

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22862> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Askar, Saïd F.A.

Title: Cellular and molecular mechanisms of arrhythmias in cardiac fibrosis and beyond : from symptoms to substrates towards solutions

Issue Date: 2013-12-11

**Cellular and Molecular Mechanisms of
Arrhythmias in Cardiac Fibrosis and Beyond:
*From Symptoms to Substrates towards Solutions***

Chapter IX

Summary, Conclusions, Discussion and Future Perspectives

Summary

The general introduction of this thesis described the basic mechanisms of cardiac electrophysiology and how these relate to arrhythmias. Furthermore, the current anti-arrhythmic treatments were discussed and while these strategies are effective, it can be concluded that the efficacy of these strategies may be optimized. This suboptimal efficacy may be due to our incomplete understanding of pro-arrhythmic mechanisms, which are often due to structural heart disease that forms pro-arrhythmic substrates. Due to the complexity of such substrates, its components need to be dissected and studied in detail using *in vitro* and *in vivo* models. The aim of this thesis was therefore to investigate cellular and molecular pro-arrhythmic mechanisms in *in vitro* models of pro-arrhythmic substrates such as fibrosis and hypertrophy and provide and expand a mechanistic basis for future, substrate-oriented anti-arrhythmic strategies.

Chapter II investigated the anti-arrhythmic effects of anti-proliferative treatment of myofibroblasts (MFBs) in cardiac cultures. MFB proliferation is a prominent feature of cardiac fibrosis. As cardiac fibrosis is strongly associated with arrhythmias, this study tested the hypothesis that anti-proliferative treatment of MFBs may yield anti-arrhythmic effects. For this purpose, neonatal rat myocardial cultures were treated with mitomycin-C or paclitaxel at day 1 of culture to inhibit proliferation of endogenously present MFBs. Cardiac cell cultures were kept in culture for 9 days, and electrophysiologically evaluated at day 4 and 9 using optical mapping and patch-clamp. Antiproliferative agents did not significantly increase apoptosis at the used dosages and kept MFB content stable throughout the culturing period by limiting their proliferative capacity. While free MFB proliferation progressively slowed conduction between day 4 and 9 (from 15.3 ± 3.5 cm/s to 8.8 ± 0.3 cm/s, $P < 0.05$), conduction velocity (CV) was higher and stable throughout the culturing period in cultures that received anti-proliferative treatment. Of fibrotic cultures with high amounts of fibroblasts, 81% showed spontaneous reentrant arrhythmias, whereas 3% of mitomycin-C treated and 5% of paclitaxel-treated cultures showed arrhythmias. Importantly, culture arrhythmogeneity was found to depend on drug-dose and was thereby dependent on the quantity of MFBs. Investigation by patch-clamp experiments revealed that by anti-proliferative treatment of MFBs, cardiomyocytes (CMCs) were less depolarized and more excitable. This study may therefore provide a rationale for future preventive anti-arrhythmic strategies for fibrosis-associated arrhythmias.

In Chapter III, the anti-arrhythmic effect of down regulating heterocellular coupling between CMCs and MFBs was evaluated. For this purpose, shRNA's directed against Cx43 were expressed in MFBs using a lentiviral vector. In MFB-CMC co-cultures with Cx43 knockdown, conduction was faster (16.0 ± 3.2 cm/s vs. 10.6 ± 4.6 , $P < 0.05$) and action potential duration was shorter. Moreover, the incidence of ectopic activity and spontaneous reentry was significantly lowered by reducing heterocellular coupling. In line with these findings, CMCs were less depolarized in fibrotic co-cultures by reducing heterocellular coupling (-61.4 ± 5.7 mV vs. 51.6 ± 4.0 mV). This depolarization was identified as a key pro-arrhythmic factor, as reintroducing depolarization of the membrane by I_{K1} inhibition with BaCl₂ or by increasing extracellular [K⁺] rendered the anti-arrhythmic potential of heterocellular uncoupling ineffective. In conclusion, this study showed that MFB-induced depolarization is highly pro-arrhythmic, and that MFB-CMC coupling is a major mechanism of such depolarization.

Chapter IV evaluated differences between pro-arrhythmic mechanisms of fibrosis and hypertrophy *in vitro*, because while arrhythmias are often found in remodeled hearts, discerning between hypertrophy- or fibrosis-associated mechanisms is virtually impossible *in vivo*, although differences in pro-arrhythmic mechanisms may hold relevance for the anti-arrhythmic potential of interventions. Therefore, neonatal rat myocardial cultures were exposed to phenylephrine to induce hypertrophy, or exhibited free MFB proliferation to mimic fibrosis. Interestingly, arrhythmic findings were highly similar, with similar slowing of conduction and repolarization in both groups. Also, incidences of focal arrhythmias (based on early afterdepolarizations) and reentrant arrhythmias were similarly increased in hypertrophic and in fibrotic cultures. However, further investigation revealed differences in their pro-arrhythmic mechanisms. Protein expression levels of Kv4.3 and Cx43 were decreased in hypertrophy but unaffected in fibrosis. Targeting heterocellular coupling by administration of low doses of gap-junctional uncoupling agents was only anti-arrhythmic in fibrotic cultures, whereas l-type calcium channel blockade prevented arrhythmias in hypertrophy, but caused conduction block in fibrosis. These findings provide novel insight into how distinct substrate-specific pro-arrhythmic mechanisms may give rise to similar phenotypical arrhythmicity, and how this might affect therapeutic efficacy.

Chapter V investigated mechanisms that underlie sustained ventricular fibrillation, which is maintained by multiple stable rotors that are difficult to terminate. The aim of this study was to correlate changes in arrhythmia complexity with changes in

specific electrophysiological parameters. This approach would allow for the identification of novel factors and underlying mechanisms that affect the stability of sustained fibrillation and thereby the efficacy of anti-fibrillatory interventions. For this purpose, a novel *in vitro* model of fibrillation was developed that allowed a dose-dependent increase in fibrillatory complexity using the gap-junctional uncoupler 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). Arrhythmia complexity in cardiomyocyte cultures increased with increasing dosages of 2-APB ($n > 38$), leading to sustained VF: 0.0 ± 0.1 phase singularities/cm² in controls vs. 0.0 ± 0.1 , 1.0 ± 0.9 , 3.3 ± 3.2 , 11.0 ± 10.1 , and 54.3 ± 21.7 in 5, 10, 15, 20, and 25 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB, respectively. Arrhythmia complexity inversely correlated with wavelength. Lengthening of wavelength during fibrillation could only be induced by agents ($\text{BaCl}_2/\text{BayK8644}$) increasing the action potential duration (APD) at maximal activation frequencies (minimal APD); $123 \pm 32\%/117 \pm 24\%$ of control. Minimal APD prolongation led to transient VF destabilization, shown by critical wave front collision leading to rotor termination, followed by significant decreases in VF complexity and activation frequency (52%/37%). Interestingly, these key findings were reproduced *ex vivo* in adult rat hearts ($n=6$ per group). These results show that stability of sustained fibrillation is highly regulated by the minimal APD. Minimal APD prolongation leads to transient destabilization of fibrillation, ultimately decreasing VF complexity and thereby provides novel insights into anti-fibrillatory mechanisms.

Chapter VI explored the effects of stem cell engraftment on pro-arrhythmic risk. Due to low engraftment rates, the current paradigm for stem cell therapy is to increase engraftment rate to increase its therapeutic effects. However, it is unknown whether increasing the stem cell engraftment rate also increases the risk of pro-arrhythmic effects of stem cell therapy. Moreover, stem cell engraftment patterns are difficult to regulate *in vivo*. To investigate the pro-arrhythmic mechanisms of stem cell therapy, human mesenchymal stem cells (hMSCs) were seeded in co-culture with neonatal rat cardiomyocytes in a quantity of 7% or 28% in a diffuse or clustered pattern, after which electrophysiology was evaluated by optical mapping and patch-clamp experiments at day 9 of culture. Interestingly, in diffuse co-cultures, hMSCs dose-dependently slowed conduction and increased APD. Conduction slowing was shown to be dependent on heterocellular gap-junctional coupling, as partial uncoupling increased CV, but did not affect APD. As hMSCs did not express α -smooth muscle actinin or n-cadherin, mechanical heterocellular coupling did not appear to play a significant pro-arrhythmic role. Triggered activity and inducibility of reentry were dose-dependently increased by diffuse hMSC engraftment. For clustered hMSC engraftment, conduction slowing and APD prolongation were locally observed.

Moreover, only reentry inducibility was dose-dependently increased while triggered activity was not observed with clustered engraftment. Transwell experiments revealed that the hMSC secretome dose-dependently increased APD, APD dispersion and inducibility of reentry, while CV was unaffected. Interestingly, hMSC-derived exosomes did not yield any detectable effects on culture electrophysiology. These findings not only strongly illustrate the pro-arrhythmic potential of higher engraftment rates of hMSCs, but also show that the specific pro-arrhythmic effects are due to gap-junctional coupling and paracrine mechanisms. Thereby, this study provides cautionary data that may aid to prevent future adverse pro-arrhythmic effects of stem cell therapy when engraftment rate is increased beyond the therapeutic window.

Chapter VII investigated a novel method to counteract fibroblast arrhythmicity, as fibroblasts can be pro-arrhythmic due to their detrimental effects on cardiomyocyte electrophysiology through several mechanisms that rely on suboptimal integration into the cardiac syncytium. Therefore, the feasibility of forced cellular fusion between human ventricular scar cells (hVSCs) and nrCMCs as a potentially anti-arrhythmic strategy was explored. For this purpose, hVSC were isolated from human ventricular scars and co-cultured with nrCMCs in a 1:4 ratio. Prior to co-culture, these hVSCs were genetically modified with a lentiviral vector to express Vesicular-Stomatitis-G-protein- and eGFP that produces fusogenic hVSCs or solely eGFP (control hVSCs). Fusion was induced by brief exposure to acidic buffer (pH=6.0) at day 3 and electrophysiological effects of fusion were evaluated at day 5 by optical mapping. Co-expression of fibroblast-specific collagen-I and nrCMC-specific α -actinin was observed in multinucleated cells that contained both human and rat nuclei, without increased apoptosis as judged by annexin V staining. These nrCMC-hVSC hybrids retained sarcomeric α -actinin expression and remained contractile, while vimentin expression in nrCMC-hVSC hybrids was lower than in non-fused hVSCs. Moreover, Cx43 and Cav1.2 protein expression levels were increased in heterokaryons compared to unfused hVSCs. Importantly, the expression levels did not linearly correlate to the percentage of human nuclei in the heterokaryons. Fused cultures showed faster conduction (16.8 ± 1.6 vs. 10.3 ± 2.6 cm/s, $P < 0.05$) and shorter action potential duration (328 ± 56 vs. 480 ± 70 ms, $P < 0.05$). Triggered activity and reentry were ameliorated by heterocellular fusion (incidences of 58%, $n=12$ vs. 0%, $n=23$ in fused co-cultures). The results of this study showed that heterocellular fusion between hVSCs and nrCMCs is feasible and well-tolerated as it forms excitable and contractile heterokaryons. Moreover, heterocellular fusion had a strong anti-arrhythmic effect in hVSC-nrCMC co-cultures. As the nrCMC phenotype appeared to

be relatively dominant within the heterokaryon, these results may provide novel insights in anti-arrhythmic reprogramming of fibroblasts.

Chapter VIII investigates viral vectors capable of selectively transducing myocardial scar fibroblasts (MSFs), as these cells may represent therapeutic targets due to their potentially detrimental effects on conduction. One way of modulating the properties of MSFs is by genetic modification with viral vectors. Among the currently used viral gene delivery vehicles, adeno-associated virus (AAV) vectors stand out for their *in vivo* safety and ability to spread easily through tissues. The aim of this study was to compare the transduction of nrCMCs and of human, mouse and rat MSFs by AAV vectors with different capsids and with transgenes driven by different promoters. For this purpose, vector shuttle plasmids containing a *LacZ* gene driven by 9 different promoters including the human, mouse and rat cytomegalovirus *immediate early* gene (CMV-IE) promoter were constructed. The AAV vector genomes specified by these plasmids were packaged in AAV serotype 2 (AAV2) capsids. β -galactosidase assays revealed that of all CMV-IE promoters, the human CMV-IE promoter outperformed the rodent CMV-IE promoters in human MSFs while the rodent CMV-IE promoters were more active in murine and rat MSFs. Furthermore, of all nine promoters tested the human *eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1* gene (hEF1 α) promoter was most active in rodent MSFs while the Rous sarcoma virus (RSV) promoter gave the highest transgene expression in nrCMCs. A comparison of the transduction efficiency of rat MSFs and nrCMCs with AAV2 vectors carrying capsids of AAV serotypes 2, 5, 6, 8 and 9 showed that transduction of rat MSFs was most efficient with AAV2/2 vectors whereas AAV2/9 best transduced the nrCMCs. In conclusion, the highest transgene expression in rat MSFs is obtained by transduction with an AAV2/2 vector containing an hEF1 α promoter-driven transgene while transgene expression in nrCMC is highest after transduction with an AAV2/9 vector in which foreign gene expression is controlled by the RSV promoter.

In conclusion, MFBs may represent a target for several anti-arrhythmic interventions in the context of cardiac fibrosis. By decreasing the proliferative capacity of MFBs, their numbers and thereby their dose-dependent pro-arrhythmic effects can be limited *in vitro*. However, as anti-proliferative treatment has the potential for serious systemic adverse side-effects, more specific targeting of MFB-induced depolarization can be considered preferable. One such approach was also investigated in this thesis, by limiting heterocellular coupling through genetic connexin43 knockdown in only

MFBs or pharmacological heterocellular uncoupling, which yielded significant anti-arrhythmic effects based on the pro-arrhythmic mechanism. Alternatively, it was shown that through heterocellular fusion, fibrotic co-cultures showed faster conduction, shorter action potential duration (APD) and lower arrhythmic incidence compared to unfused fibrotic co-cultures. Additionally, this thesis emphasizes the importance of targeting such substrate-specific mechanisms in its specific substrate by demonstrating that hypertrophic cultures do not benefit from the same anti-arrhythmic interventions as fibrotic cultures, despite their highly similar arrhythmicity. Instead, these cultures suffered from intrinsic electrical remodeling and benefited from other interventions. By targeting the key parameters of arrhythmias that are formed by the substrate, substantial anti-arrhythmic effects could be achieved in these models. This concept was expanded upon by showing that the minimal APD is the key parameter that determines arrhythmic complexity in an *in vitro* and *ex vivo* model of ventricular fibrillation. In addition, this thesis provides evidence for dose-dependent pro-arrhythmic mechanisms of MSC transplantation. Taken together, this thesis demonstrates multiple cellular and molecular arrhythmic mechanisms in several pro-arrhythmic substrates, and how these mechanisms may be targeted as an anti-arrhythmic intervention.

Discussion and Future Perspectives

In vitro disease modeling and optimization of anti-arrhythmic treatment

Although current anti-arrhythmic treatments are beneficial to the patient, the suboptimal efficacy of these strategies may be attributed to an incomplete understanding of the underlying pro-arrhythmic substrate (see the general introduction of this thesis). In clinical cardiology, this realization was responded upon with the Sicilian Gambit, a statement that recognizes the complexity of arrhythmias and the infeasibility of adequately treating different arrhythmias with the same drugs without understanding the arrhythmic mechanisms.¹ The Sicilian Gambit proposed the concept of the vulnerable parameter, which is the critical parameter to alter for optimal anti-arrhythmic effects.² To be able to investigate such parameters, basic research using *in vitro* and *in vivo* models to identify and modify pro-arrhythmic substrates is essential to improve upon our current knowledge and therapeutic efficacy of anti-arrhythmic drugs.³ Such disease models are generally developed to allow for more standardized interpretation of results. For this purpose, most computer simulations and *in vitro* studies using monolayers simplify the 3-

dimensional cardiac structure into a 2-dimensional structure in which pro-arrhythmic mechanisms and features can be studied in greater detail. Due to the complexity of arrhythmias in 3-dimensional context, simplification by such 2-dimensional models facilitates the interpretation of data. Also, *in vitro* models typically facilitate a high degree of control over the experimental environment that allows isolating and investigating key components. By starting with a simplified disease model and then gradually increasing its complexity, not only can novel pro-arrhythmic mechanisms be uncovered that are difficult to investigate *in vivo*, but can these models also be extrapolated eventually to more relevant *in vivo* situations. An example of such a concept of a vulnerable parameter studied in a simplified model in this thesis is the minimal action potential duration (**Chapter V**), which determines the refractory state of tissue during fibrillation. In our 2-dimensional *in vitro* model of ventricular fibrillation that was induced by gap-junctional uncoupling, prolongation of the minimal APD showed a reduction of arrhythmic complexity, which was predicted by *in silico* studies. The mechanism of reducing the complexity of arrhythmias relied on transient destabilization of the arrhythmia, which could only be studied in detail in this model due to its relative simplicity. Moreover, by replicating the same model using adult rat hearts *ex vivo*, it was shown that the *in silico* and *in vitro* concept of prolonging the minimal APD remained relevant to the adult 3-dimensional situation. By increasing the complexity of the *in vivo* models to larger animals, these findings obtained in simplified models may ultimately prove to be relevant to the treatment of human ventricular fibrillation in the future.

In addition to the simplification of pro-arrhythmic substrates, *in vitro* models can also provide a platform that allows the study of substrates that normally coincide *in vivo* independently of each other to be able to distinguish between and elucidate their individual pro-arrhythmic mechanisms. An example of such an approach in this thesis was in the case of hypertrophy and fibrosis which often co-exist during cardiac remodeling.⁴ Interestingly, it was found that the arrhythmogeneity of both substrates in separate conditions was highly similar. However, the underlying pro-arrhythmic mechanisms were distinct. These differences could implicate that each substrate may need different pro-arrhythmic treatment. However, regardless of the mechanistic insights such studies offer, it is important to stay vigilant of overstating the implications of *in vitro* models for *in vivo* situations as oversimplification of the *in vivo* situation can be a potential hazard of *in vitro* research. Therefore, it needs to be taken into account what the model represents and how this is achieved. In the current example, fibrosis was mimicked by extensive myofibroblast (MFB) proliferation, which is an established feature of fibrosis *in vivo* that even in the

absence of extensive extracellular matrix deposition produced a highly pro-arrhythmic model. Hypertrophy *in vitro* was achieved by treatment of CMCs with phenylephrine, an α 1-agonist that is known to be involved in the induction of hypertrophy *in vivo*. However, hypertrophy may also be induced by other agents and *in vivo* is often a result of altered pressure and volume load in addition to hormonal changes. It is therefore difficult to determine where the *in vitro* hypertrophy fits in the scale of progressive hypertrophy and heart failure that is seen during cardiac remodeling *in vivo*. Due to the strong pro-arrhythmogeneity in this model of hypertrophy, it is likely that it represents an end-stage of hypertrophy, and may therefore hold relevance for the treatment of arrhythmias in the stage of heart failure. Ironically, at that stage of cardiac remodeling, fibrosis which can function as a pro-arrhythmic substrate independently of hypertrophy, is often also present as both hypertrophy and fibrosis are compensatory mechanisms against pressure overload. Furthermore, the extent of fibrosis and hypertrophy may differ between patients, and therefore the extent of the involvement of individual substrate-specific pro-arrhythmic mechanisms may play different roles for different patients in different stages of their structural heart disease. Besides the notion that the concomitance of these two substrates was the motivation behind the investigation of their individual pro-arrhythmic mechanisms, it may also be responsible for the choice of largely symptomatic anti-arrhythmic treatment due to the complexity it proposes. As both substrates were discovered to be equally pro-arrhythmic, treatment of one substrate may yield insufficient anti-arrhythmic effects due to the co-existence of another pro-arrhythmic substrate. Moreover, rather than attempting the complicated task of treating different pro-arrhythmic substrates in proportion to its presence in a heart at a given time, it may be more feasible to target common pro-arrhythmic features in the presence of multiple pro-arrhythmic substrates. In the example of our models of hypertrophy and fibrosis, pharmacologically targeting the common APD prolongation in such substrates may yield beneficial results. However, the complexity of combined arrhythmic substrates also emphasizes the need for more in-depth investigation of pro-arrhythmic substrates for the optimization of anti-arrhythmic drug regimes.

The concept of substrate-specific intervention fits within the surfacing paradigm of tailor-made patient care throughout the field of medicine, in which the complexity of disease is increasingly recognized and responded upon by the investigation and use of mechanism-specific interventions. For example, the realization of the complexity of not only arrhythmias but all human disease has motivated researchers to investigate to possibility of patient-specific drug screening using induced

pluripotent stem cells (iPS cells).⁵ By genetically modifying somatic cells with several transcription factors, these cells dedifferentiate to an embryonic stem cell-like phenotype, and can subsequently be differentiated towards different patient-specific cell lineages including cardiomyocytes. Although the maturity and purity of iPS-derived cardiomyocytes remain an issue that needs to be overcome for its clinical relevance, this approach is promising throughout the field of biology.⁶ Alternatively, efforts are being made to directly reprogram easily obtainable somatic cells towards CMCs.⁷ Using such techniques, patient-derived cell types that are otherwise difficult to obtain such as CMCs can be cultured and tested for their response to specific drugs.⁸ Thereby, optimal drug selection can be realized in a patient-specific manner, which may optimize therapeutic effects of pharmacological treatment. By combining this technique with already available *in vitro* models of different pro-arrhythmic substrates, our understanding of arrhythmias may one day be sufficient to pharmacologically treat all patients optimally through tailor-made patient-specific anti-arrhythmic drug regimes.

Targeting of the MFB in vivo as an anti-arrhythmic strategy

While drugs are often administered to treat arrhythmias, their efficacy is largely based on symptomatic alleviation. As a result, underlying pro-arrhythmic substrates such as structural heart disease are not modified despite the fact that they are a prominent cause of arrhythmias. Therefore, intrinsically changing the underlying pro-arrhythmic substrates by disease modifying drugs, genetic modification or cell therapy may lead to more optimal and longer lasting results than pharmacological treatment. In the case of fibrosis, myofibroblasts (MFBs) have been gaining interest in recent years as potential key players in fibrosis-associated arrhythmias. Initially thought to be a rather quiescent cell type that maintained the extracellular matrix, the discovery of MFBs functionally coupling to CMCs has implicated these cells in the context of fibrosis-associated arrhythmias.⁹ Since then, heterocellular coupling between CMCs and MFBs has been shown to dose-dependently slow conduction,¹⁰ increase ectopic activity¹¹ and increase the propensity towards reentrant arrhythmias.¹² While these *in vitro* results provide promising concepts that further improve our understanding of arrhythmias and are supported by *in silico* simulations,¹³ translation to *in vivo* experiments is expectedly more difficult. As a result, the clinical relevance of such findings is a predictable subject of debate. An example of such a discussion is about the clinical relevance of heterocellular coupling between MFBs and CMCs, which has not been clearly demonstrated *in vivo* yet.¹⁴⁻¹⁶ Functional coupling between administered cells that have been genetically labeled

and native myocardium has been demonstrated *in vivo*,¹⁷ but to unequivocally establish functional coupling between natively present and therefore unlabeled cell types is more difficult to realize from a technical standpoint. Furthermore, although proving functional coupling *in vivo* is technically challenging, it is per definition more challenging to provide compelling evidence that disproves the existence of such mechanisms. Further complicating the matter of MFB-induced arrhythmogeneity is the notion that MFBs may also exert pro-arrhythmic effects through mechanical coupling and paracrine mechanisms.^{18,19} As this is in line with the only partial recovery of electrophysiological health after reducing heterocellular coupling *in vitro* (**Chapter III**), this suggests that perhaps the entire phenotype of the MFB itself needs to be targeted instead of targeting all of its individual pro-arrhythmic mechanisms to alleviate fibrosis-associated arrhythmias *in vivo*. Moreover, an intervention that targets MFBs as a whole may also affect extracellular matrix deposition, a feature that is still considered of paramount importance in the pro-arrhythmogeneity of fibrosis *in vivo*, but remains difficult to properly investigate *in vitro*.²⁰ A potentially feasible approach of targeting the whole of MFB arrhythmogeneity was demonstrated in Chapter II, in which inhibition of MFB proliferation yielded strong anti-arrhythmic effects. Since MFBs can be expected to exert their pro-arrhythmic effects in a dose-dependent manner, decreasing their numbers indirectly lowers the effects of all their combined pro-arrhythmic mechanisms. Limiting proliferative capacity of MFBs has been shown to prevent excessive scar formation in non-cardiac tissue by also limiting extracellular matrix deposition.²¹ Expectedly, evidence is surfacing that such a strategy may also yield anti-arrhythmic effects *in vivo*.^{22,23} However, pharmacologic agents that inhibit proliferation are notorious for side-effects due to their often systemic administration and unwanted binding affinity to off-target molecules. The technical advantages that genetic modification can offer over pharmacological treatment are important, such as longer-lasting effects and reduced side-effects by selectively targeting specific cell and tissue types using cell type specific promoters and viruses with tissue-specific tropisms. As a result, interventions that alter the behavior of MFBs may be preferentially delivered through genetic modification. For instance, by reducing expression of myocardin-related transcription factor- α , myofibroblast activation is limited and as a result, the pro-fibrotic response of these cells is strongly diminished *in vivo*.²⁴

A similar anti-arrhythmic approach that targets the entire MFB is cellular reprogramming, that aims to force MFBs to act like a cell type that is less detrimental to cardiac function, such as stem cells or even CMCs. Initially realized by nuclear reprogramming,²⁵ cellular reprogramming of MFBs into stem cells or cardiomyocytes

can now be realized by genetic modifications with a few transcription factors, although this approach is still considered rather inefficient.⁷ In this context, forced heterocellular fusion as investigated in this thesis may provide a future alternative route of anti-arrhythmic MFB reprogramming, as fusion can effectively be used to genetically reprogram cells.²⁵ Alternatively, MFBs can be genetically modified to electrically resemble a CMC by forcing expression of the gap-junctional protein connexin43 and the ion channels kir2.1 and nav1.5, which also yields expectable anti-arrhythmic effects.^{26,27} A novel and refined method of genetic modification is found in the field of optogenetics, which allows for the regulation of transgene activity by exposure to light. Recently, optical control of even protein activity was demonstrated.²⁸ Such delicate approaches allow precise direction and timing of the genetic intervention of choice, which due to the complexity of arrhythmic substrates, may be a powerful tool to investigate and targeting pro-arrhythmic mechanisms. Based on the light-sensitive rhodopsins, optogenetics has already been shown to be a powerful technique in the field of neurology and may be used to modify the electrical behavior of cardiomyocytes or fibroblasts as a future anti-arrhythmic strategy.²⁹ Regardless of the way in which MFBs will be targeted in future *in vivo* studies, the advances in our understanding of their detrimental effects and advances in biological technology are likely to provide novel mechanistic insights into new anti-arrhythmic strategies for the foreseeable future, which may ultimately result in optimal substrate-oriented treatment of fibrosis-associated arrhythmias.

Modifying a substrate beyond its pro-arrhythmic mechanisms as the ultimate anti-arrhythmic strategy

The idea of looking more closely at certain phenomena as the best way to uncover their mechanisms, has been widely incorporated into science since the invention of the microscope. As stated above, targeting of pro-arrhythmic mechanisms is considered necessary to more adequately treat arrhythmias in the future. Therefore, more profound experiments that investigate deeper underlying pro-arrhythmic experiments remain necessary to understand arrhythmias to their finest details. However, the vastly expanding knowledge of different pro-arrhythmic mechanisms may indicate that the complexity of treating pro-arrhythmic mechanisms in all substrates may be too high to realize optimal anti-arrhythmic treatments in the near future. Due to the currently expanding epidemic of atrial fibrillation and structural cardiac disease, there is a need for timely action against pro-arrhythmic substrates. In addition, while targeting of pro-arrhythmic mechanisms of individual substrates

such as fibrosis and hypertrophy may ultimately lead to the optimized treatment of arrhythmias, these pro-arrhythmic substrates are often also associated with decreased mechanical cardiac functionality which in turn may lead to systemic comorbidity such as emboli and fatigue. While cardiac hypertrophy is a (mal)adaptive response aimed to increase cardiac output, cardiac fibrosis is a response to pressure overload to maintain structural integrity of the heart. As a result, both contractility and myocardial compliance or stiffness are affected. Importantly, cardiac stiffness itself can have pro-arrhythmic consequences. Therefore, targeting of the entire structural substrate may be necessary to alleviate all arrhythmogeneity it is associated with. Regenerative medicine with the use of stem cell therapy is such a strategy that is considered to positively modify and even reverse multiple aspects of structural heart disease and may therefore yield anti-arrhythmic effects at a level upstream of pro-arrhythmic mechanisms. Initially, the rationale behind cardiac stem cell therapy initially was to administer cells capable of cardiomyogenic differentiation to fibrotic myocardium to replenish the loss of excitable cells to counteract arrhythmias. However, the differentiation potential of such cells remains disappointingly low.³⁰ In recent years, the basis of the small but significant therapeutic effect of stem cell therapy is considered to be mostly based on its paracrine effects that modify structural heart disease.³¹ Due to low engraftment rates, the current aim in stem cell research is to increase the therapeutic efficacy by increasing engraftment rates by a variety of strategies that involve tissue engineering and genetically or magnetically modifying cells.³²⁻³⁴ However, as demonstrated in this thesis, such strategies may invoke its own pro-arrhythmic consequences, as heterocellular coupling and non-exosomal paracrine pro-arrhythmic mechanisms are exhibited by mesenchymal stem cells in a dose-dependent manner in healthy *in vitro* cardiac monolayers. In this context, it needs to be elucidated if the beneficial effects on the modification of the pro-arrhythmic substrates electrophysiologically outweigh the pro-arrhythmic effects of heterocellular coupling and paracrine signaling of MSCs. Interestingly, a large portion of the beneficial effects of stem cell therapy may be attributed to the release of exosomes, which are small lipid vesicles that contain mRNA, miRNAs and proteins that reside in the MSC secretome.^{35,36} As exosomes did not show significant pro-arrhythmic effects in our study, these components of the MSC secretome may be a future, safe alternative to cell therapy that may be able to modify the substrate positively without concomitant pro-arrhythmic effects. Besides stem cell therapy, methods such as angiotensin-II blockade counteract fibrosis as a whole and therefore act upstream of its pro-arrhythmic mechanisms, which may yield indirect anti-arrhythmic effects.³⁷ Alternatively, anti-fibrotic reprogramming by knockdown of transcription factors in

MFBs could be feasible as an anti-arrhythmic strategy that also improves mechanical cardiac function.²⁴ Such approaches benefit from advances in selective genetic modification targeting specific cell types using adeno-associated-viral vector (AAV) technology as demonstrated in this thesis. Moreover, AAVs may be incorporated into clinical practice sooner rather than later, as phase-I and phase-II clinical trials that demonstrate the success of such strategies are beginning to surface.^{38,39} Taken together, all the options and tools that are or soon will be available to investigate and target pro-arrhythmic mechanisms demand more effort, dedication and investigation by the scientific community that may ultimately lead to the best anti-arrhythmic option that can be achieved: curing the pro-arrhythmic substrate instead of treating it.

Dutch Summary - Nederlandse Samenvatting

De algemene introductie van dit proefschrift beschreef de basale mechanismen van cardiale elektrofysiologie en hoe deze zich verhouden tot aritmieën. Tevens werden de huidige anti-aritmische strategieën besproken, waarvan de efficiëntie, ondanks de bewezen werkzaamheid van dergelijke behandelingen, nog geoptimaliseerd kan worden. De suboptimale efficiëntie van deze strategieën is mogelijk te wijten aan het incomplete begrip van pro-aritmische mechanismen, die vaak zijn gerelateerd aan structureel hartlijden en de bijbehorende formatie van pro-aritmische substraten. Wegens de complexiteit van zulke substraten moeten de individuele componenten worden onderscheiden en in detail worden bestudeerd met behulp van *in vitro* en *in vivo* modellen. Het doel van dit proefschrift was daarom om cellulaire en moleculaire pro-aritmische mechanismen in *in vitro* modellen van pro-aritmische substraten zoals fibrose en hypertrofie te bestuderen om zo een mechanistische basis voor toekomstige, substraat-gerichte therapieën te vormen en uit te breiden.

Hoofdstuk II onderzocht de anti-aritmische effecten van anti-proliferatieve behandeling van myofibroblasten (MFBs) in hartcel-kweken. MFB proliferatie is een prominente eigenschap van cardiale fibrose. Aangezien cardiale fibrose sterk is geassocieerd met aritmieën, testte deze studie de hypothese dat anti-proliferatieve behandeling van MFBs anti-aritmische effecten zou kunnen hebben. Hiertoe werden myocardiale kweken van neonatale rattencellen behandeld met mitomycine-C of paclitaxel op de eerste dag van kweek om proliferatie te remmen van de endogeen aanwezige MFBs. Gedurende de kweekperiode van 9 dagen werd de elektrofysiologie van deze kweken op dag 4 en dag 9 in kaart gebracht middels optical mapping en patch-clamp experimenten. Apoptose werd niet significant verhoogd door de antiproliferatieve reagentia en deze hielden de hoeveelheid MFBs constant gedurende de kweekperiode door het remmen van de proliferatieve capaciteit van deze cellen. Hoewel vrije MFB proliferatie de geleidingssnelheid progressief liet afnemen tussen dag 4 en 9 (van 15.3 ± 3.5 cm/s tot 8.8 ± 0.3 cm/s, $P < 0.05$), was de geleidingssnelheid hoger en stabiel gedurende de kweekperiode in kweken die anti-proliferatieve behandeling hadden ontvangen. Van de fibrotische kweken met veel fibroblasten had 81% spontane reentry aritmieën, terwijl slechts 3% van mitomycine-C en 5% van paclitaxel behandelde kweken dergelijke aritmieën liet zien. Aritmogeniteit van de kweken was afhankelijk van de dosering van de anti-proliferatieve drugs en was daarmee afhankelijk van de hoeveelheid MFBs. Patch-clamp experimenten onthulden dat cardiomyocyten (CMCs) minder gedepolariseerd en meer exciteerbaar waren na antiproliferatieve behandeling. Deze studie kan een

rationale verschaffen voor toekomstige preventieve anti-aritmische strategieën voor fibrose-gerelateerde aritmieën.

In hoofdstuk III werd het anti-aritmische effect geëvalueerd van het verminderen van heterocellulaire koppeling tussen CMCs en MFBs. Dit werd bewerkstelligd met shRNA's die waren gericht tegen Cx43, die tot expressie werden gebracht in MFBs met behulp van een lentivirale vector. In MFB-CMC co-culturen met Cx43 knockdown was de geleiding sneller (16.0 ± 3.2 cm/s vs. 10.6 ± 4.6 , $P < 0.05$) en de actiepotentiaal duur korter. Bovendien was de incidentie van ectopische activiteit en spontane reentry significant lager door de reductie in heterocellulaire koppeling. Eveneens waren CMCs minder gedepolariseerd in fibrotische co-culturen (-61.4 ± 5.7 mV vs. 51.6 ± 4.0 mV). Deze depolarisatie werd geïdentificeerd als een belangrijke pro-aritmische factor, aangezien de herintroductie van depolarisatie van het membraan middels I_{K1} inhibitie met BaCl_2 of door het verhogen van extracellulair $[\text{K}^+]$ het anti-aritmische effect van heterocellulaire ont koppeling teniet deed. Deze studie demonstreert dat MFB-geïnduceerde depolarisatie zeer pro-aritmisch is, en dat MFB-CMC koppeling een belangrijk mechanisme is van dergelijke depolarisatie.

Hoofdstuk IV onderzocht verschillen tussen pro-aritmische mechanismen van fibrose en hypertrofie *in vitro*. Ondanks dat aritmieën vaak voorkomen in geremodelleerde harten, is het uitermate lastig onderscheid te maken tussen hypertrofie- of fibrose-geassocieerde mechanismen, hoewel verschillen in pro-aritmische mechanismen mogelijk relevant kunnen zijn voor het anti-aritmische potentiëel van interventies. Myocardiale kweken van neonatale rattenharten werden blootgesteld aan phenylephrine om hypertrofie te induceren, of hadden vrijelijk prolifererende MFBs als model voor fibrose. De aritmische bevindingen waren gelijksoortig in beide groepen, die trage geleiding en repolarisatie lieten zien. Incidenties van focale aritmieën (gebaseerd op early afterdepolarizations) en reentry aritmieën waren eveneens gelijksoortig verhoogd in hypertrofische en in fibrotische kweken. Verder onderzoek liet echter zien dat er verschillen waren in hoe deze aritmische uitingen tot stand kwamen. Eiwitexpressie niveaus van Kv4.3 en Cx43 werden verlaagd in hypertrofie maar waren niet aangedaan in fibrose. Gedeeltelijke ont koppeling door toediening van een lage dosering van gap-junction ont koppelende stoffen was alleen anti-aritmisch in fibrotische kweken, terwijl L-type calcium kanaal blokkade aritmieën tegenging in hypertrofische kweken maar geleidingsblokkade veroorzaakte in fibrotische kweken. Deze bevindingen verschaffen nieuwe inzichten in hoe sterk verschillende substraat-specifieke pro-

aritmische mechanismen kunnen leiden tot gelijksoortige aritmie en hoe dit mogelijk therapeutische werkzaamheid kan beïnvloeden.

Hoofdstuk V onderzocht de mechanismen van stabiele ventriculaire fibrillatie, dat onderhouden wordt door meerdere stabiele rotors die moeilijk te termineren zijn. Het doel van deze studie was het correleren van veranderingen in aritmie complexiteit met veranderingen in specifieke elektrofysiologische parameters. Middels deze aanpak kunnen nieuwe factoren die de stabiliteit van ventriculaire fibrillatie veranderen worden geïdentificeerd, om uiteindelijk de werkzaamheid van anti-fibrillatoire interventies te verbeteren. Hiervoor werd een nieuw *in vitro* model van fibrillatie ontwikkeld, waarin een dosis-afhankelijke toename in fibrillatoire complexiteit mogelijk werd gemaakt door het gap-junction ontkoppelende farmacon 2-aminoethoxydiphenyl boraat (2-APB). De complexiteit van aritmieën in neonatale rattenhart kweken nam toe met toenemende doseringen van 2-APB ($n > 38$) en leidde tot stabiele VF: 0.0 ± 0.1 phase singularities/cm² in controles versus 0.0 ± 0.1 , 1.0 ± 0.9 , 3.3 ± 3.2 , 11.0 ± 10.1 , en 54.3 ± 21.7 in respectievelijk 5, 10, 15, 20, en 25 $\mu\text{mol/L}$ 2-APB. De complexiteit van aritmieën was omgekeerd evenredig met de golflengte van aritmieën. Verlengen van de golflengte gedurende fibrillatie kon slechts worden geïnduceerd met reagentia ($\text{BaCl}_2/\text{BayK8644}$) die de actiepotentiaal duur verlengen bij maximale activatie frequenties (de zogeheten minimale APD); $123 \pm 32\%/117 \pm 24\%$ van controles. Verlenging van de minimale APD leidde tot tijdelijke destabilisatie van fibrillatie, middels de botsing van activatie-fronten die daarmee tot rotor terminatie leidde, gevolgd door een significante vermindering in de complexiteit en activatiefrequentie van VF (52%/37%). Deze bevindingen werden *ex vivo* gereproduceerd in adulte rattenharten ($n=6$ per groep). Deze resultaten laten zien dat de stabiliteit van fibrillatie sterk afhankelijk is van de minimale APD. Verlenging van de minimale APD leidt tot tijdelijke destabilisatie van fibrillatie en verlaging van de complexiteit en verschaft daarmee nieuw inzicht in anti-fibrillatoire mechanismen.

Hoofdstuk VI verkende de pro-aritmische effecten van stamceltherapie op myocardiale kweken. Omdat weinig stamcellen na transplantatie in hart achter blijven, is het huidige streven binnen de stamceltherapie om meer stamcellen te laten hechten in het myocard. Het is echter onbekend of dergelijke veranderingen tevens het pro-aritmische risico van stamceltherapie vergroten. Bovendien is het integratie patroon van stamcellen moeilijk te reguleren *in vivo*. Om de pro-aritmische mechanismen van stamcel therapie te onderzoeken werden humane mesenchymale stamcellen (hMSCs) uitgeplaat in co-cultuur met neonatale ratten cardiomyocyten

in hoeveelheden van 7% of 28% in een diffuus of geclusterd patroon, waarna elektrofysiologische eigenschappen middels optical mapping en patch-clamp experimenten in kaart werden gebracht op dag 9 van de kweek. In diffuse co-kweken vertraagden de hMSCs de geleiding op een dosis-afhankelijke wijze, terwijl de APD werd verlengd. Het vertragen van de geleiding was afhankelijk van heterocellulaire koppeling middels gap-junctions, aangezien gedeeltelijke ont koppeling de CV verhoogde, maar de APD niet veranderde. Omdat hMSCs geen α -smooth muscle actinin of n-cadherine tot expressie brengen was het onwaarschijnlijk dat mechanische heterocellulaire koppeling een significante pro-aritmische rol speelt. Triggered activity en de induceerbaarheid van reentry werden verhoogd op een dosis-afhankelijke manier door diffuus verspreide hMSCs. Voor co-culturen met geclusterde hMSCs werden ter plaatse van het cluster geleidingsvertraging en APD verlenging waargenomen. Bovendien werd alleen de induceerbaarheid van reentry verhoogd op dosisafhankelijke wijze, terwijl triggered activity niet werd geobserveerd. Experimenten met transwells onthulden dat het secretoom van hMSCs op dosisafhankelijke wijze de APD, dispersie van APD en de induceerbaarheid van reentry verhogen, terwijl de geleidingssnelheid niet was aangedaan. Exosomen afkomstig uit dit secretoom hadden geen detecteerbare elektrofysiologische effecten. Deze bevindingen illustreren niet alleen het pro-aritmische potentiël van het verhogen van het aantal getransplanteerde hMSCs, maar ook dat de specifieke effecten worden gemedieerd door koppeling middels gap-junctions en paracrine mechanismen. Deze studie biedt data die mogelijk helpt eventuele toekomstige pro-aritmische effecten van stamcel therapie te voorkomen wanneer de hoeveelheid gehechte stamcellen toeneemt voorbij de therapeutische index.

Hoofdstuk VII onderzocht een nieuwe methode om fibroblast-geassocieerde aritmie tegen te gaan, aangezien MFBs pro-aritmicus kunnen zijn middels meerdere mechanismen die berusten op suboptimale integratie in het cardiale syncytium. Daarom werd de toepasbaarheid van geforceerde cellulaire fusie tussen humane ventriculaire litteken cellen (hVSCs) en nrCMCs als potentiële anti-aritmische strategie verkend. Hiertoe werden hVSCs geïsoleerd van humane ventriculaire littekens en in co-cultuur gebracht met nrCMCs in een ratio van 1:4. Voor de co-cultuur werden deze hVSCs genetisch gemodificeerd middels een lentivirale vector om zo Vesiculair-Stomatitis-G-Protein en eGFP tot expressie te brengen en fusogene cellen te produceren, of werd slechts eGFP tot expressie gebracht ter controle. Fusie werd geïnduceerd door korte blootstelling aan zure buffer (pH=6.0) op dag 3 van de kweek en de elektrofysiologische effecten van fusie werden geëvalueerd op dag 5 middels optical mapping. Co-expressie van fibroblast-

specifiek collageen-I en nrCMC-specifiek α -actinine werd geobserveerd in meerkernige cellen die zowel humane als van ratten afkomstige celkernen bevatten, terwijl een annexin-V kleuring niet wees op verhoogde apoptose door cellulaire fusie. Deze nrCMC-hVSC hybriden behielden sarcomerische α -actinine expressie en contractiliteit, terwijl vimentine expressie in nrCMC-hVSC hybriden lager was dan in niet gefuseerde hVSCs. Bovendien waren Cx43 en Cav1.2 eiwitexpressie niveaus hoger in heterokaryons ten opzichte van ongefuseerde hVSCs. De expressie niveaus waren niet recht evenredig met het percentage van humane kernen in heterokaryons. Gefuseerde culturen lieten snellere geleiding (16.8 ± 1.6 vs. 10.3 ± 2.6 cm/s, $P < 0.05$) en kortere actiepotentialaalduraties zien (328 ± 56 vs. 480 ± 70 ms, $P < 0.05$). Heterocellulaire fusie was sterk anti-aritmisch, aangezien triggered activity en reentry niet werden gezien (incidenties van 58%, $n=12$ in controles vs. 0% $n=23$ in gefuseerde co-culturen). De resultaten van deze studie lieten zien dat heterocellulaire fusie tussen hVSCs en nrCMCs haalbaar is en goed wordt getolereerd gezien de behouden exciteerbaarheid en contractiliteit van heterokaryons. Bovendien has heterocellulaire fusie een sterk anti-aritmisch effect in hVSC-nrCMC co-culturen. Aangezien het nrCMC fenotype relatief dominant leek te zijn binnen het heterokaryon, kunnen deze resultaten mogelijk nieuwe inzichten verschaffen in anti-aritmische herprogrammering van fibroblasten.

In **hoofdstuk VIII** wordt een studie beschreven waarin virale vectoren worden onderzocht die myocardiale litteken fibroblasten (MSFs) selectief kunnen transduceren, omdat deze cellen therapeutische doelen kunnen zijn wegens de pro-aritmische effecten van deze cellen. Van de huidige vehikels voor genetische modificatie, zijn de adeno-associated viruses (AAV) vectoren het beste hiervoor geschikt wegens de *in vivo* veiligheid en het verspreidingsgemak door weefsels. Het doel van deze studie was het vergelijken van de transductie van nrCMC en humane, muis en rat MSFs door AAVs met verschillende capsiden en met transgenen die werden gedreven door verschillende promotors. Voor dit doel werden vector shuttle plasmiden met een *LacZ* gen gedreven door 9 verschillende promotors waaronder de humane, muis en rat cytomegalovirus immediate early gene (CMV-IE) geconstrueerd. De AAV vector genomen die werden gespecificeerd door deze plasmiden werden verpakt in AAV serotype 2 (AAV2) capsiden. B-galactosidase assays onthulden dat van alle CMV-IE promotors, de humane CMV-IE promotor beter presteerde dan de murine of rat CMV-IE promotors in humane MSFs, terwijl de murine of rat CMV-IE promotors actiever waren in murine en rat MSFs. Van alle 9 promotors die werden getest was de human eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (hEF1 α) promotor het meest actief in murine en rat MSFs terwijl de Rous

sarcoma virus (RSV) promotor de hoogste transgen expressie genereerde in nrCMCs. Een vergelijking van de transductie efficiëntie van rat MSFs en nrCMCs met AAV2 vectoren met capsiden van AAV serotypes 2, 5, 6, 8 en 9 liet zien dat transductie van rat MSFs het meest efficiënt is met AAV2/2 vectoren terwijl AAV2/9 de nrCMCs het beste transduceerde. In conclusie werd de hoogste transgen expressie in ratten MSFs verkregen door transductie met een hEF1 α promotor in een AAV2/2 vector, terwijl transgen expressie in nrCMCs het hoogste was na transductie met een AAV2/9 vector waarvan de transgen expressie wordt gecontroleerd door de RSV promoter.

Concluderend zijn MFBs een mogelijk aangrijpingspunt voor verschillende anti-aritmische interventies in de context van cardiale fibrose. Door het verlagen van de proliferatieve capaciteit van MFBs kunnen de hoeveelheden en daarmee de dosisafhankelijke effecten van MFBs worden beperkt *in vitro*. Echter, wegens de kans op ernstige systemische bijwerkingen van anti-proliferatieve behandeling is het wenselijk om MFB-geïnduceerde depolarisatie op specifiekere wijze aan te pakken. Een dergelijke aanpak werd eveneens onderzocht in dit proefschrift, waarbij heterocellulaire ontkoppeling middels farmaca of genetische Cx43 downregulatie in MFBs werd bewerkstelligd en significante anti-aritmische effecten had op basis van het pro-aritmische mechanisme. Een alternatieve aanpak was heterocellulaire fusie, waardoor fibrotische co-culturen sneller geleidden, repolariseerden en minder aritmiën vormden in vergelijking met ongefuseerde co-culturen. Dit proefschrift benadrukt het belang van het aanpakken van dergelijke substraat-specifieke mechanismen met de demonstratie dat hypertrofische kweken niet gebaat zijn bij dezelfde anti-aritmische interventies als fibrotische kweken ondanks de nagenoeg identieke aritmische bevindingen. Hypertrofische kweken leden echter aan intrinsieke elektrische remodelering en behoefden andere interventies ter voorkoming van aritmiën. Via het aanpakken van belangrijke aritmische parameters, die worden bepaald door het onderliggende substraat, konden substantiële anti-aritmische effecten worden bereikt in deze modellen. Dit concept werd verder verkend door te demonstreren dat de minimale APD de sleutel parameter is die de aritmische complexiteit bepaald in een *in vitro* en *ex vivo* model van ventriculaire fibrillatie. Dit proefschrift verschaft eveneens bewijs voor dosisafhankelijke pro-aritmische mechanismen van MSC transplantatie. Ter samenvatting, demonstreert dit proefschrift meerdere cellulaire en moleculaire aritmische mechanismen in meerdere pro-aritmische substraten, en hoe deze mechanismen kunnen worden aangepakt middels nieuwe anti-aritmische interventies.

Discussie en toekomst perspectieven

In vitro ziekte-modellen en de optimalisatie van anti-aritmische behandeling

Hoewel huidige anti-aritmische behandelingen de patiënt ten goede komen, kan de suboptimale werkzaamheid van deze strategieën mogelijk worden toegeschreven aan een incompleet begrip van het onderliggende pro-aritmische substraat (zie de algemene inleiding van dit proefschrift). In de klinische cardiologie werd gereageerd op deze realisatie met het opstellen van de Sicilian Gambit, een stelling die de complexiteit van aritmiën en de onhaalbaarheid van adequate behandeling van verschillende aritmiën met dezelfde middelen zonder begrip van de onderliggende mechanismen erkende.¹ De Sicilian Gambit stelde het concept van de kwetsbare parameter voor, hetgeen de kritische parameter is om te veranderen voor optimale anti-aritmische effecten.² Om zulke parameters te kunnen onderzoeken is basaal onderzoek dat gebruik maakt van *in vitro* en *in vivo* modellen om pro-aritmische substraten te identificeren en modificeren essentieel om huidige kennis en therapeutische werkzaamheid van anti-aritmische drugs te verbeteren.³ Dergelijke ziektemodellen worden over het algemeen ontwikkeld wegens de mogelijkheid tot gestandaardiseerde interpretatie van onderzoeksresultaten. Voor dit doeleinde versimpelen de meeste simulatie- en *in vitro* studies die gebruik maken van zogeheten monolayers de 3-dimensionale cardiale structuur tot een 2-dimensionale structuur waarin pro-aritmische mechanismen en kenmerken in groter detail kunnen worden onderzocht. Bovendien faciliteert de 2-dimensionale simplificatie de interpretatie van data, die in de 3-dimensionale context van aritmiën uiterst complex kunnen zijn. Tevens is er typisch een hoge mate van controle over de experimentele omgeving bij *in vitro* modellen, waardoor het mogelijk is sleutelcomponenten te isoleren en te onderzoeken. Door te starten met een versimpeld ziekte model en vervolgens geleidelijk de complexiteit van het model te verhogen, kunnen niet alleen nieuwe pro-aritmische mechanismen worden verkend die *in vivo* moeilijk te onderzoeken zijn, maar is het eveneens mogelijk de bevindingen uit deze modellen te extrapoleren naar klinisch meer relevante *in vivo* situaties. Een voorbeeld van een dergelijk concept van een kwetsbare parameter onderzocht in een versimpeld model binnen dit proefschrift is de minimale actiepotentiaal duratie (Hoofdstuk V), hetgeen de refractaire status bepaalt van weefsel gedurende fibrillatie. In het gepresenteerde 2-dimensionale *in vitro* model van ventriculaire fibrillatie dat werd geïnduceerd middels ontkoppeling van gap-junctions, veroorzaakte verlenging van de minimale APD een reductie in de aritmische complexiteit, hetgeen eerder werd voorspeld door *in silico* studies. Het mechanisme van complexiteit reductie berustte op tijdelijke destabilisatie van de aritmie, hetgeen alleen in dit model bestudeerd

kon worden gezien de relatieve simpliciteit. Bovendien werd middels replicatie van hetzelfde model in adulte ratten harten *ex vivo* gedemonstreerd dat het *in silico* en *in vitro* concept van minimale APD verlenging relevant bleef in de adulte 3-dimensionele situatie. Door de complexiteit van de *in vivo* modellen verder te vergroten richting grotere dieren kunnen de bevindingen uit versimpelde modellen uiteindelijk relevant blijken in de behandeling van humaan ventrikelfibrilleren.

Behalve de simplificatie van pro-aritmische substraten, kunnen *in vitro* modellen tevens een platform bieden waarin gewoonlijk tegelijk voorkomende substraten afzonderlijk kunnen worden onderzocht, zodat er onderscheid tussen pro-aritmische mechanismen kan worden gemaakt en deze uitvoeriger kunnen worden onderzocht. Een voorbeeld van een dergelijke aanpak in dit proefschrift is in het geval van hypertrofie en fibrose welke vaak samen voorkomen bij cardiale remodelering.⁴ Een interessante bevinding was dat aritmische bevindingen in elk van deze afzonderlijke substraten nagenoeg gelijk waren *in vitro*. De onderliggende pro-aritmische mechanismen verschilden echter significant. Deze verschillen impliceren dat ieder substraat mogelijk een specifieke pro-aritmische behandeling behoeft. Ongeacht het mechanistische inzicht dat dergelijke studies kunnen verschaffen is het belangrijk om waakzaam te blijven tegen het overdrijven van de implicaties van *in vitro* modellen voor *in vivo* situaties aangezien het overmatig versimpelen van de *in vivo* situatie een potentieel gevaar is van *in vitro* onderzoek. Daarom moet in acht worden genomen wat het model tracht na te bootsen en hoe dit wordt bewerkstelligd. In het huidige voorbeeld werd fibrose nagebootst door uitgebreide MFB proliferatie, hetgeen een kenmerk is van *in vivo* fibrose en zelfs in afwezigheid van de eveneens bekende excessieve matrix depositie een zeer pro-aritmisches model produceerde. *In vitro* hypertrofie werd behaald door behandeling van CMCs met fenylefrine, een α 1-agonist waarvan het belang voor *in vivo* inductie van hypertrofie bekend is. Hypertrofie kan echter ook worden geïnduceerd door andere stoffen en is *in vivo* vaak een resultaat van veranderde druk- en volumebelasting in combinatie met hormonale veranderingen. Het is daarom moeilijk te bepalen waar *in vitro* hypertrofie past in de schaal van progressieve hypertrofie en hartfalen die wordt geobserveerd gedurende cardiale remodelering *in vivo*. Wegens het sterke pro-aritmische fenotype van het gebruikte model van hypertrofie is het waarschijnlijk dat het overeenkomt met een eindstadium van hypertrofie en is derhalve mogelijk relevant voor de behandeling van aritmiën in het hartfalen stadium. Omdat fibrose zelfstandig als pro-aritmisches substraat kan functioneren, is het ironisch dat in het hartfalen stadium van cardiale remodelering vaak eveneens fibrose wordt geobserveerd aangezien zowel hypertrofie als fibrose compensatoire mechanismen

zijn tegen cardiale overbelasting. Bovendien kan de uitgebreidheid van fibrose en hypertrofie verschillen tussen patiënten, en daarom varieert mogelijk de betrokkenheid van individuele substraat-specifieke mechanismen in verschillende patiënten tijdens verschillende stadia van cardiale remodelering. Buiten dat het gelijktijdig bestaan van deze twee substraten de initiële motivatie was achter het onderzoek naar de individuele pro-aritmische mechanismen, kan dit tevens een reden zijn voor de keuze van vooral symptomatische anti-aritmische behandelingen wegens de veronderstelde complexiteit. Aangezien beide substraten vrijwel gelijkwaardige pro-aritmische kenmerken bezitten kan behandeling van slechts één substraat mogelijk onvoldoende anti-aritmisches effect behalen wegens het bestaan van een ander, minder gevoelig pro-aritmisches substraat. Derhalve is het mogelijk meer haalbaar om een gemeenschappelijk pro-aritmisches kenmerk te behandelen wanneer meerdere pro-aritmische mechanismen werkzaam zijn, dan te trachten verschillende pro-aritmische substraten te behandelen in proportie tot de aanwezigheid in een hart op moment van behandeling. In het voorbeeld van de gebruikte modellen van hypertrofie en fibrose behaalt het aanpakken van de gemeenschappelijke APD verlenging in zulke substraten mogelijk positieve resultaten. De complexiteit van gecombineerde pro-aritmische substraten leidt echter ook tot een behoefte aan uitgebreider onderzoek van pro-aritmische substraten teneinde anti-aritmische drug-regimes te optimaliseren.

Het concept van substraat-specifieke interventie past binnen het opkomende paradigma van patiëntenzorg als maatwerk, waarin de complexiteit van ziekten steeds meer wordt erkend en wordt beantwoord met het onderzoek en gebruik van mechanisme-specifieke interventies. De erkenning van de complexiteit van niet slechts aritmiën maar humane ziekte in het algemeen is een drijfveer geweest voor het onderzoek naar de mogelijkheid tot patiënt-specifieke medicijn-testen middels induced pluripotent stem cells (iPS cellen).⁵ Met behulp van genetische modificatie van somatische cellen middels enkele transcriptiefactoren dedifferentiëren deze cellen tot een op embryonale stamcel gelijkend fenotype, waarna deze kunnen differentiëren naar verschillende patiënt-specifieke cellijnen waaronder cardiomyocyten. Hoewel de uitrijping en puurheid van iPS-afgeleide cardiomyocyten obstakels zijn die overkomen dienen te worden voor daadwerkelijke klinische relevantie, is deze aanpak veelbelovend voor het biologische onderzoeksveld.⁶ Als alternatief wordt er gestreefd naar de mogelijkheid van het direct reprogrammeren van eenvoudig verkrijgbare somatische cellen tot CMCs.⁷ Met dergelijke technieken kunnen patient-specifieke celtypen zoals cardiomyocyten, die normaliter moeilijk te verkrijgen zijn, worden gekweekt en kan de respons op verschillende farmaca

worden getest.⁸ Zodoende kan optimale medicijn selectie worden gerealiseerd op patiënt-specifieke wijze, hetgeen de therapeutische werkzaamheid van farmacologische behandeling kan optimaliseren. Door deze techniek te combineren met reeds bestaande *in vitro* modellen van verschillende pro-aritmische substraten, kan ons begrip van aritmieën uiteindelijk toereikend zijn om alle patiënten farmacologisch optimaal te behandelen door op maat gemaakte anti-aritmische patiënt-specifieke drug regimes.

Het aanpakken van de MFB in vivo als anti-aritmische strategie

De werkzaamheid van anti-aritmica is vooral gebaseerd op symptomatische verlichting. Hierdoor worden onderliggende pro-aritmische substraten zoals cardiale remodelering niet gemodificeerd ondanks de prominente rol in aritmogenese. Het is daarom mogelijk dat het bewerkstelligen van intrinsieke veranderingen van pro-aritmische substraten door ziekte-modificerende medicijnen, genetische modificatie of celtherapie kan leiden tot meer optimale en langdurige resultaten dan wat behaald kan worden met farmacologische behandeling. In het geval van fibrose genieten MFBs sinds recentelijk steeds meer aandacht als potentiële hoofdrolspelers in fibrose-geassocieerde aritmieën. Hoewel deze cellen initieel werden verondersteld een nagenoeg latent te zijn en gedacht werd dat zij slechts de extracellulaire matrix onderhielden, is recentelijk ontdekt dat MFBs functioneel kunnen koppelen met CMCs hetgeen impliceert dat deze cellen een actieve rol kunnen spelen in de context van fibrose-geassocieerde aritmieën.⁹ Sindsdien is gebleken dat heterocellulaire koppeling tussen CMCs en MFBs op dosis-afhankelijke wijze geleiding vertraagt,¹⁰ ectopische activiteit verhoogt¹¹ en de neiging tot het vormen van reentry aritmieën vergroot.¹² Alhoewel deze *in vitro* experimenten, gesteund door *in silico* simulaties,¹³ veelbelovende concepten aan de orde brengen die ons begrip van aritmieën verbeteren is een vertaling naar *in vivo* situaties moeilijk. Daarom is de klinische relevantie van dergelijke bevindingen een voorspelbaar onderwerp van discussie. Een voorbeeld van een dergelijke discussie betreft de klinische relevantie van heterocellulaire koppeling tussen MFBs en CMCs, hetgeen tot op heden niet duidelijk is aangetoond *in vivo*.¹⁴⁻¹⁶ Functionele koppeling tussen toegediende, genetisch gelabelde cellen en myocard is aangetoond *in vivo*,¹⁷ maar onomstotelijk bewijs van koppeling tussen endogeen aanwezige en daardoor ongelabelde cellen is moeilijk te realiseren vanuit technisch oogpunt. Alhoewel het bewijzen van het bestaan van functionele heterocellulaire koppeling *in vivo* een technische uitdaging vormt, is het vele malen uitdagender om met onomstotelijk bewijs het bestaan van dergelijke mechanismen uit te sluiten. Een verder

complicerende factor van MFB-geïnduceerde aritmieën is het gegeven dat tevens mechanische koppeling en paracrine mechanismen een mogelijke rol spelen.^{18,19} Aangezien deze bevindingen in lijn liggen met het slechts gedeeltelijke herstel van elektrofysiologische functie na heterocellulaire ontkoppeling *in vitro* (Hoofdstuk III), is het mogelijk dat, om fibrose-geassocieerde aritmieën effectief te behandelen *in vivo*, het gehele fenotype van de MFB aangepast moet worden in plaats van ieder afzonderlijk pro-aritmisch mechanisme te behandelen. Bovendien zou een interventie die de gehele MFB modificeert ook de extracellulaire matrix depositie kunnen aantasten, een belangrijk pro-aritmisch kenmerk van fibrose *in vivo* dat tot op heden nauwelijks te onderzoeken is *in vitro*.²⁰ Een mogelijk haalbare aanpak van de gehele MFB werd gedemonstreerd in Hoofdstuk II, waarin remming van MFB proliferatie sterke anti-aritmische effecten teweeg bracht. Omdat MFBs pro-aritmische effecten op een dosis-afhankelijke wijze, zal het verlagen van de hoeveelheid aanwezige MFBs indirect de pro-aritmische effecten van alle bekende en onbekende pro-aritmische mechanismen tegengaan. Het verminderen van de proliferatieve capaciteit van MFBs voorkomt excessieve littekenformatie in non-cardiaal weefsel, waarbij tevens extracellulaire matrix depositie is verminderd.²¹ Het is te verwachten dat in toenemende mate bewijs wordt geleverd dat een dergelijke strategie tevens anti-aritmische effecten teweeg kan brengen *in vivo*.^{22,23} Echter is het van groot belang te erkennen dat proliferatie-remmende stoffen berucht zijn wegens ernstige, vaak systemische neveneffecten en ongewenste binding aan gevoelige, perifere celtypen. De meerwaarde die genetische modificatie kan bieden boven farmacologische behandeling is substantieel, zoals langere werkzaamheidsduur en verminderde neveneffecten door selectieve transductie van specifieke cel- en weefseltypen door gebruik te maken van celtype-specifieke promotors en virussen met weefsel-specifiek tropisme. Hierdoor is het preferabel het gedrag van MFBs te moduleren middels genetische modificatie. Een voorbeeld hiervan is het verlagen van myocardin-related transcription factor- α , waardoor myofibroblast activatie wordt verhinderd hetgeen resulteert in een sterk verlaagde pro-fibrotische respons van deze cellen *in vivo*.²⁴

Een gelijksoortige anti-aritmische benadering die de gehele MFB modificeert is cellulaire herprogrammering, met als doel de MFB te forceren zich te gedragen als een celtype met minder schadelijke gevolgen voor de hartfunctie, zoals stamcellen of zelfs CMCs. Hoewel cellulaire herprogrammering initieel werd gerealiseerd door nucleaire herprogrammering²⁵ wordt cellulaire herprogrammering van MFBs tot stamcellen of CMCs tegenwoordig bewerkstelligd door genetische modificatie met enkele transcriptie factoren, alhoewel deze aanpak vooralsnog als inefficiënt wordt

beschouwd.⁷ In deze context zou geforceerde heterocellulaire fusie zoals onderzocht in dit proefschrift een toekomstige alternatieve route kunnen bieden voor anti-aritmische MFB herprogrammering, aangezien fusie kan worden gebruikt voor genetische herprogrammering van cellen.²⁵ Als alternatief kunnen MFBs genetisch worden gemodificeerd om qua elektrofysiologie een CMC gedeeltelijk na te bootsen door expressie te forceren van Cx43 en de ionkanalen Kir2.1 en Nav1.5, hetgeen ook voorspelbare anti-aritmische effecten heeft.^{26,27} Een nieuwe methode van genetische modificatie is optogenetica, waarmee transgen activiteit kan worden gereguleerd door middel van blootstelling aan licht. Recentelijk is zelf optische controle over eiwitactiviteit gedemonstreerd.²⁸ Dergelijke verfijnde methoden laten het toe om een genetische interventie precies te richten en timen, hetgeen wegens de complexiteit van aritmische substraten een krachtige mogelijkheid is voor het onderzoek en de toekomstige behandeling van pro-aritmische mechanismen. Optogenetica is gebaseerd op de lichtgevoelige rhodopsines en is binnen neurologisch onderzoek inmiddels een bewezen krachtige techniek die in de toekomst mogelijk gebruikt kan worden om CMCs danwel MFBs te modificeren.²⁹ Ongeacht de wijze waarop MFBs zullen worden aangepakt in toekomstig *in vivo* onderzoek zullen de voortschrijdende inzichten in de pro-aritmische mechanismen van MFBs alsmede de vooruitgang in biotechnologie blijven leiden tot nieuwe anti-aritmische strategieën voor de voorzienbare toekomst, die uiteindelijk kunnen resulteren in optimale substraat-georiënteerde behandeling van fibrose-geassocieerde aritmiën.

Het modificeren van een substraat voorbij de pro-aritmische mechanismen als de ultieme anti-aritmische strategie

Sinds de ontdekking van de microscoop persisteert binnen de wetenschap het idee dat het nader bekijken van bepaalde fenomenen de beste wijze is om de onderliggende mechanismen te begrijpen. Zoals reeds besproken, worden pro-aritmische mechanismen als aangrijpingspunt gezien voor meer adequate toekomstige anti-aritmische behandeling. Daarom zullen voorlopig experimenten die diep gelegen pro-aritmische mechanismen onderzoeken nodig blijven om aritmiën tot in de diepste details te kunnen begrijpen. De snel uitbreidende kennis betreffende verschillende pro-aritmische mechanismen wijst er echter op dat de complexiteit van het behandelen van deze mechanismen in alle substraten te hoog is om in de nabije toekomst optimale anti-aritmische therapieën te realiseren. Wegens de huidige uitbreidende epidemie van atriumfibrilleren en structurele hartziekte is het nodig tijdig actie te ondernemen tegen pro-aritmische substraten.

Ondanks dat het behandelen van pro-aritmische mechanismen van individuele substraten zoals fibrose en hypertrofie uiteindelijk kunnen leiden tot een geoptimaliseerde anti-aritmische behandeling, zijn deze pro-aritmische substraten tevens geassocieerd met verminderde mechanische hartfunctie die vervolgens systemische co-morbiditeit kan veroorzaken zoals thrombus-vorming met embolisatie en vermoeidheid. Waar cardiale hypertrofie erop is gericht om cardiale output te handhaven, is cardiale fibrose een respons op drukoverbelasting om zo de structurele integriteit van het hart te behouden. Dit resulteert in veranderde contractiliteit en cardiale stijfheid, het geen op zichzelf pro-aritmische consequenties kan hebben. Daarom zou het nodig kunnen zijn het gehele structurele substraat te modificeren om de gehele aritmogeniteit te behandelen. Een dergelijke strategie is stamceltherapie, waarvan wordt verondersteld dat het meerdere nadelige aspecten van structurele hartziekten positief beïnvloedt of zelfs kan omkeren waardoor het mogelijk anti-aritmische effecten kan bewerkstelligen op een hoger organisatieniveau dan individuele pro-aritmische mechanismen. Initieel was de rationale achter cardiale stamceltherapie het vervangen van verloren exciteerbare cardiomyocyten in fibrotisch myocard door middel van toediening van cellen die in staat waren tot cardiale differentiatie om zodoende aritmiën tegen te gaan. Het potentieel tot cardiale differentiatie van dergelijke cellen is echter teleurstellend laag.³⁰ De laatste jaren wordt verondersteld dat het kleine maar significante therapeutische effect van stamceltherapie berust op paracrine effecten die structurele hartziekte ten goede beïnvloeden.³¹ Wegens de lage hoeveelheid stamcellen die achterblijft bij stamceltherapie, is het huidige streven binnen stamcelonderzoek om de werkzaamheid van deze therapie te verhogen door meer stamcellen in het myocard achter te laten middels verschillende technieken waaronder tissue engineering en genetische of magnetische modificatie van cellen.³²⁻³⁴ Echter, zoals gedemonstreerd in dit proefschrift, kunnen dergelijke strategieën pro-aritmische effecten hebben, aangezien mesenchymale stamcellen middels heterocelulaire koppeling en non-exosomale paracrine activiteit pro-aritmische effecten hebben op CMCs op dosisafhankelijke wijze. In deze context moet worden verhelderd of de voordelige effecten van stamceltherapie berusten op de afgifte van exosomen, hetgeen kleine lipide vesikels zijn die mRNA, miRNA en eiwit bevatten.^{35,36} Aangezien exosomen in onze studie geen significante pro-aritmische effecten liet zien, kunnen deze componenten van het MSC secretoom een toekomstig, veilig alternatief voor celtherapie vormen dat mogelijk het substraat positief beïnvloedt zonder de pro-aritmische effecten. Behalve stamceltherapie zijn er methoden als angiotensine-II blokkade waarmee fibrose in het geheel wordt tegengegaan, waardoor indirecte anti-aritmische effecten kunnen worden bereikt

op een organisatieniveau boven individuele pro-aritmische mechanismen.³⁷ Als alternatief kan anti-fibrotische reprogramming door verlaging van transcriptiefactor *expressive* in MFBs een haalbare anti-aritmische strategie zijn die tevens mechanische cardiale functie zou kunnen verbeteren.²⁴ Zulke benaderingen profiteren van vorderingen in selectieve genetische modificatie waarin specifieke celtypen worden aangepakt middels AAV technologie zoals beschreven in dit proefschrift. Bovendien wordt behandeling middels AAVs mogelijk relatief spoedig opgenomen in de kliniek, aangezien fase-I en fase-II klinische trials die het succes van dergelijke strategieën demonstreren inmiddels worden beschreven.^{38,39} Samenvattend vragen alle strategieën die nu of in de nabije toekomst beschikbaar zijn om pro-aritmische mechanismen te onderzoeken en te behandelen meer aandacht, toewijding en onderzoek door de wetenschappelijke gemeenschap, hetgeen uiteindelijk kan leiden tot de beste anti-aritmische strategie die kan worden bereikt: het genezen van een pro-aritmisch substraat in plaats van het slechts te behandelen.

References

1. The 'Sicilian Gambit'. A new approach to the classification of antiarrhythmic drugs based on their actions on arrhythmogenic mechanisms. The Task Force of the Working Group on Arrhythmias of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 1991;12:1112-1131.
2. Rosen MR and Janse MJ. Concept of the vulnerable parameter: the Sicilian Gambit revisited. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010;55:428-437.
3. Chang MG, Zhang Y, Chang CY, Xu L, Emokpae R, Tung L, Marban E, Abraham MR. Spiral waves and reentry dynamics in an in vitro model of the healed infarct border zone. *Circ Res.* 2009;105:1062-1071.
4. Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res.* 1989;64:1041-1050.
5. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131:861-872.

6. Lin B, Kim J, Li Y, Pan H, Carvajal-Vergara X, Salama G, Cheng T, Li Y, Lo CW, Yang L. High-purity enrichment of functional cardiovascular cells from human iPSC cells. *Cardiovasc Res.* 2012;95:327-335.
7. Chen JX, Krane M, Deutsch MA, Wang L, Rav-Acha M, Gregoire S, Engels MC, Rajarajan K, Karra R, Abel ED, Wu JC, Milan D, Wu SM. Inefficient reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes using Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circ Res.* 2012;111:50-55.
8. Malan D, Friedrichs S, Fleischmann BK, Sasse P. Cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells with long-QT syndrome 3 recapitulate typical disease-specific features in vitro. *Circ Res.* 2011;109:841-847.
9. Rook MB, Jongsma HJ, de JB. Single channel currents of homo- and heterologous gap junctions between cardiac fibroblasts and myocytes. *Pflugers Arch.* 1989;414:95-98.
10. Miragoli M, Gaudesius G, Rohr S. Electrotonic modulation of cardiac impulse conduction by myofibroblasts. *Circ Res.* 2006;98:801-810.
11. Miragoli M, Salvarani N, Rohr S. Myofibroblasts induce ectopic activity in cardiac tissue. *Circ Res.* 2007;101:755-758.
12. Zlochiver S, Munoz V, Vikstrom KL, Taffet SM, Berenfeld O, Jalife J. Electrotonic myofibroblast-to-myocyte coupling increases propensity to reentrant arrhythmias in two-dimensional cardiac monolayers. *Biophys J.* 2008;95:4469-4480.
13. Xie Y, Garfinkel A, Camelliti P, Kohl P, Weiss JN, Qu Z. Effects of fibroblast-myocyte coupling on cardiac conduction and vulnerability to reentry: A computational study. *Heart Rhythm.* 2009;6:1641-1649.
14. Baum JR, Long B, Cabo C, Duffy HS. Myofibroblasts cause heterogeneous Cx43 reduction and are unlikely to be coupled to myocytes in the healing canine infarct. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302:H790-H800.
15. Camelliti P, Green CR, Kohl P. Structural and functional coupling of cardiac myocytes and fibroblasts. *Adv Cardiol.* 2006;42:132-149.
16. Camelliti P, Green CR, LeGrice I, Kohl P. Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling. *Circ Res.* 2004;94:828-835.

17. Shiba Y, Fernandes S, Zhu WZ, Filice D, Muskheli V, Kim J, Palpant NJ, Gantz J, Moyes KW, Reinecke H, Van BB, Dardas T, Mignone JL, Izawa A, Hanna R, Viswanathan M, Gold JD, Kotlikoff MI, Sarvazyan N, Kay MW, Murry CE, Laflamme MA. Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature*. 2012;489:322-325.
18. Pedrotty DM, Klinger RY, Kirkton RD, Bursac N. Cardiac fibroblast paracrine factors alter impulse conduction and ion channel expression of neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2009;83:688-697.
19. Thompson SA, Copeland CR, Reich DH, Tung L. Mechanical coupling between myofibroblasts and cardiomyocytes slows electric conduction in fibrotic cell monolayers. *Circulation*. 2011;123:2083-2093.
20. de Bakker JM, van Capelle FJ, Janse MJ, Tasseron S, Vermeulen JT, de JN, Lahpor JR. Slow conduction in the infarcted human heart. 'Zigzag' course of activation. *Circulation*. 1993;88:915-926.
21. Min J, Lukowski ZL, Levine MA, Meyers CA, Beattie AR, Schultz GS, Samuelson DA, Sherwood MB. Prevention of ocular scarring post glaucoma filtration surgery using the inflammatory cell and platelet binding modulator saratin in a rabbit model. *PLoS One*. 2012;7:e35627.
22. Lin X, Yu M, Wu K, Yuan H, Zhong H. Effects of pirfenidone on proliferation, migration, and collagen contraction of human Tenon's fibroblasts in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:3763-3770.
23. Nguyen DT, Ding C, Wilson E, Marcus GM, Olgin JE. Pirfenidone mitigates left ventricular fibrosis and dysfunction after myocardial infarction and reduces arrhythmias. *Heart Rhythm*. 2010;7:1438-1445.
24. Small EM, Thatcher JE, Sutherland LB, Kinoshita H, Gerard RD, Richardson JA, Dimaio JM, Sadek H, Kuwahara K, Olson EN. Myocardin-related transcription factor-a controls myofibroblast activation and fibrosis in response to myocardial infarction. *Circ Res*. 2010;107:294-304.
25. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggen K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*. 2005;309:1369-1373.
26. Kirkton RD and Bursac N. Engineering biosynthetic excitable tissues from unexcitable cells for electrophysiological and cell therapy studies. *Nat Commun*. 2011;2:300.

27. Kirkton RD and Bursac N. Genetic engineering of somatic cells to study and improve cardiac function. *Europace*. 2012;14 Suppl 5:v40-v49.
28. Zhou XX, Chung HK, Lam AJ, Lin MZ. Optical control of protein activity by fluorescent protein domains. *Science*. 2012;338:810-814.
29. Galvan A, Hu X, Smith Y, Wichmann T. In vivo optogenetic control of striatal and thalamic neurons in non-human primates. *PLoS One*. 2012;7:e50808.
30. Ramkisoensing AA, Pijnappels DA, Askar SF, Passier R, Swildens J, Goumans MJ, Schutte CI, de Vries AA, Scherjon S, Mummery CL, Schalij MJ, Atsma DE. Human embryonic and fetal mesenchymal stem cells differentiate toward three different cardiac lineages in contrast to their adult counterparts. *PLoS One*. 2011;6:e24164.
31. van RJ, Bax JJ, Beeres SL, Dibbets-Schneider P, Roes SD, Stokkel MP, de RA, Fibbe WE, Zwaginga JJ, Boersma E, Schalij MJ, Atsma DE. Intramyocardial bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2009;301:1997-2004.
32. Cheng K, Li TS, Malliaras K, Davis DR, Zhang Y, Marban E. Magnetic targeting enhances engraftment and functional benefit of iron-labeled cardiosphere-derived cells in myocardial infarction. *Circ Res*. 2010;106:1570-1581.
33. Cheng K, Malliaras K, Li TS, Sun B, Houde C, Galang G, Smith J, Matsushita N, Marban E. Magnetic enhancement of cell retention, engraftment and functional benefit after intracoronary delivery of cardiac-derived stem cells in a rat model of ischemia/reperfusion. *Cell Transplant*. 2012.
34. Terrovitis J, Lautamaki R, Bonios M, Fox J, Engles JM, Yu J, Leppo MK, Pomper MG, Wahl RL, Seidel J, Tsui BM, Bengel FM, Abraham MR, Marban E. Noninvasive quantification and optimization of acute cell retention by in vivo positron emission tomography after intramyocardial cardiac-derived stem cell delivery. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:1619-1626.
35. Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen Med*. 2011;6:481-492.
36. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, Salto-Tellez M, Timmers L, Lee CN, El Oakley RM, Pasterkamp G, de Kleijn DP, Lim SK. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*. 2010;4:214-222.

37. van Kats JP, Duncker DJ, Haitsma DB, Schuijt MP, Niebuur R, Stubenitsky R, Boomsma F, Schalekamp MA, Verdouw PD, Danser AH. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade prevent cardiac remodeling in pigs after myocardial infarction: role of tissue angiotensin II. *Circulation*. 2000;102:1556-1563.
38. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, Chowdary P, Riddell A, Pie AJ, Harrington C, O'Beirne J, Smith K, Pasi J, Glader B, Rustagi P, Ng CY, Kay MA, Zhou J, Spence Y, Morton CL, Allay J, Coleman J, Sleep S, Cunningham JM, Srivastava D, Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F, High KA, Gray JT, Reiss UM, Nienhuis AW, Davidoff AM. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2011;365:2357-2365.
39. Flotte TR, Trapnell BC, Humphries M, Carey B, Calcedo R, Rouhani F, Campbell-Thompson M, Yachnis AT, Sandhaus RA, McElvaney NG, Mueller C, Messina LM, Wilson JM, Brantly M, Knop DR, Ye GJ, Chulay JD. Phase 2 clinical trial of a recombinant adeno-associated viral vector expressing alpha1-antitrypsin: interim results. *Hum Gene Ther*. 2011;22:1239-1247.

