## Optogenetische Aktivierung des G<sub>i</sub>-Signalwegs ermöglicht eine zeitlich präzise Modulation der Schrittmacheraktivität von Kardiomyozyten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

## Milan Cokić

aus Wien 2025 Angefertigt mit der Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. Philipp Sasse
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Busskamp

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.03.2025

Aus dem Institut für Physiologie I

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis			5
1.	Deute	sche Zusammenfassung	7
1.	1 E	inleitung	7
1.	2 N	lethoden und Material	10
	1.2.1	Vektorkonstrukt und Transfektion	10
	1.2.2	Embryonale Stammzellkultur und Differenzierung	10
	1.2.3	Immunofluoreszenz	11
	1.2.4	Frequenzanalyse und Lichtstimulation der Herzzellen	11
	1.2.5	Analyse des LWO Effektes und der Lichtsensitivität	12
	1.2.6	Pharmakologie	12
	1.2.7	Statistik	13
1.	3 E	rgebnisse	13
	1.3.1	Schlagfrequenzreduktion von Kardiomyozyten durch LWO Illumination	13
	1.3.2	Gi-Signalweg und GIRK Aktivierung in Kardiomyozyten durch LWO	14
	1.3.3	Nachweis einer hohen Lichtsensitivität von LWO	15
	1.3.4	Kinetisch schnellere Gi-Aktivierung mit LWO Beleuchtung verglichen mit	
	pharm	nakologischer Agonistenperfusion	15
1.	4 C	Diskussion	16
	1.4.1	Die LWO Auswahl als Gi-Signalaktivator	16
	1.4.2	Basiseigenschaften von LWO in Kardiomyozyten	17
	1.4.3	Kinetik und Sensitivität des LWO zur Modulation des Gi-Signalwegs	18
	1.4.4	Limitationen	20
1.	5 Z	usammenfassung	20
1.	6 L	iteraturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	22
2.	Veröf	fentlichung	29
	Abs	stract	29
	Intro	oduction	29

4.	Lebenslauf		39
3.	Danksagung		38
	References		36
	Conclusion		36
	Discussion		33
	Results		31
	Materials and Metho	ls	30

## Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
ANOVA	Varianzanalyse (ANalysis Of VAriance)
bpm	Schläge pro Minute (beats per minute)
Ca <sup>2+</sup>	Ionisiertes Calcium
CAG	CMV early enhancer/chicken $\beta$ actin promoter
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCh	Carbachol
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Adler-Medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
EB	Kugelförmige Stammzellkolonie (Embryoid body)
ELi <sub>50</sub> -Wert	Halbmaximale effektive Lichtintensität
ESC	Embryonale Stammzellen (embryonic stem cells)
eGFP	Grün fluoreszierendes Protein (enhanced Green Fluorescent Protein)
eYFP	Gelb fluoreszierendes Protein (enhanced Yellow Fluorescent Protein)
FCS	Fetales Kalbserum (Fetale Celver Serum)

GIRK	G-Protein gekoppelter, einwärts gleichrichtender Kaliumkanal (G-protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels)
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
I <sub>Ca</sub> ,L	L-Typ Calcium-Kanal-Strom
IBMX	3-IsobutyI-1-methylxanthin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
JellyOp	Jellyfish Opsin
LWO	Humanes langwellig sensitives Opsin (h. Long Wavelength cone Opsin)
mOPN4	Maus Opsin 4 (Melanopsin)
min	Minute
PTX	Pertussis-Toxin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
SEM	Mittlerer Standardfehler (standard error of the mean)
t	Zeit
λ	Lambda (Wellenlänge in nm)

## 1. Deutsche Zusammenfassung

### 1.1 Einleitung

In optogenetischen Studien werden genetische Manipulationen an Zellen vorgenommen, um lichtsensible Proteine, sogenannte Opsine, zu bilden. Diese können als "Schalter" durch spezifische Lichtwellenlängen aktiviert werden, um intrazelluläre Prozesse zu steuern (Shimizu-Sato S, 2002). Neben direkt lichtsensiblen Ionenkanälen (Deisseroth K, 2011; Boyden ES et al., 2005; Bruegmann et al., 2010) sind auch viele lichtsensitive G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) erforscht und in der Wissenschaft im Einsatz (Beiert et al., 2014; Makowka et al., 2019; Masseck OA et al., 2014; Abreu N, 2020). Traditionelle Methoden zur Veränderung und Analyse zellulärer Prozesse, wie pharmakologische und elektrische Anwendungen, haben jedoch den Nachteil einer mangelnden räumlichen und zeitlichen Präzision. Optogenetik hingegen kann Licht lokal begrenzt und zeitlich definiert applizieren und hat somit in diesem Bereich klare Vorteile.

Die Optogenetik findet breite Anwendung in der Neurophysiologie, Neurowissenschaft, Neuropsychologie und Verhaltensforschung. Sie wird sowohl in zellulären Modellen als auch in in vivo Versuchen genutzt, um neuronale Schaltkreise in Echtzeit zu manipulieren und dadurch Signalwege zu aktivieren oder zu deaktivieren. Dies dient unter anderem der Erforschung von Funktionen und Eigenschaften bestimmter Hirnareale (Ortolani D, 2018; Masseck OA et al., 2014; Kätzel D et al., 2014; Belzung C et al., 2014; Miesenböck G, 2011; Kravitz AV, 2010; Boyden ES et al., 2005). In den letzten Jahren wurden neue optogenetische Ansätze auch in verschiedenen Organen untersucht, einschließlich Kardiomyozyten und dem gesamten Herzen. Besonders hervorzuheben ist die optogenetische Defibrillation und Kardioversion bei Herzrhythmusstörungen in vivo in Mausherzen (Bruegmann T et al., 2016; Sasse P et al., 2019).

Für die korrekte Pumpfunktion des Herzens und die Anpassung an verschiedene Umweltfaktoren sind sowohl neurohumorale als auch lokale Regulationen essentiell (Robbins RJ, 2017; Baxter JD, 2003; Irisawa H, 1993). Das vegetative Nervensystem spielt hierbei eine entscheidende Rolle, indem es das Gleichgewicht zwischen Sympathikus und Parasympathikus aufrechterhält. Neurotransmitter wie Noradrenalin und Acetylcholin übertragen Informationen und lösen aktivierende oder hemmende Funktionen im Herzen aus (Teleanu RI et al. 2022; Hyman SE, 2005; Strosberg AE, 1993), hauptsächlich über GPCR, die für die intrazelluläre Regulation entscheidend sind. Die gegensätzlichen Wirkungen und das Zusammenspiel von  $G_{s}$ - (stimulierenden) und  $G_{i}$ - (hemmenden) Proteinen sind grundlegend für die Regulation der Herzfrequenz, der Kontraktilität und der neurohormonellen Steuerung des Kreislaufsystems sowie der pathophysiologischen Prozesse (Capote et al., 2015).

Der G<sub>i</sub>-Signalweg wird durch Bindung von Acetylcholin am M2 GPCR aktiviert, wobei die G<sub>i</sub>  $\alpha$ -Untereinheit die Adenylatzyklase hemmt. Dadurch sinkt der intrazelluläre cAMP-Spiegel, die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) wird verringert und somit werden die L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle weniger phosphoryliert und deren Ströme damit reduziert. In Vorhofmy-ozyten, wie auch in Zellen des Sinusknotens und des AV-Knotens, aktiviert zusätzlich die G<sub>i</sub>  $\beta$ γ-Untereinheit einen sogenannten einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal (IK,ACh/GIRK) (Krapivinsky et al., 1995; Ivanova-Nikolova et al., 1998; Dhein et al., 2001). Die resultierende Hyperpolarisation führt dies zu einer Verlangsamung der Herzfrequenz, einer Verlängerung der Erregungsleitung im AV-Knoten und einer Verkürzung der Aktionspotentialdauer in Kardiomyozyten (Belardinelli und Isenberg, 1983).

Die hohe Relevanz der G<sub>i</sub>-gekoppelten Rezeptoren für physiologische und pathologische Abläufe im Herzen ist gut dokumentiert. Eine gesteigerte Aktivierung der G<sub>i</sub>-gekoppelten Adenosin-A1-Rezeptoren hat beispielsweise eine protektive Funktion bei der Entstehung von Herzrhythmusstörungen (Hutchinson und Scammells, 2004). G<sub>i</sub>-gekoppelte  $\alpha$ 2-Rezeptoren haben eine wichtige sympatho-inhibitorische Funktion (Xiang und Kobilka, 2003). Bei akuten Myokardinfarkten, Herzinsuffizienz, Hypertrophie und arterieller Hypertonie spielen veränderte Signalwege durch eine Dysregulation der G-Proteine eine zentrale Rolle. Eine Dysbalance zwischen G<sub>s</sub>- und G<sub>i</sub>-Proteinen kann bei Herzfunktion weiter verschlechtert. Studien zeigen, dass die Überexpression von G<sub>i</sub>-Proteinen während eines Myokardinfarkts die Infarktgröße reduzieren und die Herzfunktion verbessern kann (Kaur G et al., 2023; McMullen JR et al., 2007; Lompré AM et al., 2010). Eine Hochregulierung von G<sub>i</sub>-Proteinen kann zudem den apoptotischen Zelltod in Myokardzellen nach kardialen

Ischämien vermindern, was den kardioprotektiven Effekt dieser Proteine weiter verdeutlicht (DeGeorge BR Jr, 2008).

Die optogenetische Lichtstimulation bietet den Vorteil einer höheren räumlichen und zeitlichen Präzision im Vergleich zur Anwendung konventioneller Rezeptor-Agonisten und ermöglicht die gezielte Isolierung der Proteinaktivierung durch spezifische Wellenlängen (Beiert et al., 2014; Guru et al., 2015; Makowka et al., 2019). Zum Beispiel wurde das Jellyfish Opsin (JellyOP), ein blaulichtempfindlicher Rezeptor, verwendet, um die G<sub>s</sub>-Signalkaskade in Kardiomyozyten und im gesamten Herzen mit hoher räumlicher und zeitlicher Präzision selektiv zu aktivieren (Makowka et al., 2019). Ähnliche Vorteile wurden für Melanopsin, ein  $G_{\alpha}$ -gekoppeltes lichtsensitives Protein, nachgewiesen (Beiert et al., 2014), dessen Aktivierung zu einer Erhöhung der Schlagfrequenz in Kardiomyozyten führte. In der Familie der G-Proteine existieren mehrere optogenetische Proteine zur Aktivierung der Gi/o-Signalkaskade. Masseck et al. (2014) haben in ihrer Arbeit an in vitro und in vivo murinen Neuronen gezeigt, dass die Kontrolle von Gi/o-Proteinen durch kurzwellig- (SWO) und langwellig-sensitive Opsine (LWO) möglich ist, welche GIRK-Kanäle aktivieren und damit voraussichtlich intrazelluläre hemmende Kaskaden auslösen können. Eine Anwendung von lichtsensitiven Gi-Proteinen und deren Wirkung in Kardiomyozyten wurde hingegen noch nicht beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war es, ein neues optogenetisches Werkzeug zu etablieren das die G<sub>i</sub>-Signalkaskade in Kardiomyozyten durch rotes Licht mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung aktivieren kann. Rotes (langwelliges) Licht wurde gewählt, da es tiefer in das Gewebe eindringen kann und im Vergleich zu kürzeren Wellenlängen eine geringere Phototoxizität aufweist, was die Zellen weniger schädigt und damit eine sicherere Stimulation ermöglicht (Dani S et al., 2024). Die Anwendung dieses Werkzeugs könnte zukünftig ein besseres Verständnis physiologischer und pathologischer Prozesse im Herzen ermöglichen und letztlich die Entwicklung präventiver und therapeutischer Strategien für verschiedene Herzkrankheiten unterstützen.

## 1.2 Methoden und Material

## 1.2.1 Vektorkonstrukt und Transfektion

Um ein Plasmid mit LWO und damit fusioniertes gelb fluoreszierendes Protein (eYFP) zu generieren, wurde für die Expression LWO (humanes langes-wellenlängensensitives Opsin 1, NP\_064445.1) am c-Terminus mit eYFP fusioniert. Hierfür wurde kodonoptimierte synthetisierte DNA (GeneArt, Life Technologies, Deutschland) verwendet. Mit den Enzymen Spel und Mlul wurde die DNA ausgeschnitten und in einen Backbone-Vektor mit dem Chicken  $\beta$ -Actin Promotor (CAG) subkloniert (Beiert et al., 2014). Zur Transfektion wurde 40 µg DNA mit dem Enzym Bgl II linearisiert und anschließend mit einem elektrischen Impuls (250 V, 750 µF, Elektrodenabstand 0,4 cm, BioRad Gene Pulser, CA, USA) in 4×10<sup>6</sup> embryonale Stammzellen (ES) der Maus (Linie D3) per Elektroporation eingebracht. Die elektroporierten Zellen wurden ausplattiert und 24 Stunden nach der Transfektion zur Selektion mit 400 µg/ml Neomycin behandelt. EYFP-positive Klone wurden ausgewählt, vereinzelt und weiter separat kultiviert. Zwei positive Klone wurden anhand ihrer spezifischen eYFP-Expression innerhalb der Kardiomyozyten und ihrer stabilen Lichtreaktion ausgewählt. Als Kontrollgruppe verwendeten wir D3-ES-Zellen, die das grün fluoreszierende Protein (eGFP) unter der Kontrolle des CAG-Promotors exprimierten.

## 1.2.2 Embryonale Stammzellkultur und Differenzierung

ES wurden mittels der 'hanging-drop'-Technik (Wobus et al., 1991; Maltsev et al., 1993; Desbaillets I et al., 2000; Beiert et al., 2014) in embryoiden Körpern (embryoid bodies, EBs) kultiviert und differenziert. Für die Differenzierung wurde Iscove's Modified Eagle's Medium (Invitrogen, MA, USA) verwendet, ergänzt mit 20 % fetalem Kalbserum (FCS, Pan-Biotech, Deutschland), 0,1 mM nicht-essentiellen Aminosäuren (Invitrogen), 100 U/ml Penicillin (Invitrogen), 100 mg/ml Streptomycin (Invitrogen) und 0,1 mM β-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich, MO, USA).

Am 5. Tag der Differenzierung wurden die EBs entweder auf Glasdeckgläser mit einer 0,1 %-igen Gelatinebeschichtung für die Analyse der Schlagfrequenz an Tag 9-14 platziert oder direkt für die immunhistochemische Analyse fixiert. Bei einigen Differenzierungen wurde das Differenzierungsmittel von Tag 4 bis 6 mit Noggin (R&D System, MN, USA, 250 ng/ml) und von Tag 6 bis 8 um Retinsäure (Sigma Aldrich, 1 µM) ergänzt. Zusätzlich wurde von Tag 6 bis 11 Dickkopf-related protein 1 (R&D System, 200 ng/ml) hinzugefügt, um die Differenzierung zu Vorhofkardiomyozyten zu fördern.

## 1.2.3 Immunofluoreszenz

Die EBs wurden mit 4 % Paraformaldehyd (Sigma Aldrich) fixiert und für 20 Minuten mit 0,2 % Triton X-100 (Sigma Aldrich) permeabilisiert. Danach wurden sie für 20 Minuten mit 5 % Eselserum (Jackson ImmunoResearch, UK) blockiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einem primären Antikörper gegen  $\alpha$ -Actinin (Herzmuskel-spezifisch; 1:400, Sigma Aldrich) gefärbt. Der mit Alexa Fluor 647 konjugierte sekundäre Antikörper (1:400, Invitrogen), verdünnt mit 1 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma Aldrich), wurde anschließend eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellpräparate wurden mit einem Eclipse Ti2-Mikroskop mit NIS-Elements und Dekonvolutions-Software (Nikon, Japan) aufgenommen.

## 1.2.4 Frequenzanalyse und Lichtstimulation der Herzzellen

Für die Auswertung wurden schlagende EBs genutzt, welche in schlagenden Arealen eine eYFP-Expression nachwiesen und zwischen Tag 9-14 der Differenzierung gewonnen wurden. Das Medium wurde 1-2 Stunden vor Durchführung der Experimente gegen Tyrode-Lösung ausgetauscht (Konzentration der Bestandteile in mM: 142 NaCl, 5,4 KCl, 1,8 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 Glukose, 10 HEPES; pH eingestellt auf 7,4). Zusätzlich wurde entweder 11-cis Retinal (1 µM, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) oder 9-cis Retinal (1 µM, Sigma Aldrich) für 1-2 Stunden vor dem Versuch zugesetzt. Während der Versuche und der mikroskopischen Videoaufnahme wurden die kontrahierenden EBs konstant mit Tyrode-Lösung bei ca. 35°C ohne zusätzliches Retinal perfundiert. Die Mikroskopie und die Videoaufnahme erfolgten mittels Axiovert 200 Mikroskop mit einem 5-fach Objektiv (Fluar, NA 0,25, Zeiss, Deutschland) und infrarotem Licht (760 nm, 1,8 µW/mm<sup>2</sup>), um eine unbeabsichtigte LWO-Aktivierung zu vermeiden. Spontane Kontraktionen wurden mittels einer CCD-Kamera (charge-coupled device, CCD) (piA640-210gm, Basler, Deutschland) mit 51 fps (Bildern pro Sekunde) aufgenommen. Die Frequenzanalyse erfolgte durch eine eigens programmierte Software (LabView, National Instruments, TX, USA) wie bereits beschrieben (Bruegmann 2010). Die optogenetische Stimulation wurde mit einer 625 nm

LED (LedHUB, Omicron Laserage, Deutschland) durchgeführt. Das Licht wurde über eine Glasfaser mit einem 10 % Neutraldichtefilter (ND) und einem 660 nm dichroitischen Filter (AHF Analysentechnik, Deutschland) auf das Mikroskopobjektiv fokussiert. Die Belichtung wurde mithilfe eines Steuerungs- und Aufnahmegeräts (PowerLab 4/35, Labchart Software, AD Instruments, Sydney, Australien) gesteuert. Gleichzeitig wurden die Zeitpunkte der individuellen Kontraktionen aufgenommen, um die Schlagfrequenz zu berechnen. Vor jedem Experiment wurde die Lichtintensität am Objektiv mit einem Power-Meter (PM100 Powermeter, S130A Sensor, Thorlabs, NJ, USA) kontrolliert und kalibriert.

## 1.2.5 Analyse des LWO Effektes und der Lichtsensitivität

Für die statistische Analyse wurden ausschließlich stabil schlagende EBs ohne arrhythmische Episoden berücksichtig, welche innerhalb von 5 Minuten vor dem Experiment keine Frequenzschwankungen aufwiesen. Die durchschnittliche Frequenz während einer 10-sekündigen kontinuierlichen 625 nm Belichtung wurde analysiert und zur Baseline, die 10 Sekunden vor der Belichtung gemessen wurde, normiert. Um die Effektivität von LWO darzustellen, wurden 100 % als vollständiger Block des spontanen Schlagens und 0 % als kein Effekt definiert. Zur Bestimmung der Lichtsensitivität von LWO wurde die Lichtintensität jedes einzelnen Lichtimpulses schrittweise gesteigert (in µW/mm<sup>2</sup>: 0,3; 1; 3; 10; 30; 100; 300). Ebenfalls wurden individuelle Lichtimpulse bei  $\mu$ W/mm<sup>2</sup>), gleicher Lichtintensität (100 aber schrittweiser Anpassung der Belichtungszeiten (in Sekunden: 0,1; 0,3; 0,5; 1; 3; 5; 10; 30), appliziert. Anschließend wurde die durchschnittliche Schlagfrequenz der Kardiomyozyten berechnet, indem die 5 Sekunden nach Belichtung mit den 5 Sekunden vor Belichtung verglichen wurden. Die Dosis-Wirkungsbeziehung wurde durch eine Hill-Funktion mit einem oberen Maximalwert von 100 % analysiert (GraphPad Prism, CA, USA), wodurch die Lichtintensität für halbmaximalen Effekt berechnet werden konnte.

## 1.2.6 Pharmakologie

Um den Effekt von LWO mit einer pharmakologischen Stimulation zu vergleichen, wurde die supramaximale Illumination (100 µW/mm<sup>2</sup>, 10 s) und die Stimulation der muskarinen Acetylcholin-Rezeptoren mit Carbachol (60 s, 100 µM, Sigma Aldrich) verglichen. Die

Effektivität der Kontraktionsinhibition wurde berechnet, indem die Frequenz 5 Sekunden nach der tiefsten Frequenz (effektivste Blockade) mit der Frequenz 5 Sekunden vor Beleuchtung bzw. Carbachol-Perfusion verglichen wurde. Um die Kinetik zu bestimmen, wurde die Zeit ab dem Beginn der Beleuchtung oder Perfusion bis zum maximalen inhibitorischen Effekt gemessen. Zusätzlich wurde auch die Dauer vom Stimulationsende bis zum Erreichen von 50 % der vorherigen Baseline-Schlagfrequenz erfasst.

Im Rahmen der Signalwegbestimmung der LWO-Aktivierung wurden pharmakologische Rezeptor- und Kanal-Blocker verwendet. Die zu testenden EBs wurden für etwa 24 Stunden mit 0,5 µg/ml Pertussis-Toxin (PTX, Invitrogen) in IMDM-Medium ohne Kalbserum inkubiert, um die Gi-Proteine-Blockade zu erreichen. Zur Inhibition der GIRK wurde der spezifische Blocker Tertiapin-q verwendet. Nach der ersten Lichtstimulation wurden die EBs für 30 Minuten mit Tertiapin-q (100 nM, Tocris, Bristol, UK) inkubiert und bis zum Ende des Experiments kontinuierlich damit perfundiert (Abbildung 2C, Cokić et al., 2021).

## 1.2.7 Statistik

Alle Daten werden als Mittelwert ± Standardfehler (Mean ± SEM) dargestellt.

Für die statistische Analyse wurde GraphPad Prism 7.0 verwendet. In den Abbildungen 1D und E wurde eine Einfaktor-Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Tukey-Post-hoc-Test für die Frequenzexperimente verwendet. Der Pertussis-Toxin (PTX)-Effekt in Abbildung 2B wurde mittels ungepaartem t-Test analysiert. Für die restlichen Experimente (Abbildungen 1G, 2D, 4B-D, Cokić et al., 2021) wurde der zweiseitige gepaarte t-Test genutzt. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Variable 'n' bezeichnet die Anzahl der unabhängigen Experimente (einzelne EBs).

## 1.3 Ergebnisse

1.3.1 Schlagfrequenzreduktion von Kardiomyozyten durch LWO Illumination

Das humane LWO wurde in Fusion mit eYFP unter Kontrolle des CAG-Promotors in ES-Zellen (D3-Linie) exprimiert (Abbildung 1A, Cokić et al., 2021). Zur Differenzierung von

ES-Zellen in spontan kontrahierende Kardiomyozyten wurden EBs mittels der 'hängenden Tropfen'-Methode generiert (Wobus et al., 1991; Maltsev et al., 1993; Desbaillets et al., 2000; Beiert et al., 2014). Spontan schlagende Areale in EBs zeigten eine Differenzierung in Alpha-Aktinin- und eYFP-positive Kardiomyozyten, was die Expression von LWO belegt (siehe Abbildung 1B, Cokić et al., 2021). Um eine ungewollte Aktivierung von LWO während der Schlagfrequenzanalysen zu vermeiden, wurde die Video-Mikroskopie mit Infrarotlicht (760 nm) durchgeführt. Die Beleuchtung der kontrahierenden Areale mit rotem Licht (625 nm, 10 s, 100 µW/mm<sup>2</sup>) führte zu einer nahezu vollständigen Blockade der spontanen Kontraktion der EBs, die aus zwei verschiedenen ES-Zellklonen differenziert wurden (Abbildungen 1C, D, Cokić et al., 2021; Klon C1 und Klon C2). Im Vergleich dazu führte die Beleuchtung von Kontroll-EBs, die nur eGFP exprimierten, zu keiner Reduktion der Schlagfrequenz (Abbildungen 1C, D, Cokić et al., 2021; Ctr). Es ist erwähnenswert, dass die Baseline-Schlagfrequenzen zwischen den EBs der beiden LWO-Klone und des Kontroll-Klons ähnlich waren, was darauf hinweist, dass die LWO-Expression die Schrittmacherfunktion nicht negativ beeinflusst und im Dunkeln nicht aktiviert wurde (siehe Abbildung 1E, Cokić et al., 2021). Die Anwendung von zwei gleichen Lichtimpulsen im Abstand von 90 Sekunden ergab einen ähnlichen Effekt des zweiten Lichtpulses (Abbildungen 1F, G, Cokić et al., 2021).

## 1.3.2 Gi-Signalweg und GIRK Aktivierung in Kardiomyozyten durch LWO

Um die Spezifität von LWO für die G<sub>i</sub>-Aktivierung zu beweisen, wurden EBs 24 Stunden lang mit PTX (0,5 µg/ml) vorbehandelt, um G<sub>i/o</sub>-Proteine zu blockieren. Frequenzmessungen zeigten, dass die PTX-Inkubation den LWO-Effekt nahezu vollständig aufhob (Abbildungen 2A, B, Cokić et al., 2021), wobei die Blockierungswirkung von LWO auf nur noch 4 % sank. Im Gegensatz dazu betrug die LWO-Wirkung bei unbehandelten EBs 88 %. Da die Aktivierung von GIRK-Kanälen durch G<sub>i</sub>-Protein- $\beta\gamma$ -Untereinheiten ein Hauptmechanismus für die Verlangsamung der Herzfrequenz ist (Huang et al., 1995; Nobles et al., 2018), wurden die Belichtungseffekte vor und nach der Anwendung des GIRK-Kanalblockers Tertiapin (100 nM, 30 min) verglichen (Abbildung 2C, Cokić et al., 2021, blaues Areal). Tertiapin reduzierte den LWO-Effekt signifikant von 91 % auf 21 % Blockierung (Abbildung 2D, Cokić et al., 2021, p=0,003).

### 1.3.3 Nachweis einer hohen Lichtsensitivität von LWO

Um die Lichtsensitivität von LWO zur Blockierung der Schrittmacheraktivität zu bestimmen, wurden die Lichtintensität oder Belichtungsdauer bei wiederholter Lichtapplikation angepasst (Abbildung 3, Cokić et al., 2021). Die Schlagfrequenz wurde nach jedem 10sekündigen Lichtpuls mit zunehmender Lichtintensität von 0,3 bis 300 µW/mm<sup>2</sup> stetig reduziert (Abbildung 3A, Cokić et al., 2021), was eine sigmoidale Abhängigkeit des Blockierungseffekts vom Logarithmus der Lichtintensität ergab (Abbildung 3C, Cokić et al., 2021 - Durchschnittsdaten). Eine Hill-Fit-Analyse ergab eine durchschnittliche halbmaximale effektive Lichtintensität (ELi<sub>50</sub>) von 2,4  $\pm$  0,7  $\mu$ W/mm<sup>2</sup> (n = 9) und einen maximalen Blockierungseffekt bei etwa 100 µW/mm<sup>2</sup>. Bei konstanter Lichtintensität von 100 µW/mm<sup>2</sup> und zunehmender Belichtungsdauer von 0,1 bis 30 s konnte ebenfalls eine schrittweise Zunahme der Blockierung der Schlagfrequenz beobachtet werden (Abbildung 3B, Cokić et al., 2021), was sich ebenfalls in einer sigmoidalen Abhängigkeit vom Logarithmus der Belichtungsdauer darstellte. Die halbmaximale effektive Belichtungsdauer betrug 1,2 ± 0,4 s (n = 6), der maximale Effekt trat bei etwa 10 s auf (siehe Durchschnittswerte in Abbildung 3D, Cokić et al., 2021). Beim graphischen Vergleich der Lichtenergie (Dauer \* Intensität; s\*µW/mm<sup>2</sup>) beider Protokolle zeigte sich, dass das Lichtintensitätsprotokoll effektiver war und weniger Lichtenergie benötigte als das Pulsdauerprotokoll (Abbildung 3E, Cokić et al., 2021) (siehe Diskussion).

Die Konstanz der Lichtempfindlichkeit von LWO wurde durch die Applikation von zwei kurzen Lichtimpulsen (0,5 s) mit selbigen Lichtintensität von 100  $\mu$ W/mm<sup>2</sup> im Abstand von 20 s überprüft. Die blockierende Wirkung und Lichtempfindlichkeit beider Impulse waren gleich (Abbildungen 3F, G, Cokić et al., 2021, n = 5, p = 0,46), was darauf hinweist, dass die submaximale Blockierung nicht durch Refraktärzeit oder Inaktivierung von LWO beeinträchtigt wird.

## 1.3.4 Kinetisch schnellere G<sub>i</sub>-Aktivierung mit LWO Beleuchtung verglichen mit pharmakologischer Agonistenperfusion

Um die zeitliche Präzision von LWO und die Vorteile der Lichtstimulation gegenüber der pharmakologischen Stimulation zu verdeutlichen, wurde die Wirkung von LWO durch Be-

leuchtung (625 nm) mit der Perfusion von EBs mit dem Acetylcholin-Rezeptor-Agonisten Carbachol (CCh, 100  $\mu$ M) verglichen (Abbildung 4A, Cokić et al., 2021). Beide Stimulationen führten zu einer vergleichbaren Blockierungseffektivität (Abbildung 4B, Cokić et al., 2021, LWO 78,6 ± 8,5 %, n = 7, CCh 72,6 ± 13,2 %, n = 7). Jedoch war die Aktivierungskinetik (Verzögerung bis zur maximalen Blockierung, Abbildung 4C, Cokić et al., 2021) durch LWO-Aktivierung (0,8 ± 0,1 s, n = 7) viel schneller als nach Perfusion mit CCh (33,4 ± 7,8 s, n = 7). Auch die Deaktivierungskinetik (Zeit vom Ende der Stimulation bis zur 50 %-igen Erholung, Abbildung 4D, Cokić et al., 2021) war nach LWO-Stimulation (0,8 ± 0,3 s, n = 7) deutlich schneller als nach dem Auswaschen von CCh (99,6 ± 21,9 s, n = 7).

## 1.4 Diskussion

Optogenetische Methoden bieten signifikante Vorteile gegenüber pharmakologischen Stimulationen. Sie ermöglichen die gezielte Modulation der G-Protein-Signalübertragung in spezifischen Zelltypen mit hoher zeitlicher und räumlicher Präzision unter Verwendung von Licht anstelle von Rezeptor-Liganden. Das Hauptziel dieser Arbeit war es, die optogenetische Aktivierung von G<sub>i</sub>-Signalen in Kardiomyozyten durch das LWO-Protein zu untersuchen und dessen Vorteile zu nutzen. Hierfür wurden Kardiomyozyten verwendet, die aus Stammzellen differenziert wurden und in Zellkultur spontan schlagen. Diese Zellen ähneln einem frühen embryonalen Phänotyp und ihr Schrittmacher-Mechanismus (Boheler et al., 2002; Touhara et al., 2016) wird durch G-Protein-Signalwege wie G<sub>q</sub>, G<sub>s</sub> und G<sub>i</sub> kontrolliert (Layden et al., 2010; Beiert et al., 2014; Makowka et al., 2019).

## 1.4.1 Die LWO Auswahl als Gi-Signalaktivator

Frühere Studien haben gezeigt, dass die G<sub>i/o</sub>-Signalkaskade durch LWO in verschiedenen Zelltypen beeinflusst werden kann, darunter HeLa-Zellen (Karunarathne et al., 2013) sowie kultivierte Neuronen und das Gehirn von Mäusen (Masseck et al., 2014). LWO eignet sich auch für eine wiederholte und anhaltende Aktivierung von G<sub>i</sub>-Proteinen, wie in HEK293-Zellen und Neuronen mittels GIRK-Strommessungen nachgewiesen wurde (Masseck et al., 2014). Im Vergleich zu anderen optogenetischen Proteinen wie

Rhodopsin, welches bei repetitiver Aktivierung eine Inaktivierung oder Desensitisierung (Masseck et al., 2014) zeigt, bietet LWO den Vorteil der Aktivierung durch langwelliges rotes Licht. Dies ermöglicht das tiefe Eindringen in Gewebe (Lehtinen K et al., 2022) und ist spektral kompatibel mit blauem Licht aktivierten optogenetischen Werkzeugen wie Channelrhodopsin-2 (Bruegmann et al., 2010) oder JellyOP (Makowka et al., 2019).

## 1.4.2 Basiseigenschaften von LWO in Kardiomyozyten

Unsere Untersuchungen haben die Gi-Spezifität und Selektivität von LWO in Kardiomyozyten eindeutig gezeigt. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können intrazellulär vielseitige und teilweise gegenläufige Wirkungen haben. Zum Beispiel kann Melanopsin, ein Photorezeptor lichtempfindlicher retinaler Ganglienzellen sowohl G<sub>q</sub>- als auch G<sub>i</sub>-Protein Signalwege aktivieren (Qiu et al., 2005; Bailes und Lucas, 2013). Die Untersuchung der spontanen Schlagfrequenz in Kardiomyozyten ist eine effektive Methode, um zwischen G<sub>q</sub>- und G<sub>i</sub>-Signalwegen zu unterscheiden. Die Aktivierung von G<sub>q</sub> Proteinen erhöht die Schlagfrequenz durch PLC/IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>-Signalwegen und verstärkt die Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen und damit die Schlagfrequenz (Sasse P et al., 2007; Beiert et al. 2014). Im Gegensatz dazu reduzieren Gi-Proteine die Schlagfrequenz. In unseren Experimenten zeigte die Aktivierung von LWO ausschließlich eine Reduktion der Schlagfrequenz oder eine vollständige Blockade der Kardiomyozytenkontraktionen (Abbildung 1D, Cokić et al., 2021), was auf eine selektive Stimulation von Gi-Proteinen hinweist. Nach Applikation des Gi-Protein-Blockers Pertussis-Toxin (PTX) konnte nach LWO Aktivierung keine Frequenzblockade mehr beobachtet werden, jedoch auch keine Frequenzsteigerung, was die Selektivität der Gi-Protein-Aktivierung durch LWO bestätigt (Abbildung 2B, Cokić et al., 2021) und eine Aktivierung von G<sub>q</sub>-Proteinen durch LWO ausschließt, da zumindest ein leichter Anstieg der Frequenz zu erwarten wäre.

Die Reduktion der Schlagfrequenz durch G<sub>i</sub>-Proteine erfolgt durch die Blockade von Adenylatzyklasen durch G<sub>i</sub>  $\alpha$ -Untereinheiten, wodurch die PKA-abhängige Phosphorylierung reduziert wird. G<sub>i</sub>  $\beta\gamma$ -Untereinheiten können auch die GIRK-Kaliumkanäle direkt aktivieren (Lyashkov et al., 2009). In unseren Versuchen mit dem spezifischen GIRK-Kanal-Hemmer Tertiapin wurde keine Beeinflussung der basalen

Schlagfrequenz festgestellt, jedoch wurde der Effekt der LWO-Aktivierung um etwa 75 % reduziert, was darauf hinweist, dass der Haupteffekt von G<sub>i</sub> in ES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten durch die Aktivierung von GIRK-Kanälen mit G<sub>i</sub>- $\beta\gamma$  erfolgt. Die verbleibenden etwa 25 % Frequenzreduktion sind wahrscheinlich auf die G<sub>i</sub>  $\alpha$ -abhängige Reduktion der basalen Adenylatzyklase- und PKA-Aktivität zurückzuführen, was in ES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten zur Reduktion von HCN/If- (Abi-Gerges et al., 2000) und L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Strömen (Ji et al., 1999) führt.

Bei Eingriffen in zelluläre Signalmechanismen besteht die Gefahr, unerwünschte intrazelluläre Signalabläufe zu verändern, Überexpressions-Artefakte zu verursachen oder die Grundaktivität von schlagenden Kardiomyozyten zu beeinflussen. Beiert et al. (2014) und Makowka et al. (2019) konnten bereits in ähnlichen optogenetischen Proteinen (Melanopsin, JellyOP) keine Hinweise auf spontane Aktivierung der G-Protein-Signalkaskaden nachweisen. Auch in den Kardiomyozyten mit LWO-Überexpression und ohne Lichteinfluss ist die basale Schlagfrequenz identisch mit der von Kontrollzellen, die nur eGFP exprimieren, was eine basale Aktivierung von LWO im Dunkeln unwahrscheinlich macht.

## 1.4.3 Kinetik und Sensitivität des LWO zur Modulation des Gi-Signalwegs

Die vegetative Regulation des Herzens erfolgt durch das parasympathische System, insbesondere durch den Nervus vagus. Studien haben gezeigt, dass die elektrische Stimulation des Vagusnervs (Ng et al., 2001) und die optogenetische Stimulation parasympathischer Neurone (Moreno et al., 2019) zu einer vergleichbaren Reduktion der Herzfrequenz führen können. Direkte parasympathische Stimulation von Herzmuskelzellen kann durch pharmakologische Aktivierung cholinerger M<sub>2</sub>-Rezeptoren mit Carbachol (CCh) erfolgen. Allerdings hat sich in unserer Arbeit gezeigt, dass diese Methode im in vitro dreidimensionalen EB, wie erwartet, mehr Zeit für die Aktivierung (ca. 30 s) oder Deaktivierung (ca. 100 s) benötigt. Eine Alternative dazu ist die optogenetische Stimulation mit LWO. Unsere Methode ergab, dass sie 30-100 Mal schneller ist und nur geringe Verzögerungen von jeweils etwa 0,8 Sekunden vom Beginn der Beleuchtung bis zum maximalen Effekt oder von Ende der Beleuchtung bis zur 50 %-igen Erholung aufweist. Die optogenetische Stimulation mit LWO war somit vergleichbar schnell wie die elektrische Stimulation des Vagusnervs von Ng et al. (2010) mit einer Verzögerung zwischen Stimulation und Herzfrequenzveränderung von ca. 0,8 bis 1,9 Sekunden. Insgesamt ist es möglich, die G-Protein-Stimulation mit kurzen Lichtpulsen präziser zu steuern als mit pharmakologischen Agonisten, die eine langsame Gewebeperfusion und -auswaschung erfordern. Dies ermöglicht die Anwendung kurzer, kontinuierlicher Lichtpulse mit allmählich ansteigender Stimulationsintensität. Bei pharmakologischen Agonisten mit langsamer Perfusion und Auswaschung wäre dies praktisch unmöglich, insbesondere bei multizellulären Präparaten oder in intakten Organen.

Unsere Versuche zeigten auch, dass mit einer Änderung der Impulsdauer oder der Lichtintensität die Effektivität der G<sub>i</sub>-Signalkaskade auf die Schrittmacheraktivität fein reguliert werden kann. Hierbei hängt der Effekt von der Lichtenergie (Belichtungszeit \* Lichtintensität in s\*µW/mm<sup>2</sup>) in einer sigmoidalen Beziehung ab.

Interessanterweise war die halbmaximale Lichtenergie bei Variation der Intensität (24 s\* $\mu$ W/mm<sup>2</sup>) etwas höher als bei Veränderung der Pulsdauer (120 s\* $\mu$ W/mm<sup>2</sup>). Bei einer festen Gesamtlichtenergie bei mittlerer Empfindlichkeit (z.B. 30 s\* $\mu$ W/mm<sup>2</sup>, grüne Linie in Abbildung 3E, Cokić et al., 2021) sind längere Lichtpulse (10 s bei 3  $\mu$ W/mm<sup>2</sup>, Lichtintensitätsprotokoll) wirksamer als kürzere Lichtpulse (0,3 s bei 100  $\mu$ W/mm<sup>2</sup>, Pulsdauerprotokoll). Das weist darauf hin, dass die zeitliche Integration der G<sub>i</sub>-Signalisierung relevant ist für das Erreichen eines maximalen Blockierungseffektes.

Durch die Berechnung der Gesamtlichtenergie konnten wir die Wirksamkeit von LWO im Vergleich zu anderen optogenetisch aktivierbaren GPCR, die bereits zur Manipulation der Schrittmacherfunktion von EBs verwendet wurden, vergleichen. Frühere Arbeiten zeigen, dass die Verwendung von Melanopsin zur Beschleunigung der Schrittmacherfunktion durch  $G_q$ -Signalisierung eine halbe maximale Energie von 2,4 s\*µW/mm<sup>2</sup> (60 s Pulsdauer bei Eli<sub>50</sub> von 40 nW/mm<sup>2</sup>, Beiert et al., 2014) und bei Verwendung von JellyOP zur Stimulation des G<sub>s</sub>-Signalwegs eine halbe maximale Energie von nur 0,16 s\*µW/mm<sup>2</sup> (20 s Pulsdauer bei Eli<sub>50</sub> von 8 nW/mm<sup>2</sup>, Makowka et al., 2019) betrug. Im Vergleich dazu ist LWO etwa 10 bzw. 150-mal weniger lichtempfindlich als JellyOP und Melanopsin, mit einer halben maximalen Energie von 24 s\*µW/mm<sup>2</sup>. Dies kann auch bei der experimentellen Handhabung unter realen Laborlichtbedingungen von Vorteil sein, da eine akzidentelle LWO Aktivierung z.B. durch Raumlicht unwahrscheinlich ist. Weiterhin war die Kinetik der

Frequenzreduktion durch LWO (Zeit bis zum maximalen Effekt und Zeit bis zur 50 %-igen Deaktivierung ca. 0,8 s) deutlich schneller als die Kinetik der Frequenzerhöhung durch Melanopsin oder JellyOP in EBs (Aktivierung ca. 10 - 50 s), was prinzipiell die Beteiligung schneller GIRK-Kanäle an der G<sub>i</sub>-Signalkaskade unterstützt.

## 1.4.4 Limitationen

Diese Arbeit basiert auf einem in-vitro-Modell und untersucht Kardiomyozyten in kugelförmigen EBs. Solche Modelle bieten wichtige Einblicke in zelluläre Prozesse, können jedoch die komplexe Umgebung des gesamten Herzens nicht vollständig nachahmen. Wechselwirkungen mit anderen Zelltypen, das dynamische Gewebemikromilieu und physiologische Stimuli, die in vivo vorhanden sind bleiben unberücksichtigt. Daher bleibt es aktuell noch offen, inwieweit die hier gezeigten Ergebnisse auf in-vivo-Systeme übertragbar sind. Dies ist jedoch höchst wahrscheinlich möglich, da optogenetische GPCR bereits erfolgreich in Herzen in vivo angewendet wurden (Makowka et al., 2019). In dieser Studie wurden primär die kurzfristigen Effekte der Lichtstimulation untersucht. Langfristige Auswirkungen, insbesondere hinsichtlich möglicher adaptiver Veränderungen, bleiben daher weitgehend unklar. Zusätzlich könnten potenzielle Artefakte durch akzidentelle Lichtstimulation durch Raumlicht die Ergebnisse ebenfalls beeinflussen. Trotz dieser Limitationen bieten die Ergebnisse wertvolle Ansätze für zukünftige Forschung, um die hier gezeigten Daten in in-vivo-Systemen zu validieren und ein umfassenderes Verständnis der optogenetischen Modulation von G-Protein-Signalwegen zu erreichen.

## 1.5 Zusammenfassung

Die Optogenetik ermöglicht es, Zellfunktionen präzise durch Licht zu steuern und intrazelluläre Signalwege in Echtzeit zu analysieren. Ziel dieser Arbeit war es, den G<sub>i</sub>-Signalweg in embryonalen Stammzell-abgeleiteten Kardiomyozyten (ESC-Kardiomyozyten) mittels des humanen langwellig-sensiblen Opsins (LWO) zu modulieren und so eine verbesserte zeitliche und räumliche Kontrolle gegenüber herkömmlichen pharmakologischen Ansätzen zu erreichen.

Das humane LWO wurde in embryonale Stammzellen integriert und mit gelb fluoreszierendem Protein (eYFP) fusioniert. Die differenzierten Zellen, die spontan kontrahierende Kardiomyozyten bildeten, wurden mit rotem Licht (625 nm) beleuchtet. Dies führte zu einer effektiven Hemmung der Schrittmacheraktivität durch die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten, einwärts gleichrichtenden Kaliumkanälen (GIRK), was durch den Einsatz des GIRK-Kanalblockers Tertiapin weiter bestätigt wurde. Die Spezifität der G<sub>i</sub>-Signalweg-Aktivierung wurde durch pharmakologische Hemmung mit Pertussis-Toxin nachgewiesen, das den Effekt nahezu vollständig aufhob. Eine halbmaximale effektive Lichtintensität (ELi50) von 2,4  $\mu$ W/mm<sup>2</sup> wurde bestimmt, was die Sensitivität des Systems unterstreicht. Im Vergleich zur pharmakologischen Stimulation mit Carbachol zeigte LWO eine signifikant schnellere Aktivierungs- und Deaktivierungszeit (< 1 s gegenüber > 30 s).

Die Ergebnisse zeigen, dass LWO eine präzise und effiziente Modulation des G<sub>i</sub>-Signalwegs ermöglicht und als ein vielversprechendes Werkzeug zur Untersuchung parasympathischer Signalwege im Herzen dienen kann. Durch die geringe Phototoxizität und die gute Gewebepenetration von langwelligem Licht bietet es zudem Vorteile für weiterführende Anwendungen.

Zukünftige Studien könnten die kombinierte oder alternierende Aktivierung von G<sub>i</sub>- (LWO, Cokić et al., 2021) und G<sub>s</sub>-Signalwegen (Jellyfish Opsin, JellyOP, Makowka et al., 2019) untersuchen, um deren Effekte in vivo detaillierter zu analysieren. Darüber hinaus könnte die Entwicklung implantierbarer Lichtquellen (Madrid MK et al., 2021) sowie zelltypspezifischer Opsin-Expressionen die Analyse regionaler Unterschiede in der Herzfunktion ermöglichen und langfristige Effekte dieser Signalwege beleuchten. Fortschritte in der Optogenetik versprechen nicht nur tiefere Einblicke in grundlegende Mechanismen der Herzphysiologie, sondern auch neue präventive und therapeutische Ansätze. Diese könnten insbesondere bei kardiologischen Erkrankungen wie Herzrhythmusstörungen (Ang et al., 2012), Herzmuskelhypertrophie (Wang et al., 2018), Herzinsuffizienz und Myokardinfarkt (El-Armouche A et al., 2003; DeGeorge BR Jr, 2008) Anwendung finden.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Abi-Gerges N, Ji GJ, Lu ZJ, Fischmeister R, Hescheler J, Fleischmann BK. Functional expression and regulation of the hyperpolarization activated non-selective cation current in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. J Physiol 2000; 523: 377–389

Abreu N, Levitz J. Optogenetic Techniques for Manipulating and Sensing G Protein-Coupled Receptor Signaling. Methods Mol Biol 2020; 2173: 21-51

Ang R, Opel A, Tinker A. The Role of Inhibitory G Proteins and Regulators of G Protein Signaling in the in vivo Control of Heart Rate and Predisposition to Cardiac Arrhythmias. Front Physiol 2012; 3: 96

Bailes HJ, Lucas RJ. Human melanopsin forms a pigment maximally sensitive to blue light ( $\lambda \max \approx 479 \text{ nm}$ ) supporting activation of G<sub>q/11</sub> and G<sub>i/o</sub> signaling cascades. Proc R Soc B 2013; 280: 20122987

Baxter JD, Young WF Jr, Webb P. Cardiovascular endocrinology: introduction. Endocr Rev 2003; 24: 253-260

Beiert T, Bruegmann T, Sasse P. Optogenetic activation of G<sub>q</sub> signalling modulates pacemaker activity of cardiomyocytes. Cardiovasc Res 2014; 102: 507–516

Belardinelli L, Isenberg G. Isolated atrial myocytes: adenosine and acetylcholine increase potassium conductance. Am J Physiol 1983; 244: 734-737

Belzung C, Turiault M, Griebel G. Optogenetics to study the circuits of fear- and depression-like behaviors: a critical analysis. Pharmacol Biochem Behav 2014; 122: 144-157

Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang H-T, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of Pluripotent Embryonic Stem Cells Into Cardiomyocytes. Circ Res 2002; 91: 189-201

Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. Nat Neurosci 2005; 8: 1263-1268

Bruegmann T, Boyle PM, Vogt CC, Karathanos TV, Arevalo HJ, Fleischmann BK, et al. Optogenetic defibrillation terminates ventricular arrhythmia in mouse hearts and human simulations. J Clin Invest 2016; 126: 3894–3904

Bruegmann T, Malan D, Hesse M, Beiert T, Fuegemann CJ, Fleischmann BK, et al. Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo. Nat Methods 2010; 7: 897–900

Capote LA, Mendez Perez R, Lymperopoulos A. GPCR signaling and cardiac function. Eur J Pharmacol 2015; 763: 143-148

Cokić M, Bruegmann T, Sasse P, Malan D. Optogenetic Stimulation of G<sub>i</sub> Signaling Enables Instantaneous Modulation of Cardiomyocyte Pacemaking. Front Physiol 2021; 12: 768495

Dani S, Schütz K, Dikici E, Bernhardt A, Lode A. The effect of continuous long-term illumination with visible light in different spectral ranges on mammalian cells. Sci Rep 2024; 14: 9444

Deisseroth K. Optogenetics. Nat Methods 2011; 8: 26-29

DeGeorge BR Jr, Gao E, Boucher M, Vinge LE, Martini JS, Raake PW, Chuprun JK, Harris DM, Kim GW, Soltys S, Eckhart AD, Koch WJ. Targeted inhibition of cardiomyocyte G<sub>i</sub> signaling enhances susceptibility to apoptotic cell death in response to ischemic stress. Circulation 2008; 117: 1378-1387

Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M. Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. Exp Physiol 2000; 85: 645-651

Dhein S, van Koppen CJ, Brodde OE. Muscarinic receptors in the mammalian heart. Pharmacol Res 2001; 44: 161-182

El-Armouche A, Zolk O, Rau T, Eschenhagen T. Inhibitory G-proteins and their role in desensitization of the adenylyl cyclase pathway in heart failure. Cardiovasc Res 2003; 60: 478-487

Guru A, Post RJ, Ho Y-Y, Warden MR. Making Sense of Optogenetics. Int J Neuropsychopharmacol 2015; 18: 79

Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan YN, Jan LY. Evidence that direct binding of G beta gamma to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K+ channel is important for channel activation. Neuron 1995; 15: 1133–1143

Hutchinson SA, Scammells PJ. A(1) adenosine receptor agonists: medicinal chemistry and therapeutic potential. Curr Pharm Des 2004; 10: 2021–2039

Hyman SE. Neurotransmitters. Curr Biol. 2005; 15: R154-158

Irisawa H, Brown HF, Giles W. Cardiac pacemaking in the sinoatrial node. Physiol Rev 1993; 73: 197-227

Ivanova-Nikolova TT, Nikolov EN, Hansen C, Robishaw JD. Muscarinic K+ channel in the heart. Modal regulation by G protein beta gamma subunits. J Gen Physiol 1998; 112: 199–210

Ji GJ, Fleischmann BK, Bloch W, Feelisch M, Andressen C, Addicks K, et al. Regulation of the L-type Ca 2+ channel during cardiomyogenesis: switch from NO to adenylyl cyclase-mediated inhibition. FASEB J 1999; 13: 313–324

Karunarathne WKA, Giri L, Kalyanaraman V, Gautam N. Optically triggering spatiotemporally confined GPCR activity in a cell and programming neurite initiation and extension. Proc Natl Acad Sci USA 2013; 110

Kaur G, Verma SK, Singh D, Singh NK. Role of G-Proteins and GPCRs in Cardiovascular Pathologies. Bioengineering 2023; 10: 76

Kätzel D, Miesenböck G. Experience-dependent rewiring of specific inhibitory connections in adult neocortex. PLoS Biol 2014; 12: 1798

Krapivinsky G, Krapivinsky L, Wickman K, Clapham DE. G beta gamma binds directly to the G protein-gated K+ channel, IKACh. J Biol Chem 1995; 270: 29059–29062

Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. Nature 2010; 466: 622-626

Layden BT, Newman M, Chen F, Fisher A, Lowe WL. G Protein Coupled Receptors in Embryonic Stem Cells: A Role for  $G_s$ -Alpha Signaling. PLoS ONE 2010; 5: 9105

Lehtinen K, Nokia MS, Takala H. Red Light Optogenetics in Neuroscience. Front Cell Neurosci 2022; 15: 778-900

Lompré AM, Hajjar RJ, Harding SE, Kranias EG, Lohse MJ, Marks AR. Ca2+ cycling and new therapeutic approaches for heart failure. Circulation 2010; 121: 822-830

Lyashkov AE, Vinogradova TM, Zahanich I, Li Y, Younes A, Nuss HB, et al. Cholinergic receptor signaling modulates spontaneous firing of sinoatrial nodal cells via integrated effects on PKA-dependent Ca(2+) cycling and I(KACh). Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009; 297: H949-959

Madrid MK, Brennan JA, Yin RT, Knight HS, Efimov IR. Advances in Implantable Optogenetic Technology for Cardiovascular Research and Medicine. Front Physiol 2021; 12: 720190 Makowka P, Bruegmann T, Dusend V, Malan D, Beiert T, Hesse M, et al. Optogenetic stimulation of G<sub>s</sub>-signaling in the heart with high spatio-temporal precision. Nat Commun 2019; 10: 1281

Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. Mech Dev 1993; 44: 41–50

Masseck OA, Spoida K, Dalkara D, Maejima T, Rubelowski JM, Wallhorn L, Deneris ES, Herlitze S. Vertebrate cone opsins enable sustained and highly sensitive rapid control of G<sub>i/o</sub> signaling in anxiety circuitry. Neuron 2014; 81: 1263-1273

McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. Clin Exp Pharmacol Physiol 2007; 34: 255-262

Miesenböck G. Optogenetic control of cells and circuits. Annu Rev Cell Dev Biol 2011; 27: 731-758

Moreno A, Endicott K, Skancke M, Dwyer MK, Brennan J, Efimov IR, et al. Sudden Heart Rate Reduction Upon Optogenetic Release of Acetylcholine From Cardiac Parasympathetic Neurons in Perfused Hearts. Front Physiol 2019; 10: 16

Ng GA, Brack KE, Coote JH. Effects of Direct Sympathetic and Vagus Nerve Stimulation on the Physiology of the Whole Heart - A Novel Model of Isolated Langendorff Perfused Rabbit Heart with Intact Dual Autonomic Innervation. Exp Physiol 2001; 86: 319–329

Nobles M, Montaigne D, Sebastian S, Birnbaumer L, Tinker A. Differential effects of inhibitory G protein isoforms on G protein-gated inwardly rectifying K+ currents in adult murine atria. Am J Physiol Cell Physiol 2018; 314: C616–626

Ortolani D, Manot-Saillet B, Orduz D, Ortiz FC, Angulo MC. In vivo Optogenetic Approach to Study Neuron-Oligodendroglia Interactions in Mouse Pups. Front Cell Neurosci 2018; 12: 477.

Qiu X, Kumbalasiri T, Carlson SM, Wong KY, Krishna V, Provencio I, et al. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. Nature 2005; 433: 745–749

Robbins RJ, Petak, S. Hormones and the Heart. Methodist Debakey Cardiovasc J 2017; 13: 48

Sasse P, Zhang J, Cleemann L, Morad M, Hescheler J, Fleischmann BK. Intracellular Ca2+ oscillations, a potential pacemaking mechanism in early embryonic heart cells. J Gen Physiol 2007; 130: 133-144

Sasse P, Funken M, Beiert T, Bruegmann T. Optogenetic Termination of Cardiac Arrhythmia: Mechanistic Enlightenment and Therapeutic Application? Front Physiol 2019; 10: 675

Shimizu-Sato S, Huq E, Tepperman JM, Quail PH. A light-switchable gene promoter system. Nat Biotechnol 2002; 20: 1041-1044

Spoida K, Eickelbeck D, Karapinar R, Eckhardt T, Mark MD, Jancke D, et al. Melanopsin Variants as Intrinsic Optogenetic On and Off Switches for Transient versus Sustained Activation of G Protein Pathways. Curr Biol 2016; 26: 1206-1212

Strosberg AD. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. Protein Sci. 1993; 2: 1198-1209

Teleanu RI, Niculescu AG, Roza E, Vladâcenco O, Grumezescu AM, Teleanu DM. Neurotransmitters-Key Factors in Neurological and Neurodegenerative Disorders of the Central Nervous System. Int J Mol Sci 2022; 23: 5954 Touhara KK, Wang W, MacKinnon R. The GIRK1 subunit potentiates G protein activation of cardiac GIRK1/4 hetero-tetramers. Elife 2016; 5: e15750

Wang J, Gareri C, Rockman HA. G-Protein–Coupled Receptors in Heart Disease. Circ Res 2018; 123: 716–735

Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca2+ channel blockers. Differentiation 1991; 48: 173-182

Xiang Y, Kobilka BK. Myocyte adrenoceptor signaling pathways. Science 2003; 300: 1530–1532

## 2. Veröffentlichung



#### BRIEF RESEARCH REPORT published: 20 December 2021 doi: 10.3389/fphys.2021.768495



## Optogenetic Stimulation of G<sub>i</sub> Signaling Enables Instantaneous Modulation of Cardiomyocyte Pacemaking

29

#### Milan Cokić<sup>1</sup>, Tobias Bruegmann<sup>1,2†</sup>, Philipp Sasse<sup>1\*</sup> and Daniela Malan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Medical Faculty, Institute of Physiology I, University of Bonn, Bonn, Germany, <sup>2</sup> Research Training Group 1873, University of Bonn, Bonn, Germany

### **OPEN ACCESS**

#### Edited by:

T. Alexander Quinn, Dalhousie University, Canada

#### Reviewed by:

Matthew W. Kay, George Washington University, United States Matteo Elia Mangoni, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), France

### \*Correspondence:

Daniela Malan dmalan@uni-bonn.de Philipp Sasse philipp.sasse@uni-bonn.de orcid.org/0000-0002-8502-9472

#### <sup>†</sup>Present address:

Tobias Bruegmann, Institute for Cardiovascular Physiology, University Medical Center Goettingen, Goettingen, Germany

#### Specialty section:

This article was submitted to Cardiac Electrophysiology, a section of the journal Frontiers in Physiology

Received: 31 August 2021 Accepted: 18 November 2021 Published: 20 December 2021

#### Citation:

Cokić M, Bruegmann T, Sasse P and Malan D (2021) Optogenetic Stimulation of G, Signaling Enables Instantaneous Modulation of Cardiomyocyte Pacemaking. Front. Physiol. 12:768495. doi: 10.3389/fphys.2021.768495 G-protein signaling pathways are central in the regulation of cardiac function in physiological and pathophysiological conditions. Their functional analysis through optogenetic techniques with selective expression of opsin proteins and activation by specific wavelengths allows high spatial and temporal precision. Here, we present the application of long wavelength-sensitive cone opsin (LWO) in cardiomyocytes for activation of the Gi signaling pathway by red light. Murine embryonic stem (ES) cells expressing LWO were generated and differentiated into beating cardiomyocytes in embryoid bodies (EBs). Illumination with red light (625 nm) led to an instantaneous decrease up to complete inhibition (84-99% effectivity) of spontaneous beating, but had no effect on control EBs. By using increasing light intensities with 10 s pulses, we determined a half maximal effective light intensity of 2.4 µW/mm<sup>2</sup> and a maximum effect at 100  $\mu$ W/mm<sup>2</sup>. Pre-incubation of LWO EBs with pertussis toxin completely inhibited the light effect proving the specificity for G<sub>i</sub> signaling. Frequency reduction was mainly due to the activation of GIRK channels because the specific channel blocker tertiapin reduced the light effect by ~80%. Compared with pharmacological stimulation of  $\ensuremath{\text{M}}_2$ receptors with carbachol with slow kinetics (>30 s), illumination of LWO had an identical efficacy, but much faster kinetics (<1 s) in the activation and deactivation demonstrating the temporal advantage of optogenetic stimulation. Thus, LWO is an effective optogenetic tool for selective stimulation of the Gi signaling cascade in cardiomyocytes with red light, providing high temporal precision.

Keywords: optogenetics, cardiomyocyte, GPCR (G protein coupled receptor),  $G_i$  signaling pathway, GIRK channel, pacemaking

## INTRODUCTION

G-Protein-coupled receptors (GPCR) play a pivotal role in regulating cardiac function. The counteracting effects of  $G_s$  and  $G_i$  proteins are fundamental for the heart rate regulation, contractility, neurohormonal control of circulatory system, and in pathophysiological conditions (Capote et al., 2015). As an antagonist of  $G_s$ -pathway, the  $G_i$ -pathway inhibits the adenylate cyclase, decreasing intracellular cAMP level, diminishing protein kinase A (PKA) activity, and thus, reducing L-type Ca<sup>2+</sup> currents. In atrial myocytes and cells of the sinus node and AV node, acetylcholine opens a type of inwardly rectifying potassium channel (I<sub>K,ACh</sub>/GIRK) through direct

effects of the  $G_i$   $\beta\gamma$  subunit (Krapivinsky et al., 1995; Ivanova-Nikolova et al., 1998). This results in hyperpolarization, slowing of heart rate, prolongation of AV-node conduction, and shortening of the action potential duration in atrial cardiomyocytes (Belardinelli and Isenberg, 1983). Some  $G_i$  coupled receptors, such as adenosine-A1, are cardioprotective (Hutchinson and Scammells, 2004) and reduce the risk of cardiac arrhythmia, moreover  $G_i$ -coupled  $\alpha_2$  receptors exert an important sympatho-inhibitory function (Xiang and Kobilka, 2003).

Optogenetics is a photostimulation technique which selectively activates opsin proteins by specific wavelengths and the use of light has a much higher spatial and temporal precision than application and diffusion of receptor agonists (Beiert et al., 2014; Guru et al., 2015; Makowka et al., 2019). For instance, the blue light-sensitive receptor Jellyfish Opsin has been used for selective activation of  $G_s$  signaling cascade in cardiomyocytes and the heart with high spatial and temporal precision (Makowka et al., 2019), but direct control of the  $G_{i/o}$  signaling cascade in cardiomyocytes with light has not been shown yet.

Short- and long-wavelength-sensitive opsins (LWO) have been used before for control of neuronal  $G_{i/o}$  signaling pathways (Masseck et al., 2014) and LWO has been shown to activate rather  $G_{i/t}$  than  $G_o$  signaling (Ballister et al., 2018). Thus, the aim of this study was to use the red light-activated LWO to stimulate  $G_i$  signaling pathways in cardiomyocytes.

#### **METHODS**

### Vector Construction and Transfection of Embryonic Stem (ES) Cells

An LWO-enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) plasmid was generated for the expression of LWO (human longwavelength-sensitive opsin 1, NP\_064445.1) c-terminally fused with eYFP using codon optimized synthesized DNA (GeneArt, Life Technologies, Germany) excised with SpeI und MluI and subcloned into a backbone vector with the chicken  $\beta$ -actin promoter (CAG) described before (Beiert et al., 2014). In this study, 40 µg of DNA was linearized with Bgl II and electroporated into  $4 \times 10^6$  mouse embryonic stem (ES) cells (D3 line) with a single electrical pulse (250 V, 750  $\mu$ F, 0.4 cm electrode gap, BioRad Gene Pulser, CA, USA). The electroporated cells were plated and 400 µg/ml neomycin was added for selection 24 h after transfection. The eYFP positive clones were picked and cultured separately. Two positive clones were chosen, because of their specific eYFP expression in cardiomyocytes and stable light reaction. As a control group, we used the D3 ES cells with stable expression of the enhanced green fluorescent protein (eGFP) under the control of the CAG promoter as reported before (Beiert et al., 2014).

#### **ES Cell Culture and Differentiation**

Embryonic stem cells were cultured and differentiated within embryoid bodies (EBs) using the hanging drop method as previously described (Bruegmann et al., 2010; Beiert et al., 2014). For differentiation, we used Iscove's Modified Eagle's Medium (Invitrogen, MA, USA) supplemented with 20% fetal calf serrum (FCS) (Pan-Biotech, Germany), 0.1 mM non-essential amino acids (Invitrogen), 100 U/ml penicillin (Invitrogen), 100 mg/ml streptomycin (Invitrogen), and 0.1 mmol/L  $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma Aldrich, MO, USA). At day 5 of differentiation, EBs were either plated on 0.1% gelatin-coated glass cover slips for the analysis of beating frequency conducted at day 9–14 or fixated for immunohistochemical analysis. In some differentiations, the method was modified by adding Noggin (R&D System, MN, USA, 250 ng/ml) from day 4 to 6 and retinoic acid (Sigma Aldrich, 1  $\mu$ M) from day 6 to 8 and Dickkopf-related protein 1 (R&D system, 200 ng/ml) from day 6 to 11.

#### Immunofluorescence

30

Embryoid bodies were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma Adrich) and permeabilized with 0.2% of Triton X-100 (Sigma Adrich) for 20 min, blocked with 5% of donkey serum (Jackson ImmunoResearch, UK) for 20 min and stained for 2 h at room temperature with primary antibody against  $\alpha$ -actinin (1:400, Sigma Aldrich). Alexa Fluor 647 conjugated secondary antibody (1:400, Invitrogen) diluted in 1 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma Aldrich) was applied for 1 h at room temperature. The pictures were taken with an Eclipse Ti2 microscope with NIS-Elements and deconvolution software (Nikon, Japan).

## Frequency Analysis and Light Stimulation of EBs

Beating EBs that showed eYFP expression in beating areas were used at day 9-14 of differentiation. Then, 1-2h before experiment, the medium was replaced with Tyrode external solution (in mM: 142 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucose, and 10 HEPES; pH 7.4) containing 11-cis retinal (1 µM, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) or 9-cis retinal (1 µM, Sigma Aldrich). Video microscopy of beating EBs was performed while perfusing EBs with Tyrode solution without retinal at  $\sim$ 35°C on an Axiovert 200 microscope with a 5× objective (Fluar, NA 0.25, Zeiss, Germany) using infrared light (760 nm, 1.8  $\mu$ W/mm<sup>2</sup> at the focal plane) to avoid accidental LWO activation. Spontaneous contraction was recorded with a charge-coupled device (CCD) camera (piA640-210gm, Basler, Germany) at 51 fps and analyzed online using custom designed software (LabView, National Instruments, TX, USA) as described before (Bruegmann et al., 2010; Makowka et al., 2019). Optogenetic stimulation was performed with a 625 nm LED within the LedHUB (Omicron Laserage, Germany) equipped with a 10% neutral density filter and coupled to the objective with an optical fiber and a 660 nm dichroic filter (AHF Analysentechnik, Germany). Illumination was controlled by a recording system (PowerLab 4/35 and Labchart software, AD Instruments, Sydney, Australia), which was also used to record time points of individual beats to calculate the frequency. Light intensity was calibrated at the objective with a power meter (PM100 power meter, S130A sensor, Thorlabs, NJ, USA) before each experiment.

### Analysis of LWO Effect and Light Sensitivity

For statistical analysis, only stable beating EBs without arrhythmical episodes over  $5 \min$  before illumination were included. The average frequency during  $10 \, s$  continuous

Cokić et al.

illumination was analyzed and normalized to baseline 10 s before. To describe the effectivity of LWO, we calculated the blocking effect with 100% as complete block and 0% as no effect on beating frequency. To determine light sensitivity, the light intensity of individual light pulses was gradually increased (in  $\mu$ W/mm<sup>2</sup>: 0.3; 1; 3; 10; 30; 100; and 300). In addition, 100  $\mu$ W/mm<sup>2</sup> individual light pulses of increasing durations (0.1; 0.3; 0.5; 1; 3; 5; 10; and 30 s) were applied and the frequency was averaged 5 s after onset of illumination compared with 5 s before. Half maximal effects were analyzed by fitting the normalized frequency with a Hill function with upper level set to 100% (GraphPad Prism, CA, USA).

#### Pharmacology

To compare LWO effect with pharmacological activation, we used supramaximal illumination (100  $\mu$ W/mm<sup>2</sup>, 10s) and stimulation of the muscarinergic acetylcholine receptor with carbachol (60 s,  $100 \,\mu$ M, Sigma Aldrich). Effectiveness of the inhibition was calculated 5s after the lowest frequency (to account for variations in perfusion kinetics) compared with 5 s before illumination/perfusion. The delay to maximum block was calculated between onset of illumination/perfusion and maximal effect and the delay to 50% recovery as end of stimulation/perfusion until frequency reached 50% of initial baseline. To block G<sub>i</sub> proteins, pertussis-toxin (PTX, Invitrogen) was applied for 24 h in IMDM medium without FCS at a final concentration of  $0.5\,\mu$ g/ml. The blocker of G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels (GIRK) tertiapin-q (100 nM, Tocris, Bristol, UK) was incubated for 30 min after one initial measurement and kept in the solution for the second measurement (Figure 2C).

#### **Statistics**

Data are shown as mean  $\pm$  SEM and GraphPad Prism 7.0 was used to perform the statistical analysis. For frequency experiments in **Figures 1D,E** one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test was used. Pertussis toxin (PTX) effect (**Figure 2B**) was analyzed with an unpaired Student's *t*-test. For the other experiments (**Figures 1G, 2D, 4B–D**), two-sided paired Student's *t*-tests were used. A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant. The *n* values indicate the number of independent experiments (EBs).

### RESULTS

### Red Light Activation of LWO Decreases Beating Frequency of Cardiomyocytes

The human LWO in fusion with eYFP was stably expressed under the control of the CAG promoter in ES-cells (D3 line) (**Figure 1A**). For differentiation of ES cells into spontaneously beating cardiomyocytes, EBs were generated with the hanging drop method (Wobus et al., 1991; Maltsev et al., 1993; Beiert et al., 2014). Spontaneously beating areas in the EBs showed differentiation into  $\alpha$ -actinin and eYFP positive cardiomyocytes indicating LWO expression (**Figure 1B**). An analysis of beating frequency was performed by infra-red video microscopy to avoid LWO activation. Illumination of beating areas with red light pulses ( $\lambda = 625 \text{ nm}$ , 10 s, 100  $\mu$ W/mm<sup>2</sup>) led to an almost complete block of spontaneous beating in EBs from two separately differentiated ES cell clones (**Figures 1C,D**; clones C1 and C2). In contrast, illumination of EBs expressing only eGFP but not LWO did not reduce beating frequency (**Figures 1C,D**; Ctr). Importantly, the baseline beating frequency was similar between EBs from the two LWO clones and the control eGFP clone, suggesting that LWO expression does not negatively affect pacemaking and shows no dark activity (**Figure 1E**). Application of two identical light pulses with 90 s delay showed similar effectivity of beating block (**Figures 1F,G**) indicating that LWO can be activated repetitively without desensitization.

### LWO Activates G<sub>i</sub>-Proteins and GIRK Channels in Cardiomyocytes

To confirm the LWO specificity for  $G_i$  activation, EBs were pre-treated with PTX (0.5 µg/ml) for 24 h to block all  $G_{i/o}$ proteins. Subsequent frequency measurements showed that PTX almost completely inhibited the light effect (**Figures 2A,B**) and the blocking effectivity was only 4% in contrast to an effectivity of 88% in non-treated EBs recorded in parallel. Because activation of GIRK channels by  $G_i$ -protein  $\beta\gamma$  subunits is the main mechanism for slowing the heart rate (Huang et al., 1995; Nobles et al., 2018), we compared light effects before and after application of the GIRK channel blocker tertiapin (100 nM, 30 min, **Figure 2C**, blue color) and found that tertiapin reduced the light effect significantly from 91 to 21% blocking effectivity (**Figure 2D**).

# Dose-Response Relationship Shows High Light Sensitivity of LWO

To determine LWO light sensitivity, we repetitively applied light with increasing light energy by using ascending light intensities or durations (Figure 3). Application of 10s long pulses with stepwise increasing light intensities from 0.3 to 300  $\mu W/mm^2$  led to a gradual decrease of beating frequency after each light pulse (Figure 3A) with a sigmoidal dependency of the blocking effect on the logarithm of intensity (averaged data in Figure 3C). The data points of each individual experiment were fitted with the Hill equation resulting in an average half maximal effective light intensity (ELi50) of  $2.4 \pm 0.7 \,\mu$ W/mm<sup>2</sup> (n = 9) and a maximum blocking effect at  $\sim 100 \ \mu W/mm^2$ . Similarly, application of light pulses of 100  $\mu$ W/mm<sup>2</sup> with increasing durations from 0.1 to 30 s led to gradual block of beating after each pulse (Figure 3B). The statistical analysis and Hill-fitting of individual experiments showed a sigmoidal dependence of blocking effect on logarithm of pulse duration with a half maximal effect at 1.2  $\pm$  0.4 s (n = 6) and maximal effect at ~ 10 s (averaged data in Figure 3D). To compare both gradual stimulation protocols, we calculated and overlaid the total light energy in each light pulse as  $s^*\mu W/mm^2$  (Figure 3E). Surprisingly, we found that the light intensity protocol seemed to be more effective than the pulse duration protocol (as shown in discussion).

To determine if light sensitivity and blocking efficiency is constant, we applied two brief (0.5 s) subthreshold pulses at 100  $\mu W/mm^2$  with only 20 s in-between. Because the blocking effect

Cokić et al.

Optogenetic G<sub>i</sub> Signaling in Cardiomyocytes



with LWO expression indicated by eYFP fluorescence (green, bar = 200  $\mu$ m). (B) EYFP fluorescence (green) in  $\alpha$ -actinin (red) positive cardiomyocytes differentiated within an embryoid body (EB), generated from LWO ES cells (bar = 25  $\mu$ m). (C) Representative frequency traces of spontaneous beating within two EBs differentiated from ES cell LWO clones (C1 and C2) and one EB from eGFP control ES cells (Ctr) stimulated with light (625 nm, 100  $\mu$ W/mm<sup>2</sup>, red line). (D) Effectivity of inhibition (100% = complete block of spontaneous beating) by illumination [ANOVA Tukey's multiple comparison test: \*\*p < 0.001 (C1, C2, n = 11) vs. control (n = 11)]. (E) Statistical comparison of spontaneous beating frequency of EBs from two LWO clones and the wild-type ES cells [ANOVA Tukey's multiple comparison test, p = 0.98 (C2, n = 17) p = 0.46 (C1, n = 13) vs. control (n = 9)]. (F) Representative frequency trace of two supramaximal (10s, 100  $\mu$ W/mm<sup>2</sup>) repetitive light stimuli. (G) Comparison of frequency reduction effectivity of the first and the second light pulse (two side paired *t*-test; p = 0.73, n = 6).

of the second light pulse was not different (**Figures 3F,G**, n = 5, p = 0.46), we conclude that light sensitivity was similar and the submaximal blocking effect was not compromised by LWO refractoriness at this pulse interval.

### LWO Illumination Has Much Higher

**Temporal Precision Than Agonist Perfusion** To illustrate the temporal precision of LWO and the advantage over agonist perfusion, we compared the LWO effect with pharmacological stimulation of the G<sub>i</sub> pathway (**Figure 4A**) by illumination (LWO, 625 nm) and perfusion of EBs with the acetylcholine-receptor agonist carbachol (CCh,  $100 \,\mu$ M). Both stimulations led to similar blocking effectivity (**Figure 4B**, LWO 78.6  $\pm$  8.5%, n = 7, CCh 72.6  $\pm$  13.2%, n = 7), however, activation kinetics (delay to maximum block, **Figure 4C**: LWO 0.8  $\pm$  0.1 s, n = 7: CCh 33.4  $\pm$  7.8s, n = 7) and deactivation kinetics (time from end of stimulation to 50% recovery, **Figure 4D**, LWO 0.8  $\pm$  0.3 s, n = 7; CCh 99.6

4



33

 $\pm$  21.9 s, n = 7) was significant and up to two orders of magnitude faster using LWO illumination compared with CCh perfusion.

### DISCUSSION

Optogenetic methods have many advantages over pharmacological stimulation, because they allow modulation of G-protein signaling of specific cell types with high temporal and spatial precision using light instead of receptor ligands. The aim of this study was to explore the use of LWO for optogenetic activation of  $G_i$ -signaling in cardiomyocytes. For this purpose, we used stem-cell derived cardiomyocytes which resemble an early embryonic phenotype and show spontaneous beating in cell culture. Importantly, in these cells, the pacemaking mechanism is already well-controlled by G-protein signaling (Boheler et al., 2002; Touhara et al., 2016), such as  $G_q$ ,  $G_s$ , and  $G_i$  proteins (Layden et al., 2010; Beiert et al., 2014; Makowka et al., 2019).

### Rationale for Using LWO to Control G<sub>i</sub> Signaling

To modulate  $G_i$  signaling in cardiomyocytes by light, we have chosen the LWO, which has been shown to activate  $G_{i/o}$ proteins in HeLa cells (Karunarathne et al., 2013) as well as cultured neurons and the brain of mice (Masseck et al., 2014). Importantly, LWO is well-suited for the repetitive and longlasting activation of  $G_i$ -dependent GIRK currents by light in HEK293 cells and neurons without desensitization (Masseck et al., 2014). This is of great advantage over vertebrate Rhodopsin, which also activates  $G_i$  signaling but the responses decline during repetitive stimulation (Masseck et al., 2014). We have chosen LWO over short-wavelength opsin (activated by 350–450 nm) because LWO can be activated by red light >600 nm, which is not absorbed by myoglobin and hemoglobin, penetrates deeper into cardiac tissue (Bruegmann et al., 2016), and has less phototoxic effects. Furthermore, red light >600 nm is spectrally compatible with blue light-activated optogenetic tools, such as Channelrhodopsin-2 for optical depolarization of cardiomyocytes (Bruegmann et al., 2010) or Jellyfish Opsin for light-induced stimulation of the  $G_s$  signaling cascade (Makowka et al., 2019) which are both not activated by red light and therefore can be combined with LWO co-expression.

## LWO Is G<sub>i</sub> Specific in Cardiomyocytes and Activates GIRK Channels

It is known that GPCR can show a promiscuous behavior and thereby activate multiple, even counteracting signaling pathways. For instance, Melanopsin, a photoreceptor of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells, has been initially described as a G<sub>q</sub> coupled optogenetic GPCR (Qiu et al., 2005) but it was shown later that it can signal both to G<sub>q</sub> and G<sub>i</sub> proteins (Bailes and Lucas, 2013) and can thus activate GIRK channels by G<sub>i</sub>  $\beta\gamma$  subunits (Spoida et al., 2016). Our model of spontaneous beating ES-cell derived cardiomyocytes is ideal to discriminate between G<sub>q</sub> and G<sub>i</sub> signaling as the former will increase beating rate through PLC/IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>

Cokić et al.



34

logarithmic scale fitted with Hill equation. (E) Relationship between change in beating frequency and total light energy calculated as  $s^*\mu W/mm^2$  from data in (C) (red) and (D) (blue). Note that the effect of 30  $s^*\mu W/mm^2$  light energy (green line) is stronger using 10 s at 3  $\mu W/mm^2$  (red) compared with 0.3 s at 100  $\mu W/mm^2$  (blue). (F) Representative frequency trace and (G) statistical analysis of two submaximal (0.5 s, 100  $\mu W/mm^2$ ) repetitive light stimuli (two side paired *t*-test: p = 0.46, n = 5).

release mechanisms enhancing the  $Ca^{2+}$  clock pacemaking machinery (Lakatta and DiFrancesco, 2009; Beiert et al., 2014), whereas the latter will reduce beating through G<sub>i</sub> proteins (Lyashkov et al., 2009). As we have exclusively observed frequency reduction or even complete block of beating by LWO activation (**Figure 1D**), LWO signals through G<sub>i</sub> proteins in cardiomyocytes. To confirm this, we blocked G<sub>i</sub> proteins with PTX that completely abolished all light effects. Notably, we never observed a slightest frequency increase by light in PTX treated LWO EBs (Figure 2B), therefore, excluding  $\mathrm{G}_{\mathrm{q}}$  activation by LWO.

Activated G<sub>i</sub> proteins can reduce beating rate by two mechanisms: block of adenylate cyclases by G<sub>i</sub>  $\alpha$  subunits with subsequent lowering of PKA-dependent phosphorylation or activation of GIRK potassium channels by G<sub>i</sub>  $\beta\gamma$  subunits (Lyashkov et al., 2009). In our experiments, application of the specific GIRK channel inhibitor tertiapin did not affect basal beating rate but reduced the effect of LWO illumination by

Frontiers in Physiology | www.frontiersin.org



35

 ${\sim}75\%$  suggesting that the major  $G_i$  effect in ES-cell derived cardiomyocytes obtained by our differentiation protocol is through  $G_i$   $\beta\gamma$  GIRK channel activation. In contrast, GIRK-based reduction of heart rate in mouse sinus nodal cells is only responsible for  ${\sim}50\%$  of heart rate regulation (Mesirca et al., 2013) presumably reflecting the more robust pacemaking machinery in these cells or differences in GIRK expression. The remaining  ${\sim}25\%$  of regulation we observed is most likely due to  $G_i$   $\alpha$ -dependent reduction of basal adenylate cyclase and PKA activity, which has been shown to reduce HCN/If currents (Abi-Gerges et al., 2000) and L-type-Ca<sup>2+</sup> currents (Ji et al., 1999) in ES-cell derived cardiomyocytes.

## LWO Overexpression Has No Negative Side-Effects

Overexpression of artificial light sensitive proteins might have negative side effects on the intracellular signaling machinery because of dark activity, G-protein binding, alteration of microdomain signaling, or other overexpression artifacts. In our experience, the spontaneous beating rate is a very sensitive parameter for such side effects. Similar to the expression of Melanopsin for optogenetic G<sub>q</sub> stimulation (Beiert et al., 2014) and Jellyfish Opsin for optogenetic Gs stimulation (Makowka et al., 2019), we did not observe effects on basal beating rate by LWO expression. Since we did not analyze protein expression levels or performed RNA sequencing analysis in this work, we cannot fully exclude minor side effects. However, it must be admitted that the ES-cell system itself cannot exclude side effects for future in vivo applications and thus generation of in vivo models of LWO overexpression in the heart will be an important next step.

#### Fast Kinetics and Light Sensitivity of LWO

Parasympathetic stimulation of the intact heart can be very fast which has been shown for both electrical stimulation of the vagal nerve with ~1.5s delay (Ng et al., 2001) and optogenetic stimulation of parasympathetic neurons (Moreno et al., 2019) with an immediate reduction of heart rate. In contrast, diffusion-limited pharmacological activation of M2-cholinergic receptors with CCh in the three-dimensional cardiac body in vitro resulted in slow activation ( $\sim$ 30 s) and deactivation (~100 s). In this in vitro setting stimulation of LWO led to 30-100 times faster effects with delays of only 0.8 s from the start of illumination to maximal effect or from end of illumination to 50% of recovery, which is similar to the in vivo kinetics. Thereby LWO allows the application of brief continuous light pulses with gradually increasing stimulation intensities; such a stimulation protocol would be almost impossible with slow agonist perfusion and wash out, especially in multicellular preparation, such as EB or in intact organs.

We found that gradual stimulation allows fine tuning the response of G<sub>i</sub>-stimulation on pacemaking activity by either changing pulse duration or light intensity with a sigmoidal dependence on the logarithm of light energy (duration \* intensity in s\* $\mu$ W/mm<sup>2</sup>). Interestingly, the half-maximal light energy was slightly higher using variations of intensity (24 s\* $\mu$ W/mm<sup>2</sup>) than pulse duration (120 s\* $\mu$ W/mm<sup>2</sup>). Specifically, for a fixed total light energy at mid-sensitivity (e.g., 30 s\* $\mu$ W/mm<sup>2</sup>, light intensity protocol) are more effective than shorter light pulses (0.3 s at 100  $\mu$ W/mm<sup>2</sup>, pulse duration protocol) indicating that temporal integration of G<sub>i</sub> signaling is affecting the threshold blocking effect.

Compared with previous reported LWO sensitivity for GIRK activation in HEK293 cells (4 s\* $\mu$ W/mm<sup>2</sup>, Eli50 at 590 nm: 0.2 s, 20  $\mu$ W/mm<sup>2</sup>, Masseck et al., 2014), we observed lower LWO sensitivity (14–80 s\* $\mu$ W/mm<sup>2</sup> at 625 nm), which could be due to difference in the wavelength used.

The calculation of total light energy allows comparison with other optogenetic GPCR, we have employed to modulate pacemaking of ES-cell derived cardiomyocytes. Using Melanopsin to accelerate pacemaking by G<sub>q</sub>/PLC/IP<sub>3</sub> signaling, we determined a half maximal energy of 2.4 s<sup>\*</sup> $\mu$ W/mm<sup>2</sup> (Eli50 of 40 nW/mm<sup>2</sup> at 60 s pulses, Beiert et al., 2014) and using Jellyfish Opsin to stimulate G<sub>s</sub>/cAMP/PKA signaling, we determined a half maximal energy of only 0.16 s\*µW/mm<sup>2</sup> (Eli50 of 8 nW/mm<sup>2</sup> at 20 s pulses Makowka et al., 2019). Thus, LWO is less light sensitive than Melanopsin and Jellyfish Opsin, which is also advantageous in experimental handling at normal lab room light. In addition, LWO kinetics on frequency reduction (time to peak and 50% deactivation  ${\sim}0.8\,{\rm s})$  was much faster than kinetics of frequency increase by Melanopsin or Jellyfish Opsin in EBs (activation  $\sim$ 10–50 s) which underscores the involvement or fast GIRK channels in G<sub>i</sub> signaling.

#### Outlook

In the future, the combination of LWO with the spectrally compatible JellyOP in transgenic mice (Makowka et al., 2019) will allow spatially confined simultaneous or alternating activation of Gi and Gs signaling in cardiomyocytes in the heart in vivo. This will be a valid approach to study the impact of balanced, dysbalanced, and wrong timing of parasympathetic and sympathetic input which seems to be important for the development of pathologies, such as atrial fibrillation (Ang et al., 2012). The high temporal precision of light enables to study short-term (seconds) and mid-term (minutes and hours) effects and, using implantable light emitting devices, also long-term (days and weeks) chronic G<sub>i</sub> and G<sub>s</sub> signaling. Furthermore, selective illumination of left and right ventricle, or of epicardial and endocardial cardiomyocytes will allow to determine regional differences of vegetative nerve input on cardiac function, arrhythmia generation of development of cardiac hypertrophy. Finally, optogenetics has the advantage of cell type-specific expression using specific promoters. Thus, using the Cre-LoxP

#### REFERENCES

- Abi-Gerges, N., Ji, G. J., Lu, Z. J., Fischmeister, R., Hescheler, J., and Fleischmann, B. K. (2000). Functional expression and regulation of the hyperpolarization activated non-selective cation current in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. J. Physiol. 523, 377–389. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-2-00377.x
- Ang, R., Opel, A., and Tinker, A. (2012). The role of inhibitory g proteins and regulators of G protein signaling in the *in vivo* control of heart rate and predisposition to cardiac arrhythmias. *Front. Physiol.* 3:96. doi: 10.3389/fphys.2012.00096
- Bailes, H. J., and Lucas, R. J. (2013). Human melanopsin forms a pigment maximally sensitive to blue light (λmax ≈ 479 nm) supporting activation of Gq/11 and Gi/o signalling cascades. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 280:20122987. doi: 10.1098/rspb.2012.2987

system, expression of LWO or JellyOpsin in the different cells of the heart (cardiomyocytes, fibroblast, endothelial cells, and smooth muscle cells) will enable investigation of their  $G_i$ - and  $G_s$ signaling *in vivo* which cannot be performed by agonists applied to the circulation or by electrical stimulation of vegetative nerves.

#### CONCLUSION

36

Long wavelength-sensitive cone opsin enables optogenetic stimulation of  $G_i$ -signaling cascade in ES-cell derived cardiomyocytes with red light, resulting in a high effective and very fast inhibition of spontaneous pacemaking, mainly through the activation of GIRK channels. Thus, LWO itself or in combination with the  $G_s$  coupled spectrally compatible optogenetic GPCR JellyOP will allow to investigate the physiological and pathological effects of balanced and dysbalanced vegetative nerve input on the heart.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

MC, DM, TB, and PS designed the research. MC performed the research. MC, DM, and PS wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

### FUNDING

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—313904155/SA 1785/7-1, 380524518/SA1785/9-1, and 214362475/GRK1873/2.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Frank Holst for technical assistance.

- Ballister, E. R., Rodgers, J., Martial, F., and Lucas, R. J. (2018). A live cell assay of GPCR coupling allows identification of optogenetic tools for controlling Go and Gi signaling. *BMC Biol.* 16:10. doi: 10.1186/s12915-017-0475-2
- Beiert, T., Bruegmann, T., and Sasse, P. (2014). Optogenetic activation of Gq signalling modulates pacemaker activity of cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 102, 507–516. doi: 10.1093/cvr/cvu046
- Belardinelli, L., and Isenberg, G. (1983). Isolated atrial myocytes: adenosine and acetylcholine increase potassium conductance. Am. J. Physiol. 244, H734– H737. doi: 10.1152/ajpheart.1983.244.5.H734
- Boheler, K. R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H. T., Anisimov, S. V., and Wobus, A. M. (2002). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ. Res.* 91, 189–201. doi: 10.1161/01.RES.0000027865.61704.32
- Bruegmann, T., Boyle, P. M., Vogt, C. C., Karathanos, T. V., Arevalo, H. J., Fleischmann, B. K., et al. (2016). Optogenetic defibrillation terminates

Frontiers in Physiology | www.frontiersin.org

Cokić et al.

ventricular arrhythmia in mouse hearts and human simulations. J. Clin. Invest. 126, 3894–3904. doi: 10.1172/ICI88950

- Bruegmann, T., Malan, D., Hesse, M., Beiert, T., Fuegemann, C. J., Fleischmann, B. K., et al. (2010). Optogenetic control of heart muscle *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Methods* 7, 897–900. doi: 10.1038/nmeth.1512
- Capote, L. A., Mendez Perez, R., and Lymperopoulos, A. (2015). GPCR signaling and cardiac function. *Eur. J. Pharmacol.* 763, 143–148. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.019
- Guru, A., Post, R. J., Ho, Y.-Y., and Warden, M. R. (2015). Making sense of optogenetics. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18:pyv079. doi:10.1093/ijnp/pyv079
- Huang, C. L., Slesinger, P. A., Casey, P. J., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1995). Evidence that direct binding of G beta gamma to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K+ channel is important for channel activation. *Neuron* 15, 1133–1143. doi: 10.1016/0896-6273(95)90101-9
- Hutchinson, S. A., and Scammells, P. J. (2004). A(1) adenosine receptor agonists: medicinal chemistry and therapeutic potential. *Curr. Pharm. Des.* 10, 2021–2039. doi: 10.2174/1381612043384204
- Ivanova-Nikolova, T. T., Nikolov, E. N., Hansen, C., and Robishaw, J. D. (1998). Muscarinic K+ channel in the heart. Modal regulation by G protein beta gamma subunits. *J. Gen. Physiol.* 112, 199–210. doi: 10.1085/jgp.112. 2.199
- Ji, G., Fleischmann, B. K., Bloch, W., Feelisch, M., Andressen, C., Addicks, K., et al. (1999). Regulation of the L-type Ca2+ channel during cardiomyogenesis: switch from NO to adenylyl cyclase-mediated inhibition. *FASEB J.* 13, 313–324. doi: 10.1096/fasebj.13.2.313
- Karunarathne, W. K. A., Giri, L., Kalyanaraman, V., and Gautam, N. (2013). Optically triggering spatiotemporally confined GPCR activity in a cell and programming neurite initiation and extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E1565–E1574. doi: 10.1073/pnas.1220697110
- Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K., and Clapham, D. E. (1995). G beta gamma binds directly to the G protein-gated K+ channel, IKACh. J. Biol. Chem. 270, 29059–29062. doi: 10.1074/jbc.270.49.29059
- Lakatta, E. G., and DiFrancesco, D. (2009). What keeps us ticking: a funny current, a calcium clock, or both? J. Mol. Cell Cardiol 47, 157–170. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.03.022
- Layden, B. T., Newman, M., Chen, F., Fisher, A., and Lowe, W. L. (2010). G protein coupled receptors in embryonic stem cells: a role for Gs-alpha signaling. *PLoS ONE*. 5:e9105. doi: 10.1371/journal.pone.0009105
- Lyashkov, A. E., Vinogradova, T. M., Zahanich, I., Li, Y., Younes, A., Nuss, H. B., et al. (2009). Cholinergic receptor signaling modulates spontaneous firing of sinoatrial nodal cells via integrated effects on PKA-dependent Ca(2+) cycling and I(KACh). Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 297, H949–H959. doi: 10.1152/ajpheart.01340.2008
- Makowka, P., Bruegmann, T., Dusend, V., Malan, D., Beiert, T., Hesse, M., et al. (2019). Optogenetic stimulation of Gs-signaling in the heart with high spatiotemporal precision. *Nat. Commun.* 10:1281. doi: 10.1038/s41467-019-09322-7
- Maltsev, V. A., Rohwedel, J., Hescheler, J., and Wobus, A. M. (1993). Embryonic stem cells differentiate *in vitro* into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech. Dev.* 44, 41–50. doi: 10.1016/0925-4773(93)90015-P
- Masseck, O. A., Spoida, K., Dalkara, D., Maejima, T., Rubelowski, J. M., Wallhorn, L., et al. (2014). Vertebrate cone opsins enable sustained and highly sensitive

Optogenetic Gi Signaling in Cardiomyocytes

rapid control of Gi/o signaling in anxiety circuitry. *Neuron* 81, 1263-1273. doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.041

- Mesirca, P., Marger, L., Toyoda, F., Rizzetto, R., Audoubert, M., Dubel, S., et al. (2013). The G-protein-gated K+ channel, IKACh, is required for regulation of pacemaker activity and recovery of resting heart rate after sympathetic stimulation. J. Gen. Physiol. 142, 113–126. doi: 10.1085/jgp.201310996
- Moreno, A., Endicott, K., Skancke, M., Dwyer, M. K., Brennan, J., Efimov, I. R., et al. (2019). Sudden heart rate reduction upon optogenetic release of acetylcholine from cardiac parasympathetic neurons in perfused hearts. *Front. Physiol.* 10:16. doi: 10.3389/fphys.2019.00016
- Ng, G. A., Brack, K. E., and Coote, J. H. (2001). Effects of direct sympathetic and vagus nerve stimulation on the physiology of the whole heart – a novel model of isolated langendorff perfused rabbit heart with intact dual autonomic innervation. *Exp. Physiol.* 86, 319–329. doi: 10.1113/eph8602146
- Nobles, M., Montaigne, D., Sebastian, S., Birnbaumer, L., and Tinker, A. (2018). Differential effects of inhibitory G protein isoforms on G protein-gated inwardly rectifying K+ currents in adult murine atria. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 314, C616–C626. doi: 10.1152/ajpcell.00271.2016
- Qiu, X., Kumbalasiri, T., Carlson, S. M., Wong, K. Y., Krishna, V., Provencio, I., et al. (2005). Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature* 433, 745–749. doi: 10.1038/nature03345
- Spoida, K., Eickelbeck, D., Karapinar, R., Eckhardt, T., Mark, M. D., Jancke, D., et al. (2016). Melanopsin variants as intrinsic optogenetic on and off switches for transient versus sustained activation of G protein pathways. *Curr. Biol.* 26, 1206–1212. doi: 10.1016/j.cub.2016.03.007
- Touhara, K. K., Wang, W., and MacKinnon, R. (2016). The GIRK1 subunit potentiates G protein activation of cardiac GIRK1/4 hetero-tetramers. *ELife* 5:e15750. doi: 10.7554/eLife.15750.010
- Wobus, A. M., Wallukat, G., and Hescheler, J. (1991). Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca2+ channel blockers. *Differentiation* 48, 173–182. doi: 10.1111/j.1432-0436.1991.tb00255.x
- Xiang, Y., and Kobilka, B. K. (2003). Myocyte adrenoceptor signaling pathways. Science 300, 1530–1532. doi: 10.1126/science.1079206

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Cokić, Bruegmann, Sasse and Malan. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## 3. Danksagung

"Per aspera ad astra" Kroz trnje do zvezda. Über Dornen zu den Sternen. Über die langen Nächte im Labor, bis zur Promotion.

Ich bin sehr dankbar für die bedingungslose Unterstützung, die ich von meinen Eltern, Ing. Dušanka und Dipl. Ing. Radiša Cokić, erhalten habe. Vielen Dank für eure anhaltende Geduld und Motivation, besonders in den schwierigsten Momenten. Ihr habt mich während des Studiums und bis zum letzten Moment der Promotion und drüber hinaus in allen Aspekten begleitet. Ohne eure beruhigenden und motivierenden Worte wäre dieser Erfolg nie zustande gekommen. Hvala vam!

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Philipp Sasse und meiner Betreuerin Dr. Daniela Malan bedanken. Sie haben mich während meines Werdegangs engmaschig betreut, beraten und mir in den schwierigen Zeiten den Weg gezeigt - zu jeder Tageszeit.

Auch meinen engen Freunden, ehemaligen Kommilitonen und meiner Partnerin, sowie dem gesamten Team der AG Sasse (insb. Frank Holz) ein großes Dankeschön für die langjährigen Unterstützungen.

Danke.

## 4. Lebenslauf

Name:	Milan Cokić	
Geburtsort:	Wien Österreich	
Staatsangehörigkeit:	österreichisch / serbisch	
Beruflicher Werdegang		
10/2020 – 02/2021	Militärassistenzarzt im Rahmen des militärmedizinischen Dienstes während des Grundwehrdienstes im österreichischen Bundesheer (allg. Innere Medizin)	
03/2021 – 06/2021	Assistenzarzt der Inneren Medizin am Landesklinikum Wiener Neustadt, Österreich, (Leitung: Prim. Dr. Gerhard Weidinger)	
09/2021 – 09/2024	Assistenzarzt in der Neurologie am Kantonsspital St.Gallen (KSSG), Schweiz, (Leitung: Prof. Dr. Barbara Tettenborn / Prof. Dr. Gian Marco De Marchis)	
11/2024 – 10/2025	Fremdfachrotation - Assistenzarzt der Neuroradiologie am Unversitätsspital Bern (Inselspital Bern), Schweiz, (Leitung: Prof. Dr. Jan Gralla)	
Studium und Ausbildung		
10/2013 – 05/2020	Humanmedizin Studium Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität Bonn	
2016 – 2025	Doktorand unter Herrn Prof. Dr. med. Philipp Sasse am Institut für Physiologie I der Universität Bonn (Direktor: Prof. Dr. med. Bernd Fleischmann)	

## Schule

2001 – 2005	Grundschule – Reichsapfelgasse Wien, Österreich
2005 – 2013	Realgymnasium AHS – Diefenbachgymnasium Wien, Öst.
Sonstiges	
2014 – 2016	Pflegerische Hilfskraft, Universitätsklinik Bonn
2017 – 2018	Mentor/Tutor im SkillsLabs Bonn UKB Bonn chirurgischer Naht-Tutor
2017	Mitbegründung online Nahtkurs - SutureTV/NahtkursTV