Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Science

Auswirkungen proarrhythmischer Substanzen auf einen spannungsabhängigen Fluoreszenzsensor in Engineered Heart Tissues

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von
Assia Boukhobza
[redacted]

Hamburg
am 31. Januar 2025

1. Gutachter:	Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker (HAW Hamburg)
2. Gutachter:	Prof. Dr. med. Arne Hansen (UKE Hamburg)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor des Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

Vorwort

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine Abschlussarbeit des Bachelorstudiengangs Biotechnologie der Hochschule für Angewandte Wissenschaften (HAW) Hamburg. Vor Beginn meiner Bachelorarbeit habe ich in der Arbeitsgruppe „Tissue Engineering und Stammzellen“, geleitet von Prof. Dr. med. Arne Hansen im Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf mit Engineered Heart Tissues (EHTs) gearbeitet. Dort konnte ich Erfahrungen in der Zellkultur- und Stammzelltechnik sammeln. Im November habe ich dann mit meiner Bachelorarbeit in der Arbeitsgruppe Hansen begonnen.

Die Arbeitsgruppe befasst sich mit der Optimierung von EHTs als Modell für Toxizitätsbewertungen, die Erforschung von Krankheitsmechanismen und therapeutische Ansätze. Durch die Integration innovativer Technologien wie CRISPR/Cas9, genetisch kodierter Sensoren und automatisierter Analysen findet die EHT-Technologie Anwendung in der kardiovaskulären Forschung und der Entwicklung therapeutischer Ansätze.

Die vorliegende Bachelorarbeit behandelt die Anwendung von 3D-Engineered Heart Tissues zur Analyse der konzentrationsabhängigen Effekte proarrhythmischer Substanzen auf Kontraktion und Fluoreszenzintensität, die als Surrogat für das kardiale Aktionspotential dienen. Damit soll ein Beitrag zur Validierung der EHT-Technologie als prädiktives *in vitro* Modell für proarrhythmische Risikobewertungen geleistet werden.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mich während der Erstellung meiner Bachelorarbeit unterstützt und begleitet haben. Zuerst gilt mein Dank Prof. Dr. med. Arne Hansen der mich in seiner Arbeitsgruppe im Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf aufgenommen und mit seiner fachlichen Expertise und konstruktiven Rückmeldungen stets zur Seite stand und mich während des gesamten Prozesses unterstützt hat.

Besonders möchte ich mich herzlich bei meiner Laborbetreuerin Dr. Umber Saleem bedanken, die mir während meiner Zeit im Institut stets ihr Vertrauen entgegengebracht hat. Sie stand mir bei den Experimenten und Auswertungen mit Rat und Tat zur Seite und führte mich umfassend in das Projekt ein.

Ich bedanke mich bei Thomas Schulze und Birgit Klampe für die Einführung in die Zellkulturtechnik. Auch möchte ich mich beim gesamten Institut für die kollegiale Atmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker als mein Erstgutachter, danke ich für die unterstützende Betreuung und die Begutachtung meiner Bachelorarbeit.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis I

Abbildungsverzeichnis II

Tabellenverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1 Zielsetzung 6

2 Material und Methoden 7

2.1 Material 7

2.1.1 Medien 7

2.1.2 Geräte und Hilfsmittel 7

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien 8

2.1.4 Wirkstoffe der CiPA-Studie 8

2.1.5 Zellen 8

2.1.6 Sensor 9

2.2 Methoden 10

2.2.1 EHT-Generierung (Casting) 10

2.2.2 Transduktion 12

2.2.3 Kraft- und Fluoreszenzmessung 12

2.2.4 E-4031: Vorversuch 15

2.2.5 Drug Screening 16

2.2.6 Statistische Auswertung 17

3 Ergebnisse 18

3.1 Vorversuch: E-4031 18

3.2 Drug Screenings der CiPA-Wirkstoffe 19

4 Diskussion 28

4.1 Vorversuch: E-4031 28

4.2 Drug Screenings der CiPA-Wirkstoffe 28

5 Zusammenfassung 33

6 Literaturverzeichnis 34

7 Eidesstattliche Erklärung 39

Abkürzungsverzeichnis

BL	Baseline
bpm	beats per minute
CiPA	Comprehensive In Vitro Proarrhythmia Assay
CiVS	Ciona intestinalis voltage sensor
CM	Cardiomyocyte
cTnT	kardialer Troponin-T-Gehalt
C_{max}	Maximum observed plasma concentration / maximale Plasmakonzentration
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DT	Decay Time / Repolarisationszeit
EHT	Engineered Heart Tissue
EKG	Elektrokardiogramm
FI	Fluorescence intensity / Fluoreszenzintensität
FP	Fluoreszenzprotein
GEVI	Genetically encoded voltage indicator
GFP	Green Fluorescent Protein
hERG	Human ether-a-go-go Related Gene
hiPSC	Human induced pluripotent stem cell / Humane induzierte Pluripotente Stammzelle
IC_{50}	Half-max. inhibitory concentration / mittlere inhibitorische Konzentration
I_{Kr}	schnell aktivierender verzögerter Gleichrichter-Kaliumstrom
MOI	Multiplicity of Infection / Anzahl der Viruspartikel pro Zelle
PDMS	Polydimethylsiloxan
PMT	Photomultiplier
RT	Relaxation Time / Relaxationszeit
ssAAV	single stranded Adeno-assoziierte Viren
TdP	Torsade de Pointes
TTP	Time to peak
$TTP_{-80\%,force}$	Time to Peak / Kontraktionszeit
$TTP_{-80\%,FI}$	Time to Peak / Zeit von 20 % bis zum 100 %-Fluoreszenzmaximum
TVC	Time and Vehicle Control / Zeit-Vehikel-Kontrolle

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf des ventrikulären Aktionspotentials (schwarz), Ca^{2+}-Transienten (blau) und Kontraktion (rot).[2] 2
Abbildung 2: Schematische Visualisierung der Mechanismen spannungsbedingter Fluoreszenzänderungen von ArcLight.. 5
Abbildung 3: EHT-Generierung. 11
Abbildung 4: Darstellung der optischen Pfade für den grünen Fluoreszenzkanal. .. 13
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Parameter zur Analyse von Kraft- und Fluoreszenzzeit-Kurven..... 14
Abbildung 6: Effekt von E-4031 (100 nM) auf die Kontraktionskraft und die Fluoreszenzintensität von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor 18
Abbildung 7: Konzentrationsabhängige Effekte von Loratadin von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor..... 19
Abbildung 8: Konzentrationsabhängige Effekte von Verapamil von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor. 20
Abbildung 9: Konzentrationsabhängige Effekte von Metoprolol von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor. 21
Abbildung 10: Konzentrationsabhängige Effekte von Astemizol von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor. 22
Abbildung 11: Konzentrationsabhängige Effekte von Ondansetron von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor.. ... 23
Abbildung 12: Konzentrationsabhängige Effekte von Pimozid von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor..... 24
Abbildung 13: Konzentrationsabhängige Effekte von Chinidin von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor..... 25
Abbildung 14: Konzentrationsabhängige Effekte von Vandetanib von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor. 26
Abbildung 15: Konzentrationsabhängige Effekte von Dofetilid von mit 2 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor..... 27

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettieransatz für EHT-Mastermix aller Komponenten, Stammkonzentration und Arbeitskonzentration für ein EHT und für eine vollständige Zellkulturschale mit 24 EHTs + 10%. 10

Tabelle 2: Berechnung des benötigten Virusvolumens pro EHT für nachträgliche Transduktion (PCT) für die MOIs $3{,}0 \times 10^4$ und $1{,}0 \times 10^5$ 12

Tabelle 3: Voreingestellte Parameter zur Identifizierung der Kontraktions- und Fluoreszenzpeaks humaner EHTs. 14

Tabelle 4: Übersicht der Wirkstoffe, Wirkmechanismus, C_{max} und hERG IC_{50}-Werte kategorisiert in ihre TdP-Risikogruppen. 16

Tabelle 5: Prozentuale Effekte der Substanzen auf die Kontraktionskraft und das Aktionspotenzial von EHTs. 28

1 Einleitung

Kardiale Sicherheitsbedenken sind einer der Hauptgründe für den Rückruf von Arzneimitteln, die auf dem Markt erhältlich sind, als auch in allen Phasen von klinischen Studien. Dies verdeutlicht, dass die Erforschung der molekularen Ursachen von Kardiotoxizität weiterhin von großer Bedeutung ist. Herausforderungen, die dabei entstehen sind zum einen, das große Spektrum der Kardiotoxizität, welches von Arrhythmien bis zu terminaler Herzinsuffizienz reicht. Ebenso hängt die Intensität der unerwünschten Arzneimittelwirkungen von Patienten-spezifischen Faktoren ab, was die Suche nach zugrunde liegenden Mechanismen verkompliziert. Ein hohes Sicherheitsrisiko stellt die Möglichkeit dar, potenziell tödliche Arrhythmien auszulösen, welche durch die direkte Interaktion mit der kardialen Elektrophysiologie hervorgerufen werden können.[1]

Das kardiale Aktionspotenzial (AP) ist die Grundlage der elektrischen Aktivität wie auch der Kontraktion des Herzens und wird durch den gezielten Ein- und Ausstrom von Ionen über spezialisierte Kanäle in den Membranen der Kardiomyozyten reguliert.

Zu Beginn befindet sich das Membranpotential im Ruhezustand bei etwa -90 mV. Wird der Schwellenwert des Membranpotentials überschritten, wird die Depolarisation ausgelöst. Dabei öffnen sich spannungsabhängige Natriumkanäle, was zu einem schnellen Einstrom von Natriumionen (Na^+) in die Zelle führt. Das Membranpotential verschiebt sich daraufhin in den positiven Bereich. Die anschließende Plateauphase ist durch den Einstrom von Calciumionen (Ca^{2+}) über spannungsabhängige L-Typ-Ca^{2+}-Kanäle gekennzeichnet. Anschließend folgt der Ausstrom von Kaliumionen, die die Repolarisation einleiten und das Membranpotential wieder in Richtung Ruhepotential senkt.[2,3]

Der Ca^{2+}-Einstrom während der Plateauphase spielt eine zentrale Rolle bei der Kopplung zwischen elektrischer Erregung und mechanischer Kontraktion. Der Ca^{2+}-Einstrom führt zur Calcium-induzierten Calciumfreisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum. Die Calciumionen binden an Troponin C, was zur Konformationsänderung führt, wodurch die Muskelkontraktion eingeleitet wird. Die Entfernung von Ca^{2+} durch Na^+/Ca^{2+}-Austauscher und anderen Transportmechanismen führt zur Relaxation des Herzmuskels.[2,3]

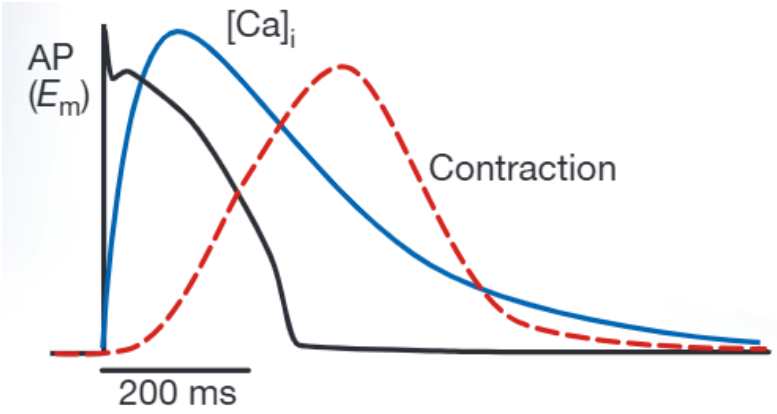

Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf des ventrikulären Aktionspotentials (schwarz), Ca^{2+}-Transienten (blau) und Kontraktion (rot).[2]

Die Blockierung des Ionenflusses durch Medikamente kann das Aktionspotenzial stören und dadurch arzneimittelinduzierte ventrikuläre Arrhythmien auslösen.[4]

Eine lebensgefährliche Variante der ventrikulären Arrhythmien ist „Torsade de Pointes“ (TdP), welche zum plötzlichen Herztod führen kann. Dies wird häufig durch Hemmung des spannungsabhängigen Kv11.1 Kaliumkanals, der durch hERG (engl. *human ether-a-go-go related gene*) kodiert wird, ausgelöst. Die Hemmung der hERG-Kanäle führt zur Reduktion des schnell aktivierenden, verzögerten Kaliumstroms (I_{Kr}), was zur Verlängerung der Repolarisationsphase des AP und der QT-Zeit im Echokardiogramm (EKG) führt und wiederum zur TdP führen kann.[4]

Um die Repolarisation und mögliche proarrhythmische Effekte zu untersuchen, wird häufig die Substanz E-4031 in der Forschung verwendet.[5] E-4031 ist ein selektiver hERG-Kanalblocker, welcher zur Familie der Methansulfonanilide gehört.[5,6] Die Blockierung der hERG-Kanäle verlängert die Repolarisationszeit und steigert das Risiko für proarrhythmische Effekte.[5]

Um kardiotoxische Effekte bei Arzneimittel zu untersuchen, werden Tiermodelle verwendet, welche elektrophysiologische Mechanismen des menschlichen Herzens simulieren sollen. Durch unterschiedliche physiologische Mechanismen zwischen Menschen und Tieren können Ergebnisse aus Tiermodellen nicht vollständig auf Menschen übertragen werden. Ein menschliches Modell mit genauerer präklinischen Kardiotoxizität wäre für die Arzneimittelentwicklung von Vorteil. Hierfür bieten sich humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) an, welche zu Kardiomyozyten (CM) differenziert werden können. HiPSC-CM besitzen einen

humanen genetischen Hintergrund, exprimieren zahlreiche herzspezifischer Gene und weisen physiologische Merkmale humaner Kardiomyozyten auf.[7]

Die Comprehensive *in vitro* Proarrhythmia Assay (CiPA)-Studie validiert hiPSC-CM als Modell zur proarrhythmischen Risikobewertung von Medikamenten. Hierfür wurden verblindete Tests mit 28 Substanzen unterschiedlicher TdP-Risikogruppen an zehn unterschiedlichen Versuchsstandorten durchgeführt. Dabei wurde nicht nur die Wirkung von Substanzen auf den hERG-Kanal überprüft, sondern auch auf weitere kardiale Ionenkanäle, die an der Repolarisation des AP beteiligt sind. Zur Analyse wurde mit Multielektrodenarrays und Spannungsindikatoren gearbeitet. Die Ergebnisse, die mit unterschiedlichen Testsystemen, Zelllinien und an verschiedenen Standorten durchgeführt wurden, zeigten große Variabilität.[8] Trotz dessen unterstreicht die Studie das Potential von hiPSC-CM als Modell für die proarrhythmische Risikobewertung, insbesondere als Alternative zu Tier- oder Primärzellmodellen. Diese Technologie könnte dazu beitragen, kardiovaskuläre Sicherheitsbewertungen in der Arzneimittelentwicklung zu verbessern.[7–9]

HiPSC-CM sind im Vergleich zu adulten Kardiomyozyten unreifer, was sich in deutlichen Unterschieden der Morphologie, der Kontraktilität und der Elektrophysiologie zeigt, wodurch sie auch unterschiedlich auf Wirkstoffe reagieren.[10] Um eine verbesserte Zellreifung der hiPSC-CM zu erhalten, kann ein dreidimensionales Fibrin basiertes Herzgewebestreifen aus einzelnen Kardiomyozyten hergestellt werden, welche als Engineered Heart Tissue (EHT) bezeichnet wird. Die EHTs bilden nach wenigen Tagen zelluläre Netzwerke und weisen auxotone Kontraktion auf, welche über mehre Wochen hinweg beobachtet werden kann. Dieses *in vitro* Model, kann im 24-Well-Format kultiviert werden, reagiert auf physiologische sowie auf pharmakologische Stimulationen.[11]

Dies unterstreicht das Potenzial der EHTs für Medikamentenscreenings (Drug Screenings), die Modellierung von Krankheiten, welche ihre vielversprechende Eignung in diesen Bereichen belegen.[10,11] Die beschriebene Verlängerung des QT-Intervalls des EKGs durch Arzneimittel, wird als Marker zur Einschätzung von TdP verwendet. Dies kann unter anderem durch Messung des AP geschehen, da das QT-Intervall die Dauer des ventrikulären Aktionspotenzials darstellt.[12,13] Eine häufig verwendete Methode ist das Patch-Clamp-Verfahren, welche eine präzise jedoch

zeitaufwendige Methode ist.[14] Eine Alternative bieten genetisch kodierte Spannungssensoren (engl. Genetically Encoded Voltage Indicator, GEVI).

Hierfür werden Zellen mit GEVI, wie dem ArcLight A242 Sensor mittels Adeno-assoziierten Viren (AAV) transduziert, wobei die Änderung der Fluoreszenzintensität des Sensors als Surrogat für das Aktionspotential dient. ArcLight basiert auf der Fusion des *Ciona intestinalis* Spannungssensors (CiVS) und des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) super ecliptic pHluorin, welches eine Punktmutation an der Aminosäureposition A227D trägt.[15,16] Durch diese Mutation erhält das fluoreszierende Protein (FP) eine negative Ladung an der Außenseite der *β*-can Struktur, was zu einer 15-fachen Erhöhung des Fluoreszenzsignals führt.[17] Die fluoreszierende Proteindomäne sitzt im Zytoplasma und ist mit einer spannungsempfindlichen Vier-Transmembran-Domäne in der Plasmamembran gekoppelt. Der Sensor verändert seine Fluoreszenz durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Molekülen und wandelt so Transienten im Membranpotenzial in Änderungen der Fluoreszenzintensität um.[17] Die Expression des ArcLight A242 Sensors wird durch den Kardiomyozyten-spezifischen Troponin-T-(Tnt)-Promotor gesteuert und mithilfe von einzelsträngigen Adeno-assoziierten Viren (ssAAV) in die Zellen gebracht. Die Ursachen für die beobachteten Fluoreszenzänderungen infolge von Spannungsänderungen sind noch nicht umfassend erforscht, können jedoch durch zwei Erklärungsansätze beschrieben werden (Abbildung 2 A).

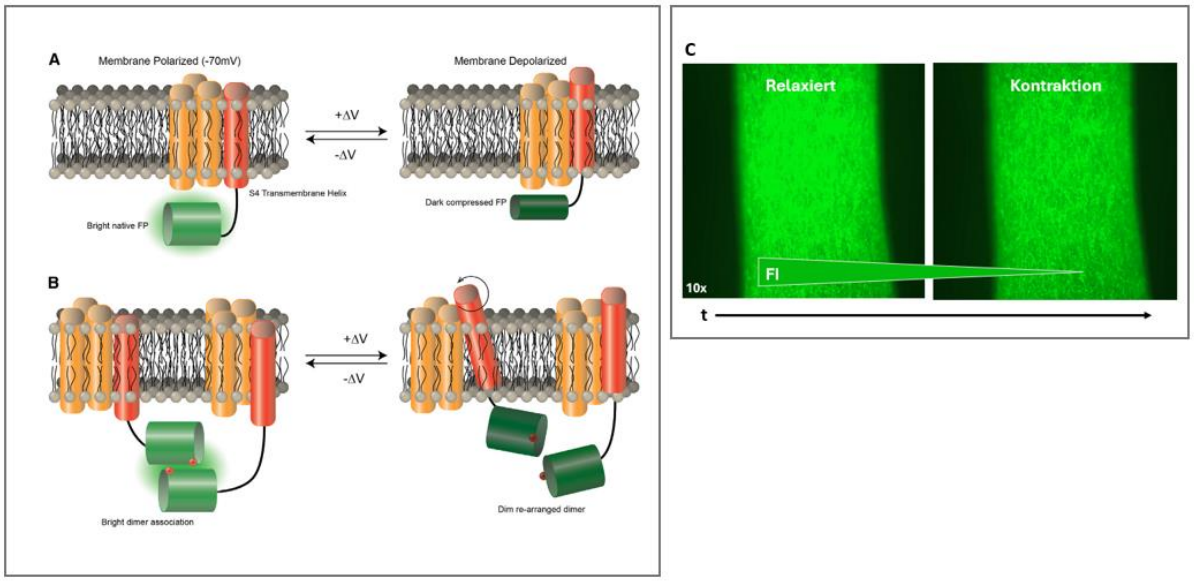

Abbildung 2: Schematische Visualisierung der Mechanismen spannungsbedingter Fluoreszenzänderungen von ArcLight. (A) Abschwächung der Fluoreszenz durch Veränderung der *β*-can-Struktur und der Chromophorumgebung bei Depolarisation.[17] (B) Dimerisierungsmodell. Fluoreszenzänderung durch Verschiebung negativer Ladungen am Chromophor und Änderungen der Polarität bei Spannungsschwankungen.[17] (C) Fluoreszenzbild eines EHTs bei einer MOI von 30.000 unter Relaxation und Kontraktion. Die Fluoreszenzintensität (FI) nimmt während der Kontraktion ab. Vergrößerung: 10x.

Ein mögliches Erklärungsmodell zur spannungsabhängigen optischen Reaktion des ArcLight Sensors ist der Kompressionsmechanismus. Dabei kommt es während der Depolarisation zur Kompression der FP-Domäne gegen die Plasmamembran. Dies führt zur Strukturänderung des FP, was eine Abschwächung der Fluoreszenz bewirken soll.[17]

Das Dimerisierungsmodell**,** das zweite Modell, bietet eine alternative Erklärung: Hier stehen elektrostatische Wechselwirkungen zwischen benachbarten FP-Domänen im Mittelpunkt, wobei die Position der negativen Ladung auf der *β*-can-Struktur entscheidend ist. Eine Neupositionierung der negativen Ladung führt zu einer Umkehr der Polarität der optischen Reaktion. Die Position der negativen Ladung bestimmt demnach, ob die Fluoreszenz bei einer Depolarisation heller oder dunkler wird.[17]

Zusammenfassend bieten EHTs in Verbindung mit dem Spannungssensor ArcLight A242 ein innovatives und vielversprechendes Modell, das für die präklinische Analyse proarrhythmischer Risiken verwendet werden kann. Diese Arbeit baut auf diesen Grundlagen auf und untersucht die Anwendbarkeit dieses Modells.

1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist sowohl die Generierung und Transduktion von EHTs mit dem ArcLight A242 Spannungssensor als auch die Analyse konzentrationsabhängiger Effekte proarrhythmischer Substanzen auf die Kontraktion und Fluoreszenzintensität, die als Surrogat für das kardialen Aktionspotentials dient. Zur Validierung des EHT-Systems als prädiktives *in vitro* Modell zur Erkennung proarrhythmischer Effekte werden jeweils drei Substanzen aus jeder TdP-Risikogruppe der CiPA-Studie verwendet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die nachfolgenden Tabellen geben eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Materialien.

2.1.1 Medien

Medium	Komposition
EHT-Kulturmedium	DMEM Pferdeserum 10 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 1 % (v/v) Insulin 0,1 % (10 mg/mL) Aprotinin 0,1 % (33 µg/mL) Tranexamsäure 0,25 % (v/v)
EHT-Gießmedium (NKM)	DMEM Pferdeserum 10 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 1 % (v/v) Y-27632 1 % (v/v) L-Glutamin 1 %

2.1.2 Geräte und Hilfsmittel

Name	Hersteller
Zellkulturplatten 24-Well-Format	Eppendorf
EHT Pacing Platten	EHT Technologies GmbH
EHT PDMS Posts	EHT Technologies GmbH
EHT PTFE Spacer	EHT Technologies GmbH
WhiteBox (Videooptisches EHT-Analysegerät)	EHT-Technologies GmbH
Konische Zentrifugenröhrchen,15 mL und 50 mL	Corning
Neubauerzählkammer	Karl-Hecht KG
Serologische Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt
Nitril Handschuhe	WRP
Sterilfilter 0,2 µm	Sarstedt
Zentrifuge	Eppendorf
Mikroskop ECLIPSE TS100	Nikon
Fluoreszenzmikroskop	Nikon
Inkubator	Sanyo
Sicherheitswerkbank	Heraeus
Vortex	Dermagrip
Eismaschine Scotman AF-10	Scotsman Ice System
Pipetboy	Integra biosciences
Analyse Software	EHT-Technologies
Analysenwaage	Sartorius

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
10x DMEM	Gibco
Agarose	Invitrogen
Aprotinin	Sigma-Aldrich
DMSO	Sigma-Aldrich
E-4031	Sigma-Aldrich
Fibrinogen	Sigma-Aldrich
FluoroBrite™ DMEM	Gibco
Insulin	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Steriles Aqua	B. Braun
Thrombin	Sigma-Aldrich
Trypan blau	Gibco
Y-27632	Biozol

2.1.4 Wirkstoffe der CiPA-Studie

Wirkstoff	Hersteller
Verapamil	Tocris
Metoprolol	Sigma-Aldrich
Loratadin	Sigma-Aldrich
Ondansetron	Sigma-Aldrich
Astemizol	Tocris
Pimozid	Sigma-Aldrich
Chinidin	Sigma-Aldrich
Vandetanib	Tocris
Dofetilid	Tocris

2.1.5 Zellen

Zelllinie	Organismus	Herkunft
ERC001	Human	Institut für experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, UKE

2.1.6 Sensor

Name	Batch	Herkunft
ssAAV6Tnt-ArcLight A242	VC879-1	Vektorielle Einrichtung des Instituts für experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, UKE

2.2 Methoden

2.2.1 EHT-Generierung (Casting)

Die Generierung von humanen Engineered Heart Tissues (EHTs) erfolgt gemäß einer standardisierten Arbeitsanweisung (Standard Operating Procedure, SOP), welche im Folgenden erläutert wird. Die Herstellung der EHTs wird in 24-Well-Platten durchgeführt, wobei jedes Well ein einzelnes EHT enthält. Für die Generierung eines EHTs werden $1{,}0 \times 10^6$ Kardiomyozyten benötigt, die aus hiPSC differenziert wurden.

Frisch dissoziierte hiPSC-CM wurden zunächst mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt und anschließend 6 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, und das Zellpellet in gekühltem EHT-Gießmedium (NKM; bestehend aus DMEM, 10 % Pferdeserum, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Y- 27632 und 1 % L-Glutamin) resuspendiert. Die Zellen sowie das NKM wurden auf Eis gelagert.

Bei der Verwendung von kryokonservierten Zellen wurde ein Troponin-T-Gehalt (cTnT) von mindestens 60 % als Qualitätskriterium festgelegt. Das Kryogefäß wurde im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend in einem 50-mL-Falcon-Tube gepoolt. Zur graduellen Stabilisierung der Osmolarität wurden tröpfchenweise etwa 3 mL DMEM hinzugefügt, bevor das Volumen auf 40 mL aufgefüllt wurde. Die Zellen wurden bei 200 x g für 6 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt, und das Zellpellet in einer definierten Menge DMEM resuspendiert. Nach der Zellzählung wird der weitere Verlauf wie oben beschrieben fortgesetzt.

Tabelle 1: Pipettieransatz für EHT-Mastermix aller Komponenten, Stammkonzentration und Arbeitskonzentration für ein EHT und für eine vollständige Zellkulturschale mit 24 EHTs + 10%.

	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration	1 EHT [µL]	24 EHTs + 10 % [µL]
Anzahl iPSC-CM			$1{,}0 \times 10^6$	$26{,}4 \times 10^6$
NKM			88,90	2346,96
2x DMEM		2 x	5,50	145,20
Y-27632	100 %	0,10 %	0,10	2,64
Fibrinogen	200 mg/mL	5 mg/mL	2,50	66,00
Thrombin	100 U/mL	3 U/mL	3,00	79,20
Summe aller Komp.			11,10	293,04
Volumen total			100,00	2640,00

Eine sterile 24-Well-Platte wurde mit 1,5 mL warmer zweiprozentige Agaroselösung pro Well gefüllt und Spacer aus weißem Teflon eingesetzt, welche als Platzhalter für die EHTs dienten, Abbildung 3 A. Anschließend wurde der Mastermix wie in Tabelle 1 beschrieben vorbereitet, wobei die berechnete Menge Fibrinogen zum Schluss hinzugefügt wurde. Der Mastermix wurde resuspendiert, bis das Fibrinogen vollständig gelöst war. Nachdem die Agarose erstarrt war (ca. 10 Minuten), wurden die Spacer entfernt und Polydimethylsiloxane (PDMS) Halterungen auf die 24-Well-Schale positioniert, so dass die PDMS-Posts in die Agarosevertiefungen ragten. Aus dem Mastermix wurden 100 µL entnommen, mit 3 µL Thrombin vermischt und in die Agarosevertiefungen pipettiert. Dieser Vorgang wurde für alle 24-Wells wiederholt. Die 24-Well-Platte wurde bei 37 °C, 7 % CO_2, 40 % O_2 und 98 % relativer Feuchtigkeit für 1,5 Stunden inkubiert.

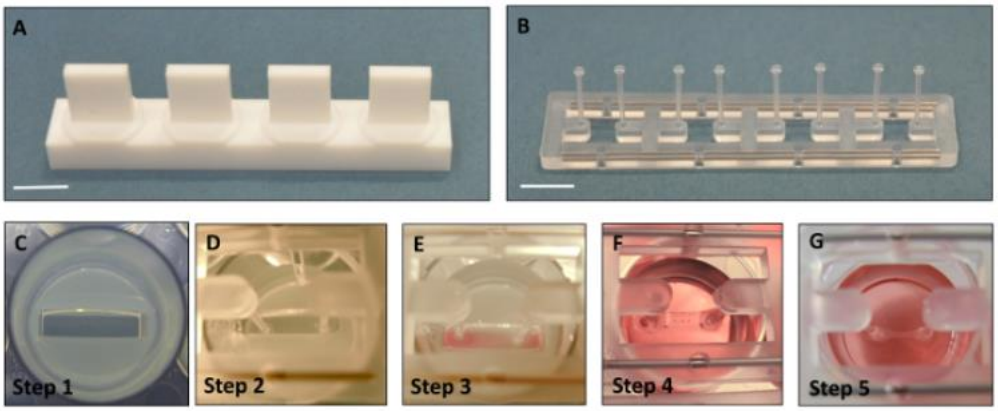

Abbildung 3: EHT-Generierung. (A) PTFE Spacer. (B) Silikon-Gestell. (C) Vertiefung einer 24-Well-Platte mit Gussform in Agarose nach Entfernung des PTFE Spacer. (D) Silikongestell in der Vertiefung. (E) Mastermix in Well. (F) EHT am Tag 0. (G) EHT am Tag 15.[11]

Nach dem das Fibringel an den PDMS-Posts gebildet hatte, wurden die Wells mit etwa 300 µL DMEM beschichtet und für weitere 10 min inkubiert. Währenddessen wurde eine neue 24-Well-Platte mit frischem EHT-Kulturmedium vorbereitet. Nach der Inkubationszeit werden die PDMS-Halterungen, welche die Fibrinblöcke trugen, vorsichtig aus den Gussformen entfernt und in die neue Platte mit frischem Medium überführt und inkubiert. Das Medium wurde alle zwei Tage mit 1,5 mL frischem Kulturmedium pro Well gewechselt.

In diesem Versuch konnte nach etwa 3 Tagen die Kontraktion einzelner Kardiomyozyten mikroskopisch beobachtet werden. Ab Tag 7 war die Kontraktion auch makroskopisch erfassbar.

2.2.2 Transduktion

In den durchgeführten Experimenten wurde der GEVI ArcLight A242 verwendet, um die spannungsabhängigen Fluoreszenzsignale als Surrogat des Aktionspotentials in EHTs zu analysieren. Für die Transduktion verwendeten EHTs waren mindestens 14 Tage alt und wurden zuvor bei 37 °C, 7 % CO_2, 40 % O_2 und 98 % relativer Feuchtigkeit inkubiert. Die Konzentration der verwendeten Viruslösung betrug $4{,}30 \times 10^{11}$ vg/µL und wurde zuvor bei -80 °C gelagert.

Das benötigte Virusvolumen (siehe Tabelle 2) wurde direkt in das Kulturmedium pipettiert und auf die EHTs in den 24-Well-Platten gegeben. Die Inkubation der EHTs mit dem Virusvolumen erfolgte bei 37 °C für 48 Stunden. Für die Experimente wurden MOIs von $3{,}0 \times 10^4$ und $1{,}0 \times 10^5$ verwendet. Diese Methode der Transduktion wird in dieser Arbeit als Post-Casting-Transduktion (PCT) bezeichnet.

Tabelle 2: Berechnung des benötigten Virusvolumens pro EHT für nachträgliche Transduktion (PCT) für die MOIs $3{,}0 \times 10^4$ und $1{,}0 \times 10^5$

c [vg/µL]	Total [vg]	MOI	vg/EHT	Vol. Virus (µL/EHT)
$4{,}30 \times 10^{11}$	$5{,}2 \times 10^{13}$	$3{,}0 \times 10^4$	$3{,}0 \times 10^{10}$	0,07
$4{,}30 \times 10^{11}$	$5{,}2 \times 10^{13}$	$1{,}0 \times 10^5$	$1{,}0 \times 10^{11}$	0,23256

Die Fluoreszenzintensität der EHTs wurden regelmäßig gemessen, um die Expression des GEVI zu validieren. Nur EHTs mit einer Fluoreszenzintensität von mindestens 0,15 AU wurden für Experimente verwendet.

2.2.3 Kraft- und Fluoreszenzmessung

Die Kraft und Fluoreszenzanalyse erfolgte mittels einer software-basierten, automatisierten videooptischen Aufzeichnung. Das System ermöglichte das Einführen einer 24-Well-Platte in eine gas- und temperatur-kontrollierte Inkubatorkammer. Eine bewegliche Kamera, die entlang der XYZ-Achsen positioniert wurde, wurde nacheinander über jedem EHT ausgerichtet, wobei die Koordinaten durch das Softwareprogramm gespeichert wurden. Ein speziell angepasster Algorithmus verfolgte die Bewegung der EHT-Konturen, um die Kontraktionskraft anhand der EHT-Verkürzung sowie der elastischen Eigenschaften und Geometrie der PDMS-Posts zu berechnen. Für jedes EHT wurde eine Videodatei mit einer Aufzeichnungsrate von 100 Bildern pro Sekunde erstellt.

Die ArcLight Fluoreszenzintensität wurde als Surrogat für das Aktionspotential gemessen. Das von ArcLight-transduzierten EHT emittierte Fluoreszenzlicht wurde von einem dichroitischen Spiegel reflektiert, über einen Bandpass gefiltert und von der Photomultiplier (PMT)-Röhre erfasst. Der PMT wandelte die Lichtintensitäten in elektrische Signale um und leitet diese mit einer Bildrate von 100 Datenpunkte pro Sekunde, an die angepasste Software weiter.[18]

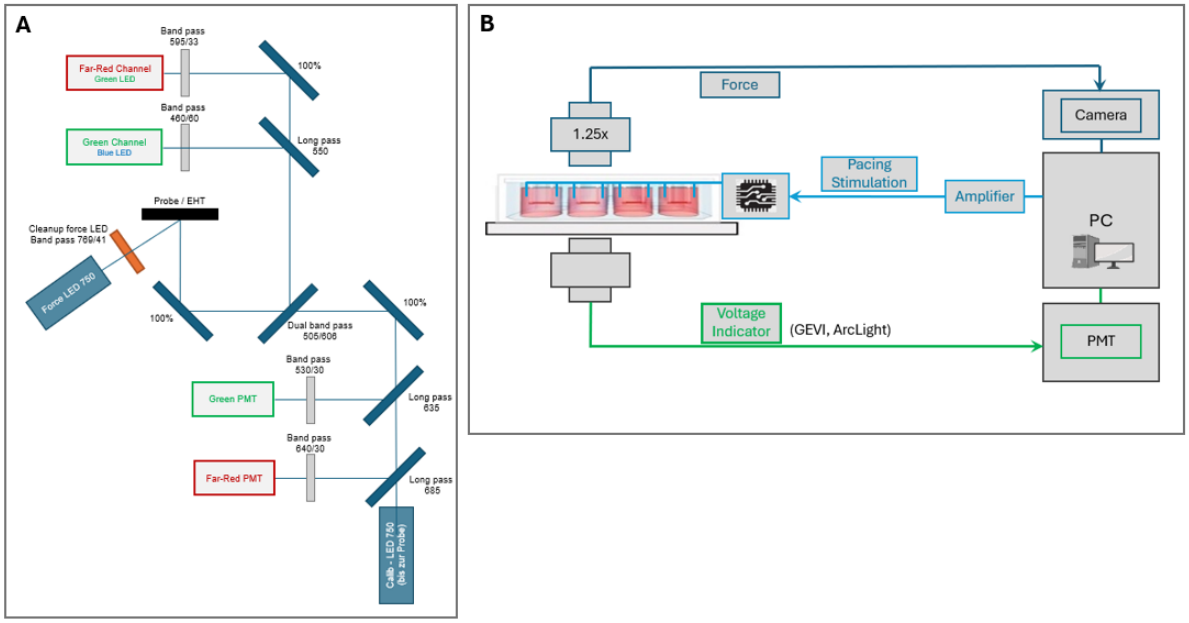

Abbildung 4: Darstellung der optischen Pfade für den grünen Fluoreszenzkanal. (A) Darstellung der optischen Pfade des grünen und fernroten Fluoreszenzkanals. Force LED entspricht der LED die zur Beleuchtung der Kraftanalyse verwendet wird. Die Calib-LED dient zur Ausrichtung des Objektivs unter dem EHT. (B) Schematischer Aufbau des EHT-Analysegeräts. Die Kraft wird videooptisch mit einem 1,25x Objektiv gemessen. Für die Fluoreszenzmessung wurde kein Objektiv verwendet. Die Fluoreszenz wird vom PTM erfasst. Durch den Einsatz von elektrischem Pacing, kann die Messungen bei einer kontrollierten Frequenz durchgeführt werden.

Die Rohdaten wurden in Form von Kraft-Zeit-Kurven bzw. Fluoreszenzintensität-Zeit-Kurven dargestellt, mittels Gaußfilter gefiltert und um die Grundlinie korrigiert. Die Kontraktions- und Fluoreszenzpeaks wurden anhand vordefinierter Kriterien identifiziert, siehe Tabelle 3 und mit Quadraten gekennzeichnet. Zusätzlich wurden Durchschnittswerte für Kraft, Frequenz und kinetische Parameter berechnet und in einer Berichtsdatei zusammengefasst. Dieser Bericht enthielt außerdem Kraftdiagramme, in denen die elektrischen Pacing-Signale durch vertikale blaue Linien angezeigt wurden. Durch elektrische Pacing-Signale können die EHTs auf eine kontrollierte Frequenz gebracht werden, wodurch Messungen unter standardisierten Bedingungen durchgeführt und Effekte von Substanzen präziser analysiert werden können.[11,18] Die Aufzeichnungen wurden für 20 Sekunden durchgeführt.

Tabelle 3: Voreingestellte Parameter zur Identifizierung der Kontraktions- und Fluoreszenzpeaks humaner EHTs.

Parameter	Kontraktion	Fluoreszenz
No. of frames of derivate calculation	4	1
Filter level	10	10
Baseline level	0,950	0,050
threshold	0,015 mN	0,03 AU
Minimum factor	0,250	0,200
Maximum peak distance [s]	60	10
TTP/RT threshold factor	0,2	-

Um die erhaltenen Messergebnisse quantitativ zu analysieren, wurden Parameter definiert, welche bestimmte Aspekte der Kontraktions- und Fluoreszenzkurven abbilden. Dazu zählen die Kontraktionszeit ($TTP_{-80\%,force}$), die Relaxationszeit ($RT_{80\%}$), die Repolarisationszeit ($DT_{80\%}$) und die Zeit bis zum 80 %-Fluoureszenzmaximum ($TTP_{-80\%,Fl}$), welche in Abbildung 5 aufgezeigt werden. Diese Parameter erlauben die detaillierte Analyse der Kontraktions- und Relaxationskinetik sowie der elektrischen Aktivität in EHTs. $TTP_{-80\%}$ beschreibt die Zeit für den Aufstrich der Kraft oder Fluoreszenzintensität von 20 % über der Baseline bis zum Maximum. $RT_{80\%}$ und $DT_{80\%}$ beschreiben die Zeitspanne des Rückgangs vom maximalen Wert auf 20 %, dadurch können Rückschlüsse auf Phasen des kardialen Aktionspotentials getroffen werden.

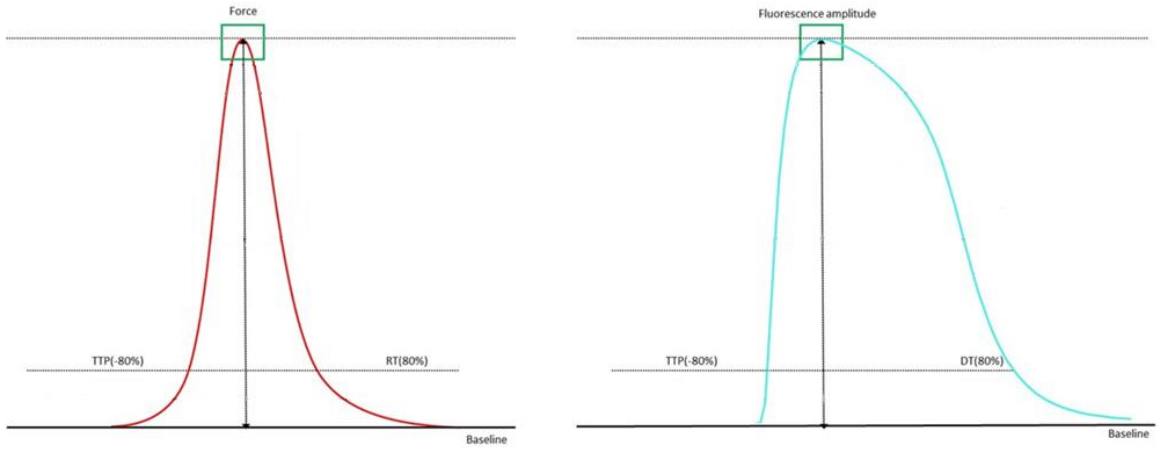

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Parameter zur Analyse von Kraft- und Fluoreszenzzeit-Kurven. Links: Kraft-Zeit-Kurve mit Markierung von Time to Peak (TTP): Kontraktionszeit und Relaxation Time: Relaxationszeiten (RT) bei unterschiedlichen Prozentwerten der Amplitude. Rechts: Fluoreszenz-Zeit-Kurve mit Time to Peak (TTP) und Decay Time: Repolarisationszeit (DT).[19]

2.2.4 E-4031: Vorversuch

E-4031 verlängert die Dauer des kardialen Aktionspotenzials durch Blockierung der hERG-Kalium-Kanäle.[20] Es zählt zu den Indikatorsubstanzen für proarrhythmische Effekte im humanen Herzgewebe.[21] In der Literatur werden für E-4031 IC_{50}-Werte von 7,7 nM und 10 nM berichtet.[21,22]

Aufgrund der bekannten Wirkung von E-4031 als potenter Inhibitor der hERG-Kaliumkanäle, wurde die Indikatorsubstanz in einem Vorversuch verwendet. Damit sollte geprüft werden, ob die Verlängerung der Repolarisation durch das Fluoreszenzsignal des ArcLight A242 Sensors, als Surrogat für das kardiale Aktionspotential detektiert werden kann.

Das Experiment basierte auf folgendem Vorgehen: Für den Vorversuch wurde eine Stammlösung von 100 µM, welche in Wasser gelöst war, verwendet, um eine Endkonzentration von 100 nM zu erreichen. Für die Vorbereitung wurden zwei 24-Well-Platten mit dem Medium FluoroBrite DMEM verwendet. Der Versuch wurde an acht EHTs durchgeführt, von denen vier zur Kontrolle dienten und vier mit E-4031 inkubiert wurden. Von insgesamt zwei Kulturschalen, wurde eine für die Baseline-Messung verwendet und die andere für die Indikatorsubstanz. Zu den 1,5 mL FluoroBrite-Medium wurden 1,5 µM der E-4031 Stammlösung pipettiert (1:1000, Arbeitskonzentration 100 nM). Die Kontrollen erhielten 1,5 µL steriles H_2O. Nach der Zugabe der Substanz wurde die Zellkulturschale für 30 min bei 37 °C, 7 % CO_2, 40 % O_2 und 98 % relativer Feuchtigkeit inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde für jedes EHT die Kontraktionskraft sowie die Fluoreszenzintensität für 20 Sekunden aufgenommen. Nach den Messungen wurde die EHTs zweimal mit 2 mL EHT-Kulturmedium für jeweils mindestens 20 min gewaschen und anschließend in ihre ursprüngliche Zellkulturschale gesetzt.

2.2.5 Drug Screening

In den Experimenten wurden Substanzen mit unterschiedlichem TdP-Risiko aus der CiPA-Studie verwendet. In Tabelle 4 sind die verwendeten Wirkstoffe mit den Wirkmechanismen, die maximale Plasmakonzentration (C_{max}) und hERG IC_{50}-Konzentrationen aufgelistet. Die C_{max} Konzentration kann mit dem IC_{50}-Wert verglichen werden, um das proarrhythmische Risiko abzuschätzen.

Tabelle 4: Übersicht der Wirkstoffe, Wirkmechanismus, C_{max} und hERG IC_{50}-Werte kategorisiert in ihre TdP-Risikogruppen.

TdP-Risiko	Wirkstoff	Wirkmechanismus	C_{max}[8] (µM)	IC_{50} (µM)
niedrig	Verapamil	L-type Ca^{2+}-Kanal Blocker[23,24]	0,045	0,143 [24] 0,214 [25]
	Metoprolol	β_1-Blocker[26]	1,8	145 [26]
	Loratadin	H_1 Rezeptor-Antagonist[27]	0,00045	5,15 [28]
mittel	Ondansetron	5-HT_3-Rezeptor Antagonist[29]	0.372	0,81 [29]
	Astemizol	H_1-Rezeptorantagonist[30,31]	0,0003	0,48 [30]
	Pimozid	D_2-Rezeptorblocker[32]	0,00043	0,018 [33]
hoch	Chinidin	Na-Kanalblocker[34]	3,0	0,41 [35]
	Vandetanib	Tyrosin Kinase Inhibitor[36]	0,3	1,15 [36]
	Dofetilid	Selektiver Kaliumkanalblocker[34]	0,002	0,007 [25]

Für die in den Experimenten eingesetzten Wirkstoffe wurden Stammlösungen gemäß wie in der CiPA-Studie hergestellt und in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst.[8] Nach der Herstellung wurden die Stammlösungen steril-filtriert. Anschließend wurden für Astemizol, Pimozid und Dofetilid fünf und für die übrigen Substanzen vier Verdünnungen aus den Stammlösungen erstellt, die entweder logarithmisch oder halblogarithmisch verdünnt wurden. Von diesen Verdünnungen wurden Aliquotes von jeweils 20 µL hergestellt und bei -20 °C gelagert. Die Stammlösung von Vandetanib wurde vor der Steril-filtration für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, um Kristallbildung vollständig aufzulösen.

Am Versuchstag wurden die Aliquots der Verdünnungen aufgetaut und im Verhältnis 1:1000 in FluoroBrite Medium verdünnt, um die entsprechenden Arbeitskonzentrationen zu erhalten. Die IC_{50}-Werte liegen innerhalb der getesteten Konzentrationsbereiche, mit Ausnahme von Metoprolol. Zeit-Vehikel-Kontrollen (TVC) wurden mit 0,1 % DMSO behandelt.

Einen Tag vor Beginn des Experiments wurden sechs 24-Well-Platten mit FluoroBrite Medium vorbereitet und bei 37 °C, 40 % O_2 und 7 % CO_2 vorequilibriert. FluoroBrite ist ein Medium mit reduzierter Hintergrundfluoreszenz, dass ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis ermöglicht.[37] Darüber hinaus weist FluoroBrite einen höheren Glukosegehalt als das reguläre EHT-Kulturmedium auf, wodurch die EHTs zu Beginn an Kontraktionskraft gewinnen. Aufgrund dessen, werden am Versuchstag die EHTs in der ersten FluoroBrite-Platte für etwa zwei Stunden inkubiert, bis eine Stabilisierung der Kontraktionskraft eintritt. Anschließend werden die EHTs in die zweite Platte überführt, um die Baseline-Messung durchzuführen. Diese erfolgte bei einer Stimulationsfrequenz von 1,5 Hz oder 2 Hz.

Für die erste Konzentration wurde die dritte Zellkulturschale verwendet. Hier wurde der Wirkstoff 20 Minuten vor Beginn der Messung erst pipettiert und daraufhin weiter inkubiert. Nachdem die EHTs in die Platte überführt wurden, erfolgte die Messung nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten. Dieser Ablauf wurde für die weiteren Konzentrationen in gleicher Weise wiederholt, wobei stets dieselben EHTs verwendet wurden (kumulative Konzentrations-Wirkungskurve).

Nach Abschluss des Experiments wurden die EHTs zweimal für jeweils 20 Minuten mit frischem Medium gewaschen und anschließend in ihre ursprüngliche Zellkulturschale zurücküberführt. Anschließend wurden die EHTs für einen Zeitraum von zwei Tagen nicht weiter experimentell genutzt.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit GraphPad Prism durchgeführt. Die Daten wurden als relative Abweichung zur mittleren Baseline berechnet und anhand eines Pools zeitgleicher Kontrollen normalisiert. Die Abweichung wurde durch die Veränderungen der experimentellen Gruppe dem Durchschnittswert der eigenen Baseline-Analyse berechnet. Diese wurde anschließend zur Zeit-Vehikel-Kontrollgruppe (TVC) normalisiert. Die Basisreferenz der TVC-Gruppe wurde auf 100 % festgelegt, wodurch die experimentellen EHT-Gruppen unter steigenden Konzentrationen der Wirkstoffzusätze vergleichbar sind.

Zur Berechnung statistischer Signifikanz wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit Dunnett's Multiple Comparisons Test im Vergleich zur Baseline

ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde auf α = 0,05 festgelegt. Signifikante Unterschiede (< 0,05) sind in den Abbildungen mit einem Sternchen (*) markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuch: E-4031

Die Indikatorsubstanz E-4031 wurde verwendet, um zu prüfen, ob die Verlängerung der Repolarisation durch das Fluoreszenzsignal des ArcLight A242 Sensors detektiert werden kann. Abbildung 6, zeigt die Ergebnisse von 100 nM E-4031 im Vergleich zur Baseline.

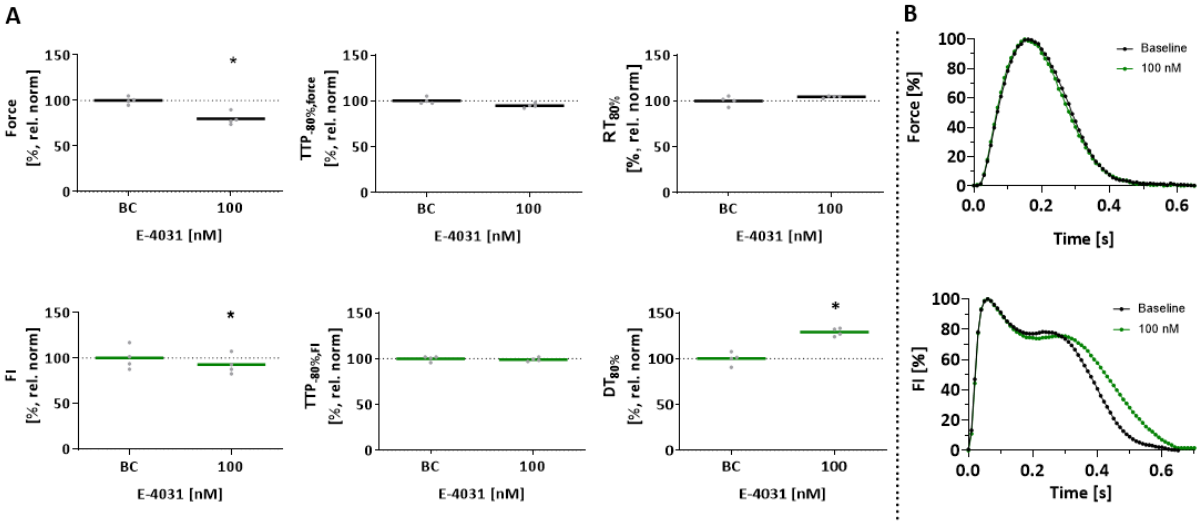

Abbildung 6: Effekt von E-4031 (100 nM) auf die Kontraktionskraft und die Fluoreszenzintensität von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor. (A) Relative Änderungen der Kraft (Force), Fluoreszenzintensität (FI), Kontraktionszeit ($TTP_{-80\%}$), Relaxationszeit ($RT_{80\%}$) und Repolarisationszeit ($DT_{80\%}$) im Vergleich zur Baseline und normalisiert auf die TVC. Die statistische Analyse wurde mittels gepaartem t-Test durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde bei *p < 0,05 definiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein EHT (n = 4). **(B)** Kontraktions- und Fluoreszenzverlauf von EHTs unter Baseline Bedingungen und nach Zugabe von 100 nM E-4031. Daten sind relativ zur Baseline und die Peakmaxima auf 100 % normalisiert.

Die Zugabe von 100 nM E-4031 zeigte eine signifikante Abnahme der Kontraktionskraft im Vergleich zur Baseline. Eine signifikante Reduktion der Fluoreszenzintensität ist ebenfalls in der experimentellen Gruppe zu sehen. Die Repolarisationszeit wurde deutlich im Vergleich zur Baseline verlängert. Die Kontraktionszeit und die Zeit bis zum Fluoreszenzmaximum unterscheiden sich nach Zugabe von E-4031 nicht signifikant vom Ausgangswert.

Der zeitliche Fluoreszenzverlauf in Abbildung 6 B vor und nach der Zugabe von 100 nM E-4031, zeigt eine deutliche Verlängerung der Repolarisationszeit.

3.2 Drug Screenings der CiPA-Wirkstoffe

Um das Fluoreszenzsignal des GEVI ArcLight A242 Sensors in EHTs weiter zu validieren, wurden konzentrationsabhängige Effekte mit hERG-Kanal hemmenden Wirkstoffen aus der CiPA-Studie untersucht. Es wurden drei Substanzen aus jeder TdP-Risikogruppe getestet.

Für die niedrige TdP-Risikogruppe, wurden Loratadin, Verapamil und Metoprolol gewählt.[38] Die Abbildungen zeigen die konzentrationsabhängigen Effekte dieser Substanzen.

In Abbildung 7 sind die Ergebnisse des Wirkstoffes Loratadin zu sehen.

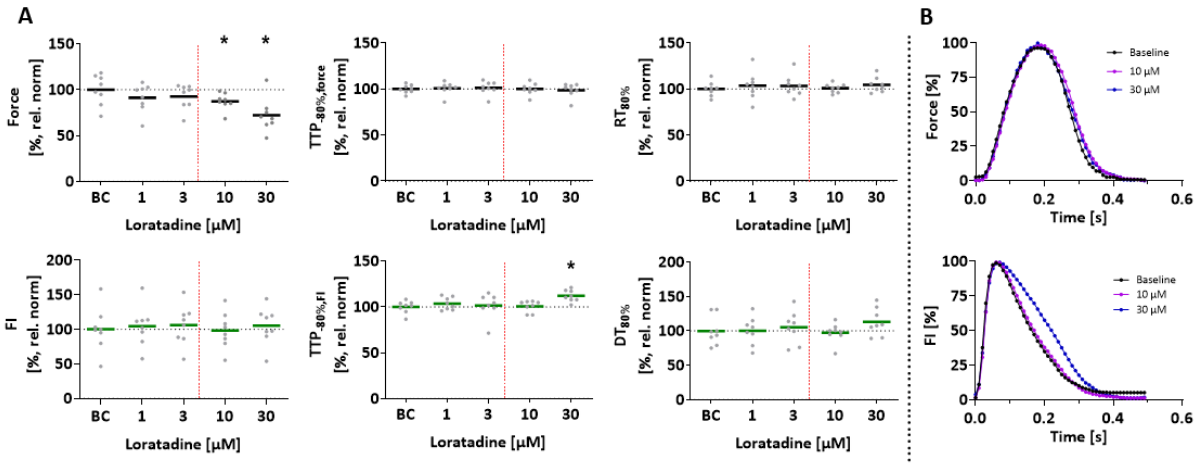

Abbildung 7: Konzentrationsabhängige Effekte von Loratadin von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor. (A) Relative Änderungen der Kraft (Force), Fluoreszenzintensität (FI), Kontraktionszeit ($TTP_{-80\%,force}$), Relaxationszeit ($RT_{80\%}$), Zeit bis zum 80%-Fluoureszenzmaximum ($TTP_{-80\%,FI}$) und Repolarisationszeit ($DT_{80\%}$) im Vergleich zur Baseline und normalisiert auf die TVC. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's multiplem Vergleichstest (*p < 0,05). Jeder Datenpunkt repräsentiert ein EHT (n = 8). Die in der Abbildung rot gestrichelte Linie markiert die IC_{50}-Konzentration am hERG-Kanal. **(B)** Kontraktions- und Fluoreszenzverlauf von EHTs unter Baseline-Bedingungen und nach Zugabe von Loratadin. Daten sind relativ zur Basislinie und die Peakmaxima auf 100 % normalisiert.

Loratadin wird zur Linderung von Symptomen von saisonaler allergischer Rhinitis verwendet und gehört zu den peripheren H_1-Antagonisten der zweiten Generation.[39] Für diesen Wirkstoff ist eine dosis-abhängige Abnahme der Kontraktionskraft der EHTs ab 10 µM zu beobachten. Ebenso zeigt sich eine signifikante Steigerung von $TTP_{-80\%,FI}$ in der letzten Konzentration (30 µM) im Vergleich zur Baseline. Für die Repolarisationszeit und den anderen Parametern wurde keine signifikante Veränderung festgestellt.

In Abbildung 7 B ist eine Verlängerung der Repolarisationszeit bei einer Konzentration von 30 µM dargestellt. Diese Veränderung war jedoch nicht statistisch signifikant (Abbildung 7 A).

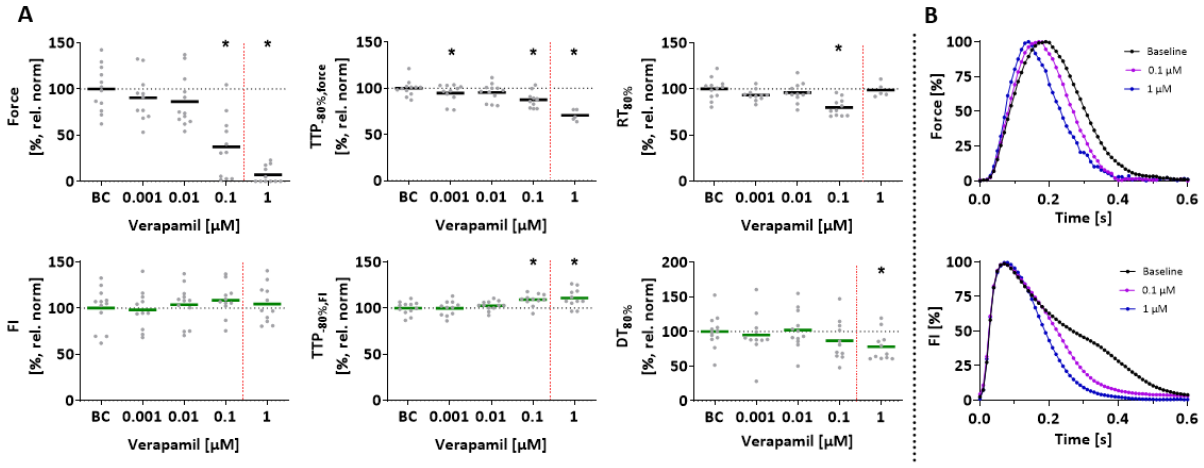

Abbildung 8: Konzentrationsabhängige Effekte von Verapamil von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor. (A) Relative Änderungen der Kraft (Force), Fluoreszenzintensität (FI), Kontraktionszeit ($TTP_{-80\%,force}$), Relaxationszeit ($RT_{80\%}$), Zeit bis zum 80%-Fluoureszenzmaximum ($TTP_{-80\%,FI}$) und Repolarisationszeit ($DT_{80\%}$) im Vergleich zur Baseline und normalisiert auf die TVC. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's multiplem Vergleichstest (*p < 0,05). Jeder Datenpunkt repräsentiert ein EHT (n = 12). Die in der Abbildung rot gestrichelte Linie markiert die IC_{50}-Konzentration am hERG-Kanal. **(B)** Kontraktions- und Fluoreszenzverlauf von EHTs unter Baseline-Bedingungen und nach Zugabe von Verapamil. Daten sind relativ zur Basislinie und die Peakmaxima auf 100 % normalisiert.

Verapamil ist ein Ca^{2+}-Kanal-Blocker, welcher zusätzlich hERG-Kanal blockiert. In der Literatur sind IC_{50}-Wert von 0,143 µM und 0,214 µM zu finden.[24,25] In den Ergebnissen für Verapamil ist eine stark konzentrationsabhängige Abnahme der Kontraktionskraft zu beobachten. Die Fluoreszenzintensität verhielt sich während des Experimentes stabil. Die $TTP_{-80\%,force}$ nahm mit steigender Konzentration ab, wobei eine signifikante Abnahme bei den Konzentrationen 0,001, 0,1 und 1 µM beobachtet werden konnte. Eine Verkürzung der Relaxationszeit zeigte sich bei der höchsten Konzentration von 1 µM.

Die Kraft- und Fluoreszenz-Zeit-Kurven (Abbildung 8 B) zeigen den Zeitlichen Verlauf der Kontraktionskraft und der Fluoreszenzintensität vor und nach der Zugabe von 0,1 und 1 µM Verapamil. Die Kraftkurve zeigt hierbei eine konzentrationsabhängige Verkürzung. Dasselbe ist auch in der Fluoreszenz-Zeit-Kurve zu sehen. Die Repolarisationszeit hat sich bei den zwei höchsten Konzentrationen um etwa 200 ms verkürzt im Vergleich zur Baseline und betrifft in erster Linie den späten Anteil der Reploarisation.

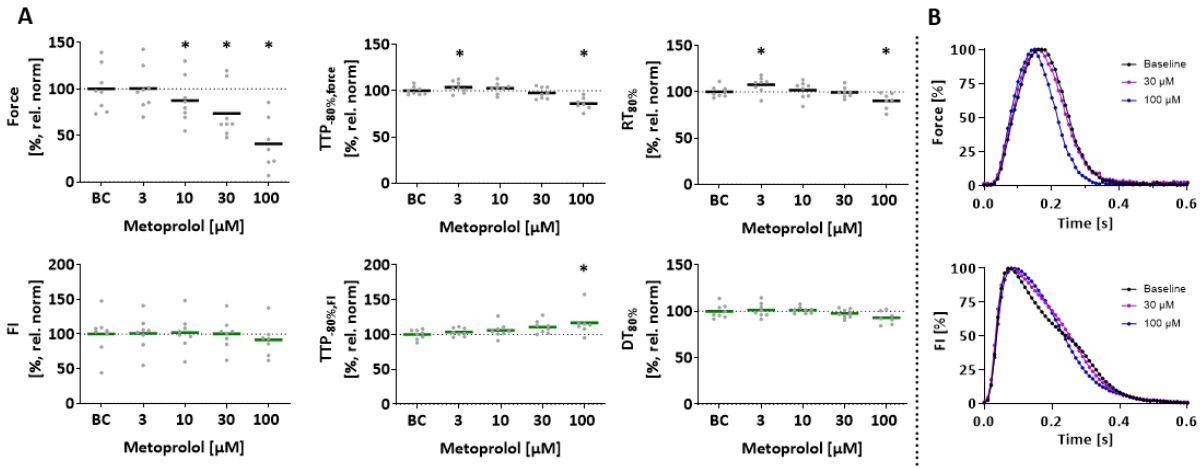

Abbildung 9: Konzentrationsabhängige Effekte von Metoprolol von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor. (A) Relative Änderungen der Kraft (Force), Fluoreszenzintensität (FI), Kontraktionszeit ($TTP_{-80\%,force}$), Relaxationszeit ($RT_{80\%}$), Zeit bis zum 80%-Fluoureszenzmaximum ($TTP_{-80\%,FI}$) und Repolarisationszeit ($DT_{80\%}$) im Vergleich zur Baseline und normalisiert auf die TVC. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's multiplem Vergleichstest (*p < 0,05). Jeder Datenpunkt repräsentiert ein EHT (n = 8). Die in der Abbildung rot gestrichelte Linie markiert die IC_{50}-Konzentration am hERG-Kanal. **(B)** Kontraktions- und Fluoreszenzverlauf von EHTs unter Baseline-Bedingungen und nach Zugabe von Verapamil. Daten sind relativ zur Basislinie und die Peakmaxima auf 100 % normalisiert.

Der letzte Wirkstoff mit niedrigem TdP-Risiko ist Metoprolol. Metoprolol ist ein β_1- Blocker, der zur Behandlung von kardiovaskulären Krankheiten wie, Bluthochdruck, koronare Herzkrankheiten oder zur Unterdrückung von Herzrhythmusstörungen verwendet wird und ist ein schwacher hERG-Inhibitor.[26] Der IC_{50}-Wert für die hERG-Kanäle beträgt 145 µM.[26]

Eine konzentrationsabhängige Abnahme der Kontraktilität ist ab 3 µM zu erkennen. Bei der Kontraktionszeit und der Relaxationszeit ist bei der ersten Konzentration (3 µM) eine signifikante Zunahme und bei der letzten Konzentration (100 µM) eine signifikante Abnahme zu beobachten. $TTP_{-80\%,FI}$ zeigt bei 100 µM eine signifikante Zunahme. Eine Veränderung der Repolarisationszeit konnte nicht festgestellt werden.

Die Kraft- und Fluoreszenz-Zeit-Kurven (Abbildung 9 B) zeigen den zeitlichen Verlauf der Kontraktionskraft und der Fluoreszenzintensität vor und nach der Zugabe von Metoprolol. Die Kraftkurve zeigt hierbei eine Verkürzung. Im Vergleich zur Baseline zeigt die Fluoreszenz-Zeit-Kurve eine geringgradige Metoprolol-induzierte Verlängerung im frühen Abschnitt und Verkürzung im späten Abschnitt der Repolarisation.

In den Abbildungen 10 bis 12 sind die Ergebnisse der Substanzen mit mittlerem TdP-Risiko, Astemizol, Ondansetron und Pimozid, dargestellt.

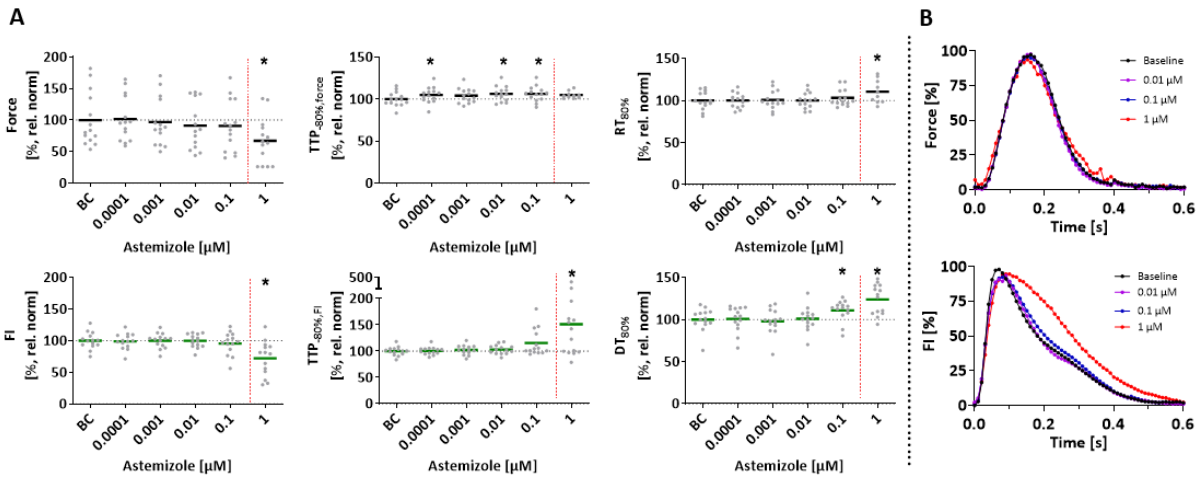

Abbildung 10: Konzentrationsabhängige Effekte von Astemizol von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor. (A) Relative Änderungen der Kraft (Force), Fluoreszenzintensität (FI), Kontraktionszeit ($TTP_{-80\%,force}$), Relaxationszeit ($RT_{80\%}$), Zeit bis zum 80%-Fluoureszenzmaximum ($TTP_{-80\%,FI}$) und Repolarisationszeit ($DT_{80\%}$) im Vergleich zur Baseline und normalisiert auf die TVC. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's multiplem Vergleichstest (*p < 0,05). Jeder Datenpunkt repräsentiert ein EHT (n = 14). Die in der Abbildung rot gestrichelte Linie markiert die IC_{50}-Konzentration am hERG-Kanal. **(B)** Kontraktions- und Fluoreszenzverlauf von EHTs unter Baseline-Bedingungen und nach Zugabe von Astemizol. Daten sind relativ zur Basislinie und die Peakmaxima auf 100 % normalisiert.

Astemizol ist ein Antihistaminikum der zweiten Generation, welcher als Histamin (H)-1-Rezeptorantagonist wirkt. Astemizol induziert die Autophagie in Brustkrebszellen, die Apoptose durch Caspase-Aktivierung als auch eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies.[30,31] Der IC_{50}-Wert von Astemizol beträgt 0,48 µM.[30]

Für Astemizol zeigte eine signifikante Verminderung der Kontraktionskraft (1 µM), die Kontraktionszeit (ab 0,001 µM) und Relaxationszeit (1 µM) zeigten geringgradig signifikante Verlängerungen. Bei 1 µM war die Fluoreszenzamplitude deutlich vermindert. Gleichzeitig waren $TTP_{-80\%,FI}$ und $DT_{80\%}$ deutlich verlängert.

Die Zeitkurven in Abbildung 10 B, zeigten die deutliche Verlängerung der Fluoreszenzamplitude.

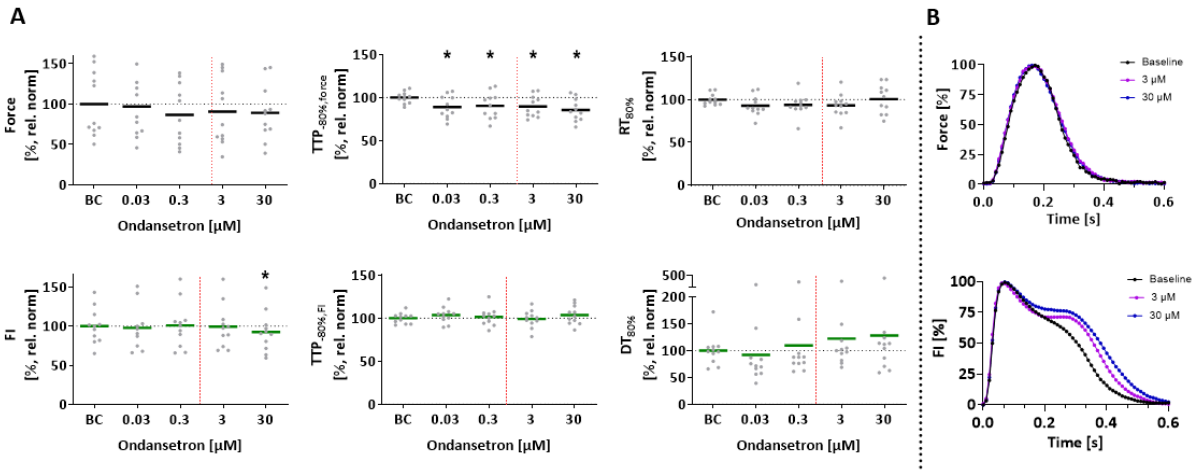

Abbildung 11: Konzentrationsabhängige Effekte von Ondansetron von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor. (A) Relative Änderungen der Kraft (Force), Fluoreszenzintensität (FI), Kontraktionszeit ($TTP_{-80\%,force}$), Relaxationszeit ($RT_{80\%}$), Zeit bis zum 80%-Fluoureszenzmaximum ($TTP_{-80\%,FI}$) und Repolarisationszeit ($DT_{80\%}$) im Vergleich zur Baseline und normalisiert auf die TVC. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's multiplem Vergleichstest (*p < 0,05). Jeder Datenpunkt repräsentiert ein EHT (n = 11). Die in der Abbildung rot gestrichelte Linie markiert die IC_{50}-Konzentration am hERG-Kanal. **(B)** Kontraktions- und Fluoreszenzverlauf von EHTs unter Baseline-Bedingungen und nach Zugabe von Ondansetron. Daten sind relativ zur Basislinie und die Peakmaxima auf 100 % normalisiert.

Ondansetron gehört zur Klasse der 5-Hydroxytryptamin-3 (5-HT_3, Serotinin)-Rezeptorantagonisten und wird als antiemetisches Mittel eingesetzt, insbesondere zur Behandlung von Übelkeit und Erbrechen, die infolge von Chemo- oder Strahlentherapie auftreten.[29,40] Ondansetron wird in der CiPA-Studie als Wirkstoff mit mittlerem TdP-Risiko eingestuft und besitzt eine mittlere inhibitorische Konzentration der hERG-Kanäle von 0,81 µM.[8,29]

Für den Wirkstoff Ondansetron zeigte sich eine signifikante Verringerung der Kontraktionszeit in allen vier Konzentrationen. Eine Zunahme der Repolarisationszeit ($DT_{80\%}$) ist in der Abbildung 11 A zu erkennen, welche jedoch aufgrund der großen Datenstreuung nicht signifikant ist. Zusätzlich war die Fluoreszenzintensität bei 30 µM vermindert. In Abbildung 11 B ist eine konzentrationsabhängige Verlängerung des Fluoreszenzsignals dargestellt.

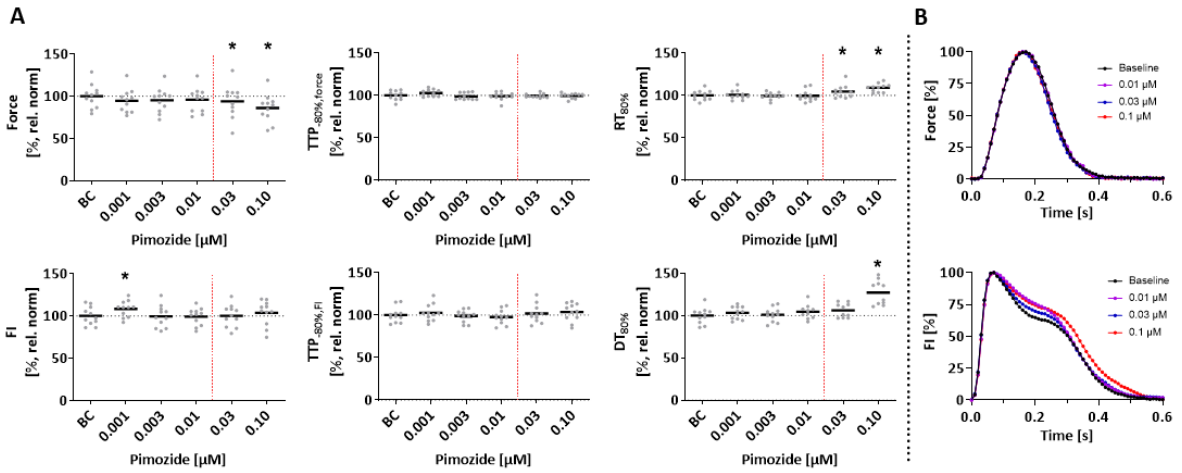

Abbildung 12: Konzentrationsabhängige Effekte von Pimozid von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor. (A) Relative Änderungen der Kraft (Force), Fluoreszenzintensität (FI), Kontraktionszeit ($TTP_{-80\%,force}$), Relaxationszeit ($RT_{80\%}$), Zeit bis zum 80%-Fluoureszenzmaximum ($TTP_{-80\%,FI}$) und Repolarisationszeit ($DT_{80\%}$) im Vergleich zur Baseline und normalisiert auf die TVC. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's multiplem Vergleichstest (*p < 0,05). Jeder Datenpunkt repräsentiert ein EHT (n = 11). Die in der Abbildung rot gestrichelte Linie markiert die IC_{50}-Konzentration am hERG-Kanal. **(B)** Kontraktions- und Fluoreszenzverlauf von EHTs unter Baseline-Bedingungen und nach Zugabe von Ondansetron. Daten sind relativ zur Basislinie und die Peakmaxima auf 100 % normalisiert.

Pimozid ist ein Dopamin-Rezeptorblocker aus der Klasse der Antipsychotika. In der klinischen Anwendung wird Pimozid zur Behandlung von Gesichtstics eingesetzt.[41] Pimozide wurde einem IC_{50}-Wert von 18 nM von der CiPA-Studie als Wirkstoff mit mittlerem TdP-Risiko eingestufft.[23,33] In den Ergebnissen zu Pimozid in Abbildung 12 ist eine konzentrationsabhängige Abnahme der Kontraktionskraft zu sehen (ab 0,03 µM). Zusätzlich ist eine Zunahme der Relaxationszeit in den letzten zwei Konzentration zu erkennen. Die Repolarisationszeit ist bei 0, 1 µM deutlich verlängert.

Eine Verlängerung der Repolarisationphase ist in der Abbildung 12 B zu sehen.

Wirkstoffe, welche ein hohes TdP-Risiko zugesprochen wird, sind Chinidin (engl. Quinidine), Vandetanib sowie Dofetilide.[8] Die Ergebnisse dieser Substanzen sind in Abbildung 13 bis 15 abgebildet.

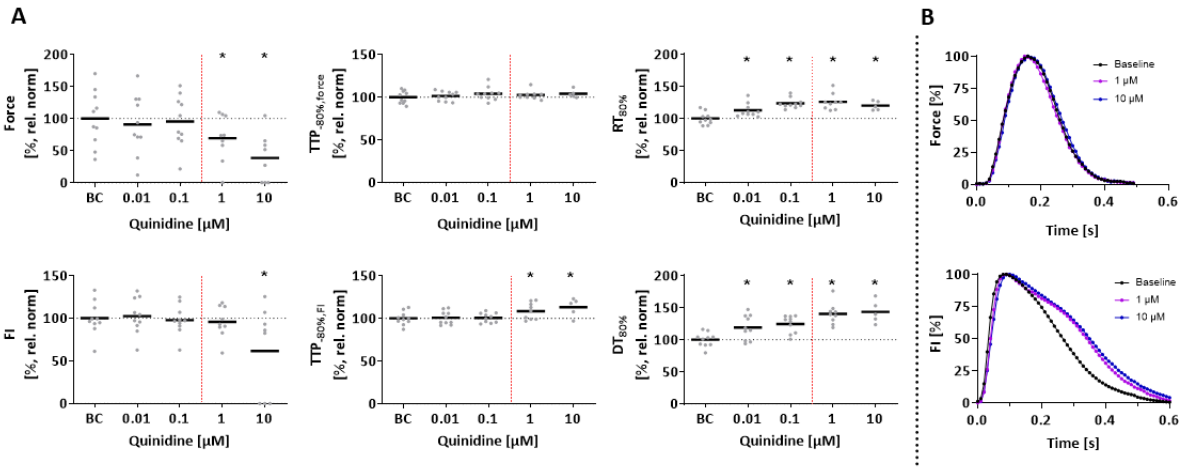

Abbildung 13: Konzentrationsabhängige Effekte von Chinidin von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor. (A) Relative Änderungen der Kraft (Force), Fluoreszenzintensität (Fl), Kontraktionszeit ($TTP_{-80\%,force}$), Relaxationszeit ($RT_{80\%}$), Zeit bis zum 80%-Fluoureszenzmaximum ($TTP_{-80\%,Fl}$) und Repolarisationszeit ($DT_{80\%}$) im Vergleich zur Baseline und normalisiert auf die TVC. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's multiplem Vergleichstest (*p < 0,05). Jeder Datenpunkt repräsentiert ein EHT (n = 10). Die in der Abbildung rot gestrichelte Linie markiert die IC_{50}-Konzentration am hERG-Kanal. **(B)** Kontraktions- und Fluoreszenzverlauf von EHTs unter Baseline-Bedingungen und nach Zugabe von Chinidin. Daten sind relativ zur Baseline und die Peakmaxima auf 100 % normalisiert.

Chinidin wurde früher klinisch als Antiarrhythmikum der Klasse Ia zur Behandlung von ventrikulären Tachyarrhythmien, Vorhofflimmern sowie als Mittel gegen Malaria eingesetzt.[42,43] Der IC_{50}-Wert beträgt 0,41 µM. Chinidin zeigt eine signifikante Abnahme der Kontraktionskraft ab 1 µM. Eine signifikante Zunahme der Relaxationszeit und der Repolarisationszeit ist in allen vier Konzentrationen zu beobachten. Ebenfalls ist die $TTP_{-80\%,Fl}$ ab 1 µM signifikant verlängert. Eine Abnahme der Fl ist in der letzten Konzentration von 10 µM festzustellen. Die deutliche Verlängerung der Replarisationszeit ist in Abbildung 13 B zu erkennen.

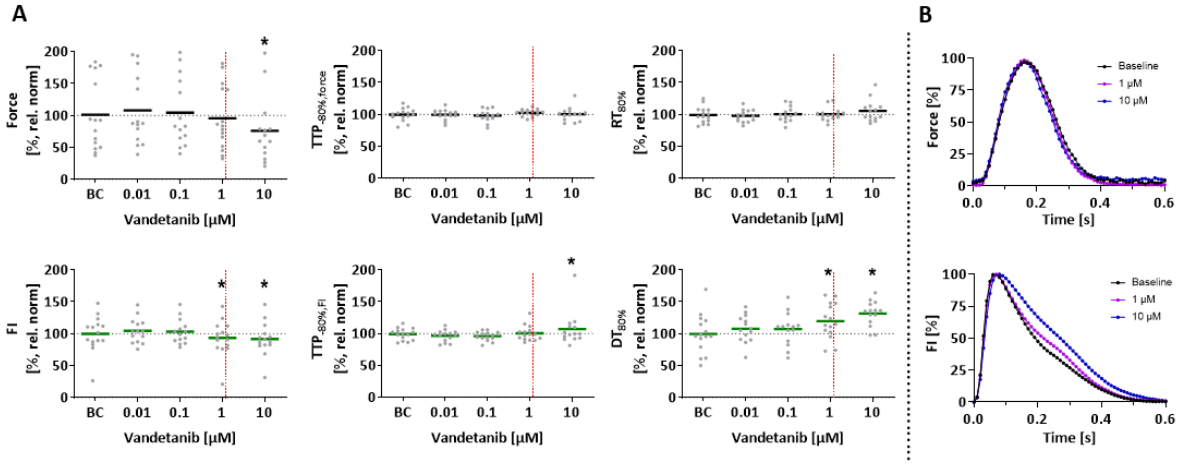

Abbildung 14: Konzentrationsabhängige Effekte von Vandetanib von mit 1,5 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor. (A) Relative Änderungen der Kraft (Force), Fluoreszenzintensität (FI), Kontraktionszeit ($TTP_{-80\%,force}$), Relaxationszeit ($RT_{80\%}$), Zeit bis zum 80%-Fluoureszenzmaximum ($TTP_{-80\%,FI}$) und Repolarisationszeit ($DT_{80\%}$) im Vergleich zur Baseline und normalisiert auf die TVC. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's multiplem Vergleichstest (*$p < 0,05$). Jeder Datenpunkt repräsentiert ein EHT (n = 15). Die in der Abbildung rot gestrichelte Linie markiert die IC_{50}-Konzentration am hERG-Kanal. **(B)** Kontraktions- und Fluoreszenzverlauf von EHTs unter Baseline-Bedingungen und nach Zugabe von Ondansetron. Daten sind relativ zur Baseline und die Peakmaxima auf 100 % normalisiert.

Vandetanib, ist ein weiterer Wirkstoff mit hohem TdP-Risiko, welcher zur Behandlung von unterschiedlichen Krebsarten eingesetzt wird. Vandetanib inhibiert die Tyrosin Kinasen und bewirkt kardiotoxische Effekte. Der IC_{50}-Wert von Vandetanib beträgt 1,15 µM. Zusätzlich blockiert Vandetanib den I_{Na} als auch I_{Ca} mit ähnlich hemmender Wirkung.[36]

Vandetanib verminderte die Kontraktionskraft (10 µM). Ebenfalls verminderte sich die Fluoreszenzintensität geringfügig (1, 10 µM). Ein signifikanter Anstieg der Repolarisationszeit von Vandetanib ist ab 1 µM zu sehen. In Abbildung 14 B ist eine deutliche Verlängerung der Replarisationszeit zu erkennen.

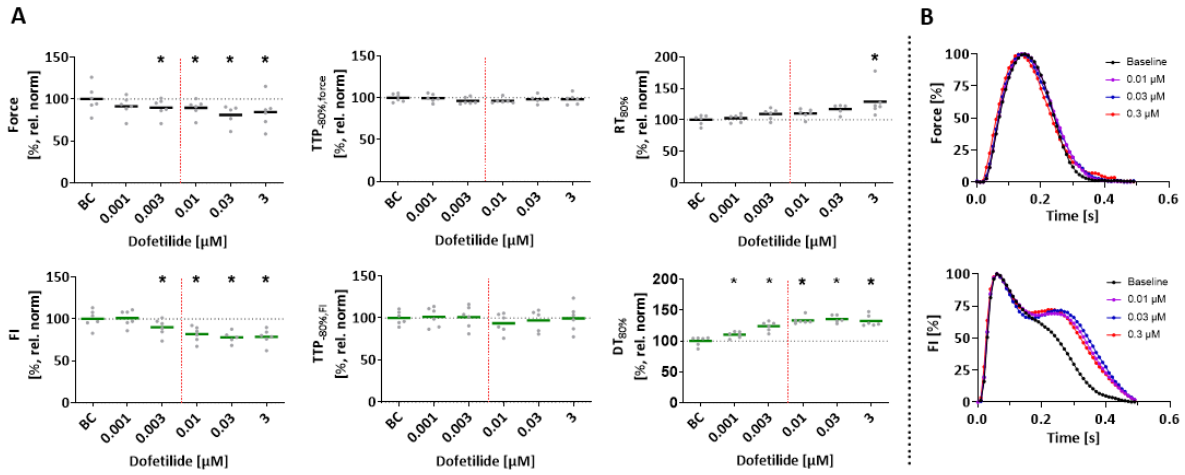

Abbildung 15: Konzentrationsabhängige Effekte von Dofetilid von mit 2 Hz gepacten, transduzierten EHTs (MOI 3,0 x 10^4) mit dem ArcLight A242-Sensor. (A) Relative Änderungen der Kraft (Force), Fluoreszenzintensität (FI), Kontraktionszeit ($TTP_{-80\%,force}$), Relaxationszeit ($RT_{80\%}$), Zeit bis zum 80%-Fluoureszenzmaximum ($TTP_{-80\%,FI}$) und Repolarisationszeit ($DT_{80\%}$) im Vergleich zur Baseline und normalisiert auf die TVC. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit Dunnett's multiplem Vergleichstest (*p < 0,05). Jeder Datenpunkt repräsentiert ein EHT (n = 6). Die in der Abbildung rot gestrichelte Linie markiert die IC_{50}-Konzentration am hERG-Kanal. **(B)** Kontraktions- und Fluoreszenzverlauf von EHTs unter Baseline-Bedingungen und nach Zugabe von Ondansetron. Daten sind relativ zur Baseline und die Peakmaxima auf 100 % normalisiert.

Dofetilid ist ein Antiarrhythmikum der Klasse III und wird unter anderem bei Vorhofflimmern verwendet. Er blockiert selektiv I_{Kr} und besitzt ein IC_{50}-Wert von 0,007 µM.[25,44]

Eine konzentrationsabhängige Reduktion der Kontraktionskraft (ab 0,003 µM) und Fluoreszenzintensität (ab 0,003 µM) durch Dofetilid sind zu beobachten. Eine signifikante Abnahme der Kontraktionszeit sowie der $TTP_{-80\%,FI}$ ist in der letzten Konzentration (0,03 µM) zu finden. Ein signifikanter Anstieg der Relaxationszeit durch Dofetlilid (ab 3 µM) sowie eine Verlängerung der Repolarisationszeit ab 0,01 µM wurden beobachtet. Das Fluoreszenzsignal in Abbildung 15 B zeigt eine deutliche Verlängerung der Repolarisationszeit.

Tabelle 5 zeigt die Effekte der verwendeten Substanzen mit verschiedenem TdP-Risiko auf die Relaxationszeit und die Repolarisationszeit von EHTs. Dargestellt sind die prozentualen Effekte der Substanzen auf die Parameter $RT_{80\%}$ und $DT_{80\%}$.

Tabelle 5: Prozentuale Effekte der Substanzen auf die Kontraktionskraft und das Aktionspotenzial von EHTs. Aufgeführt sind die relativen Mittelwerte für $RT_{80\%}$ und $DT_{80\%}$. Die Daten stellen die maximalen Effekte dar, korrigiert um die TVC. Wurde die maximale Wirkung für einen bestimmten Parameter bei einer niedrigeren Konzentration als bei der höchst getesteten festgestellt, ist dies durch eine hochgestellte Konzentration in µM gekennzeichnet.

Niedriges TdP-Risiko			Mittleres TdP-Risiko			Hohes TdP-Risiko		
	$RT_{80\%}$	$DT_{80\%}$		$RT_{8\%0}$	$DT_{80\%}$		$RT_{80\%}$	$DT_{80\%}$
Loratadin	-	-	Ondansetron	-	-	Chinidin	$+26^{(1)}$	44
Verapamil	$-20^{(0.1)}$	-22	Astemizol	-	11	Vandetanib	-	32
Metoprolol	-	20	Pimozid	8	10	Dofetilid	2	56

Wirkstoffe mit hohem TdP-Risiko, wie Chinidin, Dofetilid und Vandentanib zeigen eine deutliche Verlängerung der $RT_{80\%}$ und $DT_{80\%}$. Zum Beispiel zeigt Chinidin bei der $RT_{80\%}$ eine Verlängerung von 26 % bei 1 µM und eine Verlängerung der $DT_{80\%}$ von 44 % im Vergleich zu den Kontrollen. Substanzen wie Loratadin und Metoprolol mit niedrigem TdP-Risiko, zeigen hingegen nur minimale oder keine Effekte für dieselben Parameter.

4 Diskussion

4.1 Vorversuch: E-4031

Die Verlängerung der Repolarisationszeit, welche charakteristisch für den hERG-Kanalblocker ist, konnte mit dem Spannungssensor ArcLight A242 detektiert werden. Zusätzlich konnte eine signifikante Abnahme der Kontraktionskraft und der FI beobachtet werden, was auf die von E-4031 bewirkte Veränderung der elektrischen Aktivität zurückzuführen ist. Dieser Versuch bestätigt, dass das ArcLight Fluoreszenzsignal im EHT-Format als Surrogat für das kardiale Aktionspotential detektiert und analysiert werden kann.

4.2 Drug Screenings der CiPA-Wirkstoffe

Proarrhythmische Effekte äußern sich durch eine Verlängerung der Repolarisationszeit, dabei kann es auch zur Verlängerung der Relaxationszeit kommen, weshalb besonders auf diese Parameter in der Diskussion eingegangen wird. Effekte, welche nicht konzentrationsabhängig sind, werden nicht im Einzelnen diskutiert, Diese wurden möglicherweise aufgrund Temperaturschwankungen ausgelöst. Der IC_{50}-Wert steht im direkten Zusammenhang mit der Blockade der hERG-Kanäle, weshalb in der Diskussion auch auf diesen Wert eingegangen wird.

Loratadin

Es wurde keine signifikanten Verlängerungen in der Repolarisationsphase festgestellt, welches als Substanz mit niedrigem TdP-Risiko zu erwarten ist.

Verapamil

In den Ergebnissen ist eine signifikante Abnahme der Repolarisationszeit in der letzten Konzentration zu sehen. Obwohl Verapamil ein hERG-Blocker ist, sehen wir eine Abnahme und keine Zunahme der Repolarisationsphase. Dies liegt daran, dass Verapamil ein schwacher hERG-Inhibitor ist und hauptsächlich ein Wirkstoff, der die Calciumkanäle blockiert.[24] Die Calciumkanäle sind für die Plateauphase im kardialen Aktionspotential verantwortlich, kommt es zur Hemmung dieser Kanäle wird die Plateauphase verkürzt, wodurch sich das gesamte Aktionspotential verkürzt.[45] Hierdurch ist die Repolariationszeit trotz hERG-Kanal-Blockade nicht verlängert, sondern verkürzt. Die Kontraktionskraft der Kardiomyozyten hängt direkt von der intrazellulären Calciumverfügbarkeit ab.[3] Durch die Blockade der L-Typ-Calciumkanäle steht weniger Calcium für die Kontraktion bereit, was eine signifikante Reduktion der Kontraktionskraft zur Folge hat.[24]

Metoprolol

Aus den Ergebnissen ist keine Änderung der Repolarisationszeit zu entnehmen, was mit seinem niedrigen TdP-Risiko und somit auch seinen geringen Einfluss auf die hERG-Kaliumkanäle übereinstimmt. Auffällig ist jedoch der signifikante Abfall der Kontraktilität der EHTs. Dieser Effekt ist vereinbar mit einer basalen Aktivität der *β*-Adrenozeptoren ohne Stimulation durch einen Agonisten. Diese basale Aktivität wird in Gegenwart von Metoprolol vermindert (inverser Agonismus).[46]

Astemizol

In den Ergebnissen ist eine signifikante konzentrationsabhängige Verlängerung der Repolarisationsphase ab 0,1 µM zu sehen. Trotz eines höheren IC_{50}-Werts von 0,48 µM konnten bereits bei niedrigeren Konzentrationen signifikante repolarisationsverlängernde Effekte festgestellt werden, was auf eine hohe Sensitivität des Spannungsensors hinweist.[30] Bei der Verlängerung des AP wurde auch die typische Verlängerung der $RT_{80\%}$ festgestellt, weil eine verzögerte Repolarisation die Zeit bis zur vollständigen Relaxation beeinflusst. Passend zur Verlängerung von

$DT_{80\%}$ ist auch eine Abnahme der FI zu erkennen. Während der verzögerten Repolarisation verändert sich der Spannungsverlauf der Zellen, wird vom Sensor erfasst, und spiegelt sich in einer Verringerung der FI wider. Auch die Relaxationszeit zeigt eine Verlängerung (1 µM), allerdings ist dieser Parameter weniger sensitiv.

Ondansetron

Obwohl in den Ergebnissen für Ondansetron eine Verlängerung der Repolarisationsdauer beobachtet werden kann, zeigte sich in allen getesteten Konzentrationen kein statistisch signifikanter Effekt. Die wahrscheinliche Ursache hierfür ist die große Streuung der Daten in diesem Versuch. Hierfür spricht auch, dass die mittlere Zunahme der Repolarisationszeit von 10 % vergleichbar mit den Effekten von Astemizol und Pimozid ist.

Pimozid

Pimozid mit einem IC_{50}-Wert von 0,018 µM wurde von der CiPA-Studie als Wirkstoff mit mittlerem TdP-Risiko eingestufft.[23,33] Eine signifikante Verlängerung konnte bei einer etwa fünf Fach höheren Konzentration des IC_{50}-Wertes festgestellt werden. Die Effekte auf die Relaxationszeit waren in diesem Fall auch schon bei einer Konzentration von 0,03 µM festzustellen, allerdings war der Effekt auf die Repolarisation größer.

Chinidin

In den vorliegenden Ergebnissen zeigt sich bereits ab der niedrigsten getesteten Konzentration eine signifikante, konzentrationsabhängige Verlängerung der Repolarisationsphase. Zudem wurde in allen Konzentrationen eine Verlängerung der Relaxationszeit beobachtet. Diese Befunde stehen im Einklang mit der bekannten Wirkung von Chinidin als starkem Inhibitor des I_{Kr} was zu einer Verlängerung des kardialen Aktionspotenzials führt.[31]

Vandetanib

In den Ergebnissen können signifikante verlängernde Effekte in der Repolarisationsphase sowie eine Abnahme der Fluoreszenzintensität, welche mit der Inhibition der hERG-Kaliumkanäle zusammenhängt, beobachtet werden. Repolarisationsverlängernde Effekte wurden ab dem IC_{50}-Wert von Vandetanib

beobachtet. Eine mögliche Ursache für die Kontraktionskraft-Verminderung ist die Hemmung von Calciumkanälen.[36] Durch diese Hemmung strömt während der Plateauphase des Aktionspotenzials weniger Calcium in die Zelle ein, wodurch auch die Calcium-induzierte Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum verringert wird.[2] Dies führt zu einer Abnahme der Kontraktionskraft. Da dieser Effekt auch die Aktionspotentialdauer verkürzen sollte (wie auch am Beispiel von Verapamil beschrieben), wäre in diesem Zusammenhang die Verlängerung der Relaxationszeit bemerkenswert und kompatibel mit einer starken Hemmung der hERG-Kanäle. Alternativ könnte die Kontraktionskraft-Verminderung durch die Hemmung der Tyrosinkinasen vermittelt sein.[47] Im Gegensatz zu den Effekten auf die Repolarisation konnte kein Effekt auf die Relaxationzeit detektiert werden.

Dofetilid

Bereits ab einer Dofetilid-Konzentration von 0,001 µM (im Vergleich zu dem IC_{50}-Wert von 0,007 µM) sind Verlängerung der Repolarisationsphase zu erkennen. Dieser Effekt steht im Einklang mit der Literatur, die Dofetilid als starken und selektiven hERG-Kanal-Blocker beschreibt.[25] Für die Relaxationszeit konnte lediglich eine signifikante Veränderung ab einer Konzentration von 3 µM festgestellt werden. Dies spricht für eine geringe Sensitivität. Obwohl eine Zunahme der $RT_{80\%}$ im Scatterplot erkennbar ist, ist dies im Graphen nicht zu sehen. Dies liegt an der unterschiedlichen Normalisierung der Daten, weshalb in den Graphen nur ein relativer Effekt dargestellt wird.

Es konnten Verlängerung der Repolarisation durch proarrhythmische Substanzen in pharmakologisch relevanten Konzentrationen in EHTs mittels ArcLight Spannungssensor und auf die Relaxationzeit detektiert werden. Hierbei stellt sich die Verlängerung der Repolarisation als sensitiverer Parameter dar, da dieser in mehreren Versuchen bei geringerer Konzentration eine signifikante Verlängerung zeigte (Chinidin, Vandetanib, Dofetilid).

Die in Tabelle 5 zusammengefassten Ergebnisse validieren, dass ein Zusammenhang zwischen der Blockierung der hERG-Kanäle und dem TdP-Risiko vorliegt. Substanzen mit hohem TdP-Risiko zeigten deutliche Verlängerung der Relaxations- und Repolarisationszeit, wohingegen mittlere und niedrige TdP-Risiko Substanzen minimale, bis keine Verlängerung zeigten.

Die Ergebnisse verdeutlichen auch, dass EHTs mit dem GEVI ArcLight A242, eine vielversprechende Alternative zu Tierversuchen darstellen könnten, da es ein zuverlässiges *in vitro* Modellsystem für die Analyse proarrhythmischer Substanzen ist.

Um weitere Validierungen mit potenziell signifikanteren Effekten durchzuführen, könnte die Replikatzahl erhöht werden. Zusätzlich sollte der Effekt auch an EHTs von anderen hiPSC Linien dargestellt werden, um darzustellen, dass vergleichbare Effekte auftreten.

Eine weitere Möglichkeit, zur Verbesserung des Systems wäre die zusätzliche Transduktion eines Calciumsensors. Dies würde nicht nur ermöglichen das Aktionspotential, sondern gleichzeitig auch die Calciumtransienten zu messen. Calciumtransienten können die intrazelluläre Calcium-Dynamik zusätzlich zur bereits erfassten elektrischen Aktivität durch das AP abbilden. Diese Kombination bietet die Möglichkeit, die elektromechanische Kopplung ganzheitlich zu analysieren, einen umfassenden Einblick in Herzmechanismen zu erreichen und die prädikative Aussage von Experimenten zu erhöhen.[48,49]

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen proarrhythmischen Substanzen auf EHTs analysiert, welche aus hiPSC-CM generiert und mit dem genetisch kodierten Spannungssensor ArcLight A242 mittels AAV transduziert wurden. Es wurde die Indikatorsubstanz E-4031 und jeweils drei Substanzen aus den im Rahmen der CiPA-Studie erstellen TdP-Risikogruppen ausgewählt und untersucht. Der GEVI ArcLight A242, welcher als Surrogat für das Aktionspotential dient, konnte konzentrationsabhängige, repolarisationsverzögernde Effekte mittels automatisierte Kontraktions- und Fluoreszenzmessung zuverlässig detektieren, wodurch ein Zusammenhang zwischen der Blockierung der hERG-Kanäle und den der Repolarisationsverzögerung des ArcLight Fluoreszenzsignals bestätigt wird.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Analyse von spannungsabhängigen Fluoreszenzsensoren in EHTs, als *in vitro* Modellsystem zur prädiktiven Analyse von proarrhythmischen Substanzen geeignet ist und als Alternative zu Tiermodellen in Frage kommt. Um die prädiktive Aussagekraft zu erhöhen, könnte zusätzlich ein Calciumsensor in die EHTs transduziert werden. Dadurch wäre es möglich, die intrazelluläre Calcium-Dynamik und elektrische Aktivität gemeinsam zu analysieren. Positive Folgen wären ein umfangreicheres Verständnis der Wirkstoffeffekte auf die elektromechanische Kopplung, wie auch eine potenziell verbesserte Bewertung des proarrhythmischen Risikos.

6 Literaturverzeichnis

1. Mamoshina, P., Rodriguez, B. & Bueno-Orovio, A. Toward a broader view of mechanisms of drug cardiotoxicity. *Cell Rep. Med.* **2**, 100216 (2021). https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100216

2. Bers, D. M. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* **415**, 198–205 (2002). https://doi.org/10.1038/415198a

3. Bers, D. M. Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction. *Circ. Res.* **87**, 275–281 (2000). https://doi.org/10.1161/01.res.87.4.275

4. Ridder, B. J. *et al.* A systematic strategy for estimating hERG block potency and its implications in a new cardiac safety paradigm. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **394**, 114961 (2020). https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.114961

5. Helliwell, M. V., Zhang, Y., Harchi, A. E., Dempsey, C. E. & Hancox, J. C. Inhibition of the hERG Potassium Channel by a Methanesulphonate-Free E-4031 Analogue. *Pharmaceuticals* **16**, 1204 (2023). https://doi.org/10.3390/ph16091204

6. Tamargo, J., Caballero, R., Gómez, R., Valenzuela, C. & Delpón, E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc. Res.* **62**, 9–33 (2004). https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.12.026

7. Zhu, K., Bao, X., Wang, Y., Lu, T. & Zhang, L. Human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived cardiomyocyte modelling of cardiovascular diseases for natural compound discovery. *Biomed Pharmacother* **157**, 113970 (2023). https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113970

8. Blinova, K. *et al.* International Multisite Study of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for Drug Proarrhythmic Potential Assessment. *Cell Reports* **24**, 3582–3592 (2018). https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.079

9. Saleem, U. *et al.* Blinded, Multicenter Evaluation of Drug-induced Changes in Contractility Using Human-induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes. *Toxicol. Sci.* **176**, 103–123 (2020). https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa058

10. Li, J. *et al.* Human induced pluripotent stem cell-derived closed-loop cardiac tissue for drug assessment. *iScience* **27**, 108992 (2024). https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.108992

11. Mannhardt, I. *et al.* Automated Contraction Analysis of Human Engineered Heart Tissue for Cardiac Drug Safety Screening. *J. Vis. Exp.* (2017) doi:10.3791/55461. https://doi.org/10.3791/55461

12. Fermini, B. *et al.* A New Perspective in the Field of Cardiac Safety Testing through the Comprehensive In Vitro Proarrhythmia Assay Paradigm. *SLAS Discov.* **21**, 1–11 (2016). https://doi.org/10.1177/1087057115594589

13. Mittal, S. QT interval – Its measurement and clinical significance. *J. Clin. Prev. Cardiol.* **8**, 71 (2019). https://doi.org/10.4103/jcpc.jcpc_44_18

14. Uzun, A. U. *et al.* Ca2+-Currents in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Effects of Two Different Culture Conditions. *Front. Pharmacol.* **7**, 300 (2016). https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00300

15. Jin, L. *et al.* Single Action Potentials and Subthreshold Electrical Events Imaged in Neurons with a Fluorescent Protein Voltage Probe. *Neuron* **75**, 779–785 (2012). https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.040

16. Leyton-Mange, J. S. *et al.* Rapid Cellular Phenotyping of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes using a Genetically Encoded Fluorescent Voltage Sensor. *Stem Cell Rep.* **2**, 163–170 (2014). https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.01.003

17. Kang, B. E. *et al.* Mechanism of ArcLight derived GEVIs involves electrostatic interactions that can affect proton wires. *Biophys. J.* **120**, 1916–1926 (2021). https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.03.009

18. Saleem, U. *et al.* Force and Calcium Transients Analysis in Human Engineered Heart Tissues Reveals Positive Force-Frequency Relation at Physiological Frequency. *Stem Cell Rep.* **14**, 312–324 (2020). https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.12.011

19. WhiteBox. EHT Technologies GmbH, Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Report aus der Analysesoftware. (2024).

20. Spector, P. S., Curran, M. E., Keating, M. T. & Sanguinetti, M. C. Class III Antiarrhythmic Drugs Block HERG, a Human Cardiac Delayed Rectifier K+ Channel. *Circ. Res.* **78**, 499–503 (1996). https://doi.org/10.1161/01.res.78.3.499

21. Weinsberg, F., Bauer, C. K. & Schwarz, J. R. The class III antiarrhythmic agent E-4031 selectively blocks the inactivating inward-rectifying potassium current in rat anterior pituitary tumor cells (GH3/B6 cells). *Pflügers Arch.* **434**, 1–10 (1997). https://doi.org/10.1007/s004240050356

22. Zhou, Z. *et al.* Properties of HERG Channels Stably Expressed in HEK 293 Cells Studied at Physiological Temperature. *Biophys. J.* **74**, 230–241 (1998). https://doi.org/10.1016/s0006-3495(98)77782-3

23. Vicente, J. *et al.* Mechanistic Model-Informed Proarrhythmic Risk Assessment of Drugs: Review of the “CiPA” Initiative and Design of a Prospective Clinical Validation Study. *Clin. Pharmacol. Ther.* **103**, 54–66 (2018). https://doi.org/10.1002/cpt.896

24. Zhang, S., Zhou, Z., Gong, Q., Makielski, J. C. & January, C. T. Mechanism of Block and Identification of the Verapamil Binding Domain to HERG Potassium Channels. *Circ. Res.* **84**, 989–998 (1999). https://doi.org/10.1161/01.res.84.9.989

25. Orvos, P. *et al.* Evaluation of Possible Proarrhythmic Potency: Comparison of the Effect of Dofetilide, Cisapride, Sotalol, Terfenadine, and Verapamil on hERG and Native IKr Currents and on Cardiac Action Potential. *Toxicol. Sci.* **168**, 365–380 (2019). https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy299

26. Kawakami, K. *et al.* Comparison of HERG channel blocking effects of various β-blockers – implication for clinical strategy. *Br. J. Pharmacol.* **147**, 642–652 (2006). https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706508

27. Crumb, W. J. Loratadine blockade of K(+) channels in human heart: comparison with terfenadine under physiological conditions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**, 261–4 (1999).

28. Wiśniowska, B., Lisowski, B., Kulig, M. & Polak, S. Drug interaction at hERG channel: In vitro assessment of the electrophysiological consequences of drug combinations and comparison against theoretical models. *J. Appl. Toxicol.* **38**, 450–458 (2018). https://doi.org/10.1002/jat.3552

29. Kuryshev, Y. A., Brown, A. M., Wang, L., Benedict, C. R. & Rampe, D. Interactions of the 5-hydroxytryptamine 3 antagonist class of antiemetic drugs with human cardiac ion channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295**, 614–20 (2000).

30. Taglialatela, M. *et al.* Molecular Basis for the Lack of HERG K+ Channel Block-Related Cardiotoxicity by the H1 Receptor Blocker Cetirizine Compared with Other Second-Generation Antihistamines. *Mol. Pharmacol.* **54**, 113–121 (1998). https://doi.org/10.1124/mol.54.1.113

31. Vidicevic-Novakovic, S. *et al.* Proapoptotic and proautophagy effect of H1-receptor antagonist desloratadine in human glioblastoma cell lines. *Méd. Oncol.* **40**, 241 (2023). https://doi.org/10.1007/s12032-023-02117-3

32. Kongsamut, S., Kang, J., Chen, X.-L., Roehr, J. & Rampe, D. A comparison of the receptor binding and HERG channel affinities for a series of antipsychotic drugs. *Eur. J. Pharmacol.* **450**, 37–41 (2002).https://doi.org/10.1016/s00142999(02)02074-5

33. Kang, J., Wang, L., Cai, F. & Rampe, D. High affinity blockade of the HERG cardiac K+ channel by the neuroleptic pimozide. *Eur. J. Pharmacol.* **392**, 137–140 (2000). https://doi.org/10.1016/s0014-2999(00)00123-0

34. Shantsila, E., Watson, T. & Lip, G. Y. Drug-induced QT-interval prolongation and proarrhythmic risk in the treatment of atrial arrhythmias. *Europace* **9**, iv37–iv44 (2007).

35. Paul, A. A., Witchel, H. J. & Hancox, J. C. Inhibition of the current of heterologously expressed HERG potassium channels by flecainide and comparison with quinidine, propafenone and lignocaine. *Br. J. Pharmacol.* **136**, 717–729 (2002). https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704784

36. Lee, H.-A., Hyun, S.-A., Byun, B., Chae, J.-H. & Kim, K.-S. Electrophysiological mechanisms of vandetanib-induced cardiotoxicity: Comparison of action potentials in

rabbit Purkinje fibers and pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS ONE* **13**, e0195577 (2018). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195577

37. Thermo. FluoroBrite™ DMEM. http://thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/A1896701 (2025). (Zugriff am: 10.01.2025)

38. Blinova, K. *et al.* International Multisite Study of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for Drug Proarrhythmic Potential Assessment. *Cell Reports* **24**, 3582–3592 (2018). https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.079

39. Koshman, Y. E. *et al.* Drug-induced QT prolongation: Concordance of preclinical anesthetized canine model in relation to published clinical observations for ten CiPA drugs. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **103**, 106871 (2020).

40. Ashour, A. M. The preventive effects of ondansetron on chemotherapy-induced nausea and vomiting in adult cancer patients: systematic review from ClinicalTrials.gov. *Front. Pharmacol.* **14**, 1310455 (2023). https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1310455

41. KRÄUHENBÜHL, S. *et al.* Reversible QT Prolongation With Torsades De Pointes in a Patient With Pimozide Intoxication. *Am. J. Méd. Sci.* **309**, 315–316 (1995). https://doi.org/10.1097/00000441-199506000-00003

42. Salerno, D. M. Quinidine: Is it a good drug or a bad drug? *Postgrad. Med.* **92**, 131–140 (1992). https://doi.org/10.1080/00325481.1992.11701470

43. Achan, J. *et al.* Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar. J.* **10**, 144 (2011). https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-144

44. Roukoz, H. & Saliba, W. Dofetilide: a new class III antiarrhythmic agent. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **5**, 9–19 (2007). https://doi.org/10.1586/14779072.5.1.9

45. Grant, A. O. Cardiac Ion Channels. *Circ.: Arrhythmia Electrophysiol.* **2**, 185–194 (2009). https://doi.org/10.1161/circep.108.789081

46. Engelhardt, S., Grimmer, Y., Fan, G. H. & Lohse, M. J. Constitutive activity of the human beta(1)-adrenergic receptor in beta(1)-receptor transgenic mice. *Mol. Pharmacol.* **60**, 712–7 (2001).

47. Jacob, F. *et al.* Analysis of Tyrosine Kinase Inhibitor-Mediated Decline in Contractile Force in Rat Engineered Heart Tissue. *PLoS ONE* **11**, e0145937 (2016). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145937

48. Margara, F. *et al.* In-silico human electro-mechanical ventricular modelling and simulation for drug-induced pro-arrhythmia and inotropic risk assessment. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **159**, 58–74 (2021). https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2020.06.007

49. Yang, H., Yang, Y., Lu, Z. & Zhang, J. Z. Simultaneous Optical Imaging of Action Potentials and Calcium Transients in Human Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes. *Curr. Protoc.* **4**, e1101 (2024). https://doi.org/10.1002/cpz1.1101

7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig ohne fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle sinngemäßen und wörtlich übernommenen Textstellen aus der Literatur bzw. aus dem Internet habe ich als solche kenntlich gemacht.

Hamburg, 31.01.2025

_____

Assia Boukhobza