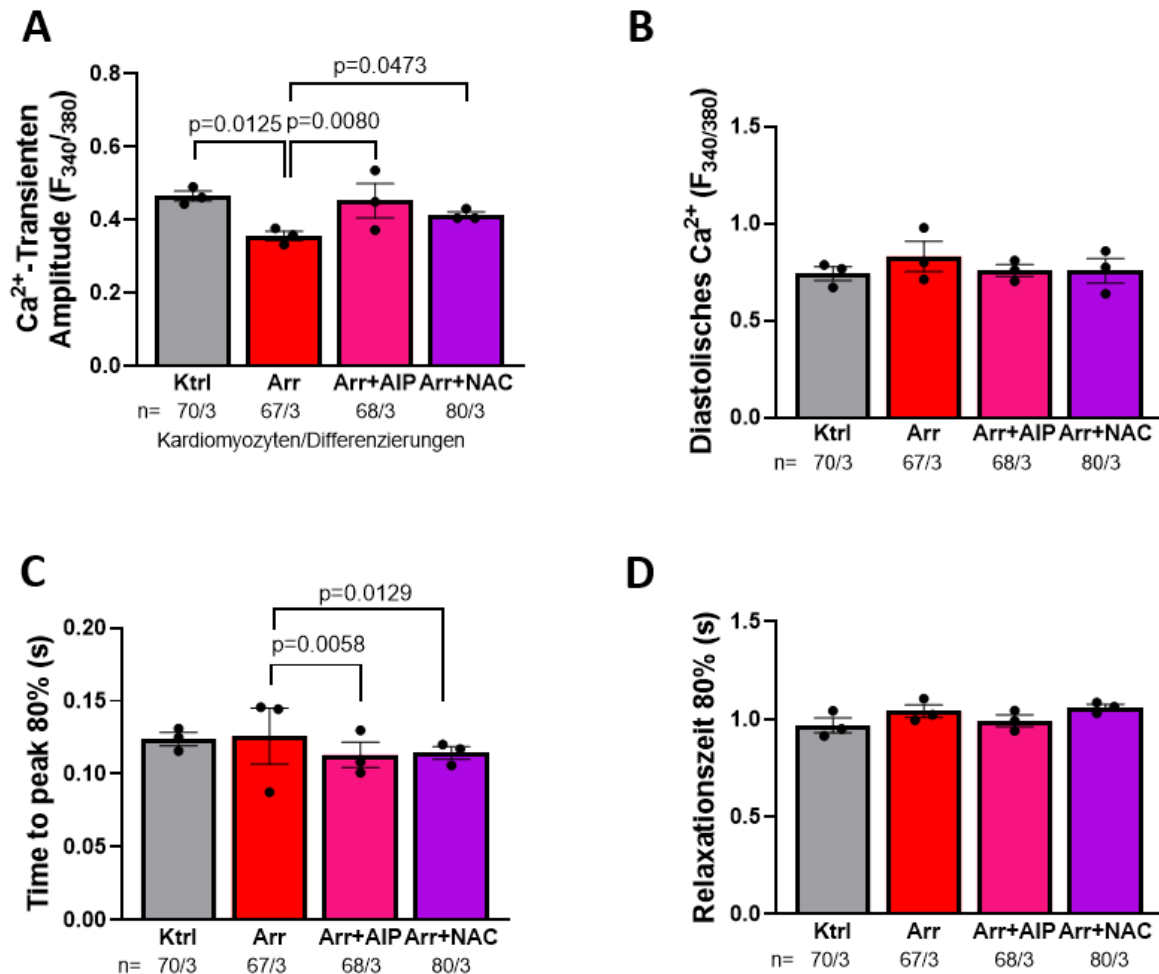


Abbildung 38: Ca²⁺-Homöostase in ventrikulären hiPSC-KM bei CaMKII-Inhibition und Reduktion des oxidativen Stress nach VHF-Simulation. Kulturstimulation an ventrikulären hiPSC-KM mit chronischer (7d) VHF-Simulation (Arr: 60 bpm mit 40% Schlag-zu-Schlag Variation) oder rhythmischer Stimulation (Ktrl: 60 bpm) und die dabei auftretenden Effekte einer CaMKII Inhibition mittels 1µmol/L AIP (autocamtide-2-related inhibitory peptide) oder einer Reduktion des oxidativen Stress mittels 200 µmol/L NAC (N-acetylcysteine), Mittelwerte der **(A)** Ca²⁺-Transientenamplitude, des **(B)** diastolischen Ca²⁺ der **(C)** Time to peak und der **(D)** Relaxationszeit 80% von hiPSC-KM nach chronischer VHF-Simulation (n=67 Kardiomyocyten/3 Differenzierungen/2 Donoren), rhythmischer Stimulation (n=70/3/2), VHF-Simulation + AIP (n=68/3/2) und VHF-Simulation+NAC (n=80/3/2), Daten werden als Scatter plot mit Mittelwerten und SEM dargestellt, jeder Datenpunkt ist als Mittelwert pro Differenzierung berechnet, p-Werte wurden mit dem nested 1-way ANOVA berechnet und für den multiplen Vergleich mit dem Holm-Sidak Test korrigiert.

Die Ca²⁺-Beladung des SR (Originaltransienten Abbildung 39) war nach VHF-Simulation ($0,802 \pm 0,075$ F_{340/380} n=12 KM/2 Differenzierungen) reduziert im Vergleich zur Kontrolle ($1,337 \pm 0,025$ F_{340/380} n=11/2) (Abbildung 40). Die Inhibition der CaMKII ($1,131 \pm 0,116$ n=16/2) oder das ROS Scavenging ($1,274 \pm 0,139$ n=15/2) führten dazu, dass die Beladung des SR trotz VHF-Simulation erhalten blieb (Arr vs Arr+AIP p=0,0405). Die CaMKII und ROS könnten also mechanistisch ursächlich sein bei der VHF-induzierten Verschlechterung der Ca²⁺-Homöostase.

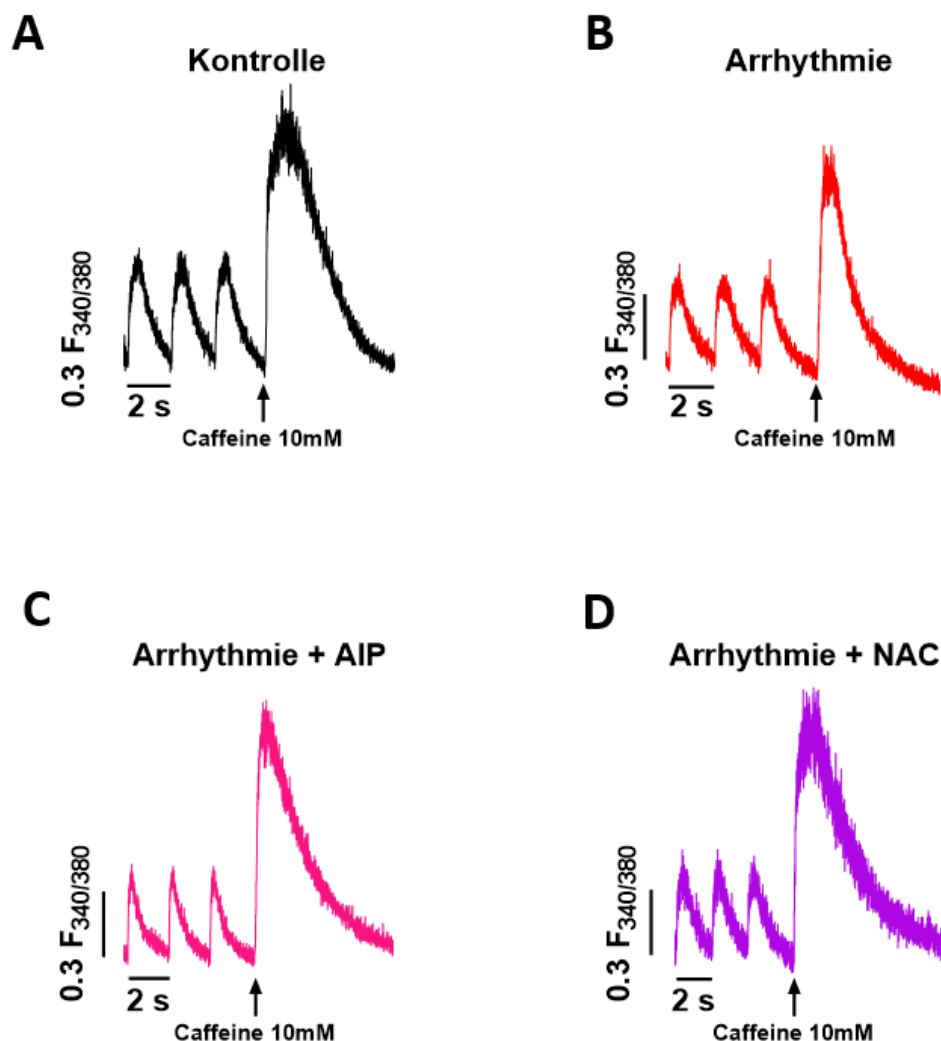


Abbildung 39: Originale Caffein-induzierte Ca^{2+} -Transienten bei CaMKII-Inhibition und Reduktion des oxidativen Stress nach VHF-Simulation. Kulturstimulation an ventrikulären hiPSC-KM mit chronischer (7d) VHF-Simulation (Arr: 60 bpm mit 40% Schlag-zu-Schlag Variation) oder rhythmischer Stimulation (Ktrl: 60 bpm) und die dabei auftretenden Effekte einer CaMKII Inhibition mittels $1 \mu\text{mol/L}$ AIP (autocamtide-2-related inhibitory peptide) oder einer Reduktion des oxidativen Stress mittels $200 \mu\text{mol/L}$ NAC (N-acetylcysteine), Originale Caffein-induzierte Ca^{2+} -Transienten (10 mmol/L Caffein, Epifluoreszenzmikroskop Fura-2) von chronisch stimulierten hiPSC-KM, von **(A)** rhythmisch stimulierten Zellen, **(B)** Zellen mit chronischer VHF-Simulation, **(C)** Zellen mit chronischer VHF-Simulation und CaMKII Inhibition mittels AIP und **(D)** Zellen mit chronischer VHF-Simulation und Reduktion des oxidativen Stress mittels NAC.

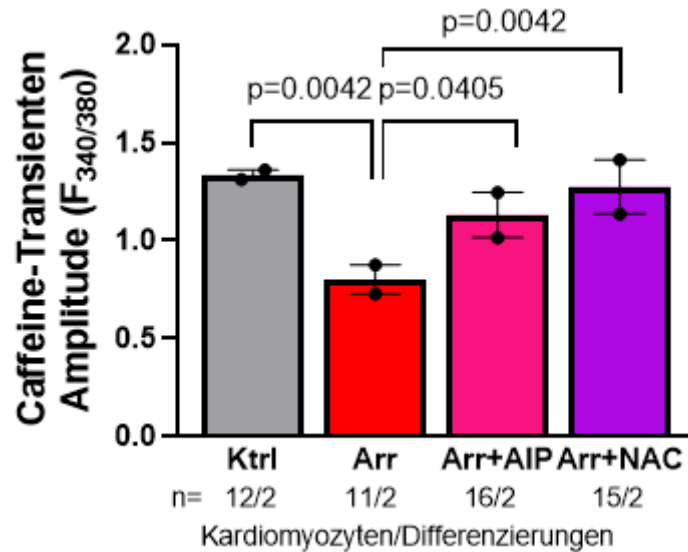


Abbildung 40: Ca²⁺-Beladung des SR bei CaMKII-Inhibition und Reduktion des oxidativen Stress nach VHF-Simulation. Kulturstimulation an ventrikulären hiPSC-KM mit chronischer (7d) VHF-Simulation (Arr: 60 bpm mit 40% Schlag-zu-Schlag Variation) oder rhythmischer Stimulation (Ktrl: 60 bpm) und die dabei auftretenden Effekte einer CaMKII Inhibition mittels 1 μ mol/L AIP (autocamtide-2-related inhibitory peptide) oder einer Reduktion des oxidativen Stress mittels 200 μ mol/L NAC (N-acetylcysteine), Mittelwerte der Coffein-induzierten Transientenamplitude als Indikator für die Ca²⁺-Beladung des Sarkoplasmatischen Retikulums von hiPSC-KM nach chronischer VHF-Simulation (n=11 Kardiomyozyten/2 Differenzierungen/2 Donoren), rhythmischer Stimulation (n=12/2/2), VHF-Simulation + AIP (n=16/2/2) und VHF-Simulation+NAC (n=15/2/2), Daten werden als Scatter plot mit Mittelwerten und SEM dargestellt, jeder Datenpunkt ist als Mittelwert pro Differenzierung berechnet, p-Werte wurden mit dem nested 1-way ANOVA berechnet und für den multiplen Vergleich mit dem Holm-Sidak Test korrigiert.

4 Diskussion

Im Bereich der kardiovaskulären Erkrankungen ist VHF eine der häufigsten Rhythmusstörungen [87]. Zudem weisen 20% bis 30% der Patienten mit VHF eine LVSD auf [10]. Zum aktuellen Zeitpunkt ist VHF vor allem als Erkrankung des Vorhofs bekannt. Zur Erforschung der Erkrankung gibt es viele Studien und Modelle, die sich mit den molekularen Mechanismen im Vorhof befassen [148]. Die gängigen Modelle arbeiten mit Vorhofgewebe von Patienten oder Tieren bzw. mit erhobenen Studiendaten zum Vorhof von betroffenen Patienten. Zu den Effekten von VHF auf den Ventrikel und deren Pathophysiologie ist im humanen Myokard bisher noch wenig erforscht. Klinisch durchaus relevant ist hierbei, dass bei vielen Patienten mit VHF Medikamente zur Frequenzkontrolle eingesetzt werden. Dennoch führt VHF weiterhin zur arrhythmischen Erregung des Ventrikels. Klinische Studien der letzten Jahre zeigen, dass auch bei Patienten mit normaler Herzfrequenz und Vorhofflimmern eine Rhythmuswiederherstellung positive Effekte auf die LV-Funktion hat [25, 147]. Daher leitet sich der Forschungsbedarf bezüglich des Einflusses von normofrequentem VHF auf den Ventrikel ab, um die Mechanismen von VHF als kausale Ursache einer LVSD zu verstehen. Zu dieser Fragestellung sind bisher nur wenige Daten erhoben und diese sind durch entscheidende Unterschiede in der Elektrophysiologie von Ratte und Mensch nicht direkt auf den Menschen übertragbar [146]. Eine Schwierigkeit bei der Erforschung der Effekte von VHF auf den Ventrikel stellt die Modellbildung dar. In vivo Modelle an Tieren sind durch artifizielle elektrische Erregung limitiert, da meist Schrittmacherpacing genutzt wird [139-141, 143-145]. Bei den Tieren wird häufig ein Schrittmacher im rechten Ventrikel implantiert. Dadurch wird die physiologische Erregungsausbreitung im Herz (von Vorhof zu Ventrikel) umgangen und die Ventrikel werden dyssynchron erregt. Diese Faktoren verstärken die Auswirkungen der arrhythmischen Stimulation und die LVSD schreitet bei den Tieren schneller und ausgeprägter voran als bei physiologischer Erregungsausbreitung über den Vorhof [11, 149]. Die Arbeit mit humanem Primärgewebe ist stark durch die Verfügbarkeit und die äußerst schwierige in vitro Nutzung limitiert. In dieser Arbeit wurde ein neues Modell zur Simulation kardialer Arrhythmien an hiPSC-KM entwickelt, das ermöglicht über längere Zeiträume elektrophysiologische Effekte nach in vitro Simulation von Arrhythmien zu analysieren.

4.1 Neues Modell für die Langzeitsimulation von Arrhythmien

Für das Modell wurden humane Stammzellen verwendet, um Speziesunterschiede zu vermeiden. Es bestehen z. Bsp. entscheidende Unterschiede bei der Ca^{2+} -Eliminierung aus dem Zytosol während der Diastole [29]. So wird in der Maus/Ratte verglichen mit dem Menschen ein höherer Anteil über die SERCA eliminiert und dafür ein geringerer Anteil über den NCX. Wir konnten erfolgreich und zuverlässig chronische elektrische Stimulation in Kultur bis zu 7 Tage etablieren. Während des Etablierungsprozesses wurde die optimale Dauer der Stimulationspulse sowie der mögliche Frequenzbereich für eine langanhaltende elektrische Stimulation evaluiert. Bei Messungen an atrialen hIPSC-KM konnten erfolgreich klinisch relevante Arrhythmien an den Zellen nachgebildet werden.

Die translationale Relevanz dieses neu etablierten Modells geht über die Fragestellungen dieser Arbeit hinaus. Mit dem Modell können verschiedene Arten von Arrhythmien simuliert werden und die Zellen anschließend für verschiedene experimentelle *Readouts* verwendet werden [130]. Dazu zählen zum Beispiel Transkriptom-Analysen und molekularbiologische oder funktionelle Messungen an Einzelzellen. Außerdem können mit dem Protokoll genetische und/oder pharmakologische Interventionen (auch drug screenings) untersucht werden. Mit dem Modell konnten wir bereits in mehreren Projekten den klinischen Phänotyp von Patienten mit VHF in hIPSC-KM erzeugen [147, 150]. Für den direkten Vergleich haben wir Messungen an Gewebeproben von Patienten mit normofrequentem VHF durchgeführt. Die ventrikulären KM der Patienten mit VHF wiesen im Vergleich zu Proben von Patienten mit Sinusrhythmus reduzierte Ca^{2+} -Transientenamplituden auf [150]. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wiesen auch die ventrikulären hIPSC-KM in dem entwickelten Modell nach VHF-Simulation reduzierte Ca^{2+} -Transientenamplituden auf. Die VHF-Simulation führte auch bei atrialen hIPSC-KM zu einer Reduktion der Ca^{2+} -Transientenamplitude und verlängerter Relaxationszeit. Ebendiese Veränderungen der Elektrophysiologie wurden auch bei Patienten mit chronischem VHF beobachtet [111].

Das Modell wurde weiterhin verwendet, um in einem „back-to-bench“ Ansatz klinische Beobachtungen zur VHF-Last zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse der CASTLE AF Studie auf zellulärer Ebene untersucht [147]. Bei einer VHF-Last über 50% wiesen die hIPSC-KM neben der in dieser Arbeit gezeigten Verlängerung der Aktionspotentialdauer, eine reduzierte Ca^{2+} -Transientenamplitude und

Beeinträchtigung der Sarkomerregelmäßigkeit auf [151]. Die genannten Veränderungen sind typische Kennzeichen der Herzinsuffizienz [124, 152-154]. Mit diesen Ergebnissen decken sich die Befunde einer Analyse der CASTLE-AF Studie, bei der gezeigt wurde, dass Patienten mit einer VHF-Last über 50% ein schlechteres Herzinsuffizienz *Outcome* hatten [147]. Der Einsatz von Stammzellen bietet die Möglichkeit, die Effekte und Mechanismen der Arrhythmien an verschiedenen Zelltypen (z. Bsp. atriale oder ventrikuläre KM), unter Berücksichtigung verschiedener patientenspezifischer Erkrankungen und auch genetischer Modulationen oder pharmakologische Interventionen zu untersuchen. Mit dem Modell können prospektive Langzeitstudien mit standardisierten Rahmenbedingungen durchgeführt werden.

4.2 Einfluss von Vorhofflimmern auf die Calciumhomöostase und Elektrophysiologie des Ventrikels

Bei Patienten mit VHF tritt im Vorhof vermehrt Fibrose auf [155, 156], wobei die Fibrose eine irreversible Veränderung des Gewebes darstellt. Im Gegensatz dazu stellte sich in Tiermodellen mit VHF Pacing heraus, dass im Ventrikel keine bis geringe Fibrose verglichen mit dem Vorhof entsteht und die geringe entstehende Fibrose sehr wahrscheinlich nicht auf die Arrhythmie-Komponente zurückzuführen ist [97, 157, 158]. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde in dieser Arbeit Ventrikelgewebe von Patienten mit VHF oder Sinusrhythmus untersucht. Dabei trat keine vermehrte Fibrose bei den Patienten mit VHF im Ventrikel auf [150]. Zusätzlich zu der fehlenden Fibrose-Entstehung gibt es klinische Beobachtungen, die zeigen, dass bei Patienten mit VHF nach Rhythmuswiederherstellung via Ablation schnell eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion eintritt [159]. Der Mechanismus dieser Verbesserung ist bisher jedoch nicht aufgedeckt [90, 159]. Aufgrund der beschriebenen Beobachtungen wird angenommen, dass reversible und funktionelle Mechanismen durch VHF im Ventrikel beeinträchtigt werden, jedoch bei Rhythmuswiederherstellung reversibel sind. Mit Hilfe des entwickelten Kulturstimulationsmodells sollen diese Mechanismen aufgedeckt und potentielle Therapieansätze entwickelt werden.

4.2.1 Effekte von Vorhofflimmern auf die Calciumhomöostase im Vorhof und Ventrikel

Um Speziesunterschiede zwischen Tier und Mensch ausschließen zu können, wurde in dieser Arbeit an humanem Gewebe der Einfluss von VHF auf die Ca^{2+} -Homöostase des Ventrikels untersucht. In Vorarbeiten an Gewebeproben von Patienten beobachteten wir, dass bei Patienten mit VHF die Ca^{2+} -Transientenamplitude reduziert

war [150]. Dabei wurde unter anderem in einem *in vitro* Ansatz mit Kultivierung von Einzelzellen normofrequentes VHF simuliert und auch hierbei eine Reduktion der Ca^{2+} -Transientenamplitude gemessen. Die Effekte von arrhythmischem Pacing auf die Ca^{2+} -Homöostase der Ventrikelzellen wurde auch in Vorstudien an einem Rattenmodell untersucht. Dabei zeigte sich übereinstimmend mit unseren Befunden eine Reduktion der Ca^{2+} -Transientenamplitude, sowie erhöhtes diastolisches Ca^{2+} [160] und Veränderungen der Kinetik der Ca^{2+} -Transienten [161]. Mit dem hier entwickelten Modell zur Arrhythmie-Simulation nutzten wir weiterhin die hPSC-KM, um in einem Langzeit *in vitro* Ansatz den Einfluss von normofrequent arrhythmischer Stimulation auf ventrikuläre KM zu untersuchen. Hierdurch sollte unabhängig von klinischen Störfaktoren z. Bsp. durch Medikamente, rein der Effekt von VHF mechanistisch evaluiert werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, war sowohl in den atrialen als auch den ventrikulären hPSC-KM die systolische Ca^{2+} -Ausschüttung vermindert (reduzierte Ca^{2+} -Transientenamplitude). Eine mögliche Erklärung dafür stellt die beobachtete reduzierte Ca^{2+} -Beladung des SR dar. Die reduzierte Beladung kann durch eine verminderte Aktivität der SERCA und der damit schlechteren Wiederaufnahme des Ca^{2+} in das SR entstehen. In den ventrikulären KM der Ratten war die Ca^{2+} -Wiederaufnahme über die SERCA ebenso reduziert [161]. Außerdem kann die in unserer Gruppe beobachtete Hyperphosphorylierung des RYR2 an der CaMKII Phosphorylierungsstelle zu einem erhöhten Ca^{2+} -Leck am SR führen [150]. Die verminderte SERCA Aktivität und das Ca^{2+} -Leck führen zu den beobachteten reduzierten Ca^{2+} -Transientenamplituden. Die zu geringe Ca^{2+} -Ausschüttung hat eine verminderte Bindung von Ca^{2+} an den Myofilamenten und damit eine Einschränkung der Kontraktilität zur Folge. Insgesamt stellen die Beobachtungen typische Veränderungen analog zum Herzinsuffizienz-Remodeling dar und können somit eine durch VHF induzierte kontraktile Dysfunktion suggerieren [5, 162].

Im nächsten Schritt wurden die Mechanismen untersucht, die zu den Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase führen. In Vorarbeiten der Gruppe konnten wir zeigen, dass die CaMKII Expression im Gewebe von Patienten mit VHF im Vergleich zu Patienten mit Sinusrhythmus erhöht ist. Außerdem war die regulatorische Domäne der CaMKII sowohl in Gewebeproben von Patienten mit VHF, als auch in VHF-stimulierten hPSC-KM an Met281/282 stärker oxidiert. Die Oxidation der CaMKII an dieser Stelle führt erwiesenermaßen zur Aktivierung der Kinase [104] und folglich war auch die CaMKII Aktivität bei den Patienten mit VHF und VHF stimulierten hPSC-KM erhöht. Als

Ursache für die Oxidation wurden erhöhte Level an ROS detektiert. In einer Studie, die den Zusammenhang zwischen oxidativer CaMKII Aktivierung und VHF beschreibt, wird bestätigt, dass im Vorhof von Patienten mit VHF erhöhte Level an oxidiertem CaMKII auftreten [69]. Außerdem wiesen Mäuse mit einem CaMKII resistenten RYR2 eine geringere Anfälligkeit für VHF-Induktion auf, wodurch die These gestützt wird, dass die oxidierte CaMKII über Hyperphosphorylierung des RYR2 VHF triggern kann [163]. Abgesehen von der CaMKII-Aktivierung kann erhöhter oxidativer Stress außerdem zu verstärkter Aktivierung des LTCC und damit erhöhtem Ca^{2+} -Einstrom führen [37, 38]. Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle führt bei den Mitochondrien zu gesteigerter ROS-Produktion und diese ROS induzierte ROS-Freisetzung wiederum aktiviert Hypertrophie-Signalwege [164-166]. Einer davon ist zum Beispiel die reduzierte Ca^{2+} -Transientenamplitude in ventrikulären KM von Patienten mit VHF. Die reduzierte Transientenamplitude kann das Korrelat einer systolischen Dysfunktion sein [29]. In einem weiteren Ansatz in dieser Arbeit inhibierten wir daher die Aktivität der CaMKII und setzten einen ROS Scavenger ein. In beiden Fällen waren die hiPSC-KM, hinsichtlich der Ca^{2+} -Transientenamplitude und der Beladung des SR, vor den Effekten durch VHF geschützt. Diese Befunde stützen die Hypothese, dass ROS induzierte, gesteigerte CaMKII Aktivität mechanistisch ursächlich für die VHF induzierte Beeinträchtigung der Ca^{2+} -Homöostase sein kann.

4.2.2 Einfluss von Vorhofflimmern auf den späten Natriumstrom im Ventrikel

Ein gesteigerter Na^{+} -Einstrom (beispielsweise durch ROS) über die Na^{+} -Kanäle kann zu einer Na^{+} -Akkumulation in den Zellen führen [113]. Dadurch wird der chemische Gradient für Na^{+} -Ionen über dem NCX vermindert und es wird weniger Na^{+} im Austausch gegen Ca^{2+} aus der Zelle hinausgeleitet. Eine Ca^{2+} -Überladung der Zelle ist die Folge. Die Myofilamente werden verstärkt und verlängert aktiviert und es kommt zu einer gestörten Relaxation [119]. Der späte Na^{+} -Einstrom wird während des gesamten Aktionspotentials nie gänzlich inaktiviert bzw. kann wieder reaktiviert werden [114-117]. Bei den Messungen an ventrikulären hiPSC-KM war der späte Na^{+} -Strom bei den Zellen, die unter VHF-Simulation kultiviert waren, erhöht im Vergleich zu den Zellen, die im Sinusrhythmus stimuliert waren. Zudem beobachteten wir eine Erhöhung der intrazellulären Na^{+} -Konzentration durch VHF-Simulation [150]. Vermutlich führt die zuvor bestätigte VHF-induzierte ROS-Erhöhung im Ventrikel zu einem gesteigerten Na^{+} -Einstrom in die Zelle und damit zur erhöhten intrazellulären Na^{+} -Konzentration. Eine Na^{+} -Überladung der Zelle kann konsekutiv eine Ca^{2+} -

Überladung über den NCX, eine kontraktile Dysfunktion und eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer zur Folge haben [113].

4.2.3 Einfluss von Vorhofflimmern auf das ventrikuläre Aktionspotential

In den kultivierten hPSC-KM wiesen die Zellen mit VHF-Simulation verlängerte Aktionspotentiale im Vergleich zu den rhythmisch stimulierten Zellen auf. Neben den Messungen an Stammzellen untersuchten wir an isolierten Einzelzellen von Patienten mit VHF die Elektrophysiologie und beobachteten auch bei diesen Primärzellen verlängerte Aktionspotentiale. Der erhöhte späte Na^+ -Strom sowie verlängerte Aktionspotentialdauer sind typische Kennzeichen des elektrophysiologischen Remodelings bei Herzinsuffizienz [167]. Dementsprechend hat VHF auch im Ventrikel negativen Einfluss auf die elektromechanische Kopplung und kann nicht länger nur als Erkrankung des Vorhofs angesehen werden.

4.3 Auswirkungen des Schwellenwertes von 50% Vorhofflimmer-Last auf den Ventrikel

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass normofrequentes VHF per se die ventrikuläre Funktion beeinträchtigen kann. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob diese Einschränkung der zellulären Funktionen auch von der Schwere der Arrhythmie-Last abhängt.

Ziel der Untersuchungen war es, an einem Modell mit humanem Gewebe die Effekte verschiedener VHF-Lasten auf die ventrikulären KM zu erforschen. Grundlage für den Ansatz waren die klinischen Beobachtungen einer Subanalyse der CASTLE AF Studie. In der Studie wurde bei Patienten mit VHF der therapeutische Erfolg einer Katheterablation zur Rhythmuskontrolle und einer konventionellen medikamentösen Therapie zur Frequenzkontrolle verglichen. [147]. Patienten, die mittels Katheterablation therapiert wurden, hatten im Follow Up eine wesentlich niedrigere VHF-Last als Patienten, die medikamentös behandelt wurden. Patienten, bei denen die VHF-Last 6 Monate nach der Ablation $<50\%$ war, wiesen ein verbessertes klinisches *Outcome* auf im Vergleich zu Patienten, die zu diesem Zeitpunkt eine VHF-Last $>50\%$ hatten. Untersucht wurden daher ventrikuläre hPSC-KM, die wir in Gruppen mit VHF-Last unter 50% und über 50% einteilten. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in den Gruppen mit VHF-Lasten von 60% und 90% die Aktionspotentiale signifikant verlängert waren im Vergleich zu den Gruppen mit keiner oder 30% VHF-Last. Mit den Messungen konnte belegt werden, dass die VHF-Last direkt mit dem

Ausmaß von elektrischem Remodeling zu korrelieren scheint, das als Kennzeichen der Verschlechterung der ventrikulären Funktion gesehen wird [154]. Neben der Aktionspotentialdauer wurden in unserer Gruppe außerdem weitere Verschlechterungen der zellulären Funktion, wie reduzierte Ca^{2+} -Transientenamplitude und Sarkomer-Unregelmäßigkeit gemessen [151]. Alle diese Veränderungen sind typische Kennzeichen der Herzinsuffizienz. [124, 152-154]

Die aktuellsten ESC (European Society of Cardiology) -Richtlinien [168] rücken inzwischen bei der Behandlung von VHF die Rhythmuskontrolle vermehrt in den Vordergrund im Vergleich zum älteren Stand der Richtlinien [169]. In der CASTLE-AF Studie wird bei Patienten mit VHF und LVSD die Überlegenheit einer Rhythmuskontrolle durch Ablation gegenüber der Frequenzkontrolle gezeigt. Die Patienten, die mittels Katheter-Ablation behandelt wurden, hatten signifikant niedrigere Sterbe- und Hospitalisierungsraten und haben in einem 60 Monate dauernden Follow-Up mit höherer Wahrscheinlichkeit den Sinusrhythmus behalten [91]. Die CASTLE-HTx-Studie zeigt außerdem, dass auch bei Patienten mit VHF und Herzinsuffizienz im Endstadium durch Rhythmuskontrolle die Mortalität reduziert werden kann, verglichen mit der Frequenzkontrolle [170]. Zu der allgemeinen Beobachtung eines besseren klinischen *Outcomes* nach Ablation, wurden genauere Analysen zum Therapieerfolg bei verschiedenen VHF-Lasten durchgeführt. Patienten mit einer VHF-Last unter 50% hatten niedrigere Sterberaten und Hospitalisierungsraten im Vergleich zu Patienten, die eine medikamentöse Frequenzkontrolle erhielten und zu Patienten, bei denen die VHF-Last nach der Ablation bei über 50% lag [147]. Aktuell wird der Erfolg einer Ablation bei VHF danach eingestuft, ob nach dem Eingriff arrhythmische Episoden mit einer Dauer länger als 30 Sekunden auftreten [171]. Betrachtet man jedoch die Ergebnisse der CASTLE-AF Studie, wird die klinische Relevanz dieser Einstufung in Frage gestellt und die Bedeutung der VHF-Last zur Beurteilung des Erfolges bei der Rhythmuskontrolle in den Vordergrund gerückt. Mit dem von uns etablierten translationalen Modell an hiPSC-KM konnten wir auf zellulärer Ebene die klinische Beobachtung bestätigen, dass eine Rhythmuskontrolle Vorzüge gegenüber der reinen Frequenzkontrolle aufweist. Eine erhöhte Arrhythmie-Last führte bei unseren Messungen zu elektrischem Remodeling.

Neben der CASTLE-AF Studie, beschreibt auch die CAMERA-MRI Studie [25] die Überlegenheit der Rhythmuskontrolle bei Patienten mit VHF und zeigt, dass bei Patienten mit Ablation eine erhöhte Reversibilität der LVSD erzielt wird im Vergleich

zu Patienten mit medikamentöser Frequenzkontrolle. In dieser Arbeit werden die negativen Effekte, die selbst normofrequentes VHF auf den Ventrikel hat, beschrieben. Bezüglich dieser Hypothese wird in der CAMERA-MRI Studie gezeigt, dass selbst eine erfolgreiche Frequenzkontrolle keinen vergleichbaren Therapieerfolg zum Erhalt des Sinusrhythmus erzielt. Vergleichbar hierzu werden die Effekte auf die linksventrikuläre Funktion in der CASTLE-AF Studie beschrieben. Patienten mit Ablation zur Rhythmuskontrolle wiesen signifikant bessere linksventrikuläre Funktion im Vergleich zu Patienten mit reiner Frequenzkontrolle auf. Dabei hatten die Patienten mit Ablation eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass die linksventrikuläre Funktion auf über 35% wiederhergestellt werden kann. Zudem war die Gesamtmortalität und die kardiovaskuläre Hospitalisierungsrate bei Patienten mit Ablation reduziert [172].

4.4 Translationale Relevanz

VHF ist eine der häufigsten Rhythmusstörungen und 20% - 30% der Patienten mit VHF haben eine LVSD [10]. Außerdem scheint VHF mit einem erhöhten Risiko, am plötzlichen Herztod zu sterben, verbunden zu sein [173]. In der Klinik werden Patienten mit VHF häufig mit einer reinen Frequenzkontrolle behandelt. In klinischen Studien konnte jedoch nachgewiesen werden, dass auch normofrequentes VHF die linksventrikuläre Funktion beeinträchtigt [10, 95, 96]. Es wurde bereits in mehreren klinischen Studien gezeigt, dass Rhythmuskontrolle bei Patienten mit VHF ein besseres klinisches *Outcome* erzielt als reine Frequenzkontrolle. Dazu zählen insbesondere die EAST-AFNET4 und die CASTLE-AF Studie [91, 93]. Die EAST-AFNET4 Studie zeigt, dass frühzeitige Rhythmuskontrolle bei Patienten, die seit einem Jahr oder weniger VHF haben, zu einem besseren klinischen *Outcome* führte [93]. Die CASTLE-AF Studie zeigt, dass bei Patienten mit Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion und VHF eine Rhythmuskontrolle über Katheterablation die Mortalität und die Hospitalisierungsrate wegen Herzinsuffizienz reduziert und die Funktion des linken Ventrikels verbessert [91]. Weiterhin wurde in anderen Studien beobachtet, dass bei Patienten mit Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion und VHF eine Ablation zur Verbesserung der linksventrikulären Funktion führte [90, 91]. Insgesamt suggerieren Studien an Patienten mit VHF positive Effekte auf die kardiale Funktion und andere funktionelle *Outcomes* durch Rhythmuskontrolle [92]. Sogar bei Patienten mit permanentem VHF mit verschmälertem QRS Komplex, führte die Ablation der atrioventrikulären Verbindung kombiniert mit biventrikulärem Pacing zu einer signifikant reduzierten Mortalität [174]. Insgesamt fokussieren sich die

Behandlungsstrategien bei Patienten mit VHF daher in den neuen Therapierichtlinien vermehrt auf die Rhythmuskontrolle [93, 94].

Demnach ist die zugrunde liegende Pathophysiologie der Effekte von VHF auf den Ventrikel zwar klinisch äußerst relevant, aber bisher kaum aufgeklärt. Die Effekte von VHF im Vorhof sind dagegen umfassend charakterisiert [148]. In dieser translationalen Arbeit wird gezeigt, dass normofrequentes VHF über arrhythmische Erregung des Ventrikels zur Beeinträchtigung der elektromechanischen Kopplung und der Elektrophysiologie im Ventrikel führt. Die Forschungsergebnisse könnten so die Entwicklung einer LVSD bei Patienten mit VHF erklären und Grundlage für neue Therapieansätze sein. Die Beobachtungen in unserer Gruppe zur fehlenden Fibrose-Entstehung durch VHF im Ventrikel, zeigen außerdem, dass die VHF induzierte LVSD im Ventrikel eher funktioneller Natur ist und durch Wiederherstellung des Sinusrhythmus reversibel sein könnte. Diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse klinischer Studien belegt, bei denen bei Patienten mit AIC eine Wiederherstellung des Sinusrhythmus zur Erholung der LVSD führt [10]. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit legen die Vermutung nahe, dass VHF auch der Grund für die Entstehung einer LVSD sein kann und nicht nur die Folge einer bestehenden Herzinsuffizienz [175]. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass diese Arbeit erste Erkenntnisse zur Charakterisierung der Effekte von VHF auf den Ventrikel liefert. Daraus kann geschlossen werden, dass VHF nicht nur als Erkrankung des Vorhofs betrachtet werden sollte.

Abgesehen von den bereits untersuchten Ionen, Kanälen, Strömen und Mechanismen gibt es höchstwahrscheinlich weitere Abläufe in und auch außerhalb des Ventrikels, die bei der Pathophysiologie der Effekte von VHF auf den Ventrikel eine Rolle spielen. Es sind demnach weitere Untersuchungen nötig, um ein vollständiges Bild der Erkrankung zu erhalten. In einer weiterführenden Forschungsarbeit untersuchen wir zum Beispiel den Einfluss von oxidativem Stress und der CaMKII-Aktivierung auf die VHF induzierte ventrikuläre Dysfunktion.

5 Zusammenfassung

Vorhofflimmern (VHF) ist im Bereich der kardiovaskulären Erkrankungen eine der häufigsten Rhythmusstörungen und steht in Zusammenhang mit einer ventrikulären Dysfunktion des Herzens. Zum aktuellen Zeitpunkt ist VHF jedoch fast ausschließlich als Erkrankung des Vorhofs beschrieben. Der Einfluss von VHF auf die zelluläre Elektrophysiologie im Ventrikelmyokard stellt somit eine Forschungslücke dar und soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Da bisher kein Modell existiert, das erlaubt den Einfluss von VHF auf den Ventrikel zu untersuchen, wurde ein Modell an humanen induzierten pluripotenten Stammzell-Kardiomyozyten (hiPSC-KM) etabliert, mit dem an ventrikulären Zellen in einer Langzeitkultur bis zu 7 Tage die elektrische Erregung äquivalent zu VHF simuliert werden kann. Nach der VHF-Simulation wurden mehrere Aspekte der elektromechanischen Kopplung an den Zellen untersucht. Mittels Epifluoreszenzmikroskopie wurde zunächst die Calcium (Ca^{2+})-Homöostase evaluiert. Sowohl in atrialen als auch in ventrikulären hiPSC-KM war die Amplitude der systolischen Ca^{2+} -Transienten und auch die Ca^{2+} -Beladung des Sarkoplasmatischen Retikulums nach der VHF-Simulation reduziert. Neben der Ca^{2+} -Homöostase wurden mit der Patch Clamp Technik Effekte auf den späten Natrium-Strom und die Aktionspotentiale der Zellen gemessen. Die VHF-Simulation führte zur Erhöhung des späten Natrium-Stroms, der eine mögliche Ursache für die gemessene Verlängerung der Aktionspotentialdauer darstellt. Übereinstimmend mit den Effekten an den hiPSC-KM, wurde an ventrikulären Kardiomyozyten von Patienten mit VHF eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer im Vergleich zu Zellen von Patienten ohne VHF detektiert. VHF ist, hinsichtlich der VHF-Last, bei den Patienten unterschiedlich stark ausgeprägt. Diesbezüglich wurde in der CASTLE-AF Studie ein Über- bzw. Unterschreiten des Schwellenwertes von 50% VHF-Last als entscheidend für das kardiovaskuläre *Outcome* beschrieben. In dem etablierten Kulturstimulationsmodell wurde ab einer VHF-Last >50% eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer als elektrophysiologischer Hintergrund zu den klinischen Beobachtungen eruiert. Nachdem die Effekte von VHF auf die Elektrophysiologie der Ventrikelzellen evaluiert waren, sollten die zugrunde liegenden Mechanismen aufgedeckt werden. Eine Inhibition der CaMKII und Reduktion des oxidativen Stress wirkten sich hinsichtlich der Ca^{2+} -Homöostase protektiv auf arrhythmisch stimulierte hiPSC-KM aus.

Diese Arbeit liefert erste Erkenntnisse dazu, wie arrhythmische Erregung bei VHF zur Beeinträchtigung der Elektromechanischen Kopplung im Ventrikel führt und könnte damit zum Teil die Entwicklung der ventrikulären Dysfunktion bei Patienten mit VHF erklären. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass VHF auch der Grund für die Entstehung einer LVSD sein kann und nicht nur die Folge einer bestehenden Herzerkrankung. VHF sollte demnach nicht nur als Erkrankung des Vorhofs betrachtet werden.

Literatur

1. Davies, M., et al., Prevalence of left-ventricular systolic dysfunction and heart failure in the Echocardiographic Heart of England Screening study: a population based study. *Lancet*, 2001. 358(9280): p. 439-44.
2. Ziaeian, B. and G.C. Fonarow, Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol*, 2016. 13(6): p. 368-78.
3. Heidenreich, P.A., et al., Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circ Heart Fail*, 2013. 6(3): p. 606-19.
4. Cook, C., et al., The annual global economic burden of heart failure. *Int J Cardiol*, 2014. 171(3): p. 368-76.
5. Fischer, T.H., L.S. Maier, and S. Sossalla, The ryanodine receptor leak: how a tattered receptor plunges the failing heart into crisis. *Heart Fail Rev*, 2013. 18(4): p. 475-83.
6. Bundesärztekammer, K.B., Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz. 2019. 3.
7. Maggioni, A.P., et al., EURObservational Research Programme: regional differences and 1-year follow-up results of the Heart Failure Pilot Survey (ESC-HF Pilot). *Eur J Heart Fail*, 2013. 15(7): p. 808-17.
8. Santangeli, P., et al., What do tachycardiomyopathy belong to? *Eur Heart J*, 2008. 29(8): p. 1073-4.
9. Pinto, Y.M., et al., 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*, 2016. 37(23): p. 1850-8.
10. Sossalla, S. and D. Vollmann, Arrhythmia-Induced Cardiomyopathy. *Dtsch Arztebl Int*, 2018. 115(19): p. 335-341.
11. Gopinathannair, R., et al., Arrhythmia-Induced Cardiomyopathies: Mechanisms, Recognition, and Management. *J Am Coll Cardiol*, 2015. 66(15): p. 1714-28.
12. Fenelon, G., et al., Tachycardiomyopathy: mechanisms and clinical implications. *Pacing Clin Electrophysiol*, 1996. 19(1): p. 95-106.

13. Coleman, H.N., 3rd, et al., Congestive heart failure following chronic tachycardia. *Am Heart J*, 1971. 81(6): p. 790-8.
14. Armstrong, P.W., et al., Rapid ventricular pacing in the dog: pathophysiologic studies of heart failure. *Circulation*, 1986. 74(5): p. 1075-84.
15. Schillinger, W., et al., High intracellular Na⁺ preserves myocardial function at low heart rates in isolated myocardium from failing hearts. *Eur J Heart Fail*, 2006. 8(7): p. 673-80.
16. Spinale, F.G., et al., Chronic supraventricular tachycardia causes ventricular dysfunction and subendocardial injury in swine. *Am J Physiol*, 1990. 259(1 Pt 2): p. H218-29.
17. Ellis, E.R. and M.E. Josephson, Heart failure and tachycardia-induced cardiomyopathy. *Curr Heart Fail Rep*, 2013. 10(4): p. 296-306.
18. Moe, G.W., et al., Alterations in serum sodium in relation to atrial natriuretic factor and other neuroendocrine variables in experimental pacing-induced heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 1989. 13(1): p. 173-9.
19. Riegger, A.J. and G. Liebau, The renin-angiotensin-aldosterone system, antidiuretic hormone and sympathetic nerve activity in an experimental model of congestive heart failure in the dog. *Clin Sci (Lond)*, 1982. 62(5): p. 465-9.
20. Moe, G.W., et al., Early recovery from heart failure: insights into the pathogenesis of experimental chronic pacing-induced heart failure. *J Lab Clin Med*, 1988. 112(4): p. 426-32.
21. Nerheim, P., et al., Heart failure and sudden death in patients with tachycardia-induced cardiomyopathy and recurrent tachycardia. *Circulation*, 2004. 110(3): p. 247-52.
22. Jeong, Y.H., et al., Diagnostic approach and treatment strategy in tachycardia-induced cardiomyopathy. *Clin Cardiol*, 2008. 31(4): p. 172-8.
23. Kirchhof, P., et al., 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur Heart J*, 2016. 37(38): p. 2893-2962.
24. Maisel, W.H. and L.W. Stevenson, Atrial fibrillation in heart failure: epidemiology, pathophysiology, and rationale for therapy. *Am J Cardiol*, 2003. 91(6A): p. 2D-8D.

25. Prabhu, S., et al., Catheter Ablation Versus Medical Rate control in Atrial Fibrillation and Systolic Dysfunction (CAMERA-MRI). *J Am Coll Cardiol*, 2017. 70(70): p. 1949-1961.
26. Hsu, L.F., et al., Catheter ablation for atrial fibrillation in congestive heart failure. *N Engl J Med*, 2004. 351(23): p. 2373-83.
27. Borrmann, C.M., et al., The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. II. Colocalizations of desmosomal and fascia adhaerens molecules in the intercalated disk. *Eur J Cell Biol*, 2006. 85(6): p. 469-85.
28. Grossmann, K.S., et al., Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *J Cell Biol*, 2004. 167(1): p. 149-60.
29. Bers, D.M., Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 2002. 415(6868): p. 198-205.
30. Bers, D.M., *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 2 ed. *Developments in Cardiovascular Medicine*. 2001: Springer, Dordrecht. XXIV, 427.
31. Pieske, B., et al., Ca^{2+} handling and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*, 1999. 85(1): p. 38-46.
32. Neef, S. and L.S. Maier, Remodeling of excitation-contraction coupling in the heart: inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak as a novel therapeutic approach. *Curr Heart Fail Rep*, 2007. 4(1): p. 11-7.
33. Nowicky, M.C., A.P. Fox, and R.W. Tsien, Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 1985. 316(6027): p. 440-3.
34. Klugbauer, N., Specht, V., Welling, A., Spannungsabhängige Kalziumkanäle: Neue Einblicke mit Hilfe transgener Mausmodelle, in *BioSpektrum*. 2002. p. 704-707.
35. Satin, J., E.A. Schroder, and S.M. Crump, L-type calcium channel auto-regulation of transcription. *Cell Calcium*, 2011. 49(5): p. 306-13.
36. Anderson, M.E., Calmodulin kinase and L-type calcium channels; a recipe for arrhythmias? *Trends Cardiovasc Med*, 2004. 14(4): p. 152-61.

37. Hool, L.C., Reactive oxygen species in cardiac signalling: from mitochondria to plasma membrane ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006. 33(1-2): p. 146-51.
38. Hool, L.C. and B. Corry, Redox control of calcium channels: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 2007. 9(4): p. 409-35.
39. January, C.T. and J.M. Riddle, Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca^{2+} current. *Circ Res*, 1989. 64(5): p. 977-90.
40. Wu, Y., et al., Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation*, 2002. 106(10): p. 1288-93.
41. Zeng, J. and Y. Rudy, Early afterdepolarizations in cardiac myocytes: mechanism and rate dependence. *Biophys J*, 1995. 68(3): p. 949-64.
42. Muth, J.N., et al., A Ca^{2+} -dependent transgenic model of cardiac hypertrophy: A role for protein kinase Ca^{α} . *Circulation*, 2001. 103(1): p. 140-7.
43. Schröder, F., et al., Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation*, 1998. 98(10): p. 969-76.
44. Zhang, Q., et al., Mutations in voltage-gated L-type calcium channel: implications in cardiac arrhythmia. *Channels (Austin)*, 2018. 12(1): p. 201-218.
45. Satin, J. and E.A. Schroder, Autoregulation of cardiac L-type calcium channels. *Trends Cardiovasc Med*, 2009. 19(8): p. 268-71.
46. Angelini, M., et al., Suppression of ventricular arrhythmias by targeting late L-type Ca^{2+} current. *J Gen Physiol*, 2021. 153(12).
47. Katz, G., et al., Optimizing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia therapy in calsequestrin-mutant mice. *Heart Rhythm*, 2010. 7(11): p. 1676-82.
48. Hakamata, Y., et al., Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett*, 1992. 312(2-3): p. 229-35.
49. Serysheva, II, Structural insights into excitation-contraction coupling by electron cryomicroscopy. *Biochemistry (Mosc)*, 2004. 69(11): p. 1226-32.
50. Takeshima, H., et al., Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature*, 1989. 339(6224): p. 439-45.

51. Zhang, L., et al., Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, 1997. 272(37): p. 23389-97.
52. Meissner, G., Evidence of a role for calmodulin in the regulation of calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry*, 1986. 25(1): p. 244-51.
53. Marx, S.O., et al., Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *J Cell Biol*, 2001. 153(4): p. 699-708.
54. Witcher, D.R., et al., Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem*, 1991. 266(17): p. 11144-52.
55. Yoshida, A., et al., Phosphorylation of ryanodine receptors in rat myocytes during beta-adrenergic stimulation. *J Biochem*, 1992. 111(2): p. 186-90.
56. Wuytack, F., L. Raeymaekers, and L. Missiaen, Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium*, 2002. 32(5-6): p. 279-305.
57. Dally, S., et al., Multiple and diverse coexpression, location, and regulation of additional SERCA2 and SERCA3 isoforms in nonfailing and failing human heart. *J Mol Cell Cardiol*, 2010. 48(4): p. 633-44.
58. Vangheluwe, P., et al., Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. *Cell Calcium*, 2005. 38(3-4): p. 291-302.
59. Stokes, D.L., Keeping calcium in its place: Ca(2+)-ATPase and phospholamban. *Curr Opin Struct Biol*, 1997. 7(4): p. 550-6.
60. Kirchberger, M.A., M. Tada, and A.M. Katz, Phospholamban: a regulatory protein of the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab*, 1975. 5: p. 103-15.
61. Simmerman, H.K., et al., Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem*, 1986. 261(28): p. 13333-41.
62. MacLennan, D.H. and E.G. Kranias, Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(7): p. 566-77.

63. Luo, W., et al., Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res*, 1994. 75(3): p. 401-9.
64. Asahi, M., et al., Physical interactions between phospholamban and sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases are dissociated by elevated Ca^{2+} , but not by phospholamban phosphorylation, vanadate, or thapsigargin, and are enhanced by ATP. *J Biol Chem*, 2000. 275(20): p. 15034-8.
65. Tada, M., M.A. Kirchberger, and A.M. Katz, Regulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab*, 1976. 9: p. 225-39.
66. Cornea, R.L., et al., Mutation and phosphorylation change the oligomeric structure of phospholamban in lipid bilayers. *Biochemistry*, 1997. 36(10): p. 2960-7.
67. Maier, L.S., et al., Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca^{2+} handling: reduced SR Ca^{2+} load and activated SR Ca^{2+} release. *Circ Res*, 2003. 92(8): p. 904-11.
68. Gray, C.B. and J. Heller Brown, CaMKII δ subtypes: localization and function. *Front Pharmacol*, 2014. 5: p. 15.
69. Luczak, E.D. and M.E. Anderson, CaMKII oxidative activation and the pathogenesis of cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol*, 2014. 73: p. 112-6.
70. Lai, Y., et al., Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II: identification of autophosphorylation sites responsible for generation of Ca^{2+} /calmodulin-independence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(16): p. 5710-4.
71. Meyer, T., et al., Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science*, 1992. 256(5060): p. 1199-202.
72. Stratton, M., et al., Activation-triggered subunit exchange between CaMKII holoenzymes facilitates the spread of kinase activity. *Elife*, 2014. 3: p. e01610.
73. Rosenberg, O.S., et al., Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme. *Cell*, 2005. 123(5): p. 849-60.
74. Yang, E. and H. Schulman, Structural examination of autoregulation of multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*, 1999. 274(37): p. 26199-208.
75. Mustroph, J., S. Neef, and L.S. Maier, CaMKII as a target for arrhythmia suppression. *Pharmacol Ther*, 2017. 176: p. 22-31.

76. Maier, L.S. and D.M. Bers, Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Cardiol*, 2002. 34(8): p. 919-39.
77. Maier, L.S. and D.M. Bers, Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res*, 2007. 73(4): p. 631-40.
78. Wagner, S., et al., Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na⁺ channels. *J Clin Invest*, 2006. 116(12): p. 3127-38.
79. Neef, S., et al., While systolic cardiomyocyte function is preserved, diastolic myocyte function and recovery from acidosis are impaired in CaMKII δ -KO mice. *J Mol Cell Cardiol*, 2013. 59: p. 107-16.
80. Marx, N.E., E., *Klinische Kardiologie. Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße. Vol. 9.* 2023: Springer.
81. Eckart, R.E., et al., Sustained ventricular tachycardia associated with corrective valve surgery. *Circulation*, 2007. 116(18): p. 2005-11.
82. Vaseghi, M., et al., Outcomes of Catheter Ablation of Ventricular Tachycardia Based on Etiology in Nonischemic Heart Disease: An International Ventricular Tachycardia Ablation Center Collaborative Study. *JACC Clin Electrophysiol*, 2018. 4(9): p. 1141-1150.
83. Anter, E., et al., Infarct-Related Ventricular Tachycardia: Redefining the Electrophysiological Substrate of the Isthmus During Sinus Rhythm. *JACC Clin Electrophysiol*, 2018. 4(8): p. 1033-1048.
84. de Bakker, J.M., et al., Reentry as a cause of ventricular tachycardia in patients with chronic ischemic heart disease: electrophysiologic and anatomic correlation. *Circulation*, 1988. 77(3): p. 589-606.
85. Mitchell, L. <msdmanual_Ventrikuläre Tachykardie.pdf>. 2023; Available from: <https://www.msdmanuals.com/de/profi/herz-kreislauf-krankheiten/spezifische-herzrhythmusst%C3%B6rungen/ventrikul%C3%A4re-tachykardie-vt>.
86. Haïssaguerre, M., et al., Role of Purkinje conducting system in triggering of idiopathic ventricular fibrillation. *Lancet*, 2002. 359(9307): p. 677-8.
87. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, H.-u.K.e.V., <2012_Pocket-Leitlinien_Vorhofflimmern.pdf>. 2012.
88. Benjamin, E.J., et al., Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation*, 1998. 98(10): p. 946-52.

89. Anter, E., M. Jessup, and D.J. Callans, Atrial fibrillation and heart failure: treatment considerations for a dual epidemic. *Circulation*, 2009. 119(18): p. 2516-25.
90. Wang, T.J., et al., Temporal relations of atrial fibrillation and congestive heart failure and their joint influence on mortality: the Framingham Heart Study. *Circulation*, 2003. 107(23): p. 2920-5.
91. Marrouche, N.F., et al., Catheter Ablation for Atrial Fibrillation with Heart Failure. *N Engl J Med*, 2018. 378(5): p. 417-427.
92. Willems, S., et al., Cabins, castles, and constant hearts: rhythm control therapy in patients with atrial fibrillation. *Eur Heart J*, 2019. 40(46): p. 3793-3799c.
93. Kirchhof, P., et al., Early Rhythm-Control Therapy in Patients with Atrial Fibrillation. *N Engl J Med*, 2020. 383(14): p. 1305-1316.
94. Packer, D.L., et al., Ablation Versus Drug Therapy for Atrial Fibrillation in Heart Failure: Results From the CABANA Trial. *Circulation*, 2021. 143(14): p. 1377-1390.
95. Prabhu, S., et al., Catheter Ablation Versus Medical Rate Control in Atrial Fibrillation and Systolic Dysfunction: The CAMERA-MRI Study. *J Am Coll Cardiol*, 2017. 70(16): p. 1949-1961.
96. Hunter, R.J., et al., A randomized controlled trial of catheter ablation versus medical treatment of atrial fibrillation in heart failure (the CAMTAF trial). *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2014. 7(1): p. 31-8.
97. Wijesurendra, R.S. and B. Casadei, Atrial fibrillation: effects beyond the atrium? *Cardiovasc Res*, 2015. 105(3): p. 238-47.
98. Fan, X., et al., Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII) Increases Small-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Current in Patients with Chronic Atrial Fibrillation. *Med Sci Monit*, 2018. 24: p. 3011-3023.
99. Zhang, R., et al., Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med*, 2005. 11(4): p. 409-17.
100. Vila-Petroff, M., et al., CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2007. 73(4): p. 689-98.
101. Salas, M.A., et al., The signalling pathway of CaMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 2010. 48(6): p. 1298-306.

102. He, B.J., et al., Oxidation of CaMKII determines the cardiotoxic effects of aldosterone. *Nat Med*, 2011. 17(12): p. 1610-8.
103. Singh, M.V., et al., MyD88 mediated inflammatory signaling leads to CaMKII oxidation, cardiac hypertrophy and death after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. 52(5): p. 1135-44.
104. Erickson, J.R., et al., A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell*, 2008. 133(3): p. 462-74.
105. Luo, M., et al., Diabetes increases mortality after myocardial infarction by oxidizing CaMKII. *J Clin Invest*, 2013. 123(3): p. 1262-74.
106. Hove-Madsen, L., et al., Atrial fibrillation is associated with increased spontaneous calcium release from the sarcoplasmic reticulum in human atrial myocytes. *Circulation*, 2004. 110(11): p. 1358-63.
107. Vest, J.A., et al., Defective cardiac ryanodine receptor regulation during atrial fibrillation. *Circulation*, 2005. 111(16): p. 2025-32.
108. Schwinger, R.H., et al., Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*, 1999. 31(3): p. 479-91.
109. Neef, S., et al., CaMKII-dependent diastolic SR Ca²⁺ leak and elevated diastolic Ca²⁺ levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation. *Circ Res*, 2010. 106(6): p. 1134-44.
110. Kass, R.S., et al., Role of calcium ions in transient inward currents and aftercontractions induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol*, 1978. 281: p. 187-208.
111. Voigt, N., et al., Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation*, 2012. 125(17): p. 2059-70.
112. Maier, L.S. and G. Hasenfuss, Role of [Na⁺]_i and the emerging involvement of the late sodium current in the pathophysiology of cardiovascular disease. *European Heart Journal Supplements*, 2006. 8(suppl_A): p. A6-A9.
113. Sossalla, S., G. Hasenfuss, and L.S. Maier, Inhibition des späten Natriumeinstroms (I_{Na,late}) als neuartige kardioprotektive Therapieoption. *Der Kardiologe*, 2008. 2(2): p. 142-148.

114. Undrovinas, A.I., I.A. Fleidervish, and J.C. Makielski, Inward sodium current at resting potentials in single cardiac myocytes induced by the ischemic metabolite lysophosphatidylcholine. *Circ Res*, 1992. 71(5): p. 1231-41.
115. Ward, C.A. and W.R. Giles, Ionic mechanism of the effects of hydrogen peroxide in rat ventricular myocytes. *J Physiol*, 1997. 500 (Pt 3)(Pt 3): p. 631-42.
116. Song, Y., et al., Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. 318(1): p. 214-22.
117. Ahern, G.P., et al., Induction of persistent sodium current by exogenous and endogenous nitric oxide. *J Biol Chem*, 2000. 275(37): p. 28810-5.
118. Valdivia, C.R., et al., Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart. *J Mol Cell Cardiol*, 2005. 38(3): p. 475-83.
119. Silverman, H.S. and M.D. Stern, Ionic basis of ischaemic cardiac injury: insights from cellular studies. *Cardiovasc Res*, 1994. 28(5): p. 581-97.
120. Antzelevitch, C. and W. Shimizu, Cellular mechanisms underlying the long QT syndrome. *Curr Opin Cardiol*, 2002. 17(1): p. 43-51.
121. Passman, R. and A. Kadish, Polymorphic ventricular tachycardia, long Q-T syndrome, and torsades de pointes. *Med Clin North Am*, 2001. 85(2): p. 321-41.
122. Priori, S.G., et al., Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*, 2001. 103(2): p. 196-200.
123. Sagawa, T., et al., Activation of cardiac ryanodine receptors by cardiac glycosides. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. 282(3): p. H1118-26.
124. Hasenfuss, G. and B. Pieske, Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 2002. 34(8): p. 951-69.
125. Hajjar, R.J., et al., Prospects for gene therapy for heart failure. *Circ Res*, 2000. 86(6): p. 616-21.
126. Marx, S.O., et al., PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*, 2000. 101(4): p. 365-76.

127. Hasenfuss, G., et al., Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation*, 1999. 99(5): p. 641-8.
128. Sipido, K.R., et al., Altered Na/Ca exchange activity in cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy? *Cardiovasc Res*, 2002. 53(4): p. 782-805.
129. Schwinger, R.H., et al., Reduced sodium pump alpha1, alpha3, and beta1-isoform protein levels and Na⁺,K⁺-ATPase activity but unchanged Na⁺-Ca²⁺ exchanger protein levels in human heart failure. *Circulation*, 1999. 99(16): p. 2105-12.
130. Bommer, T., et al., Simulation of cardiac arrhythmias in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One*, 2024. 19(9): p. e0310463.
131. Neher, E. and B. Sakmann, Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 1976. 260(5554): p. 799-802.
132. Sigworth, F.J. and E. Neher, Single Na⁺ channel currents observed in cultured rat muscle cells. *Nature*, 1980. 287(5781): p. 447-9.
133. Coleman L, C.H., Lynker M, McClintock P, Payne M, Shore S, Tipler P, Wiescher M, Dictionary of Physics. 2004: Macmillan.
134. Lakowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy. Vol. 3. 2010, New York: Springer.
135. Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien, A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 1985. 260(6): p. 3440-50.
136. Barreto-Chang, O.L. and R.E. Dolmetsch, Calcium imaging of cortical neurons using Fura-2 AM. *J Vis Exp*, 2009(23).
137. Pessah, I.N., R.A. Stambuk, and J.E. Casida, Ca²⁺-activated ryanodine binding: mechanisms of sensitivity and intensity modulation by Mg²⁺, caffeine, and adenine nucleotides. *Mol Pharmacol*, 1987. 31(3): p. 232-8.
138. Bassani, J.W., R.A. Bassani, and D.M. Bers, Twitch-dependent SR Ca accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 1993. 265(2 Pt 1): p. C533-40.
139. Abraham, M.R., et al., Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ Res*, 2005. 97(2): p. 159-67.

140. Arutunyan, A., et al., Localized injury in cardiomyocyte network: a new experimental model of ischemia-reperfusion arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. 280(4): p. H1905-15.
141. Bian, W. and L. Tung, Structure-related initiation of reentry by rapid pacing in monolayers of cardiac cells. *Circ Res*, 2006. 98(4): p. e29-38.
142. Landstrom, A.P., D. Dobrev, and X.H.T. Wehrens, Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias. *Circ Res*, 2017. 120(12): p. 1969-1993.
143. Moe, G.W. and P. Armstrong, Pacing-induced heart failure: a model to study the mechanism of disease progression and novel therapy in heart failure. *Cardiovasc Res*, 1999. 42(3): p. 591-9.
144. Tung, L. and Y. Zhang, Optical imaging of arrhythmias in tissue culture. *J Electrocardiol*, 2006. 39(4 Suppl): p. S2-6.
145. van Gorp, P.R.R., et al., Multicellular In vitro Models of Cardiac Arrhythmias: Focus on Atrial Fibrillation. *Front Cardiovasc Med*, 2020. 7: p. 43.
146. Clauss, S., et al., Animal models of arrhythmia: classic electrophysiology to genetically modified large animals. *Nat Rev Cardiol*, 2019. 16(8): p. 457-475.
147. Brachmann, J., et al., Atrial Fibrillation Burden and Clinical Outcomes in Heart Failure: The CASTLE-AF Trial. *JACC Clin Electrophysiol*, 2021. 7(5): p. 594-603.
148. Staerk, L., et al., Atrial Fibrillation: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Outcomes. *Circ Res*, 2017. 120(9): p. 1501-1517.
149. Zupan, I., et al., Tachycardia induced cardiomyopathy in dogs; relation between chronic supraventricular and chronic ventricular tachycardia. *Int J Cardiol*, 1996. 56(1): p. 75-81.
150. Pabel, S., et al., Effects of Atrial Fibrillation on the Human Ventricle. *Circ Res*, 2022. 130(7): p. 994-1010.
151. Körtl, T., et al., Atrial Fibrillation Burden Specifically Determines Human Ventricular Cellular Remodeling. *JACC Clin Electrophysiol*, 2022. 8(11): p. 1357-1366.
152. Kostin, S., et al., The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. *Heart Fail Rev*, 2000. 5(3): p. 271-80.
153. Marks, A.R., Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. *J Clin Invest*, 2013. 123(1): p. 46-52.

154. Wickenden, A.D., et al., The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure. *Cardiovasc Res*, 1998. 37(2): p. 312-23.
155. Sohns, C. and N.F. Marrouche, Atrial fibrillation and cardiac fibrosis. *Eur Heart J*, 2020. 41(10): p. 1123-1131.
156. Dzeshka, M.S., et al., Cardiac Fibrosis in Patients With Atrial Fibrillation: Mechanisms and Clinical Implications. *J Am Coll Cardiol*, 2015. 66(8): p. 943-59.
157. Dossdall, D.J., et al., Chronic atrial fibrillation causes left ventricular dysfunction in dogs but not goats: experience with dogs, goats, and pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013. 305(5): p. H725-31.
158. Avitall, B., et al., Atrial and ventricular fibrosis induced by atrial fibrillation: evidence to support early rhythm control. *Heart Rhythm*, 2008. 5(6): p. 839-45.
159. Müller-Edenborn, B., et al., Rapid improvement in left ventricular function after sinus rhythm restoration in patients with idiopathic cardiomyopathy and atrial fibrillation. *Europace*, 2019. 21(6): p. 871-878.
160. Lenski, M., et al., Arrhythmia causes lipid accumulation and reduced glucose uptake. *Basic Res Cardiol*, 2015. 110(4): p. 40.
161. Ling, L.H., et al., Irregular rhythm adversely influences calcium handling in ventricular myocardium: implications for the interaction between heart failure and atrial fibrillation. *Circ Heart Fail*, 2012. 5(6): p. 786-93.
162. Sossalla, S., et al., Inhibition of elevated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res*, 2010. 107(9): p. 1150-61.
163. Purohit, A., et al., Oxidized Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II triggers atrial fibrillation. *Circulation*, 2013. 128(16): p. 1748-57.
164. Viola, H.M., P.G. Arthur, and L.C. Hool, Transient exposure to hydrogen peroxide causes an increase in mitochondria-derived superoxide as a result of sustained alteration in L-type Ca^{2+} channel function in the absence of apoptosis in ventricular myocytes. *Circ Res*, 2007. 100(7): p. 1036-44.
165. Zorov, D.B., et al., Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med*, 2000. 192(7): p. 1001-14.

166. Zhou, L., et al., A reaction-diffusion model of ROS-induced ROS release in a mitochondrial network. *PLoS Comput Biol*, 2010. 6(1): p. e1000657.
167. Dybkova, N., et al., Differential regulation of sodium channels as a novel proarrhythmic mechanism in the human failing heart. *Cardiovasc Res*, 2018. 114(13): p. 1728-1737.
168. Wolfes, J. and L. Eckardt, [The 2024 ESC guidelines for management of atrial fibrillation : AF-CARE as new credo]. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol*, 2024.
169. Hindricks, G., et al., 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *Eur Heart J*, 2021. 42(5): p. 373-498.
170. Sohns, C., et al., Catheter Ablation in End-Stage Heart Failure with Atrial Fibrillation. *N Engl J Med*, 2023. 389(15): p. 1380-1389.
171. Calkins, H., et al., 2017 HRS/EHRA/ECAS/APHRS/SOLAECE expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, 2017. 14(10): p. e275-e444.
172. Sohns, C., et al., Impact of Left Ventricular Function and Heart Failure Symptoms on Outcomes Post Ablation of Atrial Fibrillation in Heart Failure: CASTLE-AF Trial. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2020. 13(10): p. e008461.
173. Waldmann, V., et al., Association Between Atrial Fibrillation and Sudden Cardiac Death: Pathophysiological and Epidemiological Insights. *Circ Res*, 2020. 127(2): p. 301-309.
174. Brignole, M., et al., AV junction ablation and cardiac resynchronization for patients with permanent atrial fibrillation and narrow QRS: the APAF-CRT mortality trial. *Eur Heart J*, 2021. 42(46): p. 4731-4739.
175. Wijesurendra, R.S., et al., Lone Atrial Fibrillation Is Associated With Impaired Left Ventricular Energetics That Persists Despite Successful Catheter Ablation. *Circulation*, 2016. 134(15): p. 1068-1081.

Veröffentlichungen

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde die Etablierung des Kulturstimulations-Modells veröffentlicht:

Simulation of cardiac arrhythmias in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, **Thea Bommer**, Maria Knierim, Julia Unsöld, Dominic Riedl, Laura Stengel, Michael Paulus, Thomas Körtl, Norman Liaw, Lars S Maier, Katrin Streckfuss-Bömeke, Samuel Sossalla, Steffen Pabel., PLOS One, 2024, doi: 10.1371/journal.pone.0310463. eCollection 2024.

Folgende Ko-Autorenschaften sind bisher veröffentlicht:

Inhibition of NaV 1.8 prevents atrial arrhythmogenesis in human and mice; Steffen Pabel, Shakil Ahmad, Petros Tirilomis, **Thea Stehle**, Julian Mustroph, Maria Knierim, Nataliya Dybkova, Philipp Bengel, Andreas Holzamer, Michael Hilker, Katrin Streckfuss-Bömeke, Gerd Hasenfuss, Lars S Maier, Samuel Sossalla, Basic Research in Cardiology, 2020, doi: 10.1007/s00395-020-0780-8.

Dantrolene reduces CaMKII δ C-mediated atrial arrhythmias: Steffen Pabel, Julian Mustroph, **Thea Stehle**, Simon Lebek, Nataliya Dybkova, Andreas Keyser, Leopold Rupprecht, Stefan Wagner, Stefan Neef, Lars S Maier, Samuel Sossalla; Europace, 2020, doi: 10.1093/europace/euaa079.

Empagliflozin Inhibits Cardiac Late Sodium Current by Ca/Calmodulin-Dependent Kinase II, Julian Mustroph #, Maria J Baier #, Steffen Pabel, **Thea Stehle**, Maximilian Trum, Zdenek Provaznik, Peter J Mohler, Hassan Musa, Thomas J Hund, Samuel Sossalla, Lars S Maier, Stefan Wagner, Circulation 2022, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.122.057364. Epub 2022 Oct 17.

Effects of Atrial Fibrillation on the Human Ventricle, Steffen Pabel, Maria Knierim, **Thea Stehle**, Felix Alebrand, Michael Paulus, Marcel Sieme, Melissa Herwig, Friedrich Barsch, Thomas Körtl , Arnold Pöppel, Brisca Wenner, Senka Ljubojevic-Holzer, Cristina E Molina, Nataliya Dybkova, Daniele Camboni, Thomas H Fischer, Simon Sedej, Daniel Scherr, Christof Schmid, Christoph Brochhausen, Gerd Hasenfuß, Lars S Maier, Nazha Hamdani, Katrin Streckfuss-Bömeke, Samuel Sossalla, Circulation Research, 2022, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.319718. Epub 2022 Feb 23

Atrial Fibrillation Burden Specifically Determines Human Ventricular Cellular Remodeling, Thomas Körtl, **Thea Stehle**, Dominic Riedl, Johanna Trausel, Sabine Rebs, Steffen Pabel, Michael Paulus, Andreas Holzamer, Nassir Marrouche, Lars S Maier, Christian Sohns, Katrin Streckfuss-Bömeke, Samuel Sossalla, JACC: Clinical Electrophysiology, 2022, doi: 10.1016/j.jacep.2022.07.016. Epub 2022 Sep 28.

Cellular calcium handling and electrophysiology are modulated by chronic physiological pacing in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, Maria Knierim, **Thea Bommer**, Michael Paulus, Dominic Riedl, Sarah Fink, Arnold Pöppel, Florian Reetz, Peter Wang, Lars Maier, Niels Voigt, Matthias Nahrendorf, Samuel Sossalla, Katrin Streckfuss-Bömeke, Steffen Pabel, AJP Heart, 2024, doi: 10.1152/ajpheart.00536.2024.

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Thea Bommer (geb. Stehle), geboren am 07.12.1994 in Augsburg, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater*in oder andere Personen) in Anspruch genommen.

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

Ort, Datum

eigenhändige Unterschrift der Promovendin