Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck

Kardiale „Delayed Rectifier“ Kaliumkanäle:

Bedeutung in humanem Myokard, Speziesunterschiede, transmurale Verteilung und Regulation bei Herzinsuffizienz

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ludwig Andreas Zwermann
aus München

2005

Mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. M. Näbauer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. B. Fichtl Prof. Dr. med. W. Nagel
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. med. S. Kääb Dr. med. A. Barth Dr. med. M. Hinterseer
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	23. Juni 2005

Meiner Mutter

Inhalt

1 EINLEITUNG 1

1.1 Physiologische Bedeutung der delayed rectifier Kaliumkanäle 1

1.1.1 Funktion von I_{Kr} und I_{Ks} im Aktionspotential 1

1.1.2 Speziesunterschiede 4

1.1.3 Transmurale Heterogenität 5

1.2 Pathologische Bedeutung der delayed rectifier Kaliumkanäle 8

1.2.1 Long QT-Syndrom 8

1.2.2 Regulation bei Herzinsuffizienz 11

1.3 Ziele der Arbeit 15

2 METHODEN 16

2.1 Elektrophysiologie 16

2.1.1 Zellgewinnung 16

2.1.1.1 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus humanem Gewebe ... 16

2.1.1.2 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus Meerschweinchenherzen 18

2.1.1.3 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus Schweineherzen 19

2.1.1.4 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus Hundeherzen 20

2.1.2 Transiente Expression von KCNH2 und KCNQ1 in murinen Fibroblastenzellen (LTK^--Zellen) 20

2.1.3 Patch Clamp Untersuchungen 21

2.1.3.1 Messung der delayed rectifier Ströme 22

2.1.3.2 Aufzeichnung von Aktionspotentialen 23

2.2 Molekularbiologie 24

2.2.1 mRNA – Isolation aus humanem Gewebe und cDNA-Synthese 24

2.2.2 Quantifizierung der mRNA mittels „real-time“ PCR 25

2.2.2.1 Prinzip der „real-time“ PCR 25
2.2.2.2 Durchführung der Messungen 26

2.3 Materialien 27
2.3.1 Elektrophysiologie 28
2.3.2 Molekularbiologie 30

2.4 Auswertung und statistische Analyse 30

3 ERGEBNISSE 32

3.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von delayed rectifier Kaliumkanälen 32
3.1.1 Nachweis von I_{Kr} in humanem Myokard 34
3.1.2 Aktivierung von I_{Kr} 36
3.1.3 Pharmakologische Modulation von I_{Kr} 38
3.1.3.1 Dofetilide 38
3.1.3.2 Haloperidol 41
3.1.3.3 Einfluss der extrazellulären Kalium-Konzentration auf I_{Kr} 42
3.1.4 Nachweis von I_{Ks} und pharmakologische Modulation 42
3.1.4.1 Chromanol 293b und HMR 1556 44

3.2 I_{Kr} und I_{Ks} in verschiedenen Spezies unter Berücksichtigung der transmuralen Verteilung 47
3.2.1 Meerschweinchen 50
3.2.2 Schwein 52
3.2.3 Hund 54
3.2.4 Mensch 56

3.3 Regulation von I_{Kr} bei Herzinsuffizienz 57

3.4 KCNH2 und KCNQ1 als molekulares Substrat für I_{Kr} bzw. I_{Ks} im humanen Herzen 59
3.4.1 Transiente Expression von KCNH2 in LTK- Zellen 59

3.4.2 Transiente Expression von KCNQ1 in LTK- Zellen 60

3.5 Expression von KCNH2, KCNQ1, KCNE1 und KCNE2 in humanem Myokard 61

3.5.1 Transmurale Verteilung und Regulation bei Herzinsuffizienz: KCNH2 63

3.5.2 Transmurale Verteilung und Regulation bei Herzinsuffizienz: KCNQ1 64

3.5.3 Transmurale Verteilung und Regulation bei Herzinsuffizienz: KCNE1 65

3.5.4 Transmurale Verteilung und Regulation bei Herzinsuffizienz: KCNE2 66

4 DISKUSSION 67

4.1 Methodik 67

4.1.1 Patch clamp Experimente 68

4.1.2 Molekularbiologische Untersuchungen 69

4.2 Speziesunterschiede 70

4.3 Transmurale Verteilung 72

4.4 Regulation bei Herzinsuffizienz 73

4.5 Bedeutung von β-Untereinheiten 75

4.5.1 KCNQ1 bildet mit der KCNE1 β-Untereinheit I_{Ks} 75

4.5.2 Weitere β-Untereinheiten der KCNE-Familie 76

4.5.3 Weitere regulatorische Untereinheiten 78

4.6 Dualer Repolarisationsmechanismus in Ventrikelmyokard: Funktionelle Bedeutung von I_{Kr} und I_{Ks} in humanem Myokard 81

4.7 Klinische Relevanz 82

5 ZUSAMMENFASSUNG 86

6 ANHANG 90

6.1 Interaktionen der KCNE1-5 β-Untereinheiten mit Kaliumkanal α-Untereinheiten 90

7 LITERATUR 93

8 DANK 104

9 LEBENSLAUF 105

Abkürzungsverzeichnis

AKAP	A-kinase anchoring protein
APD	Aktionspotentialdauer
$BaCl_2$	Bariumchlorid
β-GUS	β-Glucuronidase
C	Kapazität
CaCl	Kalziumchlorid
CACL1A1	kodierendes Gen für I_{Ca} α-Untereinheit
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
$CdCl_2$	Kadmiumchlorid
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CO_2	Kohlendioxid
C_t	Schwellen-Zyklus bei real time PCR
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DMSO	Dimethyl-Sulfoxide
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleoside triphosphates
DTT	Dithiothreitol
EGTA	ethyleneglycol bis(2-aminoethylether)-tetraacetic acid
ENDO	subendokardial
EPI	subepikardial
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GFP	green fluorescent protein
HCl	Salzsäure
HCN	kodierendes Gen für I_f α-Untereinheit
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid
I	Strom
I.E.	internationale Einheiten
i.v.	intravenös

IC_{50}	Konzentration für halbmaximale Inhibierung
I_{Ca}	Kalziumstrom
I_f	hyperpolarizations-aktivierter Schrittmacher Strom
I_{K1}	inward rectifier Kaliumauswärtsstrom
I_{Ks}	langsam (slow) aktivierender delayed rectifier Kaliumauswärtsstrom
I_{Kr}	schnell (rapid) aktivierender delayed rectifier Kaliumauswärtsstrom
I_{Na}	schneller Natriumstrom
I_{Na-Ca}	Natrium-Kalziumaustauscher
I_{to1}	transienter Kaliumauswärtsstrom
K	Kalium
K_2-ATP	Kalium-Adenosintriphosphat
KChiP	Kv channel–interacting protein; mögliche β-Untereinheit von I_{to}
KCl	Kaliumchlorid
KCND2	früher: Kv4.2; kodierendes Gen für I_{to} α-Untereinheit
KCND3	früher: Kv4.3; kodierendes Gen für I_{to} α-Untereinheit
KCNE1	früher: IsK; Protein: minK; für Kaliumkanal β-Untereinheit kodierendes Gen
KCNE2	für Kaliumkanal β-Untereinheit (MiRP1) kodierendes Gen
KCNE3	für Kaliumkanal β-Untereinheit (MiRP2) kodierendes Gen
KCNE4	für Kaliumkanal β-Untereinheit (MiRP3) kodierendes Gen
KCNE5	für Kaliumkanal β-Untereinheit (MiRP4) kodierendes Gen
KCNH2	früher: hERG; kodierendes Gen für I_{Kr} α-Untereinheit
KCNJ2	kodierendes Gen für I_{K1} α-Untereinheit
KCNQ1	früher: KvLQT1; kodierendes Gen für I_{Ks} α-Untereinheit
KCNQ2	kodierendes Gen für Kaliumkanal α-Untereinheit
KCNQ3	kodierendes Gen für Kaliumkanal α-Untereinheit
KCNQ4	kodierendes Gen für Kaliumkanal α-Untereinheit
$KHPO_4$	Kaliumhydrogenphosphat
Kv3.4	kodierendes Gen für Kaliumauswärtsstrom α-Untereinheit

LAD	left anterior descending artery
LQT1 – 5	Long QT-Syndrom 1 – 5
LTK	murine Fibroblastenzellen
M	Mitte; mittlere Schichten
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger ribonucleic acid
N_2O	Distickstoffoxid; Lachgas
Na_2-ATP	Natrium-Adenosintriphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH_2PO_4	Natriumhydrogenphosphat
O_2	Sauerstoff
PCR	polymerase chain reaction
Q	Ladung
R_a	Zugangswiderstand
RNA	ribonucleic acid
SCN5A	kodierendes Gen für I_{Na} α-Untereinheit
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SGK	serum and glucocorticoid-inducible kinase
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane–HCl

1 Einleitung

Der plötzliche Herztod stellt eine bedeutende Todesursache der westlichen Welt dar (Priori et al., 2001; Zipes und Wellens, 1998). Man geht von etwa 300 000 Fällen pro Jahr von plötzlichem Herztod in den USA aus, was einer Inzidenz von über 1 / 1000 Einwohner pro Jahr entspricht (Myerburg et al., 1992). Bei Männern im Alter zwischen 60 und 69 Jahren werden sogar bis zu 8 Fälle pro 1000 Einwohner pro Jahr berichtet (Sans et al., 1997). Dem Großteil der Fälle von plötzlichem Herztod liegen tachykarde Rhythmusstörungen wie Kammerflimmern oder Kammertachykardien zugrunde. Ursachen dafür ist häufig eine akute Myokardischämie, die durch akuten thrombotischen Verschluss eines Herzkranzgefäßes verursacht wird. Die regionale Ischämie bzw. die Heterogenität zwischen ischämischen und nicht-ischämischen Arealen kann zu einer proarrhythmischen Heterogenität der Repolarisation führen. Auch strukturelle Veränderungen wie Fibrosierung, Narbenbildung und eine Dilatation des Ventrikels kann das Substrat bei der Entstehung von Herzrhythmusstörungen darstellen. Bei Patienten ohne strukturelle Herzerkrankung beobachtete Rhythmusstörungen können auf angeborenen Ionenkanalkrankheiten wie dem Long-QT Syndrom oder – viel häufiger – der pharmakologischen Beeinflussung der Ionenkanalfunktion durch Antiarrhythmika, oder vielen Medikamenten aus nicht-kardiovaskulären Indikationsgebieten beruhen.

1.1 Physiologische Bedeutung der delayed rectifier Kaliumkanäle

1.1.1 Funktion von I_{Kr} und I_{Ks} im Aktionspotential

Die Konfiguration des kardialen ventrikulären Aktionspotentials kommt durch das Zusammenspiel zahlreicher depolarisierender Einwärtsströme und repolarisierender Auswärtsströme zustande. Diese Ströme setzen sich aus der

Summe aller Ionenbewegungen über die elektrisch isolierende Zellmembran zusammen. In die Zellmembran eingebettete Ionenkanäle, Austauschsysteme und Pumpen stellen aktive und passive Transportsysteme dar, die den Fluss von Ladungsträgern von extrazellulär nach intrazellulär und umgekehrt erlauben.
Die für den Erregungsablauf in humanen ventrikulären Kardiomyozyten wichtigsten Ionenkanäle und ihre Bedeutung während des Aktionspotentials sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Der schnelle Einstrom von Natrium-Ionen durch den spannungsgesteuerten Natriumkanal (I_{Na}) vermittelt die initiale Depolarisation mit dem schnellen Aufstrich des Aktionspotentials. Zu Beginn der Plateauphase findet sich oft eine charakteristische „Kerbe“, die durch den vorübergehenden Ausstrom von Kalium-Ionen durch den kalziumunabhängigen transienten Kaliumauswärtsstrom (I_{to1}) induziert wird. Die darauf folgende Plateau-Phase ist durch eine empfindliche Balance zwischen Kalzium-Einstrom durch den langsamen, spannungsgesteuerten L-Typ Kalziumkanal (I_{Ca}) und dem beginnenden Kalium-Ausstrom durch die schnelle und langsame Komponente der delayed rectifier Kaliumkanäle (I_{Kr} und I_{Ks}) gekennzeichnet. Während dieser Phase herrschen nur sehr geringe Leitfähigkeiten, so dass schon geringe Ströme ausreichen, um das sensible Gleichgewicht zwischen Depolarisation und Repolarisation zu stören. Der Kalzium-Einstrom in das Zellinnere führt zur Kontraktion der Zelle und löst so im Zusammenspiel aller ventrikulären Kardiomyozyten die Systole des Herzens aus. Beendet wird das Aktionspotential durch ein Überwiegen von I_{Kr} und I_{Ks} bei gleichzeitiger Abnahme von I_{Ca}. Die Eigenschaft von I_{Kr} als „Einwärtsgleichrichter“ begünstigt zusammen mit dem inward rectifier Kaliumkanal (I_{K1}) die Stabilisierung des Membranpotentials bei -80 mV, dem Kaliumgleichgewichtspotential.

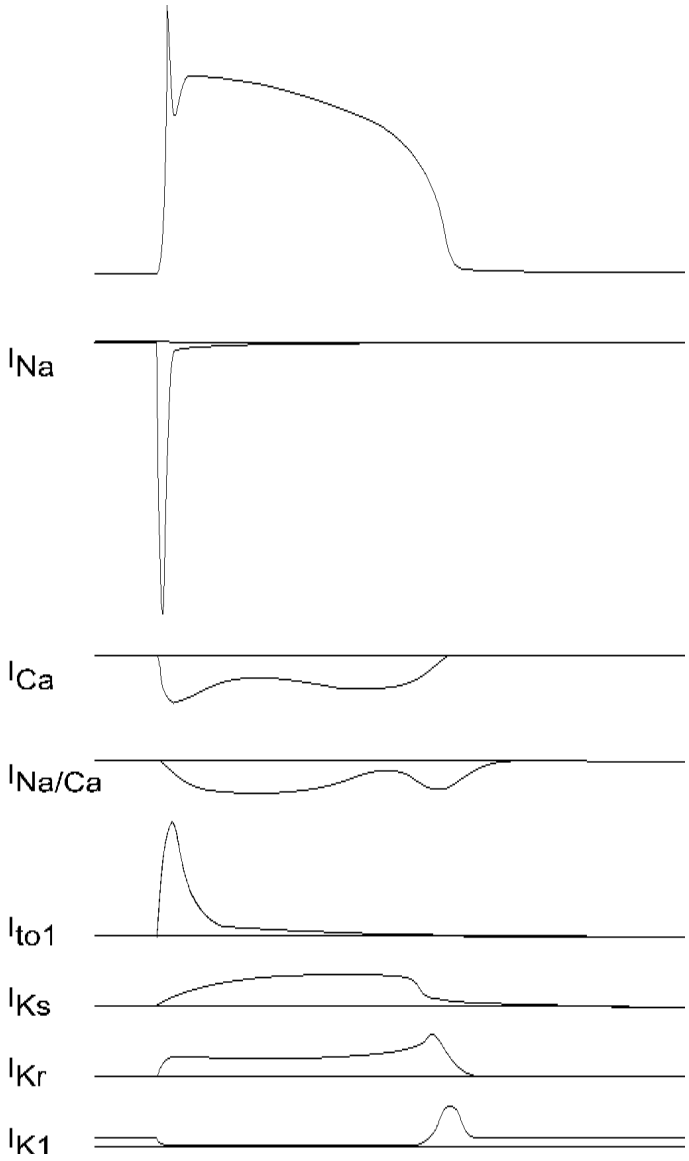


Abbildung 1

Humanes Aktionspotential (schematisch) mit den für die typische Konfiguration verantwortlichen Strömen: Die depolarisierenden Einwärtsströme I_{Na} (schneller spannungsabhängiger Natriumkanal, schnelle Depolarisationsphase; α-Untereinheit SCN5A) und I_{Ca} (langsamer, spannungsabhängiger Kalziumkanal, Plateauphase; α-Untereinheit CACL1A1) sind definitionsgemäß nach unten aufgetragen, die repolarisierenden Kaliumkanäle nach oben. Essentielle repolarisierende Kaliumkanäle sind der transiente kalziumunabhängige Kaliumauswärtsstrom I_{to1} (α-Untereinheit KCND3, mögliche β-Untereinheit KChiP), der für die Kerbe im Aktionspotential während der frühen Repolarisation verantwortlich ist. Die beiden delayed rectifier Kaliumkanäle I_{Kr} (α-Untereinheit KCNH2, β-Untereinheit KCNE2) und I_{Ks} (α-Untereinheit KCNQ1, β-Untereinheit KCNE1) vermitteln die späte Repolarisation. Der inward rectifier Kaliumkanal I_{K1} (α-Untereinheit KCNJ2) hält das Ruhemembranpotential dann bei –80 mV.

1.1.2 Speziesunterschiede

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit humanen Gewebes im Rahmen von Herztransplantationen sowie der individuellen Variabilität des Gewebes ist es nötig, auf Tiermodelle zurückzugreifen. Die Konfiguration des Aktionspotentials weist jedoch erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies auf (Abbildung 2). Insbesondere während der Repolarisationsphase finden sich große Differenzen. Für die Repolarisation im humanen Herzen ist vor allem der schnelle delayed rectifier Kaliumkanal I_{Kr} verantwortlich; jedoch spielen wohl auch der transiente Kaliumauswärtsstrom I_{to1} und der langsame delayed rectifier Kaliumkanal I_{Ks} eine Rolle. Im Hund findet sich eine ähnliche Ionenkanalausstattung mit einem transienten Kaliumauswärtsstrom und den beiden delayed rectifier Kaliumkanälen I_{Kr} und I_{Ks}. I_{Ks} weist – anders als im menschlichen Myokard - eine ähnliche Stromdichte wie I_{Kr} auf und spielt somit eine viel größere Rolle bei der Repolarisation als in humanem Myokard. Bei näherer Betrachtung werden weitere Unterschiede deutlich; I_{to} wird in humanem Myokard durch zwei unterschiedliche Kanäle mit unterschiedlichen elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften generiert, die regional differentiell exprimiert werden. Im Hund ist jedoch elektrophysiologisch nur ein Kanal nachweisbar (Barth et al., 2002).

Ein transienter Auswärtsstrom ist dagegen im Schwein nur in minimaler Stromdichte nachweisbar; hier erfolgt die Repolarisation ausschließlich über I_{Kr} und I_{Ks} (Näbauer et al., 1997).

Das Meerschweinchen ist das klassische Tiermodell zur Untersuchung der delayed rectifier Kaliumkanäle. I_{to1} spielt unter physiologischen Bedingungen – ähnlich wie im Schwein – keine Rolle bei der kardialen Repolarisation des Meerschweinchens, sie wird über verhältnismäßig sehr große I_{Kr} und I_{Ks}-Ströme vermittelt (Nakajima et al., 2002; Varro et al., 1993).

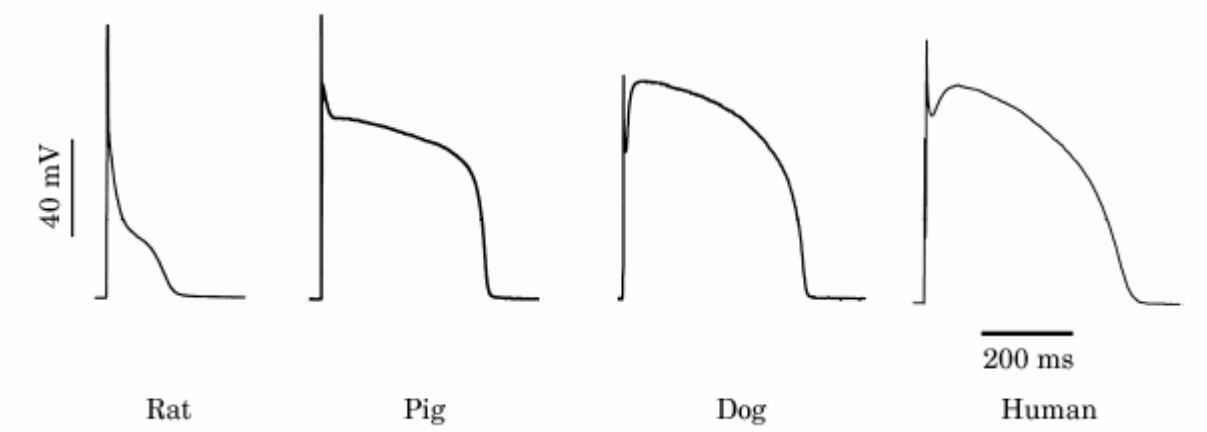


Abbildung 2

Aufzeichnung von Aktionspotentialen in isolierten Kardiomyozyten verschiedener Spezies. In Ratten-Kardiomyozyten ist ein sehr kurzes Aktionspotential mit Dreiecksförmiger Konfiguration zu registrieren. Aktionspotentiale aus Schweine-, Hunde- und Menschen-Kardiomyozyten sind ähnlich konfiguriert und weisen ein deutliches Plateau auf. Unterschiede findet man jedoch insbesondere während der frühen Phase der Repolarisation. Hund und Mensch haben hier die charakteristische Kerbe, die durch I_{to1} vermittelt wird. Im Schweinemyokard fehlt diese vollständig. (Kääb und Näbauer, 2001).

1.1.3 Transmurale Heterogenität

Vor einigen Jahren wurde die Vorstellung von im linksventrikulären Myokard homogen verteilten Ionenkanälen von der Erkenntnis abgelöst, dass subepikardiale (EPI), mittlere (so genannte M-Zellen) und subendokardiale (ENDO) Schichten mit unterschiedlichen elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften abgegrenzt werden können. Diese sind für den geregelten Ablauf der Erregungsausbreitung und –rückbildung essentiell. Die Depolarisation des Myokards läuft von endokardial nach epikardial ab, die Erregungsrückbildung in umgekehrter Richtung. Daraus resultiert endokardial eine längere Phase der Depolarisation, die sich in einer längeren Aktionspotentialdauer widerspiegelt. So findet man in Aktionspotentialmessungen sowohl im Gewebeverbund wie auch an Einzelzellen eine unterschiedliche Länge und Konfiguration des Aktionspotentials abhängig von der transmuralen Schicht (Abbildung 3): Dem

längeren Aktionspotential endokardial fehlt die charakteristische Kerbe während der frühen Repolarisationsphase, bei etwas niedrigerem Plateaupotential. Verantwortlich für die beschriebene Kerbe in epikardialen Zellen ist ein etwa vierfach größerer I_{to1} als endokardial; der Unterschied zwischen epikardialem und endokardialem I_{to1} wird zudem durch eine langsamere Reaktivierungskinetik weiter verstärkt. Zusätzlich zu den elektrophysiologischen Unterschieden sind auch pharmakologische Differenzen nachweisbar, so dass von zwei molekular unterschiedlichen Kanälen mit differentieller Expression epikardial und endokardial ausgegangen werden kann (Barth, 2001; Näbauer et al., 1996).

In mittleren Schichten des linksventrikulären Myokards findet sich die Gruppe von so genannten M-Zellen mit charakteristischen Eigenschaften: Eine Verlangsamung der Stimulationsfrequenz führt in M-Zellen im Gegensatz zu EPI und ENDO-Zellen zu einer überproportionalen Verlängerung des Aktionspotentiales (Abbildung 4) (Antzelevitch et al., 1991; Antzelevitch und Fish, 2001). Kausal wird für dieses verlängerte Aktionspotential ein kleinerer I_{Ks} (Tabelle 1) in Verbindung mit größerem späten Natrium-Strom (late I_{Na}) und Natrium-Kalzium-Austauscher ($I_{Na\text{-}Ca}$) verantwortlich gemacht (Liu und Antzelevitch, 1995; Zygmunt et al., 2000; Zygmunt et al., 2001). Somit wird das Gleichgewicht zwischen Depolarisation und Repolarisation in Richtung Depolarisation verschoben, was dann einer Aktionspotential-Verlängerung entspricht. Die Applikation von Pharmaka die I_{Kr} blockieren wie beispielsweise die Klasse III Antiarrhythmika d,l-Sotalol und Dofetilide in M-Zellen bewirken eine weitere Verlängerung des Aktionspotentials (Sicouri et al., 1997).

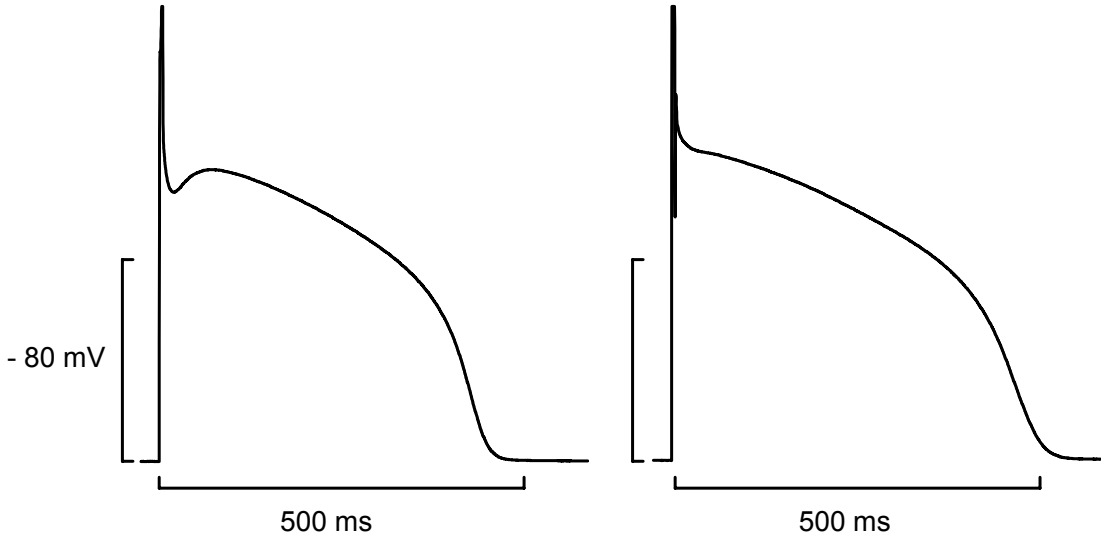


Abbildung 3

Aufzeichnung repräsentativer humaner Aktionspotentiale: Links ein epikardiales Aktionspotential mit typischer Konfiguration, kürzerer Aktionspotentialdauer und Kerbe zu Beginn des Plateaus. Rechts das Aktionspotential eines endokardialen Kardiomyozyten von längerer Dauer und ohne I_{to1} vermittelte Kerbe.

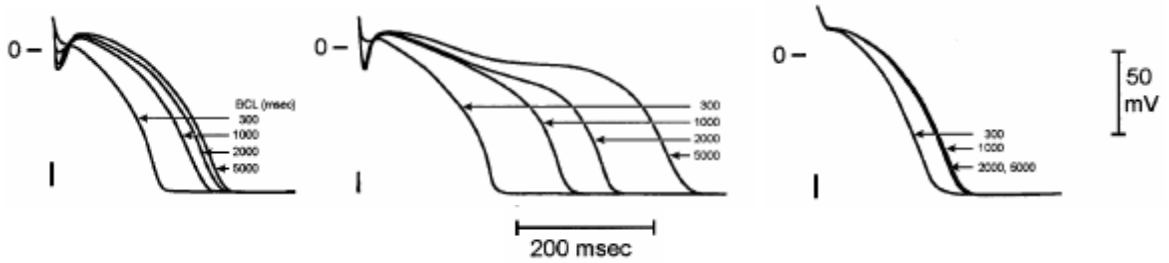


Abbildung 4

Aktionspotentialaufzeichnungen mittels Mikroelektrodentechnik in Hundemyokard aus epikardialen (links), M-Zell (Mitte) und endokardialen (rechts) Arealen des linken Ventrikels bei variablen Stimulationsintervallen. M-Zellen zeigen im Vergleich zu EPI und ENDO eine überproportionale Verlängerung der Aktionspotentialdauer bei niedrigeren Stimulationsfrequenzen. (Modifiziert aus: Sicouri und Antzelevitch, 1991)

Spezies	I_{Kr} [pA/pF]			I_{Ks} [pA/pF]			Quelle
	EPI	M	ENDO	EPI	M	ENDO	
Meer-schwein-chen	0,61±0,88	0,80±0,12	0,44±0,07	3,52±0,41	3,47±0,25	2,29±0,33	(Bryant et al., 1998)
Hund	–	–	–	1,99±0,30	0,92±0,14	1,83±0,18	(Liu und Antzelevitch, 1995)
Hund	0,22±0,02	0,26±0,01	–	0,60±0,05	0,39±0,04	–	(Gintant, 1995)
Hund	0,36±0,07	0,38±0,08	0,39±0,09	2,8±0,3	1,9±0,2	2,6±0,3	(Li et al., 2002)
Kaninchen	0,31±0,05	–	0,36±0,07	1,1±0,1	–	0,43±0,07	(Xu et al., 2001)

Tabelle 1

Untersuchungen zur transmuraler Verteilung von I_{Kr} und I_{Ks} in isolierten Kardiomyozyten nicht-insuffizienter Tiere. Für I_{Kr} wird kein transmuraler Gradient beschrieben, tendenziell sind epikardial geringere Stromdichten angegeben. I_{Ks} ist im Hund in Zellen aus mittleren myokardialen Arealen (M-Zellen) kleiner als epikardial und endokardial.

1.2 Pathologische Bedeutung der delayed rectifier Kaliumkanäle

1.2.1 Long QT-Syndrom

Das Long QT-Syndrom stellt eine Erkrankung dar, die durch eine Verlängerung des QT-Intervalls im EKG sowie durch das Auftreten potentiell lebensbedrohlicher polymorpher Tachykardien, vom Typ torsade de pointes (Abbildung 5) gekennzeichnet ist (Moss et al., 1985). Klinisch unterscheidet man die angeborene Form des Long QT-Syndroms von der erworbenen Form, die sich erst bei Vorhandensein weiterer auslösender Faktoren wie Elektrolytstörungen oder pharmakologischer Beeinflussung manifestiert (Camm et al., 2000).

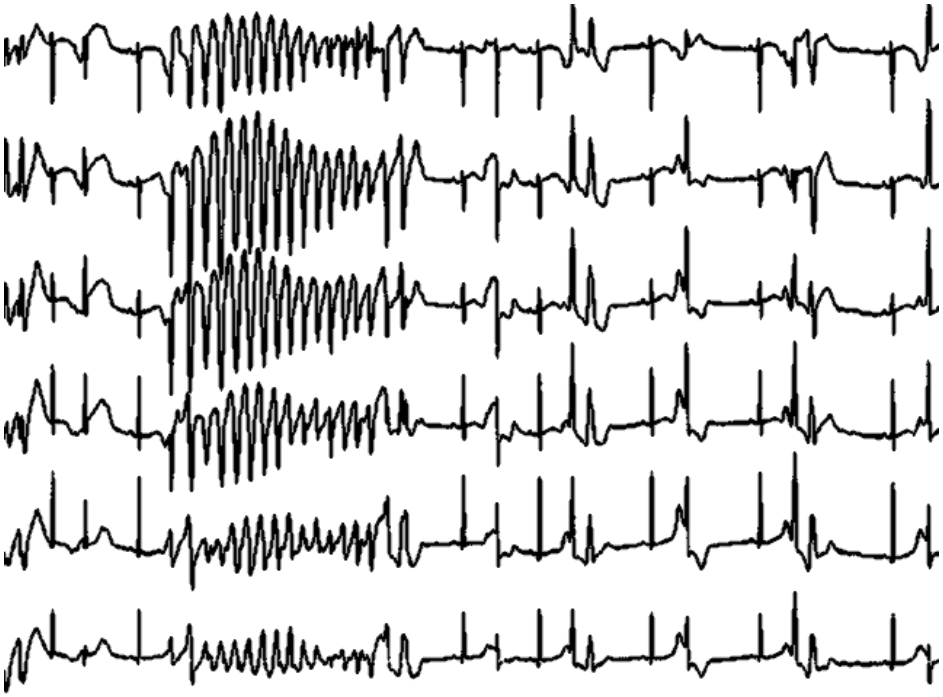


Abbildung 5

EKG-Aufzeichnung einer Torsade de pointes-Arrythmie einer Patientin mit Medikamenten-Induziertem Long QT-Syndrom. Im Rahmen eines akuten psychotischen Zustandes mit Erbrechen (und daraus folgender Elektrolytstörung mit Hypokaliämie) war vom Notarzt Haloperidol i.v. verabreicht worden, worauf es zu oben abgebildeten, hämodynamisch wirksamen Tachykardien kam. Diese mussten durch kardiopulmonale Wiederbelebung und insgesamt 18malige externe Defibrillation therapiert werden.

Für das angeborene Long QT-Syndrom wurden Mutationen auf den Chromosomen 3, 4, 7, 11, 17 und 21 beschrieben: Die Mutationen betreffen die α- und β-Untereinheit von I_{Ks} KCNQ1 (LQT1) bzw. KCNE1 (LQT5), die α- und die potentielle β-Untereinheit von I_{Kr} KCNH2 (LQT2) bzw. KCNE2 (LQT6) sowie die α-Untereinheit von I_{Na} SCN5A (LQT3) (Abbott et al., 1999; Keating und Sanguinetti, 2001; Roden und Spooner, 1999). Bei LQT4 handelt es sich um Mutationen in Ankyrin B, die über Störungen der zellulären Organisation von Natrium-Transporter, Natrium-Kalzium-Austauscher, Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor, sowie der Kalzium-Handlings arrhythmogen sein könnte (Mohler et al., 2003). Das Andersen´s Syndrom (Long QT-Syndrom in Verbindung mit

periodischer Paralyse und Fehlbildungen) mit Mutationen in KCNJ2, das für I_{K1} kodiert, wird auch als LQT7 bezeichnet (Plaster et al., 2001).

Mutationen in den für delayed rectifier Kaliumkanäle oder ihre Untereinheiten kodierenden Genen führen in der Regel zu einem „loss of function“, also einer Abnahme des für die Repolarisation verfügbaren Kaliumauswärtsstromes (Sanguinetti, 1999). Hingegen bewirken die beschriebenen Mutationen des Natriumkanalgenes eine verzögerte Inaktivierung dieses depolarisierenden Stromes („gain of function“), was zu einem während der Plateauphase des Aktionspotentials anhaltenden Natriumeinstrom und somit ebenfalls zu einer verzögerten Repolarisation führt (Wang et al., 1995). Kaliumkanäle sind – im Gegensatz zu Natriumkanälen, wo ein einzelnes Protein eine funktionsfähige Kanalpore bildet – Multimere, d.h. ein funktioneller Kanal setzt sich aus mehreren – meist vier – Kanal-Proteinen zusammen, was die Möglichkeit für dominant negative Effekte schafft, wodurch eine Reduktion des Stromes um mehr als 50 % bewirkt werden kann (Marban, 2002).

In Modellen für LQT1, LQT2 und LQT3 konnte gezeigt werden, dass vor allem die Aktionspotentialverlängerung in M-Zellen zu einem verlängerten QT-Intervall mit größerer transmuraler Heterogenität der Repolarisation führt, was zur Entstehung von Torsades de pointes Tachykardien führen kann (Shimizu und Antzelevitch, 2000). Dabei ist weniger die QT-Verlängerung an sich problematisch als vielmehr die gesteigerte transmurale Heterogenität der Repolarisation (Antzelevitch und Fish, 2001). Diese ist besonders ausgeprägt während adrenerger Stimulation mit Isoproterenol, was klinisch gut mit der großen Empfindlichkeit von Patienten mit angeborenen Long QT-Syndrom (insbesondere LQT1) gegenüber sympathischer Aktivierung korreliert (Ali et al., 2000).

Eine weitere – viel häufigere – Form ist das erworbene oder Medikamente-induzierte Long-QT Syndrom, bei dem sich Arrhythmien erst unter Einfluss von Medikamenten und ggf. weiteren prädisponierenden Faktoren wie z.B. Hypokaliämie manifestieren. Solche Medikamente sind zum einen Antiarrhythmika wie Sotalol oder Dofetilide, die über eine Blockade von

Kaliumkanälen wirken und auch proarrhythmische Effekte haben können. Es sind aber auch andere häufig verwendete Pharmaka wie Neuroleptika (z.B. Haloperidol) oder Antibiotika (z.B. Erythromycin) und viele weitere betroffen (www.torsades.org), die eine QT-Verlängerung und in der Folge ein erhöhtes Arrhythmierisiko als Nebenwirkung haben. Der Wirkmechanismus ist in den bisher bekannten Fällen eine Blockade von I_{Kr} in ventrikulären Kardiomyozyten (Crumb und Cavero, 1999; Keating und Sanguinetti, 1996; Roden et al., 1996). Für die große Empfindlichkeit von I_{Kr} bzw. KCNH2 gegenüber auch strukturell sehr vielfältigen Substanzen scheint dessen molekulare Struktur mit Bindungsstellen an der transmembranären S6 Domäne und der Poren-Helix verantwortlich zu sein. Diese Interaktionsstellen in der Porenregion sind spezifisch für KCNH2-Kanäle und in dieser Form nicht an anderen spannungsgesteuerten Kaliumkanälen zu finden (Mitcheson et al., 2000).
Auch mit einer atrialen Herzrhythmusstörung – dem familiären Vorhofflimmern – wurde kürzlich eine Mutation in dem KCNQ1-Gen (α-Untereinheit für I_{Ks}) in Verbindung gebracht, die aber im Gegensatz zu den bekannten Long QT-Mutationen zu einem „gain of function“ mit größerem I_{Ks} führen soll (Chen et al., 2003).

1.2.2 Regulation bei Herzinsuffizienz

Die chronische Herzinsuffizienz stellt eine der häufigsten Erkrankungen westlicher Länder dar. Weltweit waren im Jahre 1995 etwa 15 Millionen Menschen an Herzinsuffizienz erkrankt (Eriksson, 1995). Die Letalität der Herzinsuffizienz liegt je nach Schweregrad bei 9 – 12 % / Jahr (NYHA Stadium II und III unter ACE-Hemmer Therapie; SOLVD und V-HeFT-II Studie) bis zu 52 % (NYHA Stadium IV ohne ACE-Hemmer Therapie; CONSENSUS Studie) (Cohn et al., 1991; The CONSENSUS Trial Study Group, 1987; The SOLVD Investigators, 1991). Todesursache ist in vielen Fällen nicht das progrediente Pumpversagen, sondern der plötzliche Herztod, der meist durch tachykarde

Herzrhythmusstörungen wie ventrikuläre Tachykardien verursacht wird (Zipes und Wellens, 1998).

Fibrose und Narben können in Herzen mit ischämischer Kardiomyopathie das Substrat für Reentry-Arrhythmien bilden; daneben scheint die elektrische Instabilität insuffizienter Herzen bei der Genese von Herzrhythmusstörungen eine wichtige Rolle zu spielen. Neben gestörtem Kalzium-Handling begünstigen direkte Veränderungen der Ionenkanäle Rhythmusstörungen. Insbesondere für repolarisierende Kaliumkanäle konnte in einer Reihe von Untersuchungen an Tiermodellen wie auch an Myokardproben von Patienten gezeigt werden, dass die Expression von Ionenkanälen durch Herzinsuffizienz beeinflusst wird.

Für den transienten Auswärtsstrom I_{to} existieren übereinstimmende Daten, die eine Herunterregulation des Stromes bei Herzinsuffizienz nachweisen. Die Verringerung der Stromdichte von I_{to} konnte sowohl in Tiermodellen (z.B. Hunde mit Tachykardie-induzierter Herzinsuffizienz) (Kääb et al., 1996; Pak et al., 1997), wie auch Herzen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz gezeigt werden (Beuckelmann et al., 1993; Näbauer et al., 1993; Näbauer et al., 1996; Wettwer et al., 1994).

Für die delayed rectifier Kanäle existieren ebenfalls eine Reihe von Untersuchungen zur Regulation bei Herzinsuffizienz und Hypertrophie (Tabelle 2) mit Hinweisen auf eine Herunterregulation von I_{Kr} und I_{Ks}. Die Datenlage ist jedoch nicht eindeutig; insbesondere aus humanem Gewebe liegen keine schlüssigen Daten vor.

Generell führt die Herunterregulation von Kaliumkanälen zu einer verminderten Stabilität der Repolarisation: Während der Plateauphase des Aktionspotentiales herrschen relativ kleine Leitfähigkeiten, so dass kleine Änderungen der fließenden Ströme verhältnismäßig große Effekte haben. Das labile Plateau führt zu einer räumlichen und zeitlichen Heterogenität der Repolarisation und erhöhtem Risiko für plötzlichen Herztod, wie es bei Patienten mit Herzinsuffizienz beobachtet werden kann (Berger et al., 1997; Fu et al., 1997).

Die durch kleinere Kaliumströme verspätete Repolarisation kann sowohl zu abnormaler Impuls-Bildung (frühe Nachdepolarisationen und getriggerte

Aktivität) als auch –Weiterleitung (Reentry-Arrhythmien) führen und vermag so Arrhythmien auszulösen.
Ähnlich dem oben diskutierten Long QT-Syndrom kann die Herzinsuffizienz als eine erworbene Kanalerkrankung gesehen werden, bei der die reduzierte Stromdichte der Kaliumkanäle jedoch durch eine verminderte Expression des intakten Kanalproteins bedingt wird.

Spezies	Modell	I_{Kr}	I_{Ks}	Quelle
Mensch	Erworbene Herzinsuffizienz		↓	(Li et al., 1998)
Hund	Tachykardes Pacing	± 0	↓	(Li et al., 2000) (Li et al., 2002)
Hund	Hypertrophie (chron. AV-Block)	↓	↓ mRNA ↓ Protein ↓	(Volders et al., 1999) (Ramakers et al., 2000) (Thomas et al., 2001) (Ramakers et al., 2003)
Hund	Myokardinfarkt	↓ mRNA ↓	↓ mRNA ↓	(Jiang et al., 2000)
Hund	Tachykardes Pacing	↓ mRNA ± 0 Protein ± 0	↓ mRNA ± 0 Protein ± 0	(Rose et al., 1999)
Schwein	Tachykardes Pacing		↓	(Lacroix et al., 2002)
Kaninchen	Hypertrophie (renale Hypertonie)	± 0	↓	(Xu et al., 2001)
Kaninchen	Hypertrophie (chron. AV-Block)	↓		(Suto et al., 2001)
Kaninchen	Tachykardes Pacing	↓	↓	(Tsuji et al., 2000)
Kaninchen	Hypertrophie (Aorten-Banding)	± 0		(Gillis et al., 1998)
Katze	Hypertrophie (Pulmonalarterien-Banding)	↓		(Kleiman und Houser, 1989)
Katze	Hypertrophie (Aorten-Banding)	↓		(Furukawa et al., 1994)
Hamster	Angeborene Herzinsuffizienz	↓		(Lodge und Normandin, 1997)
Meer-schweinchen	Hypertrophie (Aorten-Banding)	± 0		(Ryder et al., 1993)
Meer-schweinchen	Hypertrophie (Aorten-Banding)	± 0	± 0	(Ahmmed et al., 2000)
Ratte	Hypertrophie (Aorten-Banding)	↓		(Volk et al., 2001)

Tabelle 2

Untersuchungen zu Regulation der Stromdichte von I_{Kr} und I_{Ks} bei Herzinsuffizienz in unterschiedlichen Tiermodellen. Generell wird eine Herunterregulation der delayed rectifier Kaliumkanäle bei Herzinsuffizienz beschrieben, die Datenlage ist jedoch nicht ganz einheitlich.

1.3 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Untersuchung der delayed rectifier Kaliumkanäle in humanem Myokard sowie im Myokard von Meerschweinchen, Schwein und Hund. Die genaue Kenntnis speziesspezifischer Eigenschaften der Repolarisation bzw. der Ionenkanäle, die die Repolarisation vermitteln ist für die Bewertung und Einordnung tierexperimentell gewonnener Daten unumgänglich. Ein besonderer Schwerpunkt wurde auf die Untersuchung der regionalen Heterogenität gelegt, die für den physiologischen Erregungsablauf essentiell ist. Untersucht wurden auch die Veränderungen der Ionenkanalexpression bei Herzinsuffizienz.

Dazu wurden elektrophysiologische und molekularbiologische Methoden angewandt: Funktionelle Daten wurden durch Aktionspotential- und Strommessungen mittels Patch Clamp Technik an isolierten Kardiomyozyten erhoben; die α-Untereinheiten der Kanalgene wurden in einem Zellsystem exprimiert und mit der Patch Clamp Technik untersucht; zusätzlich wurden die für α-und β-Untereinheiten der Kanalgene kodierende messenger-RNA mittels quantitativer PCR absolut bestimmt.

Im Einzelnen behandelt die Arbeit folgende Themenkomplexe:

- Nachweis von I_{Kr} und I_{Ks} in humanem Myokard unter Berücksichtigung der transmuralen Verteilung.
- Pharmakologische Beeinflussbarkeit von I_{Kr} und I_{Ks}.
- Messung von I_{Kr} und I_{Ks} in Meerschweinchen, Schwein und Hund unter Berücksichtigung der transmuralen Verteilung und Vergleich mit humanen Daten.
- Transiente Expression der für die α-Untereinheiten von I_{Kr} und I_{Ks} kodierenden Kanalgene im heterologen Zellsystem.
- Quantitative Bestimmung der mRNA der für I_{Kr} und I_{Ks} kodierenden Gene und Untereinheiten in humanem Herzmuskelgewebe.
- Regulation von I_{Kr} und I_{Ks} sowie mRNA in Herzen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz.

2 Methoden

2.1 Elektrophysiologie

2.1.1 Zellgewinnung

Zur Untersuchung mittels Patch-Clamp-Technik mussten einzelne, vitale und kalziumtolerante Kardiomyozyten mittels antegrader Enzymperfusion aus dem Gewebeverband isoliert werden.

2.1.1.1 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus humanem Gewebe

Für die elektrophysiologischen Experimente an humanen Kardiomyozyten wurden Gewebeproben von 4 Patienten gewonnen, die sich wegen terminaler Herzinsuffizienz bei dilatativer Kardiomyopathie einer orthotopen Herztransplantation unterziehen mussten. Alle Patienten erhielten eine medikamentöse Standardherzinsuffizienztherapie (Digitalis, β-Blocker, ACE-Hemmer, Spironolacton, Diuretika). Als Kontrollgruppe dienten 6 Herzen von Organspendern ohne bekannte kardiale Vorerkrankung die aufgrund nach der Explantation erkennbarer pathologischer Veränderungen nicht zur Transplantation verwendet werden konnten. Die Genehmigung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verwendung humanen Herzmuskelgewebes lag vor.

Nach Entnahme des insuffizienten Explantatherzens wurde ein ca. 4 x 5 cm großes Gewebestück aus der freien linksventrikulären Vorderwand präpariert. Die Gewebeprobe wurde in 4 °C kalter 0,9 %iger NaCl-Lösung ins Labor transportiert und sofort weiterverarbeitet. Ein aus der LAD abgehender Diagonalast wurde mit einem Kunststoffkatheter (Insyte-W; 22G x 32 mm; BD Medical Systems, Heidelberg) kanüliert und darüber das umgebende Gewebe

antegrad mit unten aufgeführten, auf 34° C erwärmten Lösungen perfundiert. Zunächst wurde für ca. 30 min mit kalziumfreier Tyrode noch im Gewebe vorhandenes Blut ausgewaschen. Die nächsten 25 – 35 min (abhängig von der Größe der Myokardprobe) wurde das Gewebe mit Enzymlösung perfundiert. Schließlich wurde das Enzym mit Hoch-Kalium Lösung über etwa 15 min ausgewaschen. Nach der Perfusion hatte das Gewebe noch seine ursprüngliche Form, so dass Zellen aus anatomisch identifizierten Schichten gewonnen werden konnten. Dazu wurden mit einer Mikroschere ca. 1 mm dicke Schichten von der subendokardialen und subepikardialen Seite abpräpariert, sowie Gewebe aus mittleren myokardialen Schichten entnommen. Somit entsprach die Schichtdicke weniger als 10 % der Ventrikeldicke. Das angedaute Gewebe wurde mit einer Schere weiter mechanisch zerkleinert, und durch ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von ca. 700µm in frische Hoch-Kalium Lösung filtriert. Nach 60 – 90 min wurde die Hoch-Kalium Lösung schrittweise durch Minimal Essential Medium mit 2 mM Kalzium ersetzt.

Kriterien für intakte Zellen (Abbildung 6) waren:

- klar erkennbare Quersteifung
- keine Abrundungen der Zellenden
- keine intrazellulären Bläschenbildung
- Fehlen von spontanen Kontraktionen.

Die Ausbeute an intakten kalziumtoleranten Zellen lag bei etwa 5 %. Nur Zellen die o.g. Kriterien erfüllten wurden für die Patch Clamp Untersuchungen ausgewählt.

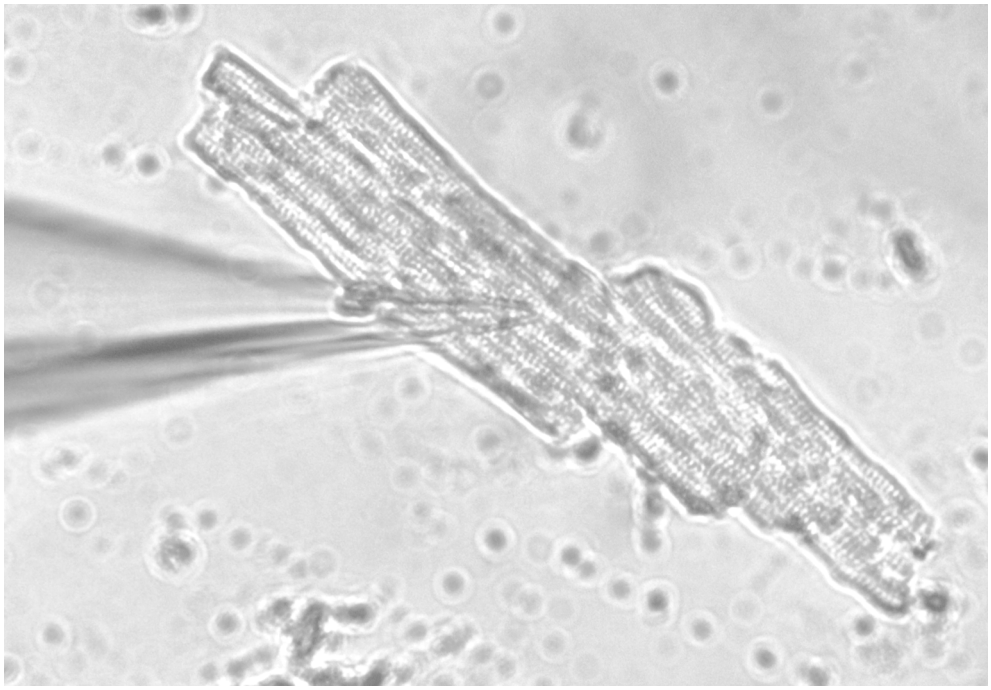


Abbildung 6

Isolierter humaner Kardiomyozyt mit Patch Clamp Pipette. Die eckige Form ohne Abrundungen sowie die Querstreifung als Zeichen einer erhaltenen Vitalität sind klar erkennbar.

2.1.1.2 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus Meerschweinchenherzen

Die Isolation von Herzmuskelzellen aus Meerschweinchenherzen wurde ebenfalls durch anterograde Perfusion der Koronargefäße mit Enzymlösungen durchgeführt. Wegen der geringen Größe der Herzen wurde jedoch die Aorta retrograd kanüliert, und darüber das gesamte Herz perfundiert.

Das Gewicht der 2 – 5 Monate alten, weiblichen Tiere betrug 250 – 500 g. Sie wurden zunächst durch die intraperitoneale Gabe von 400 mg Pentobarbital-Natrium (Merial GmbH, Hallbergmoos) anästhesiert. Zusätzlich wurden 2500 I.E. Heparin (B. Braun, Melsungen) intraperitoneal gegeben, um die Thrombosierung von Blut in den Koronargefäßen zu verhindern.

Der Thorax der narkotisierten Tiere wurde eröffnet und sofort mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gekühlt. Nach Entnahme des Herzens wurden die großen Gefäße präpariert und die Aorta mit einer Stahlkanüle

(Außendurchmesser 1 mm) kanüliert. Insbesondere wurde darauf geachtet, dass die Kanülenspitze vor der Aortenklappe zu liegen kommt und nicht bis in den linken Ventrikel vorgeschoben wird, um eine optimale Perfusion des Koronarsystems zu gewährleisten. Die Isolation wurde analog zur Isolation humaner Kardiomyozyten (s.o.) durchgeführt, jedoch die Perfusionszeiten der kleineren Größe des Herzens angepasst (d.h. ca. 20 min. Null-Kalzium-Tyrode; ca. 15 – 20 min. Enzymperfusion; ca. 10 min. Hoch-Kalium-Lösung). Nach der Isolation wurde die freie linksventrikuläre Wand abgetrennt und mit einer Mikroschere ca. 1 mm dicke endokardiale und epikardiale Schichten präpariert. Ebenso wurden Zellen aus mittleren myokardialen Arealen entnommen. Die weitere Behandlung der Zellen entsprach der humaner Zellen mit Ausnahme der Verwendung eines Nylonnetzes mit einer Maschenweite von ca. 300 µm.

2.1.1.3 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus Schweineherzen

Die Narkoseeinleitung der weiblichen Tiere (deutsches Landschwein) mit einem Gewicht von 15 – 20 kg erfolgte durch intramuskuläre Gabe von 300 mg Ketamin (Ketanest, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe) und 200 mg Azaperon (Stresnil, Janssen-Cilag GmbH, Neuss). Nach Legen eines venösen Zugangs und endotrachealer Intubation wurde die Narkose durch Gabe von 15 mg Piritramid i.v. (Dipidolor, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) sowie Beatmung mit einem Gemisch aus 2 % Enfluran (Ethrane, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) 40 % O_2 und 58 % N_2O (beide Linde AG, Höllriegelskreuth) aufrechterhalten.

Der Thorax konnte nun durch mediane Sternotomie eröffnet werden. Das Herz wurde sofort mit eiskalter 0,9 %iger Kochsalzlösung gekühlt. Nach Eröffnung des Perikards wurden die Vena cava superior und inferior dargestellt und abgeklemmt; die Aorta wurde mit einer großlumigen Kanüle punktiert. Darüber wurde 4° C kalte Bretschneider Kardioplegie-Lösung (Custodiol; Dr. Franz Köhler Chemie, Alsbach-Hähnlein) bis zum Herzstillstand retrograd infundiert.

Nach dem Durchtrennen von Vena cava superior und inferior, der Pulmonalvenen und –arterie, sowie der Aorta konnte das Herz entnommen werden.
Die Zellisolation erfolgte dann wie oben beschrieben analog zu der humaner Kardiomyozyten.

2.1.1.4 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten aus Hundeherzen

Zunächst wurde den 13 bis 17 kg schweren weiblichen Hunden (Beagle) ein peripherven öser Zugangs gelegt, über den die Narkose durch Gabe von 15 mg Midazolam und 400 mg Ketamin eingeleitet wurde. Nach endotrachealer Intubation wurde die Narkose durch Gabe von 15 mg Piritramid i.v. sowie Beatmung mit 2 % Enfluran, 40 % O_2 und 58 % N_2O aufrechterhalten
Die Präparation und Explantation des Herzens sowie die Zellisolation wurde analog zum oben beschriebenen Vorgehen durchgeführt.

2.1.2 Transiente Expression von KCNH2 und KCNQ1 in murinen Fibroblastenzellen (LTK$^-$-Zellen)

Die für die α-Untereinheiten von I_{Kr} bzw. I_{Ks} kodierenden Gene KCNH2 und KCNQ1 wurden in Fibroblastenzellen der Maus (LTK$^-$-Zellen) transient exprimiert.
Prof. Gordon Tomaselli (Johns-Hopkins-Universität, Balitmore, USA) stellte uns LTK$^-$-Zellen sowie KCNH2 und KCNQ1 cDNA im GFPire-Vektor (Clontech Laboratoires GmbH, Heidelberg) zur Verfügung.
Mittels des Transfektionsreagenz Metafectene (Biontex, München) wurde die Transfektion in Liposomen-Technik durchgeführt. Dazu wurden 10^4 Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser 3 cm, Becton-Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich) auf Kunststoff-Deckgläschen (Thermanox, Nalge Nunc, Rochester, USA) zunächst bei 5 % CO_2 und 27° C in Dubeccos Minimal Essential Medium kultiviert. Die Deckgläschen waren mit einer Schere in ca. 5 x 10 mm große

Stücke geschnittenen worden, um später den Transfer der adhärent wachsenden Zellen mit Deckgläschen aus der Zellkulturschale in die Patch Clamp Messkammer zu ermöglichen. Nach 24 Stunden wurde zunächst 2 µg DNA mit 8 µg Metafectene für 30 Minuten präinkubiert, bevor die Inkubation der Zellen für 5 Stunden mit dem DNA-Lipidkomplex erfolgte. Ein Mediumwechsel wurde alle 24 Stunden durchgeführt. Die Identifikation transfizierter Zellen erfolgte über den Nachweis der grünen Fluoreszenz durch das co-exprimierte GFP (Anregungswellenlänge: 488 nm, Fluoreszenz: 507 nm). Nach 48 Stunden war das Maximum der Expression mit ca. 1 – 2 % der transfizierten Zellen erreicht und die Zellen wurden für die Patch Clamp Experimente verwendet.

2.1.3 Patch Clamp Untersuchungen

Die Messungen wurden mittels Patch Clamp Technik in Ganzzellkonfiguration durchgeführt (Hamill et al., 1981; Neher und Sakmann, 1976). Als Verstärker wurde das Gerät Axopatch 200B der Firma Axon (Axon Instruments Inc., Union City, USA) verwendet.

Pipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Diameter innen 1,2 mm, Diameter außen 1,5 mm, Wanddicke 0,15 mm, Länge 80 mm, mit Filament, Firma Hilgenberg, Malsfelden, Deutschland) in zwei Schritten mit einem Schwerkraft-Vertikal-Puller (Firma Ochotzki Feinmechanik, Homburg) gezogen. Nach dem Befüllen mit interner Pipettenlösung (siehe Tabelle 4) wiesen sie einen Widerstand von 2,5 bis 5 MΩ auf. Die Pipetten wurden über den Pipettenhalter HL-U (Axon Instruments Inc., Union City, USA) mit dem Vorverstärker verbunden, der an einem kombinierten mechanisch-hydraulischen Mikromanipulator MHW-30 (Narishige Scientific Instrument Lab., Tokio, Japan) befestigt war.

Zur Durchführung der Experimente wurden ca. 500 µl der Zellsuspension in die auf 34° C geheizte Perfusionskammer (HW-104, Regelung durch Temperaturkontroller HW-30, Dagan Corporation, Minneapolis, USA) überführt. Zur visuellen Auswahl der Zellen und zur Positionierung der Pipette

wurde das inverse Mikroskop Axiovert 25 (Carl Zeiss GmbH, Göttingen) verwendet. Um transfizierte, GFP-markierte LTK⁻Zellen zu identifizieren, wurde ein Fluoreszenz-System bestehend aus Quecksilberdampflampe HBO 50 und Filtersatz 09 (Absorption: 450 – 490 nm, Farbteiler: 510 nm, Emission: 515 nm, Carl Zeiss GmbH, Göttingen) verwendet.

2.1.3.1 Messung der delayed rectifier Ströme

Strommessungen wurden im „Voltage Clamp“ Modus durchgeführt. I_{Kr} und I_{Ks} Ströme wurden mittels einem Standard-Pulsprotokoll (Abbildung 7) gemessen. Das Haltepotential betrug -80 mV; nach Anlegen eines Vorpulses von -40 mV über 3 Sekunden zur Vorab-Aktivierung des schnellen Natriumstromes wurde I_{Kr} bzw. I_{Ks} bei +40 mV über 5 Sekunden aktiviert. Die Stromgröße wurde durch Messung des maximalen „tail“-Stromes des bei -40 mV deaktivierenden I_{Kr} bzw. I_{Ks} bestimmt. Bezugspunkt war der (geringe) bei -40 mV fließende Strom ohne vorhergehende Aktivierung von I_{Kr} bzw. I_{Ks}. Um einen Einfluss des ausgeprägten „Run-down“-Phänomens von I_{Ks} (Abnahme der Stromdichte durch Dialyse des Zytoplasmas und Auswaschen von physiologischen Bestandteilen) auf die Messung der Stromdichte zu vermeiden, wurde die Größe der delayed rectifier Kaliumkanäle, also der Summe von I_{Kr} und I_{Ks} unmittelbar nach dem Aufbrechen der Zellmembran gemessen. Der Anteil von I_{Ks} an der gemessenen Summe aus I_{Kr} und I_{Ks} wurde durch selektive pharmakologische Blockade von I_{Ks} durch den spezifischen Kanalblocker Chromanol 293b (Bosch et al., 1998; Busch et al., 1996; Sun et al., 2001) bestimmt.

Zu Beginn der Messungen wurde jeweils die Zellkapazität als Maß für die Zellgröße ermittelt. Dazu wurden nach der Applikation hyperpolarisierender 5 mV Spannungspulse V zu -85 mV bis -110 mV die zur Rückkehr zum Haltepotential von -80 mV notwendige Ladungsverschiebung Q durch Integration des Stromes I bestimmt. Dabei gilt: Ladung $Q = \int I \, dt$ und: Membrankapazität $C = \Delta Q / \Delta V$.

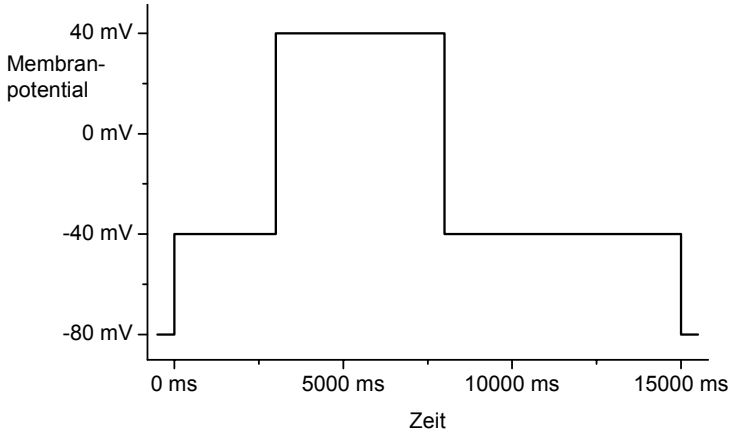


Abbildung 7

Pulsprotokoll zur Messung von I_{Kr} und I_{Ks}. Das Haltepotential zwischen den Test-Pulsen beträgt -80 mV. Zur Blockade von I_{Na} wird zunächst ein Vorpuls von -40 mV appliziert, gefolgt von einem Puls zu +40 mV zur Aktivierung von I_{Kr} bzw. I_{Ks}. Um die tail-Ströme der Deaktivierung von I_{Kr} und I_{Ks} beobachten zu können wird wieder auf ein Potential von -40 mV geschaltet.

2.1.3.2 Aufzeichnung von Aktionspotentialen

Die Aufzeichnung von Aktionspotentialen an Einzelzellen ist durch eine Vielzahl von Einflussvariablen wie Fluss- und Temperaturschwankungen, sowie Auswaschen von essentiellen Zellinhaltsstoffen (z.B. second messenger Botenstoffen) problematisch. Um Veränderungen des intrazellulären Milieus zu vermeiden wurde deshalb die Aufzeichnung von Aktionspotentialen unter Verwendung der perforated patch Technik (Rae et al., 1991) durchgeführt. Hierzu wurden 240 µg/ml des Porenbildners Amphotericin B der internen Pipettenlösung hinzugefügt, der die Zellmembran für einwertige Ionen selektiv permeabilisiert ohne das Zytoplasma zu dialysieren, was stabilere Registrierungen von Aktionspotentialen mit besserer Reproduzierbarkeit erlaubt. Bis zur Stabilisierung des Zuganges zur Zelle wurden etwa 20 – 30 min. abgewartet. Die Auslösung der Aktionspotentiale erfolgte durch Abgabe eines Strompulses der 50 % über der zur Aktivierung eines Aktionspotentiales notwendigen Stromstärke lag. Wenn nicht anders angegeben, betrug die Pulsfrequenz 1 Hz. In die Auswertung wurden nur Aktionspotentiale einbezogen, die einen stabilen Zustand der Zelle mit Ruhemembranpotential von

< - 70 mV und eine geringe Puls-zu-Puls Variabilität der APD zeigten. Dazu wurden die ersten 40 Pulse (entsprechend 40 Sekunden) verworfen, sowie auf stabile Fluss- und Temperaturbedingungen geachtet.

2.2 Molekularbiologie

2.2.1 mRNA – Isolation aus humanem Gewebe und cDNA-Synthese

Ein Teil des bei Herztransplantationen gewonnenen terminal insuffizienten Myokardgewebes und des nicht zur Transplantation verwendbaren nicht-insuffizienten Spendergewebes wurde unmittelbar nach Explantation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Durchführung der molekularbiologischen Experimente bei -80° C aufbewahrt. Zur Isolation von Gesamt-mRNA wurden mit einem Skalpell 1 – 2 mm dicke Schichten von epikardial und endokardial, sowie aus einer mittleren Schicht präpariert (pro Schicht jeweils 300 – 400 mg Myokard). Aus den Gewebeproben wurde unter Verwendung des TRIZOL-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) die mRNA-Isolation gemäß dem Standardprotokoll des Herstellers durchgeführt.

Die Ausbeute und Integrität der RNA wurde mittels visueller Analyse auf einem Argarosegel sowie durch Messung der optischen Dichte bei 260/280 nm kontrolliert; sie betrug in der Regel 20 – 25 µg Gesamt-RNA pro 100 mg Gewebe.

Mittels des DNA-free Kits (Ambion, Austin, USA) wurde ein DNase-Verdau der isolierten RNA durchgeführt, die Effizienz des Verdaus wurde mittels visueller Analyse auf einem Argarosegel überprüft.

Für die reverse Transkription in cDNA wurden ca. 500 ng Gesamt-RNA in ein Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt. Nach Präinkubation bei 70° C für 10 min mit "random hexamer"-Primern wurden 1 µl RNase-Inhibitor 1,5 U/µl (Promega), 1 µl dNTP-Mix (10 mM pro Desoxynukleotid), 2 µl 0,1 M

Dithiothreitol (DTT), 4 µl 5x Reaktionspuffer (Invitrogen, Karlsruhe) und 1 µl Superscript II RNase H$^-$-Reverse Transkriptase hinzugefügt und bei 42° C für 1 Stunde inkubiert. Danach wurde das Enzym bei 70° C (15 min) inaktiviert.

2.2.2 Quantifizierung der mRNA mittels „real-time“ PCR

2.2.2.1 Prinzip der „real-time“ PCR

Zur Quantifizierung der für die α- und β-Untereinheiten der delayed rectifier Kaliumkanäle kodierenden mRNA wurde die quantitative „real-time“ PCR angewandt. Dabei wird zusätzlich zu den bei jeder PCR eingesetzten, „forward“ und „reverse“ Primern eine fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid-Sonde verwendet, die spezifisch an der Gensequenz zwischen den beiden Primern bindet. Das 3´-Ende der Sonde ist mit einem „Quencher“-Farbstoff markiert, das 5´-Ende mit einem „Reporter“-Farbstoff und mit einem Phosphatrest blockiert, so dass es von der Taq-Polymerase nicht verlängert werden kann (Lee et al., 1993). Bei Anregung der intakten Sonde mit einer Wellenlänge von 488 nm wird die Emission des Reporter-Farbstoffes aufgrund seiner räumlichen Nähe zum Quencher-Farbstoff durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) unterdrückt. Hat die Sonde mit den Primern am DNA-Strang hybridisiert, wird sie bei der Verlängerung der Primer durch die Taq-Polymerase durch deren Exonuklease-Aktivität hydrolysiert. Dadurch entfernen sich Reporter und Quencher räumlich voneinander, so dass ein FRET nicht mehr stattfinden kann und ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Da Sonden, die nicht gebunden haben, nicht hydrolysiert werden und dadurch kein Fluoreszenzsignal abgeben, ist die gemessene Fluoreszenz direkt proportional der Menge des PCR-Produktes, die während der PCR von Zyklus zu Zyklus exponentiell zunimmt. Dessen Menge ist wiederum abhängig von der ursprünglich eingesetzten DNA-Menge. Mit dieser Methode können auch geringe Kopienzahlen noch hochspezifisch nachgewiesen werden.

Das Fluoreszenzsignal wird nach jedem Zyklus im Reaktionsgefäß gemessen und als Amplifikations-Plot graphisch dargestellt. Der Wert, bei dem das spezifische Fluoreszenzsignal aus der Hintergrundfluoreszenz hervortritt, wird als Schwellen-Zyklus (C_t-Wert) bestimmt. Dieser Wert ist ein direktes Maß für die Menge des PCR-Produktes, und somit für die Menge der ursprünglich eingesetzten mRNA. Je niedriger der C_t-Wert ist, desto höher ist die Konzentration der mRNA. Zur absoluten Quantifizierung, d.h. der Angabe der Kopienanzahl der jeweiligen Ionenkanal-mRNA pro eingesetzter Gesamt RNA ist die Erstellung einer Standardkurve notwendig. Dazu wurden Zielsequenz-spezifische cDNA-Standards in bekannten Konzentrationen eingesetzt.
Aufgrund von Schwankungen der Effizienz der reversen Transkription ist die Normalisierung der Messergebnisse mit einer endogenen Kontrolle notwendig. In unseren Messungen wurde das housekeeping Gen β-Glucuronidase zur Normalisierung verwendet, das sich nach Voruntersuchungen als geeignet erwies.

2.2.2.2 Durchführung der Messungen

Die Messungen wurden in Dreifachbestimmung mit Hilfe des quantitativen PCR Systems Mx4000® (Firma Stratagene, La Jolla, USA). Unmittelbar vor Beginn des Experimentes wurde der Mastermix vorbereitet. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen 50 µl durchgeführt, das sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzte: 5 µl core PCR Puffer, 5 mM MgCl, 800 µM dNTP, 0,75 µl Referenz-Farbstoff, 0,5 µl SureStart™ Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (alle aus „Brilliant™ Quantitative PCR Core Reagent Kit“, Firma Stratagene), jeweils 500 nM Vorwärts- und Rückwärts-Primer und 200 nM der Sonde, sowie Nuklease-freies PCR Wasser. Zuletzt wurden 10 µl der zu messenden cDNA (1:5 verdünnt) eingesetzt und nach kurzem Zentrifugieren das Experiment gestartet. Mit der „hot start“-Aktivierung der Taq-Polymerase für 10 min bei 95°C wurde begonnen, darauf folgten 40 Zyklen mit 15 s bei 95°C und 60 s bei 60°C. Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz bestimmt.

Zur Erstellung einer Standardkurve zur absoluten Quantifizierung wurden Plasmide des jeweiligen Gens in serieller Verdünnung im Bereich zu erwartender Konzentrationen eingesetzt. Die Konzentrationen und Kopienzahl der Plasmide waren vorher photometrisch durch Bestimmung der optischen Dichte bei 260/280 nm bestimmt worden.

2.3 Materialien

Sämtliche Chemikalien wurden – soweit nicht anders aufgeführt – bei der Firma Sigma Chemie (Deisenhofen) bezogen. Die bei der Zellisolation verwendete Kollagenase Typ II stammte von Worthigton und wurde über Cell Systems (Berlin) bezogen. Die Kaliumkanalblocker Chromanol 293B und HMR 1556 wurden uns von Aventis Pharma (Frankfurt am Main), Dofetilide von der Firma Pfizer (Karlsruhe) zur Verfügung gestellt. Minimal Essential Medium und Dubeccos Minimal Essential Medium wurde bei der Firma Biochrom KG (Berlin) erworben.

Die für die molekularbiologischen Untersuchungen Restriktionsenzyme und DNA-Längenmarker wurden bei der Firma MBI-Fermentas (St. Leon-Roth) bezogen.

Primer und Sonden für die quantitative real time PCR wurden mit Hilfe der Software Primer Express (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) entworfen (Tabelle 3) und mit Hilfe der NCBI Datenbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) auf ihre Spezifität überprüft. Die Primer wurden von der Firma Thermo Hybaid (Ulm) hergestellt, die Sonden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien). Sie wurden entsalzt und lyophilisiert geliefert und vor der Verwendung in TE-Puffer gelöst (Konzentration 20 µg/ml).

Gen	Primer	Sequenz
KCNH2	Vorwärts	5‘ - CAC ACG ACG CCT CTC CCT ACC G - 3‘
	Sonde	5‘ - CGG CAT CGA CAT GAA CGC GG - 3‘
	Rückwärts	5‘ - GTT GCA GTA GAT GAC GGC GCA G - 3‘
KCNQ1	Vorwärts	5‘-CGC ATG GAG GTG CTA TGC T-3‘
	Sonde	5‘ - CGA GAA CCC CGA CTC CTC CAC CTG - 3‘
	Rückwärts	5‘-GGC CTT CCG GAT GTA GAT CTT-3‘
KCNE1	Vorwärts	5‘ - GGT ACT GGG ATT CTT CGG CTT - 3‘
	Sonde	5‘ - TCA CCC TGG GCA TCA TGC TGA GC - 3‘
	Rückwärts	5‘ - CAG CTT CTT GGA GCG GAT GT - 3‘
KCNE2	Vorwärts	5‘ - GCC ACC ATC CAT GAG AAC ATT - 3‘
	Sonde	5‘ - TGC GGC TGG GTT CAA AAT GTC CC - 3‘
	Rückwärts	5‘ - TGG TGC CTT TCT CCC TTA TCA - 3‘
β-Glucuronidase	Vorwärts	5‘ - TTC CCT CCA GCT TCA ATG ACA - 3‘
	Sonde	5‘ - CAG GAC TGG CGT CTG CGG CAT - 3‘
	Rückwärts	5‘ - TAC CAC ACC CAG CCG ACA A - 3‘

Tabelle 3

Sequenzen der für die quantitative real time PCR verwendeten Primer und Sonden (mit Fluoreszenzfarbstoff FAM markiert).

2.3.1 Elektrophysiologie

Die Zusammensetzung der für die Zellisolation und für elektrophysiologischen Untersuchungen verwendeten Lösungen ist der Tabelle 4 zu entnehmen. Die Enzymlösung zur Zellisolation wurde durch Zugabe von 0,5 mg/ml Kollagenase Typ II und 0,02 mg/ml Protease zur Null-Kalzium-Tyrode hergestellt. Zur Messung der delayed rectifier Ströme wurde der L-Typ Kalzium-Kanal mit 10 µM Nifedipin (Stammlösung 3 mM in Polyethylenglycol 400), die der extrazellulären Perfusionslösung zugefügt wurden, blockiert. Nifedipin

beeinflusst – im Gegensatz zu dem alternativen Kalzium-Kanalblocker Cadmium, die delayed rectifier Kalium-Kanäle nicht in relevantem Maße (Daleau et al., 1997). Chromanol 293b (5 mM) und HMR 1556 (10 µM) wurden in Polyethylenglycol 400, Dofetilide (1 mM) und Isoproterenol (1 mM) in Aqua bidest. gelöst und der extrazellulären Perfusionslösung beigefügt.
Für Experimente in perforated patch Technik wurde der internen Pipettenlösung 240 µg/ml Amphotericin B (Stammlösung 30 mg/ml in DMSO) hinzugefügt.

[mM]	Ca^{2+}-freie Tyrode	Hoch-K^+-Lösung	Extrazelluläre Perfusionslösung	Interne Pipettenlösung
NaCl	138		138	
KCl	4	88	4	10
K-Aspartat				120
$MgCl_2$	1		1	5,5
$CaCl_2$			2	
$MgSO_2$		5		
NaH_2PO_4	0,33		0,33	
K_2HPO_4		20		
Na_2-ATP		2		
K_2-ATP				5
EGTA		0,5		5
HEPES	10	5	10	10
Glucose	10	10	10	
Taurin		20		
Creatin		5		
Pyruvat		5		
pH	7,3 mit NaOH	7,2 mit KOH	7,3 mit NaOH	7,2 mit KOH

Tabelle 4

Für die Zellisolation und elektrophysiologischen Untersuchungen verwendete Lösungen.

2.3.2 Molekularbiologie

Die für die molekularbiologischen Methoden verwendeten Lösungen wurden gemäß Tabelle 5 zubereitet und nach der Herstellung autoklaviert. LB-Agar wurde durch Zugabe von 15 g/l Bacto-Agar zum LB-Medium hergestellt.

	TE-Puffer	TAE-Puffer	LB-Medium
	10 mM Tris/HCl	40 mM Tris	10 g/l NaCl
	1 mM EDTA	1 mM EDTA	10 g/l Caseinhydrolysat
		10 mM Essigsäure	5 g/l Hefeextrakt
pH	8,0	7,5	7,4

Tabelle 5
Lösungen die für molekularbiologischen Untersuchungen verwendet wurden.

2.4 Auswertung und statistische Analyse

Die mit Hilfe der Patch Clamp Software Clampex Version 8.2 (Axon Instruments Inc., Union City, USA) gewonnenen Rohdaten wurden auf einem Personal Computer aufgezeichnet und zur späteren Analyse gespeichert. Diese wurden mit der Software Clampfit Version 8.2 (Axon Instruments Inc., Union City, USA) sowie Origin Professional Version 7.0 (OriginLab Cooperation, Northampton, USA) ausgewertet und graphisch aufbereitet.
Molekularbiologische Daten wurden mit der Software Mx4000 Version 3.0 (Stratagene, Amsterdam; Niederlande) erfasst und ausgewertet.
Zur Messung der Stromdichten der I_{Kr} und I_{Ks} Ströme wurden „tail"-Ströme als besser messbarer und verlässlicherer Parameter verwendet. Nach einer Aktivierung von I_{Kr} bzw. I_{Ks} über 5 sec. bei +40 mV wurde die Größe des tail-Stromes, also die langsame Deaktivierung bei -40 mV, als Maß für die Größe des I_{Kr} bzw. I_{Ks} Stromes bestimmt. Dazu wurde die Differenz zwischen dem maximalen tail-Strom und dem „Baseline"-Strom gemessen.

Um Effekte durch unterschiedliche Zellgrößen zu eliminieren, was insbesondere bei der Größenzunahme während Hypertrophie von Bedeutung ist, wurde auf die Zellkapazität als Maß für die Zellgröße normiert. Die so berechneten Stromdichten sind als Verhältnis von Strom zu Zellkapazität (in pA/pF) angegeben.

Die Angabe der Expressionsraten erfolgt als Anzahl der mRNA Kopien pro µg Gesamt-RNA.

Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Zellzahl und Zahl der untersuchten Herzen sind bei den Ergebnissen als n = x / y angegeben, wobei x für die Anzahl der untersuchten Zellen und y für die Zahl der untersuchen Herzen steht.

Zur statistischen Analyse wurde der zweiseitige, unabhängige Student t-Test verwendet. Zwei Datengruppen wurden dann als statistisch signifikant angesehen, wenn ein Wert für p kleiner als 0,05 errechnet worden war.

3 Ergebnisse

3.1 Elektrophysiologische Eigenschaften von delayed rectifier Kaliumkanälen

1990 wurde im Meerschweinchen – dem klassischen Tiermodell zur Untersuchung von delayed rectifier Kaliumkanälen – erstmals beschrieben, dass sich der delayed rectifier Kaliumauswärtsstrom aus zwei Komponenten zusammensetzt (Sanguinetti und Jurkiewicz, 1991; Sanguinetti und Jurkiewicz, 1990). Die beiden Komponenten des repolarisierenden delayed rectifier Kaliumauswärtsstromes unterscheiden sich im Hinblick auf elektrophysiologische Parameter wie Kinetik und in pharmakologischer Beeinflussbarkeit. Man unterscheidet anhand der Aktivierungskinetik einen schnell aktivierenden delayed rectifier Strom (I_{Kr}, rapid, schnelle Aktivierungskinetik) und einen langsam aktivierenden delayed rectifier Strom (I_{Ks}, slow, langsame Aktivierungskinetik). Des weiteren unterscheiden sich die beide Kanäle in der Kinetik des tail-Stroms: der tail-Strom von I_{Kr} weist einen langsameren Abfall auf als der von I_{Ks} (Chinn, 1993). Durch spezifische pharmakologische Blockade von I_{Kr} (mit Dofetilide; siehe 3.1.3.1) oder von I_{Ks} (mit Chromanol 293b oder mit HMR 1556; siehe 3.1.4.1) lassen sich die beiden delayed rectifier Kanäle trennen (Abbildung 8).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind die elektrophysiologischen Charakteristika von I_{Kr} und I_{Ks} sowie die transmurale Verteilung der Stromdichte und speziesspezifische Unterschiede in der Ausstattung mit delayed rectifier Kaliumkanälen.

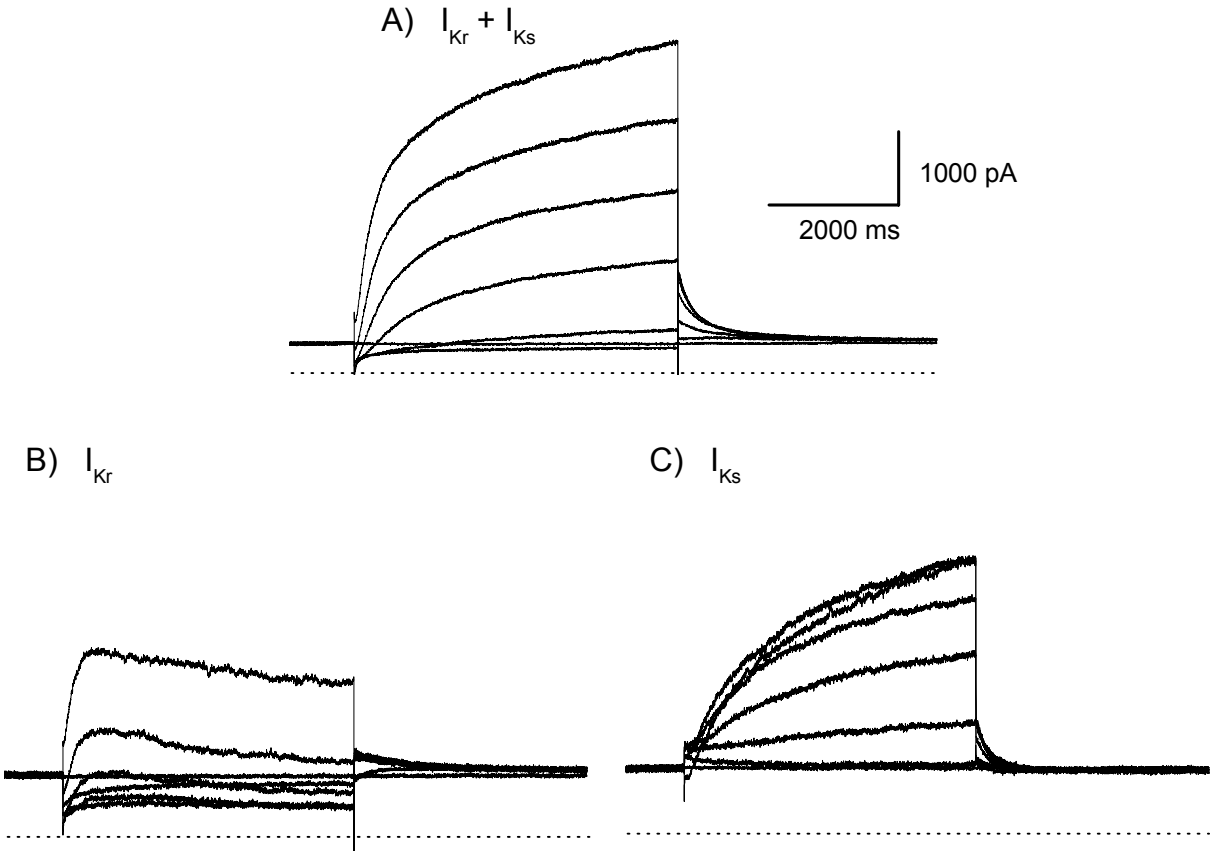


Abbildung 8

Aufzeichnung des delayed rectifier Kaliumstromes einer repräsentativen Zelle die aus dem linken Ventrikel eines Meerschweinchenherzens isoliert wurde. Nach dem Vorpuls zu -40 mV wurden I_{Kr} und I_{Ks} durch Pulse über 5 sec. zu -40 mV bis +80 mV (in 20 mV Schritten) aktiviert. Tail-Ströme wurden bei -40 mV registriert.

A) Dargestellt sind die Stromkurven des gesamten delayed rectifier Stromes, also die Summe bzw. Überlagerung von I_{Kr} und I_{Ks} ohne spezifische Blockade von I_{Kr} oder I_{Ks}. Sowohl die Aktivierung des Stromes, als auch die Deaktivierung des tail-Stroms weisen eine biexponentielle Kinetik auf, setzen sich also aus einer schnelle und einer langsamen Zeitkomponente zusammen.

B) Nach spezifischer Blockade von I_{Ks} durch 250 nM HMR 1556 ist nur noch I_{Kr} nachweisbar. Die jetzt monoexponentielle Aktivierung des Stromes weist einen schnellen Zeitverlauf auf; nach weniger als 500 ms ist I_{Kr} vollständig aktiviert. Der ebenfalls monoexponentielle Zeitverlauf der Deaktivierung des tail-Stroms ist langsam.

C) Abgebildet ist der Differenzstrom aus Gesamt-Strom (A) minus I_{Kr} (B), also der durch 250 nM blockierte Anteil des delayed rectifier Stromes entsprechend I_{Ks}. Deutlich erkennbar ist die langsame Aktivierung des I_{Ks}-Stromes über 5 s. Der Zeitverlauf der Deaktivierung des tail-Stromes von I_{Ks} ist schneller als der von I_{Kr}.

3.1.1 Nachweis von I_{Kr} in humanem Myokard

Die Messung von I_{Kr} im humanen Myokard erfolgte unter für die Untersuchung von delayed rectifier Kaliumkanälen optimierten Bedingungen bei 34° C im „whole cell“ Modus mit weitestgehender Blockade des L-Typ Kalziumstromes durch Zugabe von 10 µM Nifedipin zur externen Perfusionslösung. Intrazelluläre Kalziumtransienten wurden durch Verwendung einer natriumfreien, EGTA-haltigen internen Pipettenlösung eliminiert. Bei Vorexperimenten an Meerschweinchenkardiomyozyten (Abbildung 8) konnten in allen untersuchten Zellen I_{Kr} und I_{Ks} problemlos nachgewiesen werden.
Im humanen Myokard war in allen untersuchten humanen Zellen (n = 114 / 15) ein schnell aktivierender I_{Kr}-Strom nachweisbar (Abbildung 9 A und B). Dieser konnte durch 1 µM Dofetilide (siehe 3.1.3.1) vollständig blockiert werden.
Im Gegensatz zu den Meerschweinchenkardiomyozyten fand sich unter den Standardmessbedingungen in keiner der humanen Zellen ein I_{Ks}-Strom (langsame Aktivierungskinetik und Sensitivität gegenüber HMR 1556 (siehe 3.1.4.1) bzw. Resistenz gegenüber Dofetilide (Abbildung 9 C)) mit einer Stromgröße über der Nachweisgrenze bzw. dem Rauschen ($\geq$ 20 – 25 pA).

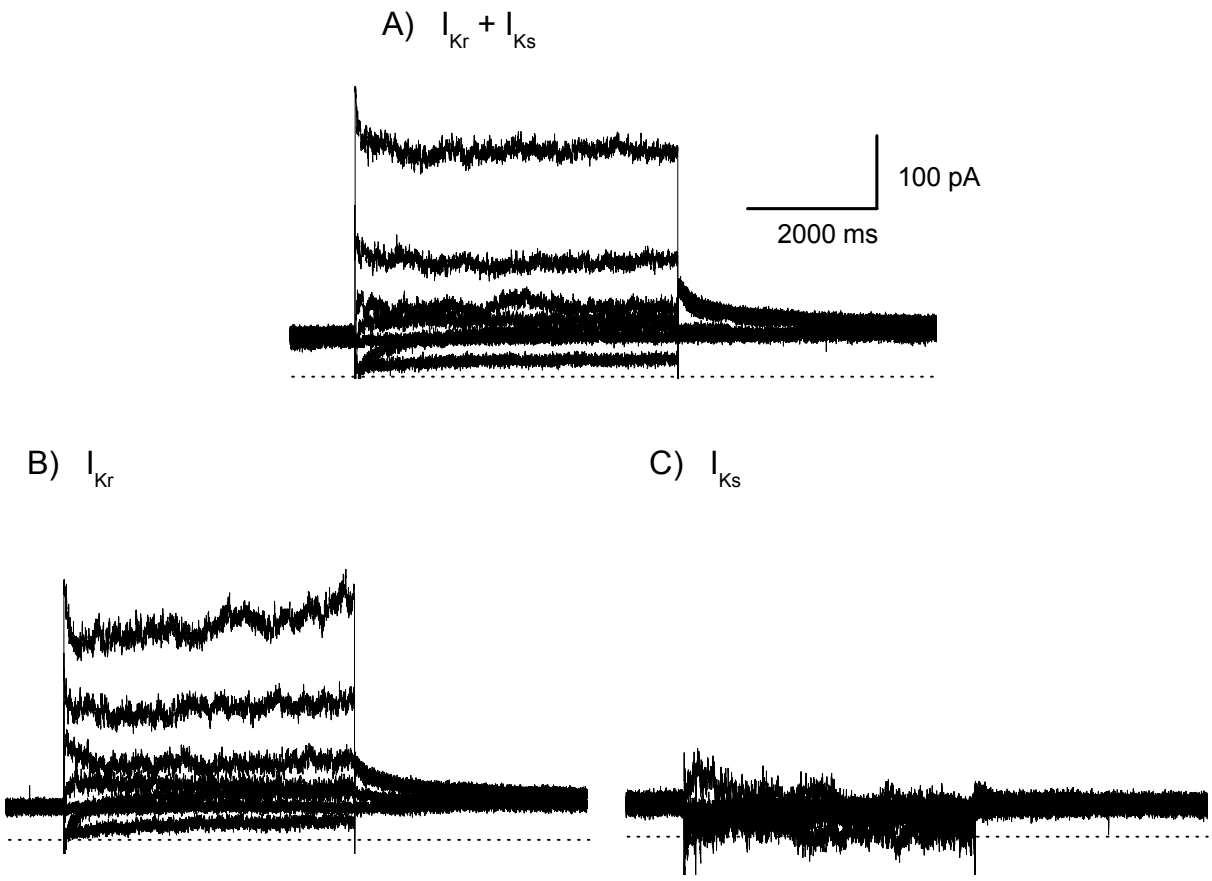


Abbildung 9

Aufzeichnung des delayed rectifier Kaliumstromes einer repräsentativen *humanen* Zelle aus einem nicht-insuffizienten Spenderherzen. Experiment und Grafik sind analog zu Abbildung 8 durchgeführt worden. Nach dem Vorpuls zu -40 mV wurden I_{Kr} und I_{Ks} durch Pulse über 5 sec. zu -40 mV bis +80 mV (in 20 mV Schritten) aktiviert. Tail-Ströme wurden bei -40 mV registriert. Man beachte den ca. 10-fach kleineren Maßstab.
A) Dargestellt sind wieder die Stromkurven des gesamten delayed rectifier Stromes, also die Summe bzw. Überlagerung von I_{Kr} und I_{Ks} ohne spezifische Blockade von I_{Kr} oder I_{Ks}. Eine biexponentielle Kinetik der Aktivierung des Stromes oder der Deaktivierung des tail-Stromes ist nicht erkennbar.
B) Nach spezifischer Blockade von I_{Ks} durch 250 nM HMR 1556 ist nur noch I_{Kr} nachweisbar. Der jetzt sichtbare Strom unterscheidet sich nicht signifikant von Abbildung A.
C) Abgebildet ist der Differenzstrom aus Gesamt-Strom (A) minus I_{Kr} (B), also der durch 250 nM HMR 1556 blockierte Anteil des delayed rectifier Stromes, der I_{Ks} entsprechen würde. Ein langsam aktivierender Strom ist nicht nachweisbar. Allenfalls ein winziger tail-Strom ist erkennbar, der sich aber kaum vom Hintergrundrauschen abhebt.

3.1.2 Aktivierung von I_{Kr}

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von I_{Kr} wurde in nicht-insuffizientem humanem Myokard untersucht. I_{Kr} wurde bei variablen Potentialen im Bereich von -40 mV bis +60 mV aktiviert und die Größe des tail-Stromes gemessen (Abbildung 10). Das Potential für die halbmaximale Aktivierung lag bei 18,4±2,09 mV (Abbildung 11).

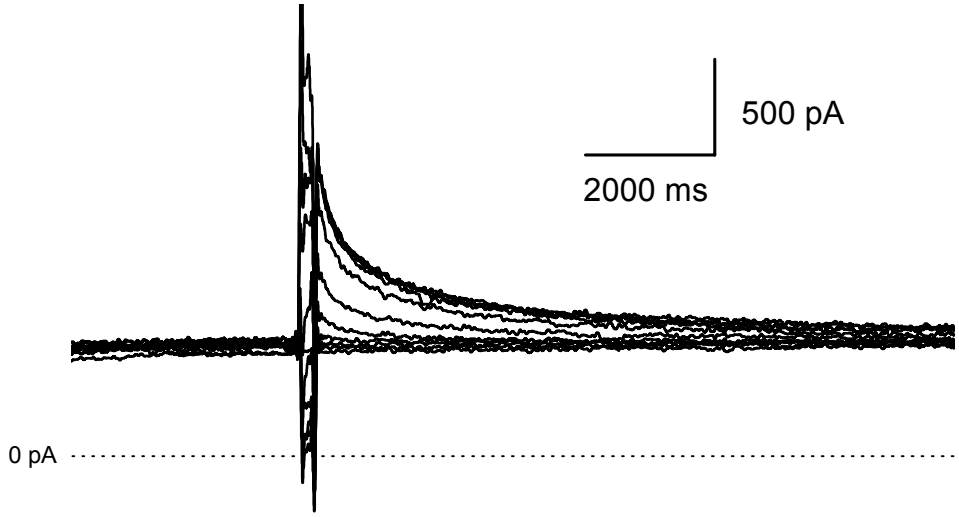


Abbildung 10

Strom-Spannungsbeziehung einer repräsentativen epikardialen humanen Zelle eines nicht-insuffizienten Herzens. Nach einem Vorpuls zu -40 mV wird I_{Kr} aktiviert. Die Spannung wird dabei von -40 mV bis +60 mV in 10 mV Schritten gesteigert. Danach wird der tail-Strom bei einem Haltepotential von +40 mV registriert und die tail-Größe als Maß für I_{Kr} bestimmt.

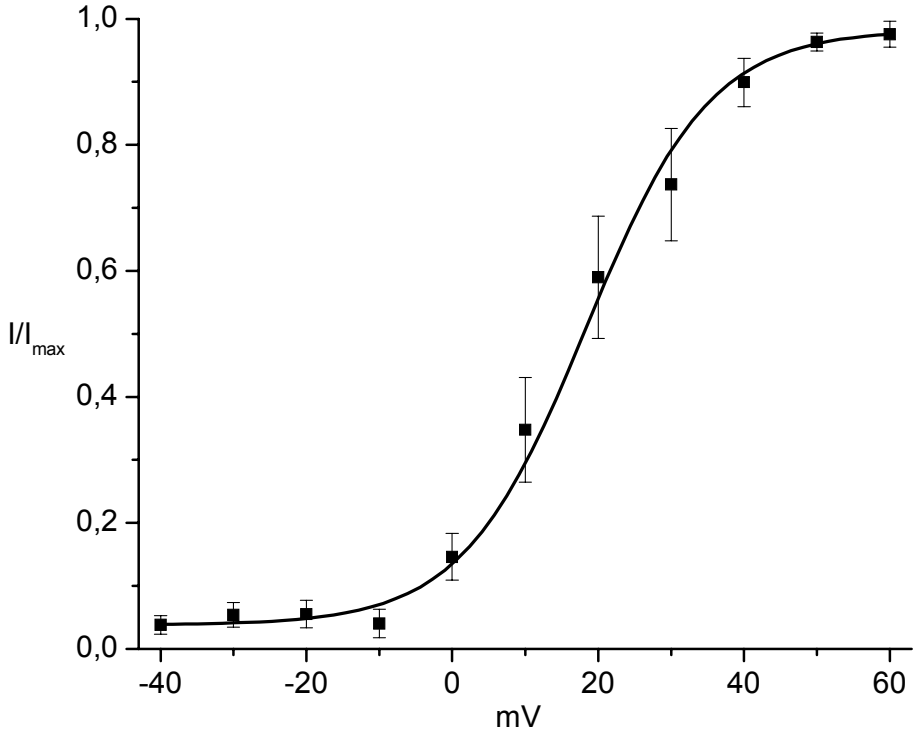


Abbildung 11

Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von I_{Kr}. Die Kurve zeigt die Größe des verfügbaren I_{Kr} tail-Stromes in Relation zum Aktivierungspotential. Das Potential der halbmaximalen Aktivierung lag bei 18,4±2,09 mV (n = 11 / 3).

3.1.3 Pharmakologische Modulation von I_{Kr}

3.1.3.1 Dofetilide

Das Klasse III Antiarrhythmikum Dofetilide (in USA zur Behandlung des Vorhofflimmerns zugelassen) ist ein spezifischer Blocker von I_{Kr} (Rasmussen et al., 1992). In humanem Myokard waren 1 µM Dofetilide ausreichend, um eine komplette Blockade von I_{Kr} zu bewirken. Nach Applikation von Dofetilide war kein delayed rectifier Strom mehr zu registrieren (Abbildung 12), insbesondere war auch kein I_{Ks} mehr nachweisbar.

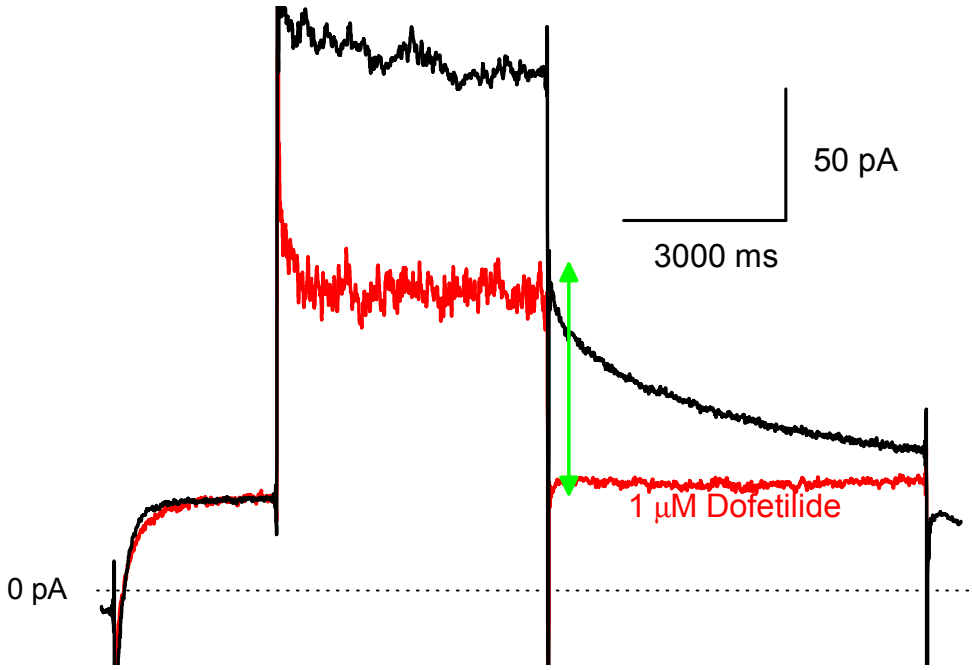


Abbildung 12

Repräsentative Aufzeichnung des I_{Kr}-Stromes und die Wirkung des spezifischen I_{Kr}-Blockers Dofetilide auf I_{Kr} in einer humanen Zelle aus einer zentralen myokardialen Schicht. Nach Aktivierung von I_{Kr} über 5 Sekunden bei +40 mV wird das Haltepotential auf -40 mV abgesenkt (Pulsprotokoll siehe Abbildung 7). Die Deaktivierung von I_{Kr} ist als tail-Strom aufzuzeichnen (Pfeil). Nach Einwaschen von 1 µM Dofetilide ist I_{Kr} vollständig blockiert.

Die Gabe von Dofetilide in current clamp Experimenten zur Aktionspotentialmessung bewirkt eine massive Verlängerung der Aktionspotentialdauer (Abbildung 13 oben). Wird das Aktionspotential einer Zelle als Pulsprotokoll verwendet (action potential clamp), lässt sich bei konstanten Bedingungen kein Stromfluss nachweisen. Nach pharmakologischer Modifikation von Aktionspotentialkonfiguration und –dauer mittels spezifischer Blockade eines Stromes lässt sich dieser registrieren, da Abweichungen des Spannungsverlaufes vom Verstärker gegengesteuert wird. Ein solches Experiment ist in Abbildung 13 dargestellt. Es wird deutlich, dass der größte I_{Kr}-Strom im humanen Aktionspotential während der späten Repolarisation zu registrieren ist. Durch die Eigenschaft als Einwärtsgleichrichter-Strom (inward rectifier) ist I_{Kr} in der Lage, das Aktionspotential auf Höhe des Kaliumgleichgewichtspotentials (ca. -80 mV, in etwa entsprechend dem Ruhemembranpotential) zu repolarisieren und dort zu stabilisieren.

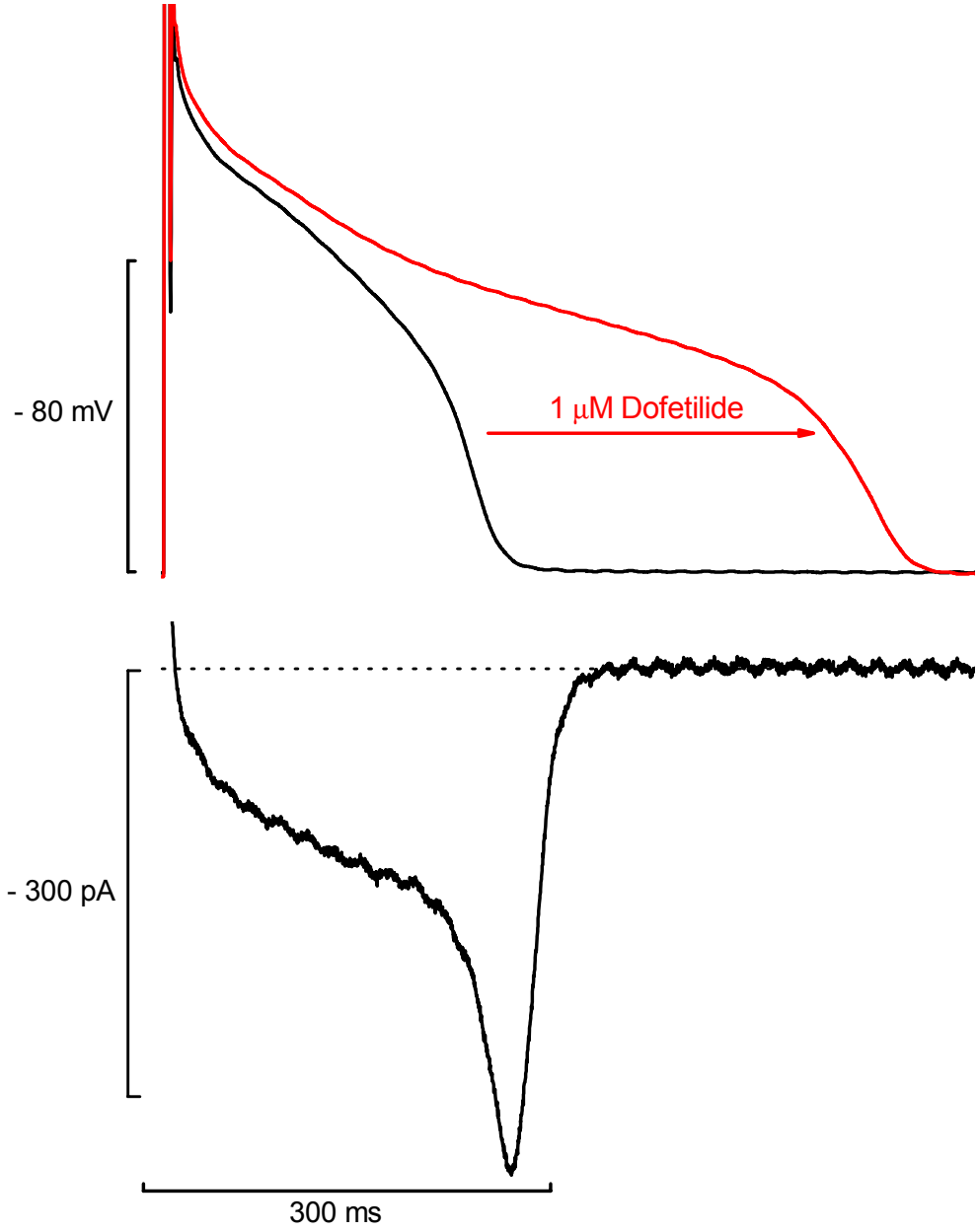


Abbildung 13

Effekt von 1 µM Dofetilide auf das Aktionspotential (oben) einer epikardialen humanen Zelle und der entsprechende, durch Dofetilide geblockte Strom (unten). I_{Kr} wird nach Aufzeichnen des Aktionspotentiales bei 1 Hz mit 1 µM Dofetilide blockiert, was zur Aktionspotential-Verlängerung führt. Wird der Zelle nun als Stromprotokoll ihr eigenes Aktionspotential (vor der Applikation von Dofetilide) vorgegeben („action potential clamp“), lässt sich unten dargestellter Strom ableiten. Da der vom Verstärker zur Substitution des pharmakologisch blockierten I_{Kr} abgegebene Strom aufgezeichnet wird, ist der Stromkurvenverlauf – im Gegensatz zu den sonst dargestellten I_{Kr}-Messungen – nach unten gerichtet. Auffällig ist die relativ geringe Stromgröße von I_{Kr} während des Plateaus des Aktionspotentiales und die starke Zunahme des Stromes gegen Ende des Aktionspotentiales (inward rectification).

3.1.3.2 Haloperidol

Eine potentiell lebensbedrohliche Nebenwirkung des starken Neuroleptikums Haloperidol (Haldol®) ist die Verlängerung der QT-Zeit, die torsades de pointes Tachykardien zur Folge haben kann (Abbildung 5). Als Wirkungsmechanismus wird die Blockade von KCNH2 (α-Untereinheit von I_{Kr}) Kanälen beschrieben (Suessbrich et al., 1997). In humanen Kardiomyozyten konnte eine Blockade des nativen I_{Kr} durch Haloperidol nachgewiesen werden (Abbildung 14A). Die IC_{50} lag bei 0,052 µM, und damit in der Größenordnung therapeutisch relevanter Plasmakonzentrationen (0,01 µM bis 0,045 µM), wo eine I_{Kr} Blockade von 20 bis 45 % zu erwarten ist (Abbildung 14B).

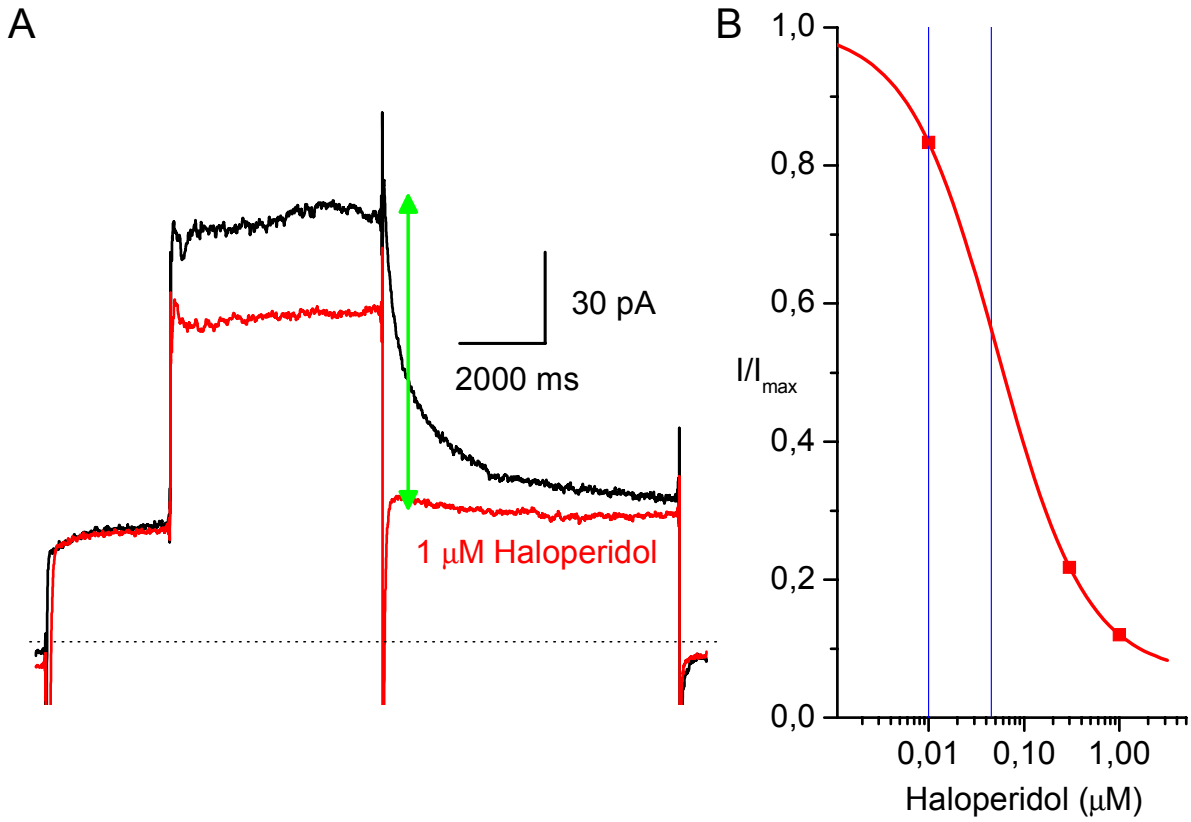


Abbildung 14

Block von I_{Kr} durch das Neuroleptikum Haloperidol in einem humanen Kardiomyozyten. 1 µM Haloperidol führen zur vollständigen Blockade von I_{Kr} (**A**). (Pulsprotokoll siehe Abbildung 7). **B)** Konzentrations-Wirkungsbeziehung für Haloperidol: 0,052 µM Haloperidol bewirken eine halbmaximale Blockade von I_{Kr}. Der Bereich therapeutischer Plasmakonzentrationen liegt zwischen 0,01 und 0,045 µM (vertikale Linien).

3.1.3.3 Einfluss der extrazellulären Kalium-Konzentration auf I_{Kr}

Neben dem elektrochemischen Gradienten, der die treibende Kraft für den Fluss von Kalium-Ionen durch die Kaliumkanäle über die Zellmembran darstellt, können Ionen durch direkte Effekte am Kanalprotein dessen Leitfähigkeit modifizieren. So wird die Größe von I_{Kr} von der extrazellulären Kaliumkonzentration beeinflusst (Abbildung 15). Auffällig ist, dass die Regulation von I_{Kr} entgegen dem elektrochemischen Gradienten erfolgt und somit der Strom entgegen der treibenden Kraft bei niedrigeren extrazellulären Kaliumkonzentrationen an Größe abnimmt.

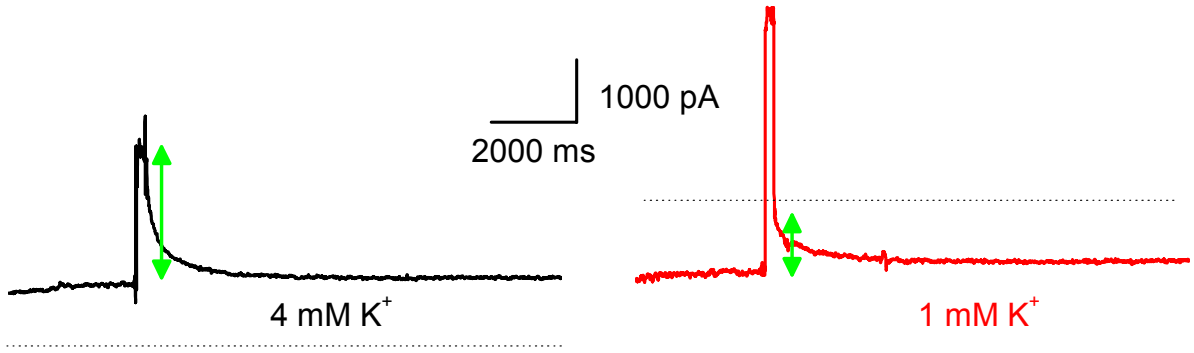


Abbildung 15

Modifikation von I_{Kr} (Größe des tail-Stromes durch Pfeil markiert) durch Variation der extrazellulären Kalium-Konzentration: Absenkung der Kalium-Konzentration der externen Perfusionslösung von 4 mM auf 1 mM verringert den I_{Kr} tail um 46 % von 1,22 nA auf 0,66 nA. Die Aktivierung von I_{Kr} erfolgt in diesem Experiment über 225 ms.

3.1.4 Nachweis von I_{Ks} und pharmakologische Modulation

Unter Standardbedingungen (Messung im whole cell Modus ohne pharmakologische Stimulation) konnte in keiner der untersuchten humanen Zellen ein I_{Ks} nachgewiesen werden, dessen Stromdichte wesentlich über dem Hintergrundrauschen liegt. Erst nach Optimierung der Messbedingungen unter Verwendung der perforated patch Methode in Verbindung mit pharmakologischer Stimulation konnte I_{Ks} mit sehr geringer Stromdichte

nachgewiesen werden. Die Verwendung des Porenbildners Amphotericin B erlaubt eine Patch Clamp Messung ähnlich dem whole cell Modus, wobei jedoch die Zellmembran unter der Patch Clamp Pipette nicht aufgebrochen wird, sondern durch Amphotericin B lediglich eine Permeabilität für einwertige Ionen erreicht wird. So ist eine Strommessung möglich, ohne das Zytoplasma zu dialysieren und essentielle Bestandteile wie z.B. second messenger Botenstoffe auszuwaschen.

Zusätzlich wurden die Zellen mit Isoproterenol adrenerg stimuliert; dies führt über einen cAMP-Anstieg zur Steigerung von I_{Ks} (Yazawa und Kameyama, 1990). Die Zugabe von 1 µM Isoproterenol zur externen Perfusionslösung ermöglichte den Nachweis eines I_{Ks} entsprechenden, langsam aktivierenden Stromes und tail-Stromes (Abbildung 16).

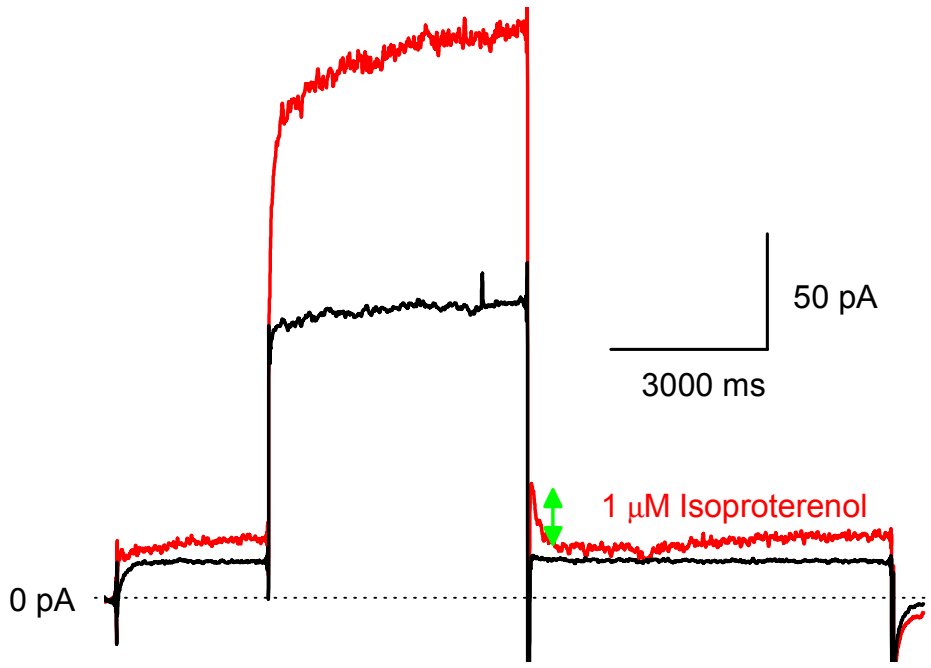


Abbildung 16

Adrenerge Stimulation der Zelle durch Isoproterenol führt zur deutlichen Steigerung der Stromgröße I_{Ks}. Unter Kontrollbedingungen findet sich kein deutlich abgrenzbarer I_{Ks}; erst nach Einwaschen von 1 µM Isoproterenol wird der langsam aktivierende I_{Ks}-Strom und tail-Strom sichtbar. Das Experiment wurde im „perforated patch“ Modus mit Amphotericin B durchgeführt um eine Dialyse des Zytoplasmas zu vermeiden. Gleichzeitig vorhandener I_{Kr} wurde mit 1 µM Dofetilide blockiert.

Somit konnte unter oben beschriebenen optimierten Messbedingungen ein sehr kleiner (Strom: 0,20±0,02 pA/pF, tail-Strom 0,12±0,01 pA/pF, n = 9 / 6) Strom im humanen Myokard nachgewiesen werden, der für I_{Ks}-Blocker (3.1.4.1) empfindlich war. Aufgrund der komplexen Messbedingungen und der geringen Stromdichte war jedoch eine weitergehende Analyse der elektrophysiologischen Eigenschaften sowie der transmuralen Verteilung des Stromes nicht möglich.

3.1.4.1 Chromanol 293b und HMR 1556

Der unter Verwendung oben aufgeführter Methode gemessene I_{Ks} wurde konnte durch die I_{Ks}-Blocker Chromanol 296b (Bosch et al., 1998; Busch et al., 1996; Sun et al., 2001) und HMR 1556 (Gogelein et al., 2000; Thomas et al., 2003) inhibiert werden. In Abbildung 17 ist der Effekt von 100 nM HMR 1556 gezeigt.

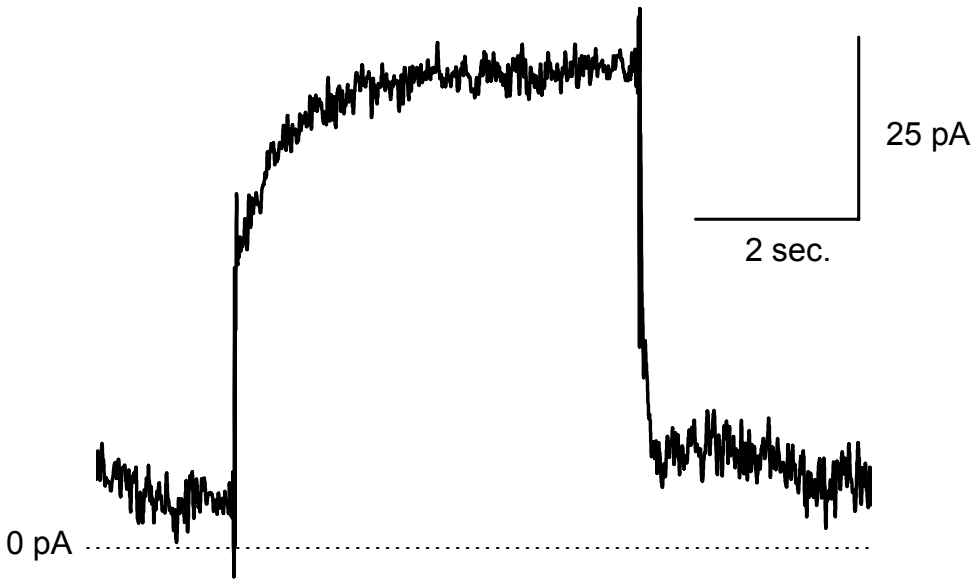


Abbildung 17

Aufzeichnung von I_{Ks} in einem humanem Kardiomyozyten: Dargestellt ist der durch 100 nM HMR 1556 blockierte Strom. Die Kurve ist durch Subtraktion des nach Einwaschen von HMR 1556 verbliebenen Hintergrundstromes von dem vorher registrierten Gesamt-Strom entstanden. Zur Stimulation von I_{Ks} wurde 1 µM Isoproterenol verwendet.

Des Weiteren wurde die Wirkung der I_{Ks}-Blockade mit HMR 1556 auf die Aktionspotentialdauer untersucht. Bei niedrigen Konzentrationen im Bereich von 10 nM war – wie bei der Blockade eines repolarisierenden Kaliumstromes zu erwarten – eine Zunahme der Aktionspotentialdauer um ca. 40 % zu beobachten (Abbildung 18). Bei höheren Konzentrationen (bis 100 nM) war dann jedoch wieder eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer nachweisbar – möglicherweise über eine unspezifische Wirkung, wahrscheinlich durch Block von Kalziumkanälen.

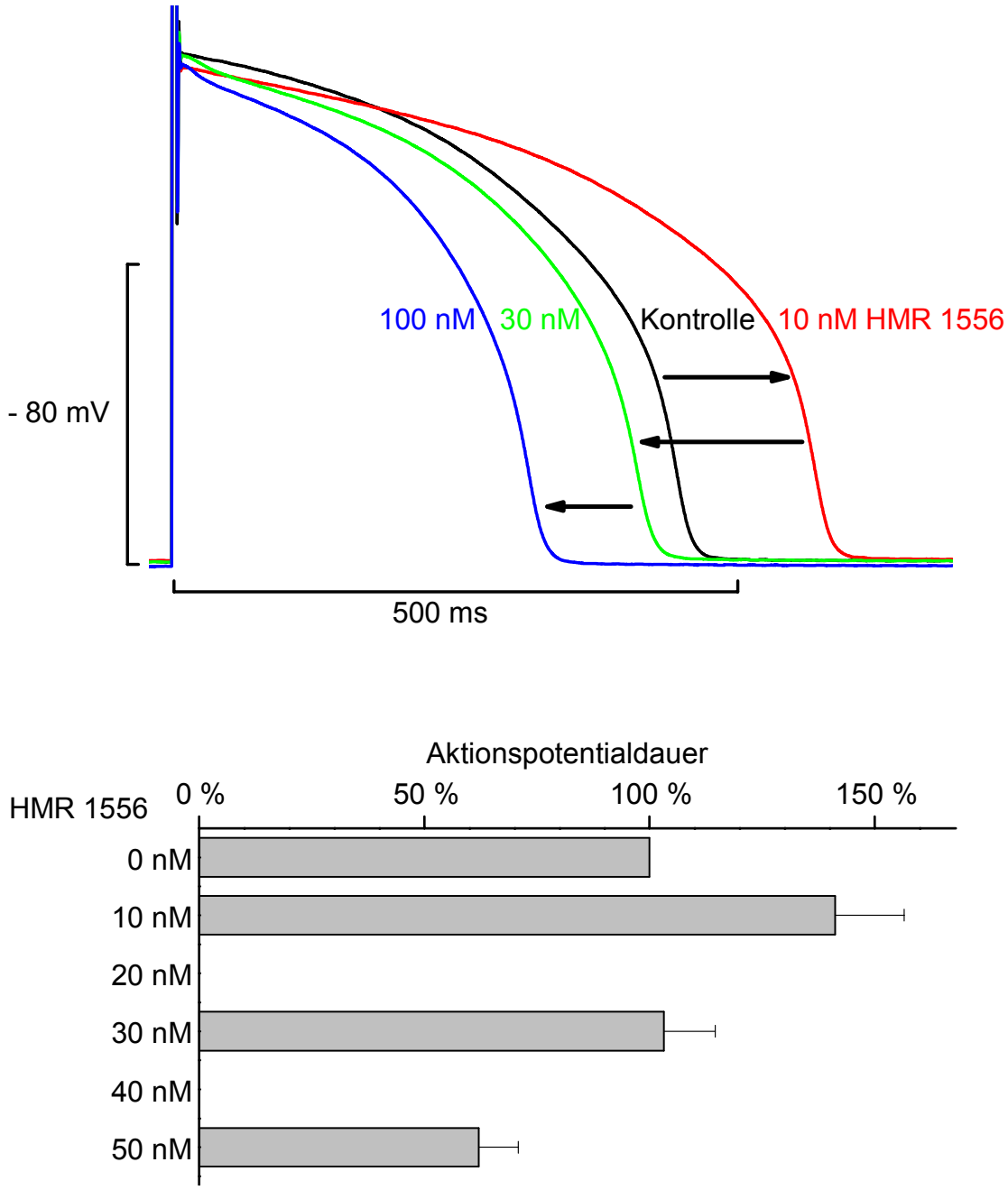


Abbildung 18

Oben: Aktionspotential einer repräsentativen humanen endokardialen Zelle unter Kontrollbedingungen und nach dem sequentiellen Einwaschen von 10, 30 und 100 nM des I_{Ks} Blockers HMR 1556. Zunächst ist eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer durch I_{Ks} Blockade zu beobachten. Bei höheren Konzentrationen von HMR 1556 kommt es dann jedoch zur Aktionspotentialverkürzung. Unten: Quantitative Darstellung des Effektes von HMR 1556 auf die Aktionspotentialdauer (n = 2). Die Aufzeichnung der Aktionspotentiale erfolgte im „perforated patch“ Modus.

3.2 I_{Kr} und I_{Ks} in verschiedenen Spezies unter Berücksichtigung der transmuralen Verteilung

Die – für den physiologischen Ablauf der Repolarisation notwendige – transmurale Verteilung von I_{Kr} und I_{Ks} wurde sowohl in humanem Myokard untersucht, als auch im Myokard tierexperimentell bedeutender Spezies, wie Meerschweinchen, Schwein und Hund. Die Ströme wurden in Zellen gemessen, die aus dünnen epikardialen, mittleren und endokardialen Schichten der freien linksventrikulären Wand isoliert worden waren. Zur Quantifizierung von I_{Kr} und I_{Ks} wurde der tail-Strom bei -40 mV nach Aktivierung bei +40 mV für 5 Sekunden bestimmt (Tabelle 6 und Tabelle 7; Abbildung 19 bis Abbildung 26). Der Chromanol 293b resistente Strom wurde als I_{Kr} definiert; der Chromanol 293b sensible Strom als I_{Ks}.

I_{Kr} [pA/pF]	Meerschweinchen	Schwein	Hund	Mensch
EPI	2,00±0,35 (n = 9 / 5)	0,78±0,08 (n = 17 / 6)	0,70±0,08 (n = 36 / 12)	0,32±0,13 (n = 15 / 5)
M	2,64±0,36 (n = 12 / 5)	1,24±0,15 (n = 32 / 7)	0,72±0,06 (n = 34 / 12)	0,56±0,05 (n = 21 / 5);
ENDO	2,53±0,29 (n = 10 / 3)	1,33±0,15 (n = 25 / 7)	0,92±0,07 (n = 27 / 12)	0,58±0,04 (n = 24 / 6)

Tabelle 6

Transmurale Verteilung von I_{Kr} über das linksventrikuläre Myokard nicht-insuffizienter Herzen von Meerschweinchen, Schwein, Hund und Mensch. In allen Spezies fanden sich epikardial geringere I_{Kr} Stromdichten als in mittleren Schichten und endokardial.

I_{Ks} [pA/pF]	Meerschweinchen	Schwein	Hund	Mensch
EPI	5,54±0,92 (n = 12 / 5)	1,65±0,23 (n = 20 / 6)	0,37±0,05 (n = 34 / 12)	0,12±0,01 (n = 9 / 6)
M	5,53±0,64 (n = 16 / 5)	1,11±0,12 (n = 31 / 7)	0,27±0,05 (n = 34 / 12)	
ENDO	3,86±0,61 (n = 7 / 3)	1,59±0,20 (n = 25 / 7)	0,22±0,05 (n = 29 / 12)	

Tabelle 7

Transmurale Verteilung von I_{Ks} über das linksventrikuläre Myokard nicht-insuffizienter Herzen von Meerschweinchen, Schwein, Hund und Mensch. In humanem Myokard konnte nur unter speziellen Untersuchungsbedingungen (Stimulation mit Isoproterenol, perforated patch Technik) ein I_{Ks} nachgewiesen werden (3.1.4). Die angegebenen Werte sind daher nur eingeschränkt mit denen in anderen Spezies unter Standartmessbedingungen gewonnenen vergleichbar. Eine systematische Untersuchung der transmuralen Verteilung des humanen I_{Ks} war aufgrund der geringen Stromdichte nicht möglich. Für I_{Ks} fanden sich in Meerscheinchen und Schwein in mittleren Schichten geringere Stromdichten als epikardial und endokardial.

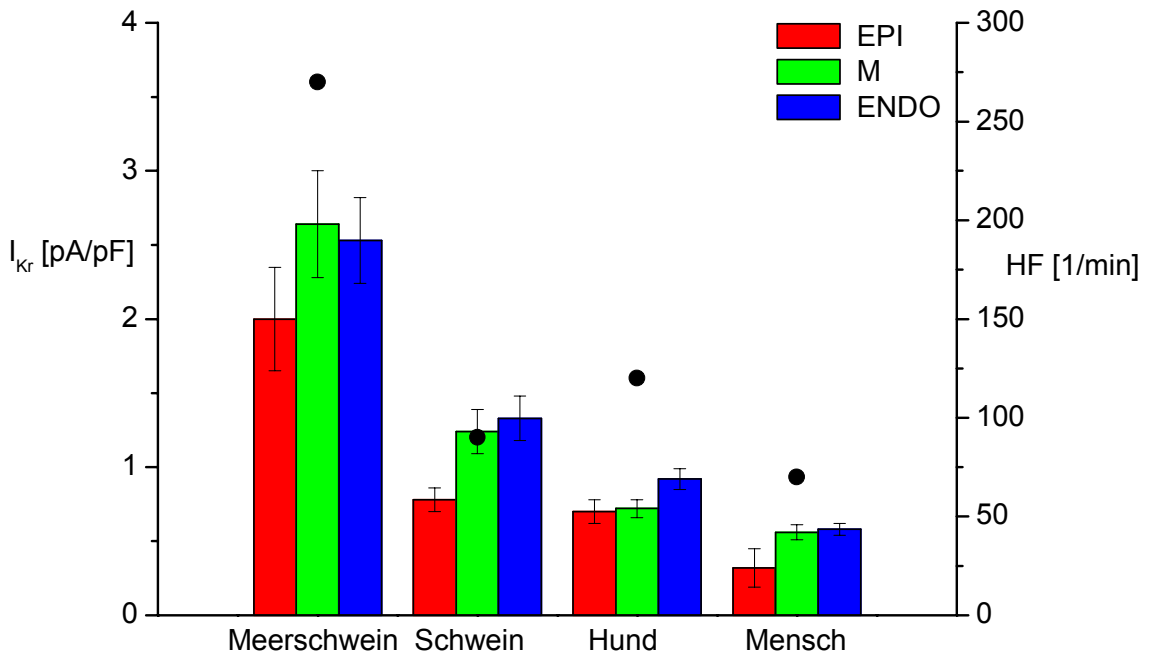


Abbildung 19

Transmurale Verteilung von I_{Kr} über das linksventrikuläre Myokard nicht-insuffizienter Herzen von Mensch, Meerschweinchen, Schwein und Hund. Die Punkte zeigen die mittlere Herzfrequenz der jeweiligen Spezies.

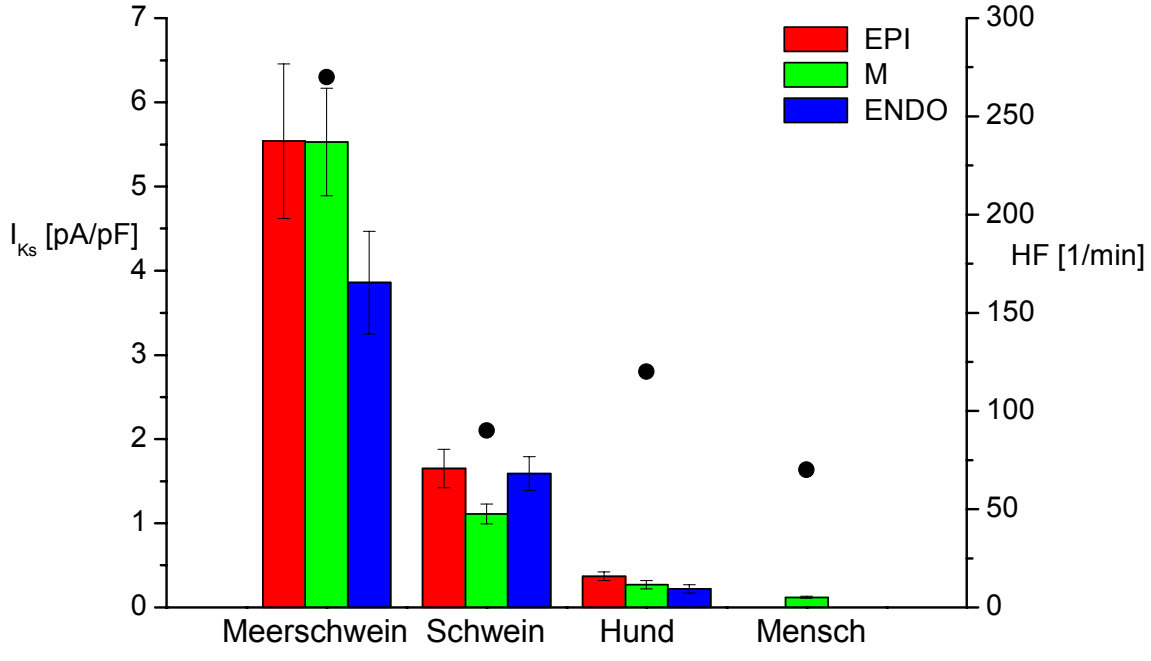


Abbildung 20

Transmurale Verteilung von I_{Ks} über das linksventrikuläre Myokard nicht-insuffizienter Herzen von Mensch, Meerschweinchen, Schwein und Hund. Die Punkte zeigen die mittlere Herzfrequenz der jeweiligen Spezies.

3.2.1 Meerschweinchen

Das Meerschweinchen stellt das klassische Kleintiermodell zur Untersuchung der delayed rectifier Kaliumkanäle dar; I_{Kr} und I_{Ks} weisen verhältnismäßig sehr große Stromdichten auf und vermitteln die Repolarisation. Aufgrund der kleinen Dimensionen des Meerschweinchenherzens betrug die Dicke epikardialer, mittlerer und endokardialer Schichten in der Regel mehr als 10 % der linksventrikulären Wanddicke. Dabei ließen sich keine signifikanten transmuralen Gradienten für I_{Kr} oder I_{Ks} nachweisen. Im Epikard fanden sich jedoch tendenziell geringere I_{Kr} Stromdichten als in mittleren oder endokardialen Schichten.

Die Stromdichten für I_{Kr} waren gegenüber dem humanem I_{Kr} etwa 6fach, gegenüber I_{Kr} in Schweine- und Hundekardiomyozyten 2 – 3fach höher. I_{Ks} wies in Meerschweinchen im Vergleich zum Schwein bzw. Hund 3 – 5fach bzw. 15 – 20fach höhere Stromdichten auf.

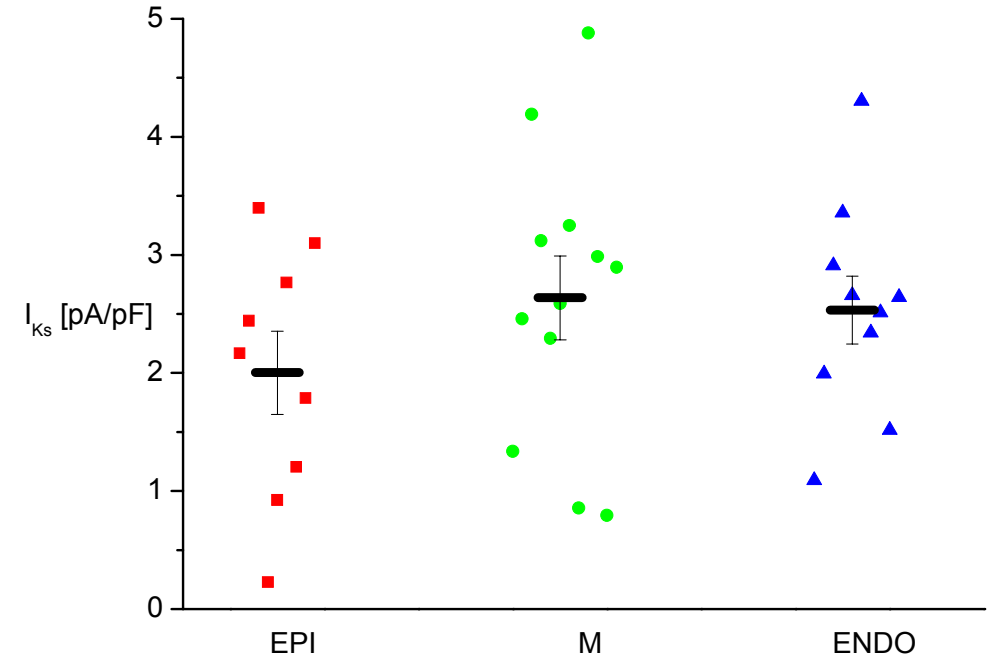


Abbildung 21

Transmurale Verteilung der Stromdichten von I_{Kr} in Meerschweinchenkardiomyozyten. Signifikante Unterschiede der I_{Kr} Expression in epikardialen, mittleren und endokardialen Zellen waren nicht nachweisbar.

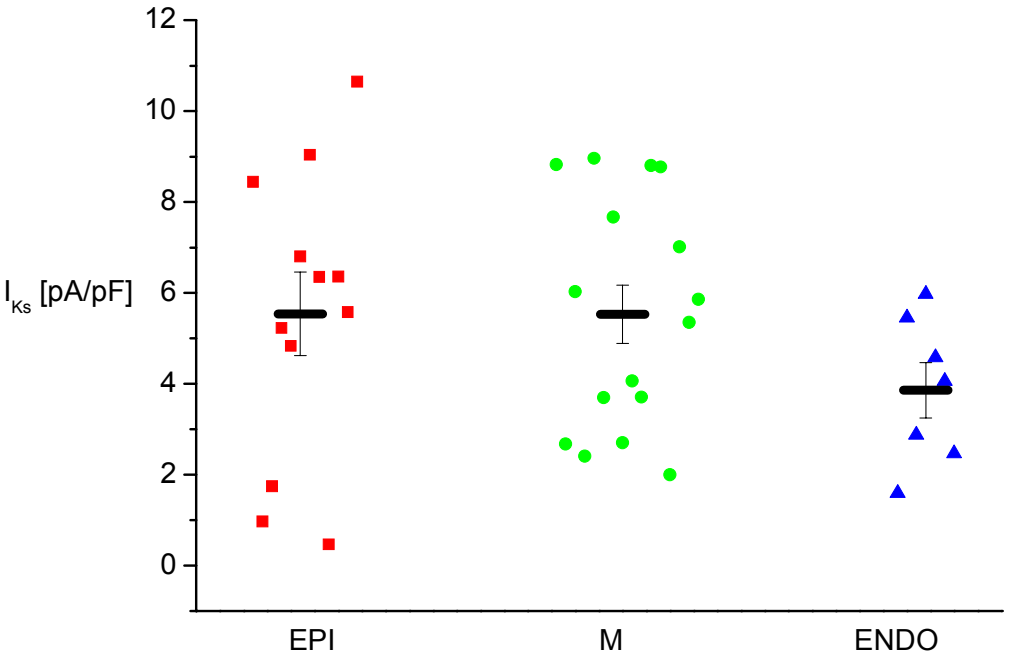


Abbildung 22

Transmurale Verteilung von I_{Ks} im Meerschweinchenherzen mit etwa doppelt so großer Stromdichte im Vergleich zu I_{Kr}. Signifikante transmurale Unterschiede waren nicht erkennbar.

3.2.2 Schwein

Wegen der kleinen Größe von Meerschweinchenherzen, die zum einen die Entstehung von Re-Entry Arrhythmien limitiert, zum anderen die Analyse der transmuralen Verteilung von Ionenkanälen erschwert, ist die Untersuchung größerer Tiermodelle notwendig.

In aus dem linken Ventrikel isolierten Kardiomyozyten ließen sich I_{Kr} und I_{Ks} nachweisen. Epikardial waren signifikant kleinere Stromdichten als in mittleren und endokardialen Arealen zu registrieren (Abbildung 23).

I_{Ks} war in mittleren Schichten (M-Zellen) mit signifikant geringerer Stromdichte exprimiert als epikardial und endokardial (Abbildung 24).

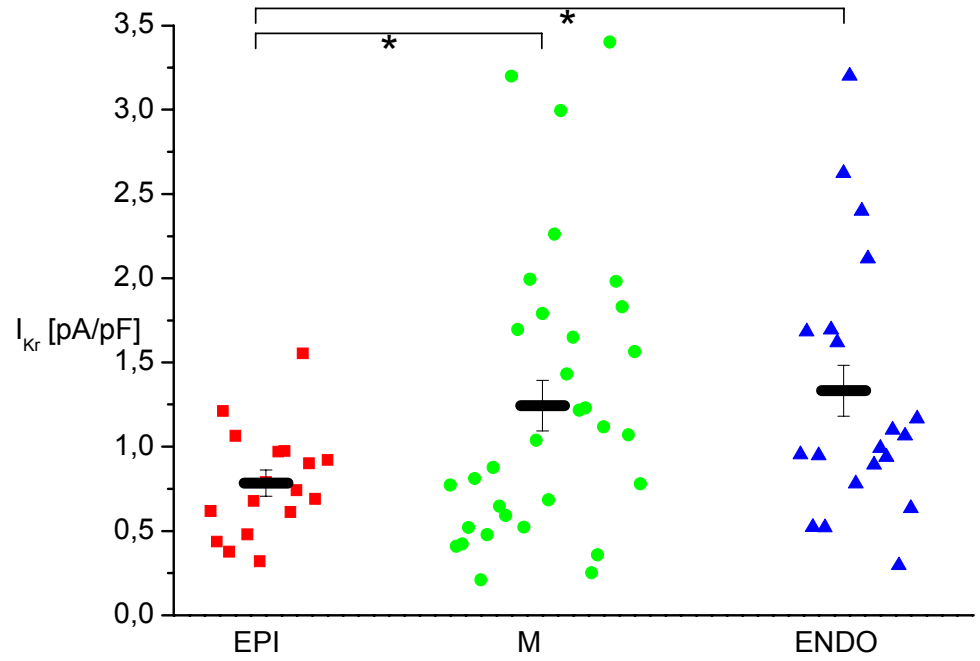


Abbildung 23

Transmurale Stromdichten von I_{Kr} im Schweineherzen mit im Epikard signifikant geringerer Stromdichte als in der Mitte sowie im Endokard. * $p < 0,05$.

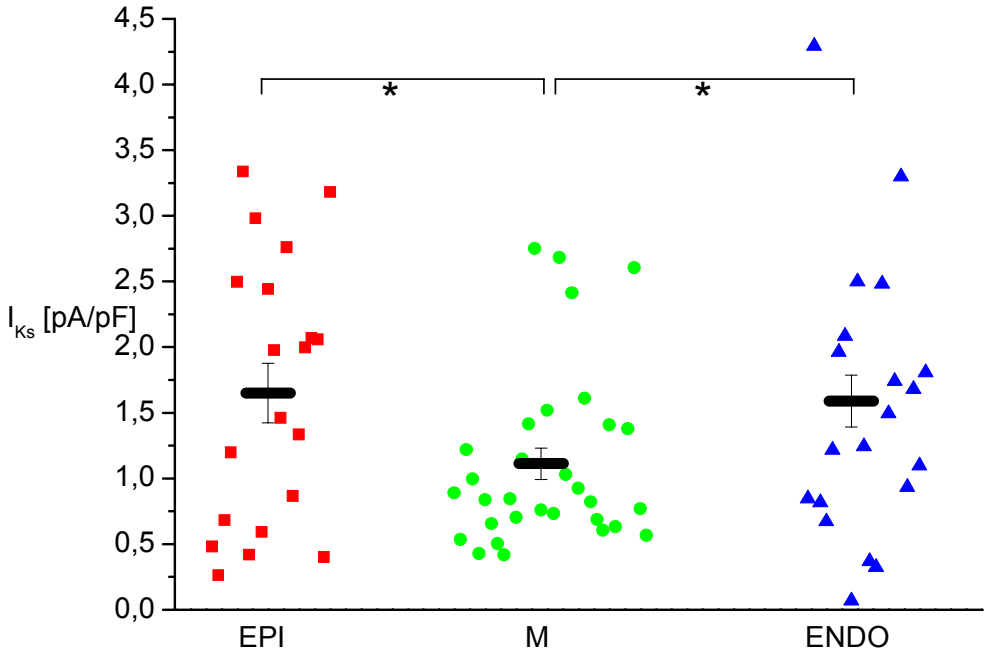


Abbildung 24

Transmurale Stromdichte-Verteilung von I_{Ks} im linksventrikulären Schweinemyokard. Die Expression von I_{Ks} war in mittleren Schichten signifikant geringer als in den beiden äußeren Schichten. * $p < 0,05$.

3.2.3 Hund

Für die Abbildung der Repolarisation in humanen Herzen ist der Hund das Tiermodell mit einer relativ großen Ähnlichkeit zur Elektrophysiologie des menschlichen Herzens. Im Gegensatz zum Schwein und ähnlich zum Menschen besitzt der Hund beispielsweise einen transienten Kaliumauswärtsstrom I_{to}.

In der vorliegenden Untersuchung ließ sich im Hundemyokard I_{Kr} in allen untersuchten Zellen nachweisen. I_{Ks} war in der Mehrzahl der untersuchten Zellen vorhanden; kein I_{Ks} war jedoch in 3 von 34 (Epikard), 5 von 34 (Mitte) bzw. 6 von 29 (Endokard) gemessenen Zellen vorhanden.

Die Stromdichten von I_{Kr} waren etwa 2fach größer als die humaner Kardiomyozyten. Für die transmurale Verteilung von I_{Kr} fand sich ein ähnlicher Gradient wie im Myokard von Mensch, Meerschweinchen und Schwein, mit geringster Stromdichte epikardial (Abbildung 25).

I_{Ks} war bei relativ geringen Stromdichten in der Mitte und endokardial geringer exprimiert als epikardial (Abbildung 26).

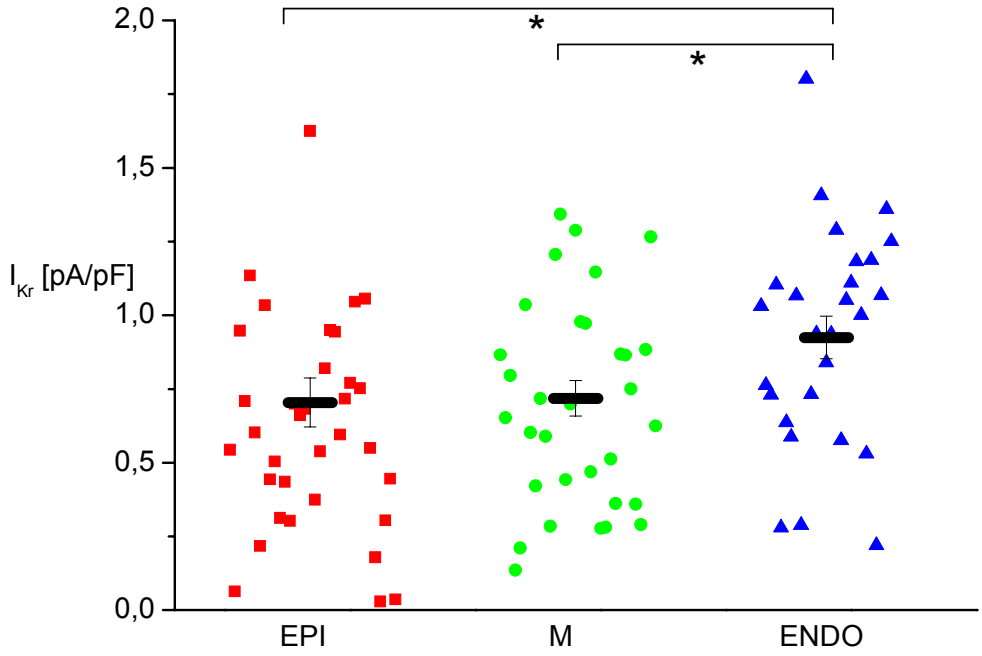


Abbildung 25

Transmurale Verteilung von I_{Kr} in nicht-insuffizienten Kardiomyozyten des Hundes. Im Epikard und in der Mitte war die Stromdichte signifikant kleiner als im Endokard. * $p < 0,05$.

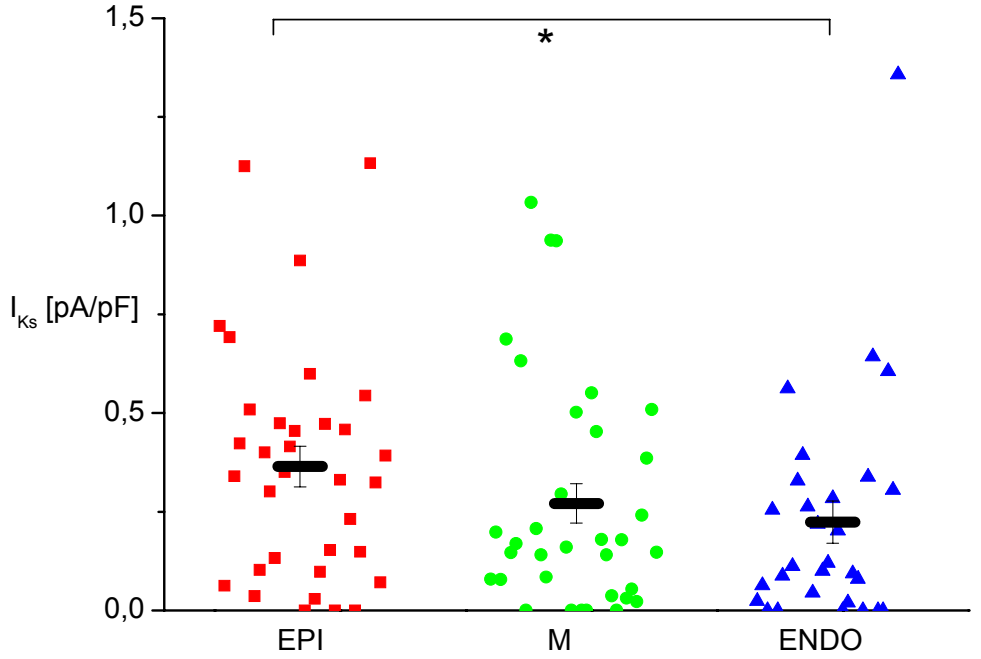


Abbildung 26

Transmurale Verteilung von I_{Ks} in nicht-insuffizienten Kardiomyozyten des Hundes mit höchsten Stromdichten epikardial. * $p < 0,05$.

3.2.4 Mensch

In Abbildung 27 ist die Verteilung von I_{Kr} im linken Ventrikel nicht-insuffizienter Herzen angegeben. In Zellen, die aus epikardialen Arealen isoliert worden waren, war die Stromdichte von I_{Kr} signifikant geringer als in Zellen aus mittleren oder endokardialen Arealen.

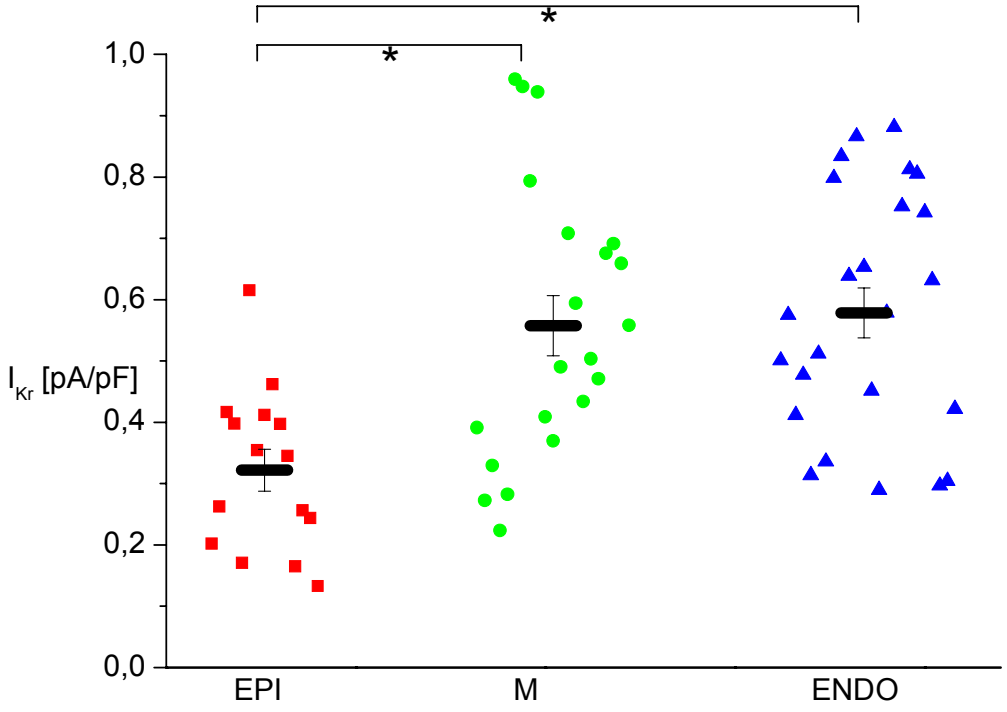


Abbildung 27

Transmurale Verteilung von I_{Kr} über die linksventrikuläre Wand nicht-insuffizienter humaner Herzen. Epikardial war eine signifikant kleinere Stromdichte von I_{Kr} nachzuweisen. * $p < 0,05$.

3.3 Regulation von I_{Kr} bei Herzinsuffizienz

Zur Untersuchung der Regulation der I_{Kr}-Expression bei Herzinsuffizienz wurde die Stromdichte von I_{Kr} in Kardiomyozyten aus nicht-insuffizientem Spendermyokard und aus Gewebe von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz bei dilatativer Kardiomyopathie untersucht (Abbildung 28 und Tabelle 8).
Dabei fanden sich für I_{Kr}-Stromdichten in mittleren und endokardialen Schichten keine signifikanten Unterschiede zwischen insuffizienten und nicht-insuffizienten Herzen. Dagegen war – im Gegensatz zu nicht insuffizientem Myokard – die geringere epikardiale Stromdichte von I_{Kr} bei Herzinsuffizienz nicht mehr nachweisbar. Die Expression von I_{Kr} war homogen über die linksventrikuläre Wand verteilt.

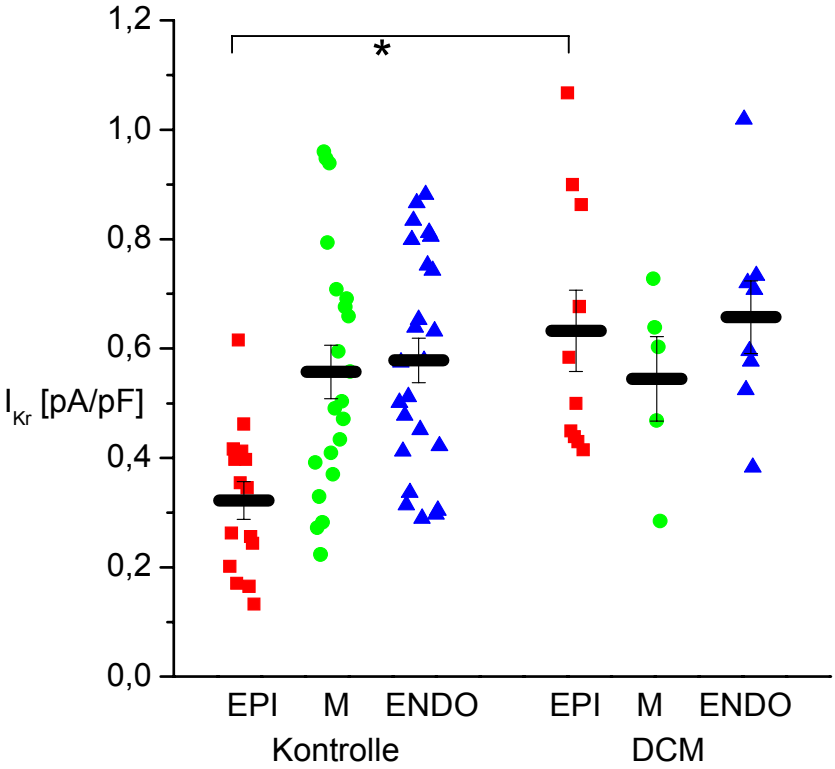


Abbildung 28

Regulation von I_{Kr} bei Herzinsuffizienz. In Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie verschwindet der – physiologischerweise vorhandene – transmurale Gradient mit geringerer Stromdichte epikardial. Die Absolutwerte für die Stromdichte sind in Tabelle 8 aufgeführt. * $p < 0,05$.

[pA/pF]	Kontrolle	DCM
EPI	0,32±0,13 (n = 15 / 5)	0,63±0,07 (n =10 / 3)
M	0,56±0,05 (n = 21 / 5);	0,54±0,08 (n = 5 / 4)
ENDO	0,58±0,04 (n = 24 / 6)	0,66±0,07 (n = 8 / 3)

Tabelle 8

Stromdichte des I_{Kr} tail-Stromes in humanem Kardiomyozyten nicht-insuffizienter Herzen sowie in Herzen mit terminaler Herzinsuffizienz.

3.4 KCNH2 und KCNQ1 als molekulares Substrat für I_{Kr} bzw. I_{Ks} im humanen Herzen

KCNH2 bzw. KCNQ1 sind in der Literatur als Gene für die porenbildende α-Untereinheit für I_{Kr} bzw. I_{Ks} beschrieben (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996; Schroeder et al., 2000; Tinel et al., 2000a). Die klonierten Gene KCNH2 und KCNQ1 wurden in murinen Fibroblasten funktionell exprimiert, um die Ähnlichkeit ihrer Ströme mit I_{Kr} bzw. I_{Ks} und ihre pharmakologische Sensitivität gegenüber I_{Kr} bzw. I_{Ks}-Blockern nachzuweisen zu können.

3.4.1 Transiente Expression von KCNH2 in LTK- Zellen

KCNH2 kodiert für einen sehr schnell aktivierenden Strom mit einem verhältnismäßig großem tail-Strom mit langsamer Deaktivierungskinetik. Der Strom zeichnete sich durch eine hohe Sensitivität gegenüber Dofetilide aus und wies somit eine große Ähnlichkeit zu I_{Kr} auf (Abbildung 29).

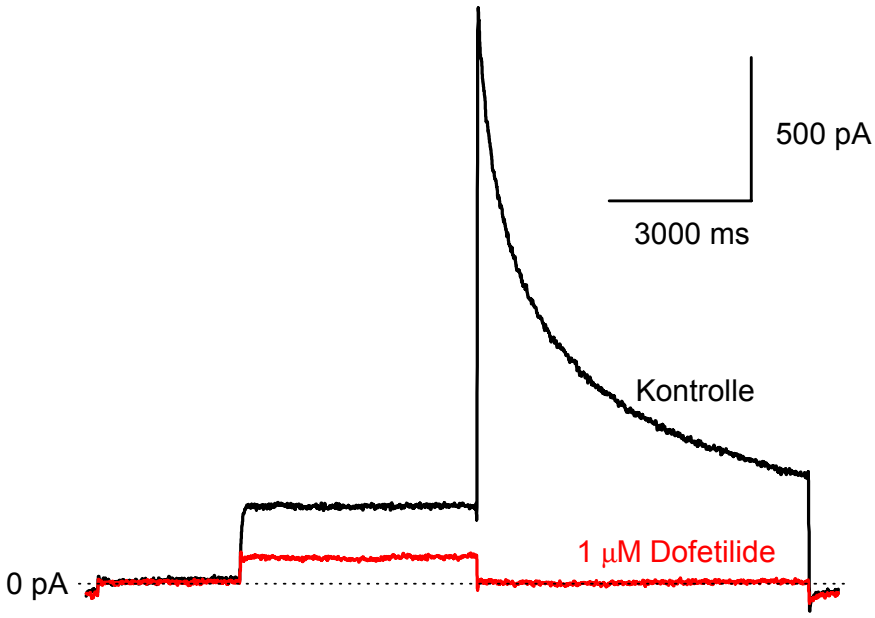


Abbildung 29

Durch KCNH2-Expression in LTK-Zelle erzeugter Kaliumstrom: Der Strom weist eine sehr schnelle Aktivierungskinetik auf, bei relativ langsamer Deaktivierungskinetik des tail-Stromes. 1 µM Dofetilide blockiert den Strom vollständig.

3.4.2 Transiente Expression von KCNQ1 in LTK- Zellen

Wird KCNQ1 im heterologen Zellsystem exprimiert, so lässt sich ein I_{Ks}-ähnlicher Strom mit langsamer Aktivierungskinetik und schneller Deaktivierung des tail-Stromes aufzeichnen (Abbildung 30). Dieser Strom lässt sich durch Exposition gegenüber dem I_{Ks}-Blocker Chromanol 293b inhibieren.

Im Gegensatz zum nativen I_{Ks} war vor der langsamen Inaktivierung ein kurzer Anstieg des tail-Stromes nachweisbar. Solche „hakenförmigen“ tail-Ströme werden mit einer Erholung von der Inaktivierung in Verbindung gebracht, die schneller ist als deren Deaktivierung. Bei Co-Expression von KCNQ1 mit KCNE1 ist ein Verschwinden dieser frühen Erholung von der Inaktivierung beschrieben (Tristani-Firouzi und Sanguinetti, 1998).

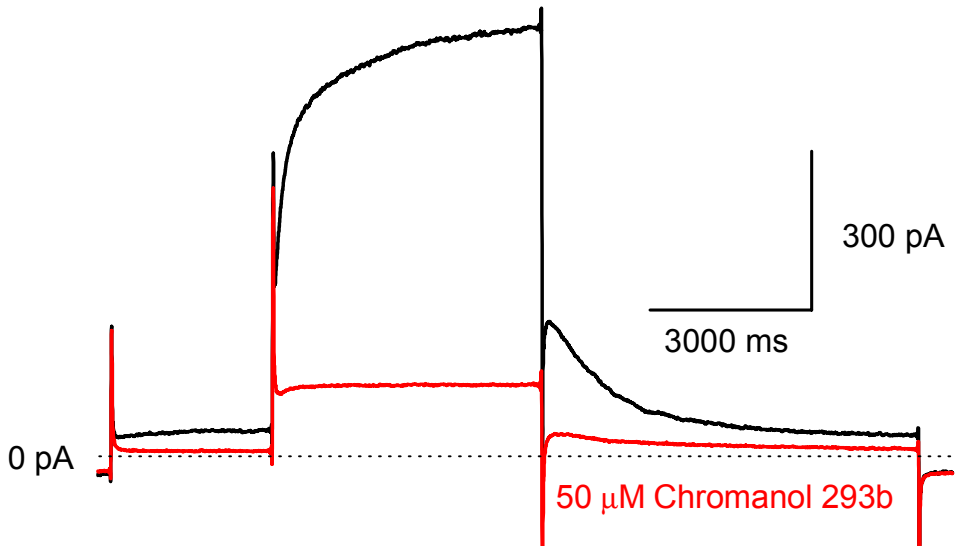


Abbildung 30

Von KCNQ1 kodierter Strom mit langsamer Aktivierungskinetik und schneller tail-Strom Deaktivierungskinetik. Durch 50 µM Chromanol 293b ließ sich eine weitgehende Blockade des Stromes erreichen.

3.5 Expression von KCNH2, KCNQ1, KCNE1 und KCNE2 in humanem Myokard

Die mRNA-Mengen der für die α- und β-Untereinheiten von I_{Kr} und I_{Ks} kodierenden Gene wurde in Gewebeproben aus nicht-insuffizienten Herzen sowie aus Herzen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie unter Berücksichtigung der transmuralen Verteilung mit Hilfe der quantitativen real-time PCR bestimmt (Abbildung 31).

Dabei waren für die porenbildenden α-Untereinheiten KCNH2 (I_{Kr}) und KCNQ1 (I_{Ks}) signifikante Unterschiede weder in der transmuralen Verteilung, noch im Vergleich zwischen insuffizienten und nicht-insuffizienten Myokard festzustellen (Tabelle 9 und Abbildung 32, bzw. Tabelle 10 und Abbildung 33).

Die β-Untereinheiten KCNE1 und KCNE2 waren in nicht-insuffizienten Herzen ebenfalls gleichmäßig über die linksventrikuläre Wand verteilt. Bei Herzinsuffizienz waren jedoch für KCNE1 epikardial eine signifikant höhere Expression nachweisbar als endokardial bei insgesamt etwas höherem Expressionsniveau als in nicht-insuffizienten Herzen. KCNE2 war in insuffizienten Herzen signifikant höher exprimiert als in nicht-insuffizienten, ohne dass signifikante transmurale Unterschiede erkennbar waren.

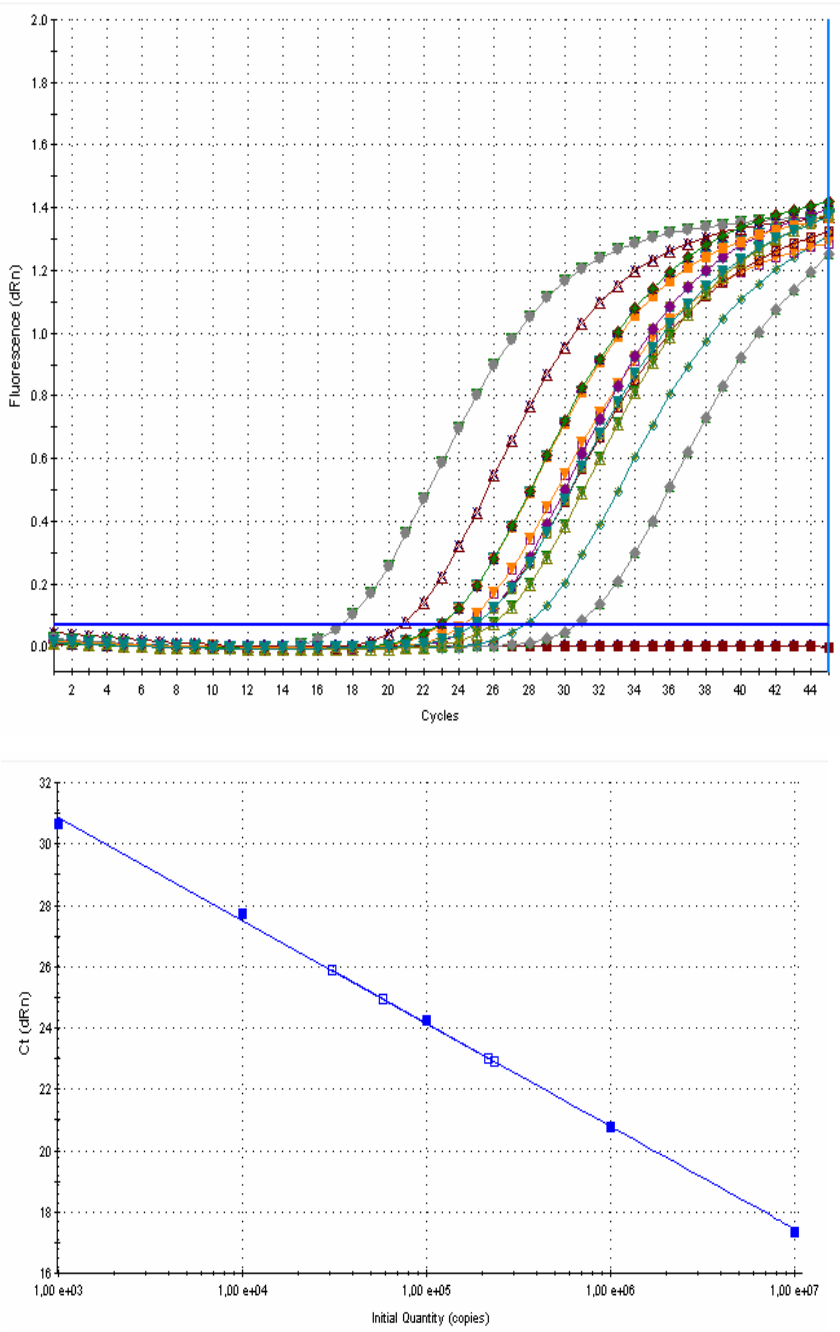


Abbildung 31

Quantitatives real time PCR-Experiment mit einer repräsentativen Amplifikationdarstellung von KCNH2 Standards sowie von Messproben (oben). Hierbei wird die mittels Referenzfarbstoff normalisierte Fluoreszenzänderung gegen die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen. Beim Heraustreten der Fluoreszenz aus der Hintergrundaktivität (horizontale Linie) wird der Schwellenzyklus C_t bestimmt. Unten: Standardgerade für KCNH2, die durch Abbildung der C_t-Werte der Standartkurven (gefüllte Kästchen) über der logarithmisch aufgetragenen Kopienanzahl entstand. Somit lassen sich die C_t-Werte der unbekannten Proben (hohle Kästchen) einer absoluten Kopienzahl zuordnen.

3.5.1 Transmurale Verteilung und Regulation bei Herzinsuffizienz: KCNH2

Kopien KCNH2 / Kopien β-GUS	Kontrolle	DCM
EPI	1,58±0,46	1,79±0,29
M	1,58±0,35	1,52±0,17
ENDO	1,33±0,21	1,38±0,24

Tabelle 9

Expressionslevel von KCNH2 mRNA, der α-Untereinheit von I_{Kr}, in nicht-insuffizienten (n = 7) und insuffizienten humanen Herzen (n = 11) unter Berücksichtigung der transmuralen Verteilung.

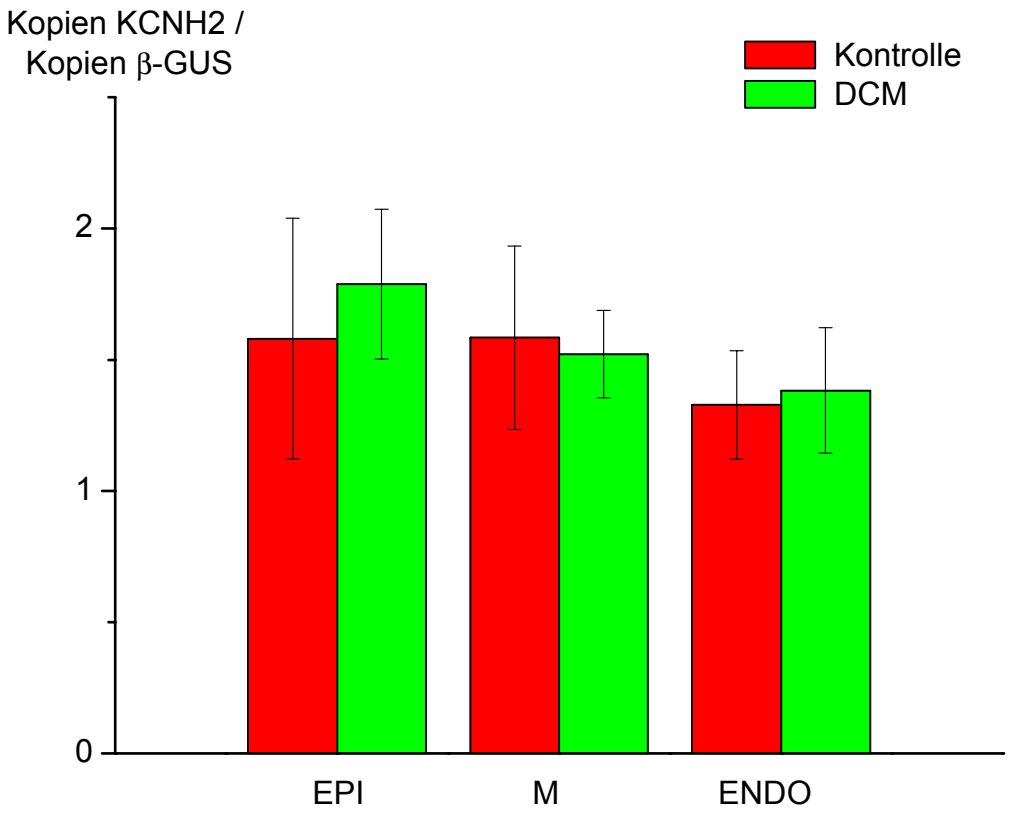


Abbildung 32

Graphische Darstellung der Expressionslevel von KCNH2 mRNA in nicht-insuffizienten (n = 7) und insuffizienten humanen Herzen (n = 11).

3.5.2 Transmurale Verteilung und Regulation bei Herzinsuffizienz: KCNQ1

Kopien KCNQ1 / Kopien β-GUS	Kontrolle	DCM
EPI	8,73±1,98	5,12±1,10
M	6,31±0,99	7,36±1,64
ENDO	9,50±1,92	9,23±2,71

Tabelle 10

mRNA Expressionsniveau der I_{Ks} α-Untereinheit KCNQ1 in nicht-insuffizienten (n = 8) und insuffizienten humanen Herzen (n = 10) unter Berücksichtigung der transmuralen Verteilung.

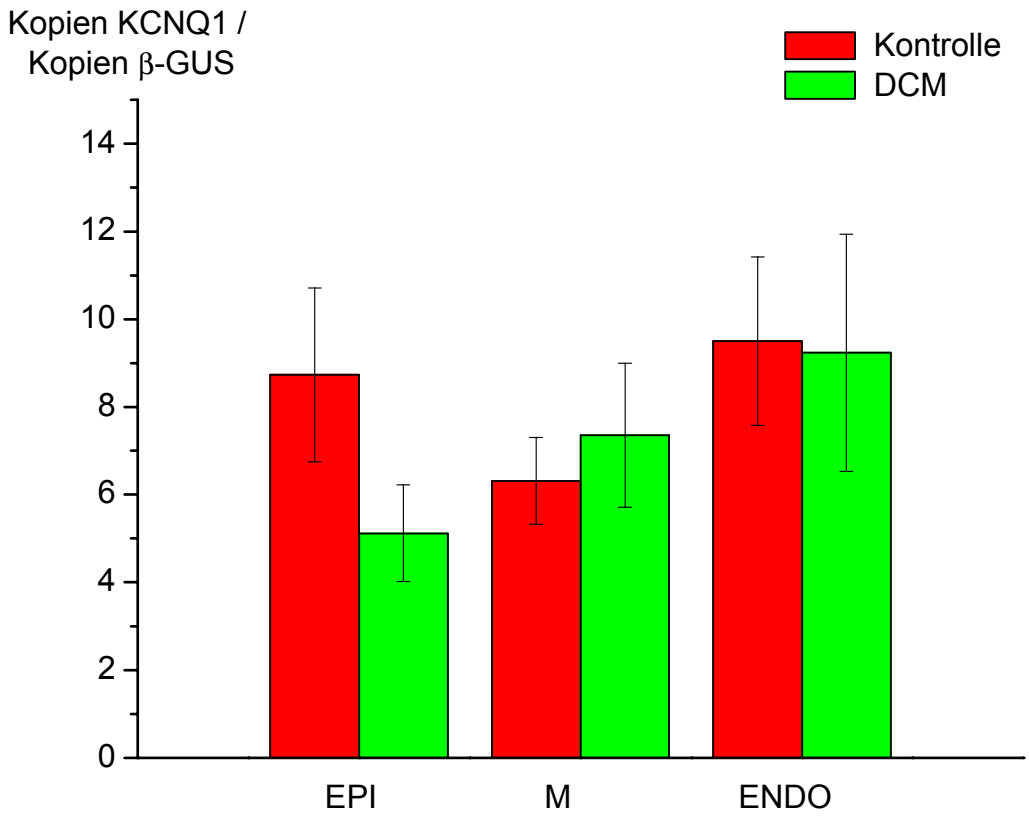


Abbildung 33

Expression von KCNQ1 mRNA in nicht-insuffizienten (n = 8) und insuffizienten humanen Herzen (n = 10) in epikardialen, mittleren und endokardialen Schichten.

3.5.3 Transmurale Verteilung und Regulation bei Herzinsuffizienz: KCNE1

Kopien KCNE1 / Kopien β-GUS	Kontrolle	DCM
EPI	2,50±0,67	4,61±1,08
M	1,75±0,39	3,66±0,85
ENDO	1,70±0,62	2,18±0,38

Tabelle 11

Expressionslevel von KCNE1, einer β-Untereinheit von I_{Ks}, in nicht-insuffizientem (n = 8) und insuffizientem Myokard (n = 11).

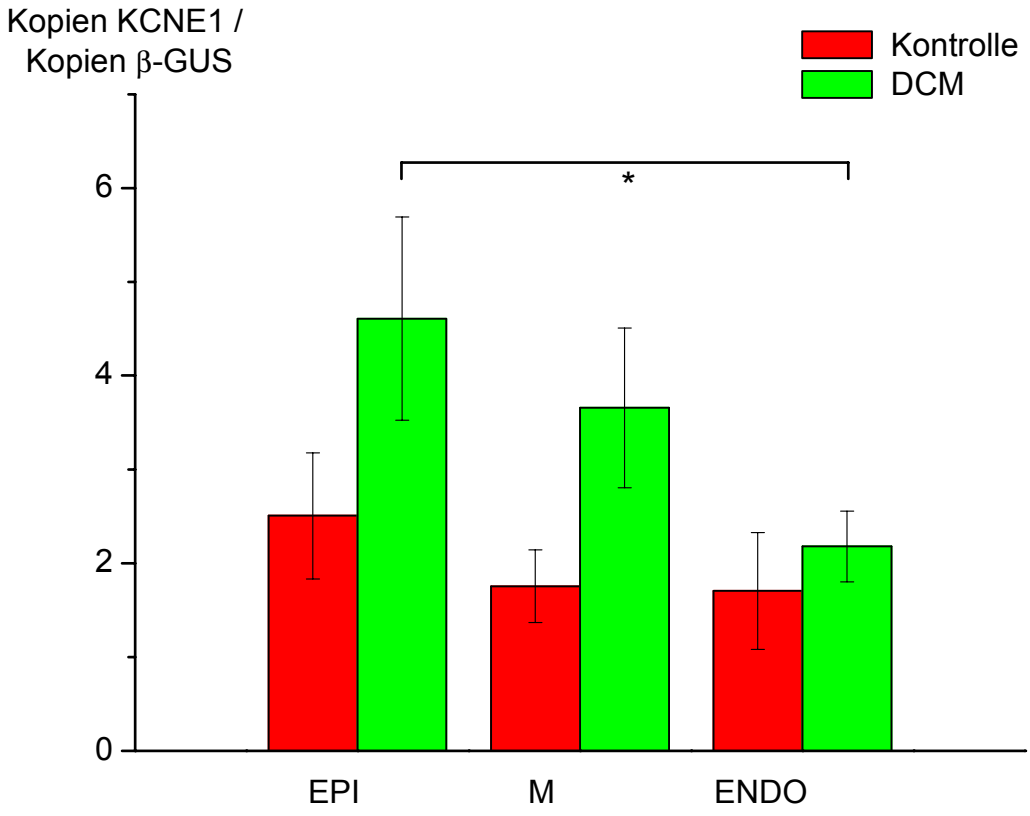


Abbildung 34

Graphische Darstellung der Expression von KCNE1 in nicht-insuffizientem und insuffizientem Myokard in epikardialen, mittleren und endokardialen Arealen.

3.5.4 Transmurale Verteilung und Regulation bei Herzinsuffizienz: KCNE2

Kopien KCNE2 / Kopien β-GUS	Kontrolle	DCM
EPI	0,07±0,01	0,26±0,07
M	0,09±0,02	0,28±0,07
ENDO	0,08±0,03	0,33±0,14

Tabelle 12

Expressionslevel von KCNE2, einer potentiellen β-Untereinheit von I_{Kr} und I_{Ks}, in nicht-insuffizientem (n = 8) und insuffizientem Myokard (n = 11).

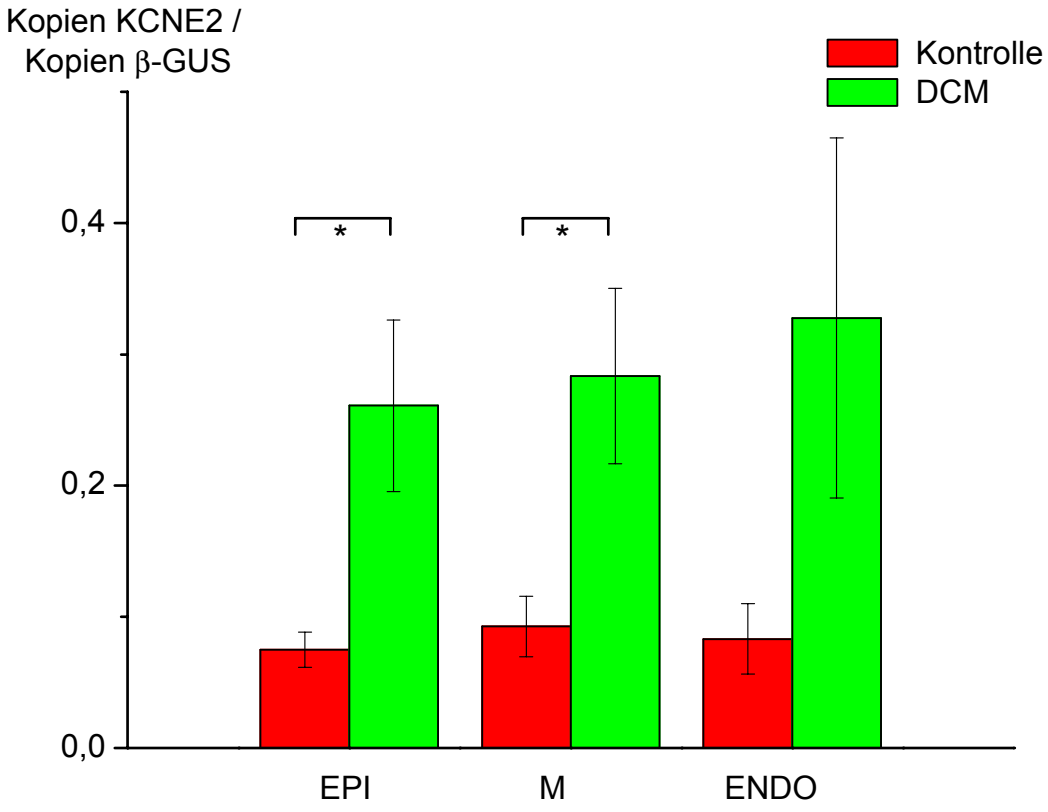


Abbildung 35

Graphische Darstellung der Expression von KCNE2 in nicht-insuffizientem und insuffizientem Myokard.

4 Diskussion

4.1 Methodik

Die Gewinnung von humanem ventrikulärem Myokard für patch clamp und molekularbiologische Experimente ist nur im Rahmen von Herztransplantationen möglich. Durch den Spenderorganmangel kam es in den letzten Jahren zu einer rückläufigen bzw. stagnierenden Anzahl von Transplantationen, die auch die wissenschaftliche Verwendung der explantierten Organe erschwerte. Insbesondere Gewebeproben von nicht-insuffizienten Herzen, also Spenderherzen, die nicht zur Transplantation freigegeben werden, sind nur in seltenen Ausnahmefällen – etwa ein- bis zweimal im Jahr – verfügbar.

Bei Myokardproben von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz bei dilatativer Kardiomyopathie ist eine große Variabilität nicht zu vermeiden, da es sich um eine klinisch heterogene Patientengruppe handelt. So bestehen große Unterschiede hinsichtlich Ätiologie der Erkrankung, Krankheitsverlauf und –dauer, Alter, Geschlecht, medikamentöser Therapie, Schrittmacher-Therapie sowie klinischem Zustand zum Zeitpunkt der Transplantation.

Die Zuhilfenahme von streng kontrollierten und standardisierten Tiermodellen ist als mögliche Alternative sinnvoll, nachdem bestimmte Expressionsmuster von Ionenkanälen in der Evolution konserviert sind. So weist z.B. der transiente Auswärtsstrom - falls vorhanden, z.B. in Mensch, Hund, Katze, Frettchen und der Ratte - stets subepikardial im Vergleich zu subendokardial höhere Stromdichte des. Ebenso konnten in den vorliegenden tierexperimentellen Untersuchungen erstmals das gleiche transmurale Verteilungsmuster von I_{Kr} wie im Menschen nachgewiesen werden.

Dennoch werden speziesübergreifende Aussagen zur zellulären Elektrophysiologie durch speziesspezifisch unterschiedliche Expression und einen unterschiedlichen Anteil einzelner Ionenkanäle an der Repolarisation in verschiedenen Spezies erschwert.

4.1.1 Patch clamp Experimente

Die Messbarkeit von Ionenströmen ist überhaupt erst in isolierten Einzelzellen möglich geworden, da nur hier eine adäquate Spannungskontrolle möglich ist. Des Weiteren erlauben Messungen an Einzelzellen die Kontrolle des intra- und extrazellulären Milieus; durch ständige Superperfusion ist eine extrazelluläre Kaliumakkumulation zu verhindern.

Die Messung der delayed rectifier Kaliumkanäle in humanem Myokard ist aufgrund der geringen Stromdichte dieser Kanäle mit messtechnischen Problemen behaftet: Die Stromdichten des I_{Kr}-tail-Stromes bewegten sich in der Größenordnung von 100 pA, etwa dem 5fachen der Amplitude des Rauschen. I_{Ks} war in humanem Myokard unter Standard-Messbedingungen nicht nachweisbar; erst unter Verwendung der perforated patch Methode in Verbindung mit adrenerger Stimulation konnte I_{Ks} nachgewiesen werden. Dabei ist zu berücksichtigten, dass die Isolation von Einzelzellen mittels enzymatischer Verdauung die Kanäle in ihrer Funktion beeinflussen kann. So konnte gezeigt werden, dass insbesondere I_{Ks} durch den Isolationsprozess beeinträchtigt werden kann (Yue et al., 1996). In Meerschweinchen und Schwein konnte in vorliegender Untersuchung I_{Ks} bei identischer Isolationsmethode jedoch in sämtlichen untersuchten Zellen nachgewiesen werden, so dass nicht von einer prinzipiellen Destruktion von I_{Ks} durch den Isolationsprozess auszugehen ist. Zudem wurde in vorliegender Untersuchung mit der antegraden Perfusion der Gewebeprobe über das Koronargefäßsystem die derzeit schonendste Isolationsmethode angewandt. Hierbei kann bei verhältnismäßig kurzen Einwirkzeiten der Enzymlösung eine relativ große Zellausbeute erreicht werden. Daneben waren globale elektrophysiologische Parameter wie Aktionspotentialdauer und –konfiguration sowie Ruhemembranpotential vergleichbar mit aus intaktem Myokardgewebe bekannten Werten, was für eine weitgehende Intaktheit der physiologisch relevanten Kanäle spricht.

Die quantitative Auswertung von in Einzelzellen aufgezeichneten Aktionspotentialen ist aufgrund großer Variabilitäten mit Problemen behaftet. Anders als bei Zellen im Gewebeverband fehlen Faktoren wie Zell-Zell-

Interaktionen und –Kopplung, die zu größerer elektrophysiologischer Stabilität führen. Für die Aufzeichnung von Aktionspotentialen wurde die perforated patch Methode gewählt, die eine weitgehende Erhaltung des physiologischen Milieus erlaubt. Somit wird die Dialyse von intrazellulären Bestandteilen wie second messengern verhindert, die die Funktion von Ionenkanälen beeinflussen. Dies ist insbesondere bei der Registrierung von Aktionspotentialen von großer Bedeutung, da hier schon kleine Veränderungen der Ströme große Auswirkung auf die Dauer und Konfiguration des Aktionspotentials haben.
Eine weiteres Problem bei der Bestimmung der I_{Ks}-Stromdichte stellt der so genannte „run-down" dar, die rasche Abnahme der Stromgröße über die Zeit, die sofort nach Aufbrechen der Zellmembran unter der patch clamp Pipette beginnt. Dieses bei I_{Ks} besonders ausgeprägte Phänomen wird durch das Auswaschen bzw. Verdünnen von intrazellulären Bestandteilen verursacht. Um zu vermeiden, dass die I_{Ks}-Stromdichte durch den „run-down" unterschätzt wird, wurde die Bestimmung des I_{Ks}-Stroms unmittelbar nach dem Aufbrechen der Zellmembran durchgeführt. Ein I_{Ks}-Strom war in humanem Myokard dennoch nicht nachweisbar. Eine routinemäßige Verwendung der perforated patch Methode zur I_{Ks}-Messung war nicht möglich, da sich mit dieser Methode bei den teilweise deutlich hypertrophierten Kardiomyozyten in den „Voltage Clamp" Messungen eine nur unzureichende Spannungskontrolle mit hohem Zugangswiderstand erreichen ließ.

4.1.2 Molekularbiologische Untersuchungen

Die Quantifizierung der für die Ionenkanaluntereinheiten kodierenden mRNA wurde mit der quantitativen real-time PCR durchgeführt. Dabei handelt es sich um die sensitivste und spezifischste Methode zur Quantifizierung von mRNA. Eine große Reproduzierbarkeit ist belegt (Walker, 2002).
Für eine relative Quantifizierung mittels real-time PCR ist die Auswahl einer geeigneten endogenen Kontrolle unerlässlich. Dabei ist für eine endogene Kontrolle ein konstantes Expressionsniveau, unabhängig von Alter, Geschlecht,

regionaler Verteilung im Myokard oder krankheitsspezifischen Einflüssen zu fordern. Gleichwohl lassen viele verbreitete „housekeeping Gene“ (z. B. GAPDH und β-Aktin) eine Regulation bei pathophysiologischen Zuständen wie Herzinsuffizienz oder Vorhofflimmern erkennen, so dass die grundsätzliche Eignung dieser Gene als endogene Kontrollen im Myokard nicht immer vorausgesetzt werden kann. Zusätzlich liegen für zahlreiche endogene Kontrollen Pseudogene vor (Bustin, 2000; Tricarico et al., 2002).

In vorliegender Untersuchung wurde β-GUS als housekeeping Gen verwendet; es stellte sich nach Voruntersuchungen aufgrund stabiler Expressionsraten und einem Expressionsniveau, das in der gleichen Größenordnung wie das der zu bestimmenden Ionenkanalgene lag, als geeignet heraus.

Generell erlaubt die Quantifizierung der mRNA Menge keine direkte Korrelation zur tatsächlich exprimierten Menge an Kanalprotein. Diese korreliert wiederum korreliert nicht zwangsweise mit der Kanalfunktion bzw. Stromdichte. Dabei spielen viele transkriptionelle (z.B. alternative Splicevarianten) und post-transkriptionelle Einflüsse (intrazellulärer Transport, Retention im endoplasmatischen Retikulum) eine Rolle. Aber auch die funktionelle Modifikation der porenbildenden Kanaluntereinheit durch β-Untereinheiten, die Stromdichte und Kinetik des Kanals stark beeinflussen können, sind bedeutsam. Vor diesem Hintergrund sind Ergebnisse von mRNA-Messungen zu interpretieren, die lediglich die Transkription repräsentieren.

4.2 Speziesunterschiede

Die vorliegende Arbeit unterstreicht große Speziesunterschiede in der Expression repolarisierender delayed rectifier Kaliumauswärtsströme zwischen Meerschweinchen, Schwein, Hund und Mensch. So waren die größten Stomdichten sowohl für I_{Kr} als auch für I_{Ks} im Meerschweinchen nachweisbar.

Für I_{Kr} fanden sich in Schwein und Hund zwei- bis dreifach kleinere Stromdichten als im Meerschweinchen. In humanem Myokard lag die

Stromdichte für I_{Kr} wiederum um die Hälfte niedriger als bei Hund und Schwein.

Ebenso waren für I_{Ks} bedeutende speziesspezifische Unterschiede nachweisbar: Während im Meerschweinchen ein sehr großer I_{Ks} nachweisbar war, fanden sich im Schwein (I_{Ks}-Stromdichte 30 % der des Meerschweinchens) und, noch ausgeprägter, im Hund (I_{Ks}-Stromdichte 5 % der des Meerschweinchens) sehr viel kleinere Stromdichten. Der I_{Ks} im Menschen weist hingegen eine so geringe Stromdichte auf, dass er unter Standardmessbedingungen überhaupt nicht erkennbar ist.

In der Literatur wird die Bedeutung von I_{Ks} in humanem Myokard kontrovers diskutiert. Während Veldkamp et al. I_{Ks} in humanem Myokard nicht nachweisen konnten, wurde von Li et al. die Anwesenheit von I_{Ks} im rechten Ventrikel beschrieben (Li et al., 1996; Veldkamp et al., 1995). Li et al. führten ihre Experimente jedoch in Anwesenheit von $CdCl_2$ und $BaCl_2$ durch, was die Interpretation deren Ergebnisse erschwert. Barium kann einen I_{Ks}-ähnlichen tail-Strom induzieren (Iost et al., 1998). Die Arbeitsgruppe von Papp untersuchte delayed rectifier Kaliumkanäle in gesundem Spendermyokard und berichtete zunächst über die Abwesenheit von I_{Ks}, konnte jedoch später – unter geänderten experimentellen Bedingungen – I_{Ks} in etwa der Hälfte der Zellen aus nicht-insuffizienten Herzen nachweisen (Iost et al., 1998; Virag et al., 2001). Diese Arbeitsgruppe hatte die Zellen – ähnlich wie in vorliegender Arbeit – mit Forskolin adrenerg stimuliert.

Die verschiedenen Spezies unterscheiden sich somit erheblich in Ihrer Ausstattung mit repolarisierenden Ionenkanälen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass große speziesspezifische Unterschiede in Herzgröße und Herzfrequenz bestehen, die sich in der Ionenkanalausstattung widerspiegeln. Diese Unterschiede sind bei der Auswahl eines Tiermodelles und der Interpretation von tierexperimentell gewonnenen Daten zu beachten. Insbesondere die unkritische Extrapolation von im Tiermodell gewonnenen Daten zur Wirksamkeit von Ionenkanal-aktiven Substanzen auf den Menschen erscheint vor diesem Hintergrund problematisch.

4.3 Transmurale Verteilung

In der Literatur liegen bisher noch keine Daten über die transmurale Verteilung von I_{Kr} in humanem Myokard vor. Publizierte Untersuchungen über die transmurale Verteilung der delayed rectifier Kaliumkanäle im Hund zeigten keine signifikanten Unterschiede von I_{Kr} zwischen epikardialen, mittleren und endokardialen Arealen, konnten jedoch in mittleren Schichten (M-Zellen) einen kleineren I_{Ks} nachweisen (Gintant, 1995; Li et al., 2002; Liu und Antzelevitch, 1995). Diese Verteilung spiegelte sich in vorliegender Untersuchung nicht in der beschriebenen Deutlichkeit wieder.

In vorliegender Untersuchung war speziesübergreifend epikardial die relativ geringste Stromdichte von I_{Kr} zu beobachten. Dieser Gradient war in Mensch, Hund und Schwein signifikant. Im Meerschweinchen ließ sich dieser Unterschied – wohl aufgrund der im Verhältnis sehr kleinen Größe des Herzens – nur als Trend aufzeigen. In solch kleinen Herzen (Ventrikeldicke 2 mm) ist die Gewinnung von Myokardzellen aus einer definierten Schicht, deren Dicke 10% des Ventrikels nicht übersteigen sollte, nicht mit der technisch notwendigen Präzision durchführbar und somit eine ausreichende regionale Selektivität nicht zu erreichen. Subendokardial könnte sich die Kontamination durch Purkinje-Fasern mit differierenden elektrophysiologischen Eigenschaften als zusätzliche Fehlerquelle auswirken.

Bei allen untersuchten Spezies lassen sich elektrokardiographisch zum QRS-Komplex konkordante T-Wellen nachweisen, so dass von einer vom Endokard zum Epikard gerichteten Depolarisation und einer umgekehrten, vom Epikard zum Endokard gerichteten Repolarisationssequenz auszugehen ist. Vor dem Hintergrund der epikardial kürzeren Aktionspotentialdauer (Abbildung 3) und der speziesübergreifend nachweisbaren epikardial geringeren Stromdichte von I_{Kr} ist von zusätzlichen Kanälen mit transmuraler Verteilung auszugehen, die die epikardial kürzere Aktionspotentialdauer bewirken. Nachdem insbesondere während der Plateauphase sehr kleine Leitfähigkeiten vorliegen, könnten prinzipiell auch kleine Ströme großen Einfluss auf die Aktionspotentiallänge haben.

Ebenso könnte der transiente Kaliumauswärtsstrom I_{to}, für den in humanem Myokard ein transmuraler Gradient mit epikardial vierfach höherer Stromdichte als endokardial bekannt ist eine Rolle bei der Bestimmung der Aktionspotentialdauer spielen (Näbauer et al., 1996).
Jedoch ist I_{to} nicht in jeder Spezies vorhanden und der Effekt von I_{to} auf die Aktionspotentialdauer wird kontrovers diskutiert (Oudit et al., 2001).
Die geringe Stromdichte von I_{Ks} entspricht dem Konzept, dass I_{Ks} weniger unter basalen Bedingungen als vielmehr unter Bedingungen eines erhöhten Repolarisationsbedarfs die wesentliche Rolle spielt, vor allem unter Katecholaminstimulation oder bei höheren Herzfrequenzen.
Auch könnten weitere Ströme wie nichtinaktiverende Natriumkanäle oder kürzlich im Hund beobachtete, bisher in der Literatur nicht beschriebene Kaliumkanäle (am ehesten KCNH2 in Verbindung mit der β-Untereinheit KCNE5 entsprechend, eigene Beobachtungen), die Dauer des Aktionspotentials modifizieren.
Die mRNA-Expression von KCNH2, dem für die α-Untereinheit von I_{Kr} kodierenden Gen, wies keine transmuralen Unterschiede auf. Dennoch könnte die Expression des I_{Kr}-Kanals durch eine Vielzahl von transkriptionellen und post-transkriptionellen Einflüssen beeinflusst werden, die sich nicht in der mRNA-Quantifizierung widerspiegeln (siehe auch 4.1.2). Eine wichtige Rolle spielt hier die funktionelle Beeinflussung der porenbildenden Kanaluntereinheit durch β-Untereinheiten, die insbesondere die Stromdichte stark beeinflussen können (siehe 4.5).

4.4 Regulation bei Herzinsuffizienz

An Tiermodellen (vor allem Hundemodell mit Herzhypertrophie durch chronischen AV-Block oder mit Tachykardie-induzierter Herzinsuffizienz) erhobene Daten zeigen überwiegend eine Herunterregulation von delayed rectifier Kaliumkanälen (siehe auch 1.2.2) (Li et al., 1998; Li et al., 2002; Volders et al., 1999).

In vorliegender Untersuchung blieb das Niveau der I_{Kr}-Stromdichte bei Herzen von Patienten, die an dilatativer Kardiomyopathie litten, in M-Zellen sowie in endokardialen Schichten unverändert. Jedoch glichen sich die bei nicht-insuffizienten Herzen beobachteten transmuralen Unterschiede der I_{Kr}-Stromdichte an, so dass eine homogene Verteilung der I_{Kr}-Stromdichte über die ventrikuläre Wand nachzuweisen war. Dieser Verlust der physiologischen transmuralen Verteilung könnte durch Störung der normalen elektrischen Heterogenität der Repolarisation arrhythmogene Wirkungen haben.

Generell wäre bei Herzinsuffizienz eher eine Herunterregulation von Kaliumkanälen zu erwarten gewesen (siehe 1.2.2). Geringere Leitfähigkeiten während des Plateaus des Aktionspotentials bewirken eine Destabilisierung dieser Phase und erhöhen somit die Anfälligkeit für Rhythmusstörungen; hier können also auch kleine Ströme eine große Wirkung haben. So führen Mutationen im KCNQ1-Gen zum Long QT-Syndrom (LQT1) mit gehäuften Fällen von plötzlichem Herztod.

Die einzige Arbeit, die die Regulation von I_{Ks} in humanem Myokard bei erworbener Herzinsuffizienz untersucht hat, ist lediglich als Abstract publiziert und aufgrund der Verwendung von $BaCl_2$, das einen I_{Ks}-ähnlichen tail-Strom bewirken kann, methodisch sehr umstritten (Li et al., 1998; Virag et al., 2001). Eine systematische Untersuchung der Regulation von I_{Ks} ist nach vorliegender Arbeit aufgrund der äußerst kleinen Stromdichte nicht erfolgsversprechend.

Auf mRNA-Ebene waren für die porenbildenden α-Untereinheiten KCNH2 und KCNQ1 weder signifikante Unterschiede in der transmuralen Verteilung nachweisbar, noch eine Veränderung deren Expression bei Herzinsuffizienz. Bei den β-Untereinheiten KCNE1 und KCNE2 war in insuffizienten Herzen insgesamt eine höhere Expression zu beobachten. Dabei wies KCNE1 in insuffizienten Herzen epikardial eine höhere Expression wie endokardial auf, bei insgesamt höherem Expressionsniveau als in nicht-insuffizienten Herzen. Die bei Herzinsuffizienz signifikant höhere Expression von KCNE2 wies keine regionalen Unterschiede auf.

Die hier gezeigte konstante Expression von KCNH2 und KCNE1 bei Herzinsuffizienz korreliert gut mit in Mircoarray gewonnenen Daten. In über 94 Datensätze war keine Korrelation zwischen NPPB (als etablierter Marker für Herzinsuffizienz und Hypertrophie) und KCNH2 sowie KCNE1 nachweisbar (Barth et al., unveröffentlichte Daten).
Eine Reihe von weiteren Untereinheiten (siehe 4.5), deren Expression in vorliegender Arbeit nicht untersucht wurde, kann ebenfalls die Expression von KCNH2 und KCNQ1 regulieren und damit Einfluss auf die Stromdichte von I_{Kr} und I_{Ks} nehmen (siehe 4.5.2 und 4.5.3).

4.5 Bedeutung von β-Untereinheiten

4.5.1 KCNQ1 bildet mit der KCNE1 β-Untereinheit I_{Ks}

1988 wurde aus Nierengewebe das Gen IsK, später minK, dann KCNE1 genannt, kloniert, das für ein kleines, 129 Aminosäuren langes Protein kodiert. Die Expression dieses Proteins in Xenopus Oozyten induziert einen delayed rectifier Strom mit sehr langsamer Aktivierungskinetik (Takumi et al., 1988). Obwohl minK einen I_{Ks}-ähnlichen Strom induzierte, war es unwahrscheinlich, dass minK alleine für I_{Ks} kodierte. So unterschied es sich aufgrund seiner Struktur mit nur einer transmembranären Domäne entscheidend von anderen bekannten Kaliumkanälen. Des Weiteren waren nur sehr geringe Mengen von KCNE1 mRNA ausreichend, einen großen Strom zu bewirken. Zudem hatte die Transfektion mit KCNE1 nur in Xenopus Oozyten einen Effekt; in allen anderen Expressionssystemen war das Einbringen von KCNE1 mRNA nicht in der Lage, einen Strom zu induzieren (Lesage et al., 1993). 1996 wurde der unbekannte Interaktionspartner von KCNE1 durch einen „positional cloning“ Ansatz als neuer, mit dem Long QT Syndrom assoziierter, Kaliumkanal identifiziert und so KvLQT1 (jetzt KCNQ1) genannt (Wang et al., 1996). Durch Expression von KCNQ1 im heterologen Expressionssystem konnte der Nachweis erbracht

werden, dass KCNQ1 einen spannungsgesteuerten Kaliumkanal kodiert (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996; Yang et al., 1997b). Dennoch unterschied sich der KCNQ1-Strom insbesondere in seiner Kinetik von den bekannten Kaliumströmen, so dass von Sanguinetti et al. die Hypothese aufgestellt wurde, dass die von KCNQ1 kodierte porenbildende α-Untereinheit Verbindungen mit anderen Untereinheiten – wie KCNE1 – eingeht. So konnte bestätigt werden, dass erst die Co-Expression von KCNQ1 mit KCNE1 zu einem Strom führt, der in seinen biophysikalischen Eigenschaften große Ähnlichkeit mit I_{Ks} aufweist (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996). So erfolgt die Aktivierung des durch KCNQ1 und KCNE1 induzierten Stromes langsamer und bei positiveren Potentialen, bei etwa 10fach größerer Stromdichte, im Vergleich zu dem durch KCNQ1-Strom.
Die Interaktion von KCNE1 ist jedoch nicht auf KCNQ1 limitiert; es konnten auch eine Modifikation des KCNH2-Stromes durch KCNE1 gezeigt werden. Der KCNH2-Strom hat – im Gegensatz zu KCNQ1 – schon alleine große Ähnlichkeit zum nativen I_{Kr} (Abbildung 29). Die Co-Expression von KCNE1 mit KCNH2 bewirkte über eine Vermehrung der funktionell aktiven Kanäle etwa eine Verdoppelung der Stromdichte im Vergleich zu KCNH2 alleine, ohne jedoch die Kinetik wesentlich zu beeinflussen (McDonald et al., 1997).

4.5.2 Weitere β-Untereinheiten der KCNE-Familie

In letzter Zeit sind eine Reihe von weiteren Genen der KCNE-Familie beschrieben worden, die alle für kleine β-Untereinheiten kodieren, welche Verbindungen mit verschiedenen Kaliumkanal α-Untereinheiten eingehen. Sie werden als KCNE2-5, bzw. minK related Protein (MiRP1-4) bezeichnet. Aus der KCNE-Familie wurden das Vorkommen von KCNE1, KCNE2, KCNE4 und KCNE5 im Herzen nachgewiesen; KCNE3 scheint im Herz nur in geringen Mengen vorzukommen und findet sich vor allem in Skelettmuskulatur, Dünn- und Dickdarm, sowie Niere (Abbott et al., 2001; Grunnet et al., 2003; Piccini et al., 1999; Schroeder et al., 2000; Teng et al., 2003). In vorliegender

Untersuchung lagen die Expressionsraten von KCNE2 etwa 20fach niedriger wie die von KCNE1 (3.5.3, 3.5.4).

KCNE2 wurde zunächst als β-Untereinheit für KCNH2 vorgeschlagen, die dessen biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften an die des nativen I_{Kr} angleicht (Abbott et al., 1999). Andere Untersuchungen zeigten jedoch, dass der KCNH2-Strom auch ohne β-Untereinheiten stark dem nativen I_{Kr} ähnelt, und nur geringe Interaktionen von KCNE2 mit KCNH2 nachgewiesen werden konnten, so dass die Rolle von KCNE2 als physiologischer Modulator von KCNH2 kontrovers gesehen wird (Weerapura et al., 2002; Zhang et al., 2001).

Zudem konnten auch Interaktionen von KCNE2 mit KCNQ1 gezeigt werden; hier bewirkt KCNE2 eine fast instantane Aktivierung in Verbindung mit schneller Deaktivierung und linearer Strom-Spannungsbeziehung bei insgesamt deutlicher Abnahme der Stromamplitude (Tinel et al., 2000a). Auch mit KCNQ2 und KCNQ3 scheint KCNE2 zu interagieren; hier kommt es zu einer Akzeleration der Deaktivierungskinetik, ähnlich wie bei der Interaktion von KCNQ1 mit KCNE3 (siehe unten) (Tinel et al., 2000b).

KCNE2 geht jedoch auch Verbindungen mit den für I_{to} kodierenden Genen KCND2 und KCND3 ein, und Verlangsamen deren Aktivierung und Inaktivierung (Deschenes und Tomaselli, 2002; Zhang et al., 2001). Des weiteren konnten auch Interaktionen von KCNE2 mit den für I_f kodierenden HCN1 und HCN2 nachgewiesen werden, wo es eine stark vermehrte Strom-Expression bei beschleunigter Aktivierungskinetik bewirkt (Yu et al., 2001).

Ähnlich viele Interaktionspartner sind für die β-Untereinheit KCNE3 identifiziert worden. Sie bewirkt eine Veränderung der Kinetik von KCNQ1 und führt zu einem nahezu instantanem Strom mit linearer Strom-Spannungs-Beziehung, der möglicherweise für die basolatereale cAMP-abhängige Kaliumleitfähigkeit in Kolon-Krypten-Zellen verantwortlich ist. Daneben hat KCNE3 eine starke inhibitorische Wirkung auf KCNH2 und KCNQ4 (Schroeder et al., 2000). KCNE3 ist im Herzen nur in geringer Menge

exprimiert, so dass die physiologische Bedeutung der beschriebenen Effekte auf den kardialen I_{Kr} und I_{Ks} unklar sind.

Bei KCNE4 handelt es sich um eine inhibitorische Untereinheit die den KCNQ1-Strom inhibieren kann und dessen Aktivierungskinetik verlangsamt, während KCNQ2-5 und KCNH2 durch Co-Expression mit KCNE4 unbeeinflusst blieben (Grunnet et al., 2002; Teng et al., 2003).

KCNE5 bewirkt eine starke Verlangsamung der Aktivierungskinetik von KCNQ1 und verschiebt die Aktivierungskurve um über 140 mV zu positiveren Potentialen, was zu einer erschwerten Aktivierbarkeit führt (Angelo et al., 2002).

Die physiologische Bedeutung der verschiedenen KCNE Untereinheiten und ihr Einfluss auf die Ströme in vivo ist derzeit unklar. Das Vorhandensein von Mutationen in KCNE1 und KCNE2, die ein angeborenes und erworbenes Long QT-Syndrom mit lebensbedrohlichen Rhythmusstörungen verursachen, gibt jedoch Hinweise, dass die Intaktheit dieser beiden Untereinheiten für die kardiale Repolarisation essentiell ist. Dennoch sind die genetischen Grundlagen des Long QT-Syndrom nicht vollständig aufgeklärt, so dass durchaus Mutationen in weiteren Kaliumkanal-Untereinheiten mögliche Ursachen dieses Krankheitsbildes darstellen könnten.

4.5.3 Weitere regulatorische Untereinheiten

Neben den KCNE Untereinheiten wurden in letzter Zeit weitere regulatorische Untereinheiten wie SGK (serum and glucocorticoid-inducible kinase) und Yotiao identifiziert, die die Funktion von delayed rectifier Kaliumkanälen modifizieren können.

Co-Expression von SGK1, SGK2 und SGK 3 mit KCNE1 (und KCNQ1) in Oozyten bewirkte eine deutliche Zunahme des KCNQ1 / KCNE1 induzierten, I_{Ks} ähnlichen Stromes (Embark et al., 2003).

Für die adrenerge Stimulation von I_{Ks} durch das sympathische Nervensystem (siehe auch 3.1.4) schein das Protein Yotiao aus der Klasse der Proteinkinase A

Anker-Proteine (AKAP) essentiell zu sein. Im Zellsystem ist die Co-Expression von Yotiao zu KCNQ1 und KCNE1 notwendig, um die adrenerge Stimulierbarkeit des KCNQ1 / KCNE1-Stromes zu ermöglichen. Es konnte gezeigt werden, dass Yotiao an das „leucine zipper motif“ am COOH-Ende von KCNQ1 bindet und die Phosphorylierung und Aktivierung des Kanals durch Proteinkinase A und Proteinphosphatase 1 ermöglicht (Hulme et al., 2004; Kapiloff, 2002; Kurokawa et al., 2003; Marx et al., 2002). Dies ist pathophysiologisch insofern von großer Bedeutung, als Patienten mit angeborenem Long QT-Syndrom mit Mutationen in KCNQ1 und KCNE1 besonders in Situationen mit erhöhtem Sypathikotonus (z.B. Sport oder Erschrecken) zu Rhythmusstörungen neigen. Eine bei Patienten mit Long QT-Syndrom beobachtete Mutation von KCNQ1 (G589) liegt in dem „leucine zipper motif“ und verhindert dort die Bindung von Yotiao, was die Assoziation des Kanals mit Proteinkinase A und Proteinphosphatase 1, und somit dessen cAMP abhängige Stimulation unmöglich macht (Marx et al., 2002).

Als weiterer Partner, der neben KCNQ1 und KCNE1 zur Bildung eines funktionellen I_{Ks}-Kanales essentiell ist, konnte das Protein FHL2 identifiziert werden, das mit KCNE1 funktionell und biochemisch interagiert und einen weiteren Baustein des I_{Ks}-Komplexes darstellt (Kupershmidt et al., 2002).

Kürzlich konnte auch eine direkte Interaktionen der beiden α-Untereinheiten KCNQ1 und KCNH2 miteinander nachgewiesen werden (Ehrlich et al., 2004). Dabei verdoppelte die Co-Expression von KCNQ1 mit KCNH2 die I_{Kr}-Stomdichte und bewirkt eine Beschleunigung der I_{Kr}-Deaktivierung.

Bei der Interpretation der hier dargestellten Daten zur Interaktion der α- und β-Untereinheiten ist zu berücksichtigen, dass die meisten Ergebnisse unter artifiziellen experimentellen Bedingungen in Zellsystemen gewonnen wurden, die kaum die realen Bedingungen in der nativen Zelle mit komplexen Interaktionen und Netzwerken der Regulation widerspiegeln. Zudem entsprechen die bei der Co-Expression erzielten Konzentrationsverhältnisse der verschiedenen RNA nicht den realen Gegebenheiten, so dass nicht jede der in vitro nachgewiesenen Interaktionen auch in vivo vorliegen wird, insbesondere

führen die üblicherweise sehr hohen Expressionsniveaus häufig zu physiologisch nicht vorliegenden unspezifischen Interaktionen.
Aufgrund der komplexen Interaktionen verschiedener Untereinheiten verschiedener Klassen handelt es sich bei den transmembranären Ionenkanälen um makromolekulare Komplexe, mit einer Vielzahl interagierender Proteine, die verschiedene Angriffspunkte zur Regulation und Modifikation ihrer Funktion haben.
Neben den Kanalunterheiten existieren weitere Mechanismen, um Expression und Funktion der Ionenkanäle zu regulieren, die hier nur kurz erwähnt werden sollen. Zum einen wird die Expression der Ionenkanäle unmittelbar über die Transkription der mRNA reguliert, die in dieser Untersuchung quantitativ bestimmt wurde. Dabei ist auch die Bedeutung von verschiedenen, durch alternatives splicing entstandenen Isoformen, die zum Teil gegensätzliche Funktionen und inhibitorische Effekte auf die Ionenkanäle haben, zu berücksichtigen. So ist für KCNQ1 eine, am NH_2-Ende verkürzte, Isoform 2 beschrieben, die über dominant negative Effekte eine Reduktion des KCNQ1 (Isoform 1) Stromes bewirken soll (Demolombe et al., 1998; Jiang et al., 1997). Für diese Isoform 2 ist in mittleren Arealen eine gegenüber epikardial und endokardial höhere mRNA Expression gezeigt worden; Isoform 1 war gleichmäßig über die ventrikuläre Wand verteilt (Pereon et al., 2000). Die Autoren vermuten, dass die höhere Expression der Isoform 2 in mittleren Arealen dort die verminderte I_{Ks} Stromdichte bewirken könnte.
Weitere Möglichkeiten zur Steuerung der Expression und Funktion der Ionenkanäle, die hier nur kurz erwähnt werden sollen, sind die posttranskriptionale Regulation, Beeinflussung von Transport des Proteins vom Syntheseort in die Zellmembran oder kurzfristige, reversible Modifikationen am Kanal, wie beispielsweise Phosphorylierung.

4.6 Dualer Repolarisationsmechanismus in Ventrikelmyokard: Funktionelle Bedeutung von I_{Kr} und I_{Ks} in humanem Myokard

I_{Kr} nimmt durch seine Einwärts-Gleichrichtereigenschaften entscheidenden Einfluss auf die terminale Repolarisation und die Länge des Aktionspotentials (siehe Abbildung 13).

Die sehr kleine, unter Standardbedingungen experimentell kaum nachweisbare Stromdichte von I_{Ks} im humanen Myokard wirft die Frage nach der funktionellen Bedeutung von I_{Ks} bei der Repolarisation des humanen Aktionspotentiales auf. I_{Ks} ist somit funktionell als „Reservestrom“ unter Bedingungen eines erhöhten Repolarisationsbedarfs zu bewerten, um zum Beispiel bei höheren Herzfrequenzen oder adrenerger Stimulation die Aktionspotentialdauer entsprechend verkürzen zu können. So ist eine durch pharmakologische I_{Ks}-Blockade hervorgerufene Verlängerung der Aktionspotentialdauer unter Isoproterenol deutlich ausgeprägter als ohne adrenerge Stimulation (Han et al., 2001; Schreieck et al., 1997). In perfundierten Myokardpräperationen aus dem Hund bewirkte ein I_{Ks}-Block durch Chromanol 293b nur in Verbindung mit adrenerger Stimulation eine Verstärkung der transmuralen Dispersion der Repolarisation, die in der Lage wäre, torsade de pointes-Tachykardien zu induzieren (Burashnikov und Antzelevitch, 2000).

Im Vergleich zur Aktionspotentialdauer ist die Aktivierungszeit von I_{Ks} mit mehreren Sekunden sehr lange, so dass in vivo eine vollständige I_{Ks}-Aktivierung nicht möglich ist. Bei Verzögerung der Repolarisation durch Faktoren wie Anwesenheit von I_{Kr}-Blockern, Bradykardie, Hypokaliämie oder genetischen Ionenkanalerkrankungen von I_{Kr} bei angeborenem Long QT-Syndrom (LQT2) nimmt die Bedeutung von I_{Ks} aufgrund der verlängerten Aktionspotentialdauer mit verlängerter Aktivierung von I_{Ks} zu und kann somit als „Repolarisationsreserve“ dienen (Varro et al., 2000).

Durch diese Funktion von I_{Ks} als „Repolarisationsreserve“ können kritische Aktionspotentialverlängerungen, die frühe Nachdepolarisationen oder torsade de pointes Tachykardien zur Folge haben können, verhindert werden. Störungen

dieses System, beispielsweise durch Mutationen in KCNQ1 (LQT1), können so zum Long QT-Syndrom mit Rhythmusstörungen bis hin zum plötzlichem Herztod führen, die charakteristischerweise in Situationen erhöhter sympathischer Aktivierung, wie z. B. Schreck oder Kontakt mit kaltem Wasser, auftreten (siehe auch 4.7).

Bei höheren Herz- bzw. Stimulationsfrequenzen kommt es zur Akkumulation von I_{Ks} mit höheren Stromdichten und somit zur Verkürzung der Aktionspotentialdauer, was ebenfalls zur Stabilisierung der Repolarisation beiträgt (Lu et al., 2001). So fehlt in Patienten mit I_{Ks}-Mutationen (LQT1) charakteristischerweise die physiologische QT-Intervall-Verkürzung bei Belastung (Swan et al., 1999).

Für eine untergeordnete Bedeutung von I_{Ks} bei der Repolarisation unter Ruhebedingungen im menschlichen Herz spricht auch die Tatsache, dass sich nur in ca. 25% der Patienten mit KCNQ1-Mutationen in Ruhe QT-Verlängerungen nachweisen lassen. Trotzdem besteht bei Patienten mit solchen Veränderungen eine große Gefahr für Rhythmusstörungen, die durch Medikamente oder adrenerge Stimuli getriggert werden können (Priori et al., 1999; Swan et al., 1998).

4.7 Klinische Relevanz

Das angeborene Long QT-Syndrom stellt als Ionenkanalmutation eine sehr seltene Erkrankung dar, der in einem Großteil der Fälle Mutationen in delayed rectifier Kaliumkanälen zugrunde liegen. Viel häufiger treten, meist medikamentös bedingt, erworbene Long QT-Syndrome auf, die gleichermaßen Rhythmusstörungen bis hin zum plötzlichen Herztod verursachen. Auch für das erworbene Long QT-Syndrom scheint überwiegend eine Störung der beiden delayed rectifier Kaliumkanäle I_{Kr} und I_{Ks} verantwortlich zu sein.

Beim angeborenen Long QT-Syndrom sind Mutationen ihrer α- und β-Untereinheiten ursächlich für potentiell tödliche Rhythmusstörungen. Am häufigsten sind Mutationen in den α-Untereinheiten von I_{Kr} (LQT1) und

I_{Ks}(LQT2), sowie in der von I_{Na} SCN5A (LQT3) (Priori et al., 2003). Auch wenn I_{Ks} unter Ruhebedingungen in humanem Myokard nur eine sehr kleine, kaum messbare Stromdichte aufweist, scheint er doch für die Repolarisation unter bestimmten Bedingungen essentiell zu sein, da zum Funktionsverlust führende Mutationen von I_{Ks} lebensbedrohlicher Arrhythmien auslösen können. Auch Mutationen der Kaliumkanal β-Untereinheiten KCNE1 (LQT5) und KCNE2 (LQT6) können ursächlich für ein Long QT-Syndrom sein, was deren Bedeutung als Interaktionspartner von Kaliumkanälen belegt.

Beim erworbenen Long QT-Syndrom handelt es sich dagegen um eine relativ häufige, multifaktorielle Erkrankung. Auslöser ist in der Regel ein repolarisationsverzögerndes Medikament, das in einem Großteil der Fälle über eine I_{Kr}-Blockade zur QT-Verlängerung führt. Diese lässt sich durch die besondere molekulare Struktur der intrazellulären Porenregion des KCNH2 Kanals erklären, die ihn empfindlich gegenüber einer Reihe strukturell untereinander wenig verwandter kleiner Proteine (z.B. Terfenadine und Cisapride) macht (Mitcheson et al., 2000).

Die QT-Verlängerung kann als gewünschte Wirkung (Antiarrhythmika wie Amiodaron oder Dofetilide) oder als Nebenwirkung nicht-kardialer Pharmaka (wie Haloperidol, Erythromycin, und viele mehr) zustande kommen, birgt aber in jedem Fall die Gefahr von Rhythmusstörungen. Daher dürfen Arzneimittel mit besonders hohem QT-verlängerndem Potential nur unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen angewandt werden (Abbildung 36).

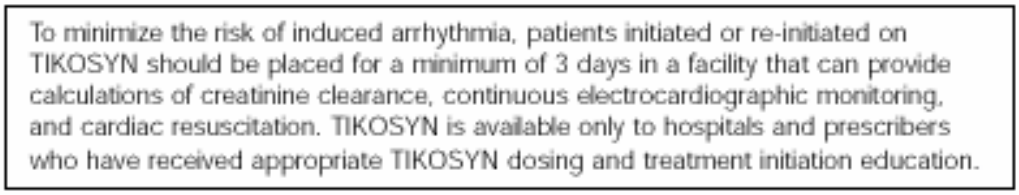

To minimize the risk of induced arrhythmia, patients initiated or re-initiated on TIKOSYN should be placed for a minimum of 3 days in a facility that can provide calculations of creatinine clearance, continuous electrocardiographic monitoring, and cardiac resuscitation. TIKOSYN is available only to hospitals and prescribers who have received appropriate TIKOSYN dosing and treatment initiation education.

Abbildung 36

Der I_{Kr}-Blocker Dofetilide, der in den USA unter dem Handelsnamen Tikosyn zur Behandlung des Vorhofflimmerns eingesetzt wird, darf nur von besonders geschulten Zentren unter engmaschigem Monitoring des Patienten eingesetzt werden. Darauf weist auch die „Boxed warning“ auf der Verpackung hin.

Besonders kritisch ist die Kombinationstherapie mit mehreren Pharmaka zu sehen, bei der es zur Akkumulation eines I_{Kr}-blockierenden Wirkstoffes kommen kann. Dabei kommt es entweder zu einem additiven Effekt mehrerer Pharmaka mit blockierender Wirkung auf den I_{Kr}-Kanal, oder aber die Kombinationstherapie beeinflusst die Metabolisierung des I_{Kr}-blockierenden Pharmakons, z.B. über Zytochrom P450, und führt zu dessen Akkumulation. Die resultierende QT-Verlängerung kann lokale Gradienten der Ionenkanäle unterschiedlich beeinflussen und über eine regionale Dispersion der Repolarisation ein arrhythmogenes Substrat entstehen lassen.

Weitere Faktoren, die die Entstehung des medikamentös induzierten Long QT-Syndroms begünstigen, sind Begleiterkrankungen wie Niereninsuffizienz oder Störungen des Elektrolythaushalts, die zur Akkumulation der Pharmaka oder zu Störungen der Kanalfunktion führen könnten. Wie bereits im heterologen Expressionssystemen und im Tiermodell in der Literatur beschrieben und in dieser Untersuchung erstmals an humanen Kardiomyozyten gezeigt (3.1.3.3), ist die Funktion I_{Kr} von der extrazellulären Kaliumkonzentration abhängig; dabei erfolgt die Regulation dem treibenden elektrochemischen Gradienten entgegengesetzt: Eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration bewirkt eine Steigerung von I_{Kr} (Kiehn et al., 1996; Sanguinetti und Jurkiewicz, 1992; Yang et al., 1997a; Yang und Roden, 1996). Diese Beobachtung korreliert gut mit der klinischen Erfahrung, dass hoch-normale Serumkaliumspiegel rhythmusstabilisierend wirken.

Die so genannte Repolarisationsreserve, also das Potential an verfügbaren repolarisierenden Kanälen, die bei einer Aktionspotential-Verlängerung aktiv werden, scheint die Empfindlichkeit eines Patienten gegenüber pharmakologischer Inhibition von delayed rectifier Kaliumkanälen zu determinieren. Es existieren pharmakologische Provokationstests, mit deren Hilfe die Repolarisationsreserve von Patienten bestimmt werden soll, um Patienten mit hohem Risiko für ein erworbenes Long QT-Syndrom zu identifizieren. Patienten mit reduzierter Repolarisationsreserve zeigen bei

pharmakologischer Blockade von I_{Kr} durch d,l-Sotalol eine übermäßige Verlängerung des QT-Intervalls (Kääb et al., 2003).

Hier ist davon auszugehen, dass unter Bedingungen der pharmakologischen Blockade von I_{Kr} die Repolarisation wesentlich von I_{Ks} als Reservemechanismus mitgetragen werden muss. Unter Berücksichtigung des dualen Repolarisationsmechanismus im Ventikelmyokard kommen für die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber pharmakologischer Blockade von I_{Kr} auf myokardialer Ebene zwei prinzipielle Mechanismen in Betracht:

1) Eine erhöhte Sensitivität von I_{Kr} gegenüber dem Pharmakon mit einer höheren Fraktion an blockierten Kanälen bei gleichen Konzentrationen, zum Beispiel durch Mutationen oder Polymorphismen der I_{Kr}-bildenden Untereinheiten.

2) Ein reduzierter funktioneller Beitrag von I_{Ks} zur Repolarisation im Sinne einer erhöhten Bedeutung von I_{Kr} für die Repolarisation mit fehlender Kompensationsmöglichkeit einer pharmakologischen Störung von I_{Kr} durch I_{Ks}, oder eine Störung der Aktivierungsmechanismen von I_{Ks}.

Somit werden aus dem dualen Repolarisationsmechanismus in humanem Ventikelmyokard klinische Konstellationen mit Neigung zu Rhythmusstörungen verständlich. Die individuellen Unterschiede in der relativen Bedeutung der beiden delayed rectifier Kanäle und eine eventuell mutations- oder polymorphismusbedingte erhöhte Sensitivität gegenüber Pharmaka von I_{Kr} sind für die große Variationsbreite der Repolarisationsverlängerung I_{Kr}-blockierender Medikamente von entscheidender Bedeutung (Abbott et al., 1999; Roden, 2001; Roden und Spooner, 1999).

5 Zusammenfassung

Ventrikuläre Tachyarrhythmien sind die Hauptursachen für den plötzlichen Herztod, der eine bedeutende Todesursache in der westlichen Welt darstellt. Dabei sind, neben strukturellen Veränderungen im Myokard wie Narben, Hypertrophie oder Ventrikeldilatation, elektrophysiologische Veränderungen der Repolarisationsphase ursächlich. Für die Repolarisation essentielle Kanäle sind die delayed rectifier Kaliumkanäle I_{Kr} und I_{Ks}; Mutationen in diesen Kanälen sind ursächlich für das angeborene Long QT-Syndrom, das mit lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen assoziiert ist. Pharmakologische Wirkungen und Nebenwirkungen auf die repolarisierenden Kaliumkanäle können ebenfalls Herzrhythmusstörungen auslösen; man spricht dabei vom erworbenen oder Medikamenten-induzierten Long QT-Syndrom.

Auch bei Herzinsuffizienz zum Beispiel aufgrund einer dilatativen Kardiomyopathie wird oft eine QT-Zeit Verlängerung und Rhythmusstörungen beobachtet. Dabei ist die Herunterregulation von Kaliumkanälen wie I_{to} ein oft beobachtetes Phänomen; in tierexperimentellen Untersuchungen wird teilweise auch eine Reduktion von I_{Kr} und I_{Ks} beschrieben.

Für viele Ionenkanäle sind Unterschiede in der transmuralen Verteilung bekannt, so dass die Messung der delayed rectifier Kaliumkanäle in vorliegender Untersuchung getrennt nach subepikardialen, mittleren und subendokardialen Arealen des linksventrikulären Myokards durchgeführt wurde.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit ist der Vergleich der Repolarisation in verschiedenen Spezies, was bei der Interpretation von tierexperimentell gewonnenen Ergebnissen von großer Bedeutung ist. Dazu wurden I_{Kr} und I_{Ks} in verschiedenen Tiermodellen (Meerschweinchen, Schwein und Hund) unter Berücksichtigung der transmuralen Verteilung gemessen und mit den aus humanem Myokard gewonnenen Ergebnissen verglichen.

Die porenbildenden α-Untereinheiten von I_{Kr} und I_{Ks}, KCNH2 und KCNQ1, wurden im heterologen Zellsystem exprimiert und deren Sensitivität auf I_{Kr} bzw. I_{Ks} spezifische Kanalblocker überprüft.

Methodisch wurde für oben genannte Fragestellungen die patch clamp Technik in Ganzzellkonfiguration verwendet; zur Aufzeichnung von Aktionspotentialen und zum Nachweis von I_{Ks} in humanem Myokard wurde die perforated patch Methode verwendet, um eine Veränderung des intrazellulären Milieus mit Dialyse von Botenstoffen zu vermeiden.

Auf molekularbiologischer Ebene wurde die mRNA-Menge der I_{Kr} und I_{Ks} α-Untereinheiten KCNH2 und KCNQ1, sowie deren (potentielle) β-Untereinheiten KCNE1 und KCNE2 mit Hilfe der quantitativen real-time PCR bestimmt.

Dabei konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

- I_{Kr} ließ sich im Menschen in allen Zellen in relevanter Größe nachweisen; der Strom ließ sich sowohl durch den spezifischen I_{Kr}-Blocker Dofetilide, aber auch durch Pharmaka aus nicht-kardiologischen Anwendungsgebieten wie das Neuroleptikum Haloperidol inhibieren. Dabei wies der Kanal eine Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration auf, die sich umgekehrt zum elektrochemischen Gradienten verhielt: höhere extrazelluläre Kaliumkonzentrationen bewirkten eine Steigerung von I_{Kr}.
- I_{Ks} (definiert als HMR 1556 sensitiver Strom) ließ sich in humanem Myokard nur unter speziell optimierten Bedingungen (perforated patch Technik, adrenerge Stimulation mit Isoproterenol) nachweisen. Er hatte dann eine sehr kleine Stromdichte, die eine weitere elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung nicht erlaubte.
- In Meerschwein, Schwein und Hund war I_{Kr} und I_{Ks} nachweisbar; dabei hatte das Meerschweinchen die höchsten Stromdichten von delayed rectifier Kaliumkanälen, das Schwein kleinere, aber robuste I_{Kr} und I_{Ks}-Ströme. Beim Hund fanden sich deutlich geringere Stromdichten für I_{Kr} und I_{Ks}; I_{Ks} war nicht in allen Zellen nachweisbar.
- I_{Kr} wies in allen Spezies epikardial eine kleinere Stromdichte auf als in mittleren und endokardialen Arealen.

- Dieser transmurale Gradient mit geringerer Stromdichte in epikardialen Arealen war nur in nicht-insuffizienten humanen Herzen nachweisbar; bei Herzinsuffizienz kam es zur Angleichung der Stromdichten in allen drei untersuchten Schichten.
- KCNH2 und KCNQ1 generierten im heterologen Zellsystem I_{Kr} bzw. I_{Ks} ähnliche Ströme, die jeweils typische Sensitivität für I_{Kr} bzw. I_{Ks} Blocker aufwiesen.
- Für KCNH2 und KCNQ1 mRNA waren keine transmuralen Gradienten und keine Regulation bei Herzinsuffizienz nachweisbar; KCNE1 und KCNE2 zeigten bei Herzinsuffizienz höhere Expressionslevel.

Somit ließ sich das Vorhandensein und die Bedeutung von I_{Kr} und I_{Ks} in humanem Myokard belegen, wobei I_{Ks} nur in sehr geringer – in Ruhe gerade noch nachweisbarer – Stromdichte vorkommt. Dennoch lässt sich seine Bedeutung am Vorhandensein von Mutationen in KCNQ1, die lebensbedrohliche Rhythmusstörungen verursachen können, ablesen. Auch für KCNH2, das für die α-Untereinheit von I_{Kr} kodiert, sowie für die (potentiellen) β-Untereinheiten KCNE1 und KCNE2 sind Mutationen beschrieben, die ursächlich für das angeborene Long QT-Syndrom sind. Damit scheinen I_{Kr} und I_{Ks} für die Repolarisation des humanen Aktionspotentials essentiell zu sein, wobei I_{Kr} aufgrund der relativ großen Stromdichte die wesentliche Rolle bei der Repolarisation des Aktionspotenials in humanem Myokard zukommt. I_{Ks} hat große Bedeutung als „Repolarisationsreserve“ zur Stabilisierung der Repolarisation unter Bedingungen erhöhter Katecholaminspiegel, bei tachykarden Herzfrequenzen und bei verzögerter Repolarisation wie durch Hypokaliämie, I_{Kr}-Blocker oder I_{Kr}-Mutationen und Polymorphismen. Mutationen in Proteinuntereinheiten von I_{Ks} können zur Störung dieser Repolarisationsreserve führen und somit Rhythmusstörungen auslösen, die charakteristischerweise in Situationen erhöhter sympathischer Aktivierung auftreten.

Die Ausstattung der unterschiedlichen Spezies mit repolarisierenden Kaliumströmen wies erhebliche Unterscheide auf, was bei der Interpretation

tierexperimentell gewonnener Daten zu berücksichtigen ist. Insbesondere korreliert eine Abnahme der Ruheherzfrequenz der Spezies mit einer deutlichen Reduktion der repolarisierenden Ströme entsprechend dem Konzept der speziesabhängigen Variabilität der repolarisierenden bei Konstanz der depolarisierenden Ströme (I_{Na} und I_{Ca}).

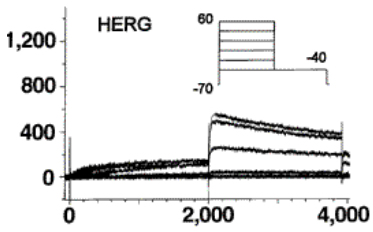
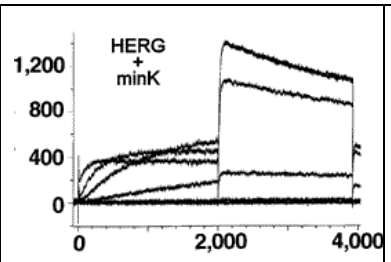
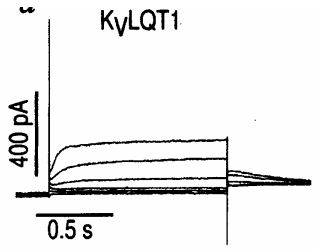
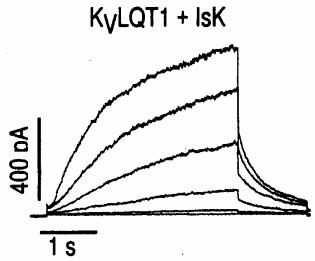
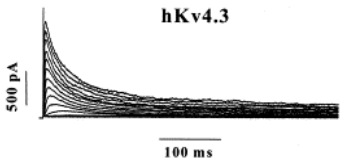
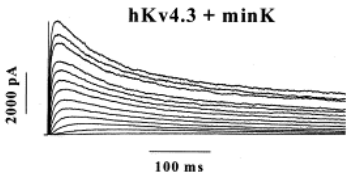
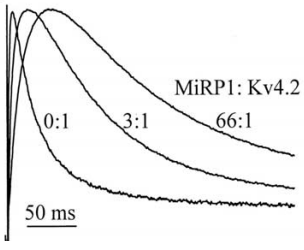
Transmurale Unterschiede in der Expression von Ionenkanälen scheinen notwendig für den Ablauf der Erregungsbildung und Erregungsrückbildung zu sein. Die epikardial geringeren Stromdichten für I_{Kr} waren in allen untersuchten Spezies nachweisbar. Die Beobachtung einer geringeren Stromdichte der repolarisierenden Kaliumströme epikardial bedeutet, dass andere Ionenkanäle als I_{Kr} und I_{Ks} für die dort kürzere Aktionspotentialdauer verantwortlich sein müsssen.

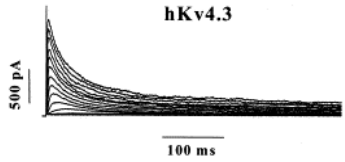
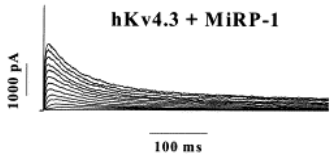
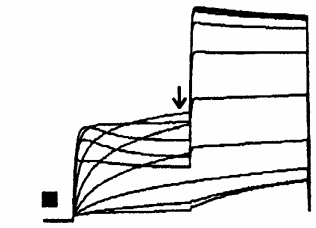
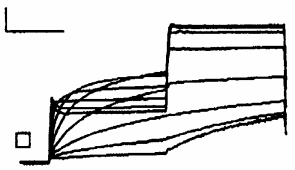
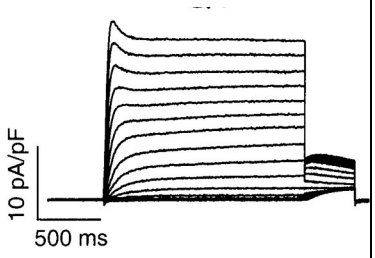
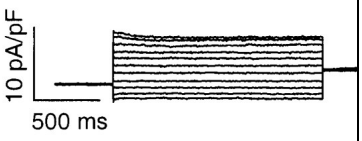
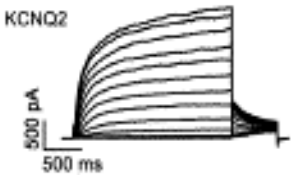
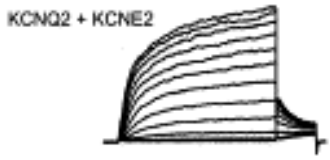
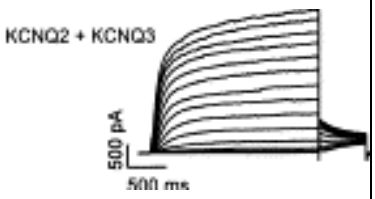
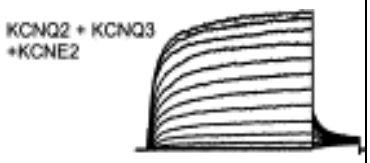
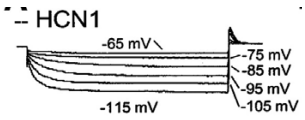
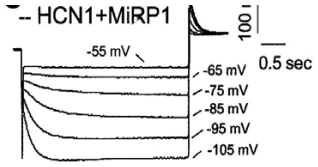
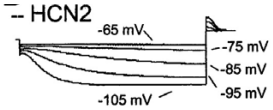
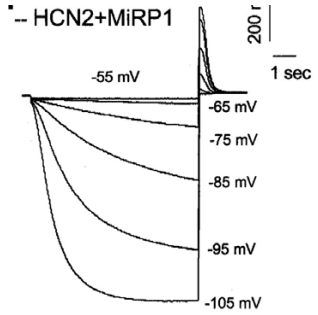
Eine Reduktion der Stromdichte bei Herzinsuffizienz, wie sie beispielsweise für I_{to} beschrieben ist, konnte für I_{Kr} nicht nachgewiesen werden. Jedoch fand sich eine Nivellierung des physiologischerweise Vorhandenen transmuralen Gradienten, was grundsätzlich zu einer Störung des physiologischen Erregungsablaufes mit Begünstigung von Rhythmusstörungen in insuffizienten Herzen beitragen könnte.

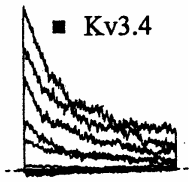
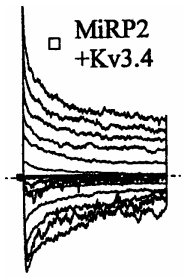
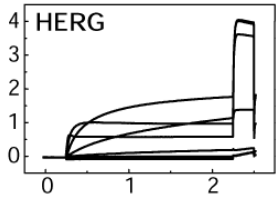
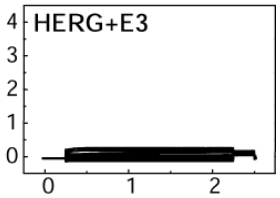
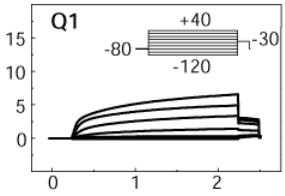
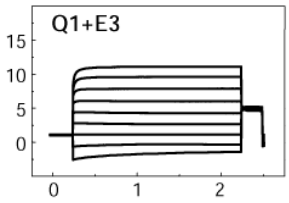
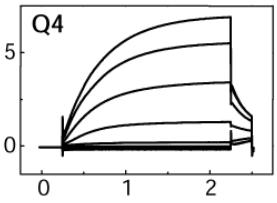
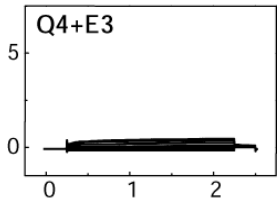
Aus dem dualen Repolarisationsmechanismus im menschlichen Ventikelmyokard werden klinische Konstellationen mit Rhythmusstörungen verständlich, insbesondere in Hinblick auf die Variabilität der Empfindlichkeit gegenüber Medikamenten mit blockierender Wirkung auf I_{Kr}. Dabei stellt I_{Ks} in unterschiedlichem Maße eine Kompensation im Sinne einer Repolarisationsreserve bereit.

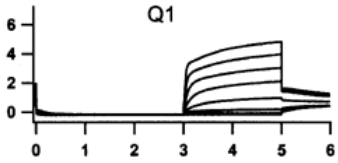
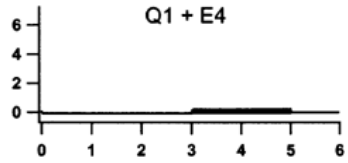
6 Anhang

6.1 Interaktionen der KCNE1-5 β-Untereinheiten mit Kaliumkanal α-Untereinheiten

β-Unter-einheit	α-Unter-einheit	Strom α-Untereinheit	Strom α- und β-Untereinheit	Quelle
KCNE1	KCNH2			(McDonald et al., 1997)
	KCNQ1			(Attali et al., 1993; Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996)
	KCND3			(Deschenes und Tomaselli, 2002)
KCNE2	KCND2			(Zhang et al., 2001)

KCNE2	KCND3			(Deschenes und Tomaselli, 2002; Zhang et al., 2001)
	KCNH2			(Abbott et al., 1999)
	KCNQ1			(Tinel et al., 2000a)
	KCNQ2			(Tinel et al., 2000b)
	KCNQ3			(Tinel et al., 2000b)
	HCN1			(Yu et al., 2001)
	HCN2			(Yu et al., 2001)

KCNE3	Kv3.4			(Abbott et al., 2001)
	KCNH2			(Schroeder et al., 2000)
	KCNQ1			(Schroeder et al., 2000)
	KCNQ4			(Schroeder et al., 2000)

KCNE4	KCNQ1			(Grunnet et al., 2002; Teng et al., 2003)

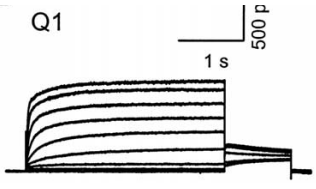
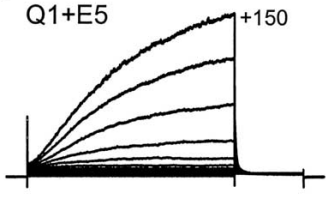
KCNE5	KCNQ1			(Angelo et al., 2002)

Tabelle 13

Interaktionen der KCNE1-5 β-Untereinheiten mit Kaliumkanal α-Untereinheiten. KCNE1, KCNE2, KCNE4 und KCNE5 konnten in humanem Myokard nachgewiesen werden. Die Zeit ist – wenn nicht anders angegeben – in Sekunden, der Strom in pA aufgetragen.

7 Literatur

1. Abbott GW, Butler MH, Bendahhou S, Dalakas MC, Ptacek LJ and Goldstein SA (2001) MiRP2 forms potassium channels in skeletal muscle with Kv3.4 and is associated with periodic paralysis. *Cell* **104**:217-231.

2. Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT and Goldstein SA (1999) MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* **97**:175-187.

3. Ahmmed GU, Dong PH, Song G, Ball NA, Xu Y, Walsh RA and Chiamvimonvat N (2000) Changes in Ca(2+) cycling proteins underlie cardiac action potential prolongation in a pressure-overloaded guinea pig model with cardiac hypertrophy and failure. *Circ.Res.* **86**:558-570.

4. Ali RH, Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, Benhorin J, Vincent GM, Locati EH, Priori S, Napolitano C, Towbin JA, Hall WJ, Robinson JL, Andrews ML, Zhang L, Timothy K and Medina A (2000) Clinical and genetic variables associated with acute arousal and nonarousal-related cardiac events among subjects with long QT syndrome. *Am.J.Cardiol.* **85**:457-461.

5. Angelo K, Jespersen T, Grunnet M, Nielsen MS, Klaerke DA and Olesen SP (2002) KCNE5 induces time- and voltage-dependent modulation of the KCNQ1 current. *Biophys.J.* **83**:1997-2006.

6. Antzelevitch C and Fish J (2001) Electrical heterogeneity within the ventricular wall. *Basic Res.Cardiol.* **96**:517-527.

7. Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH, Lukas A, Krishnan SC, Di Diego JM, Gintant GA and Liu DW (1991) Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ.Res.* **69**:1427-1449.

8. Attali B, Guillemare E, Lesage F, Honore E, Romey G, Lazdunski M and Barhanin J (1993) The protein IsK is a dual activator of K+ and Cl- channels. *Nature* **365**:850-852.

9. Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M and Romey G (1996) K(V)LQT1 and lsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* **384**:78-80.

10. Barth, A. (2001) Heterogenität der Repolarisation im menschlichen ventrikulären Myokard: Nachweis zweier kalziumunabhängiger Kaliumauswärtsströme mit inverser transmuraler Verteilung. Ludwig Maximilians Universität München. Thesis/Dissertation.

11. Barth, A., Zwermann, L., Hinterseer, M, Wahl, C., Näbauer, M. and Kääb, S. (2002) Elektrophysiologische und pharmakologische Unterschiede des kalziumunabhängigen transienten Auswärtsstromes (Ito1) im Subepikard und Subendokard des Hundes und des Menschen. Z.Kardiol. 91(Supp 13). Abstract.

12. Berger RD, Kasper EK, Baughman KL, Marban E, Calkins H and Tomaselli GF (1997) Beat-to-beat QT interval variability: novel evidence for repolarization lability in ischemic and nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circulation* **96**:1557-1565.

13. Beuckelmann DJ, Näbauer M and Erdmann E (1993) Alterations of K+ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ.Res.* **73**:379-385.

14. Bosch RF, Gaspo R, Busch AE, Lang HJ, Li GR and Nattel S (1998) Effects of the chromanol 293B, a selective blocker of the slow, component of the delayed rectifier K+ current, on repolarization in human and guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc.Res.* **38**:441-450.

15. Bryant SM, Wan X, Shipsey SJ and Hart G (1998) Regional differences in the delayed rectifier current (IKr and IKs) contribute to the differences in action potential duration in basal left ventricular myocytes in guinea-pig. *Cardiovasc.Res.* **40**:322-331.

16. Burashnikov A and Antzelevitch C (2000) Block of I(Ks) does not induce early afterdepolarization activity but promotes beta-adrenergic agonist-induced delayed afterdepolarization activity. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* **11**:458-465.

17. Busch AE, Suessbrich H, Waldegger S, Sailer E, Greger R, Lang H, Lang F, Gibson KJ and Maylie JG (1996) Inhibition of IKs in guinea pig cardiac myocytes and guinea pig IsK channels by the chromanol 293B. *Pflugers Arch.* **432**:1094-1096.

18. Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.* **25**:169-193.

19. Camm AJ, Janse MJ, Roden DM, Rosen MR, Cinca J and Cobbe SM (2000) Congenital and acquired long QT syndrome. *Eur.Heart J.* **21**:1232-1237.

20. Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY, Jin HW, Sun H, Su XY, Zhuang QN, Yang YQ, Li YB, Liu Y, Xu HJ, Li XF, Ma N, Mou CP, Chen Z, Barhanin J and Huang W (2003) KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* **299**:251-254.

21. Chinn K (1993) Two delayed rectifiers in guinea pig ventricular myocytes distinguished by tail current kinetics. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **264**:553-560.

22. Cohn JN, Johnson G, Ziesche S, Cobb F, Francis G, Tristani F, Smith R, Dunkman WB, Loeb H, Wong M and . (1991) A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *N.Engl.J.Med.* **325**:303-310.

23. Crumb W and Cavero I (1999) QT interval prolongation by non-cardiovascular drugs: issues and solutions for novel drug development. *Pharmaceut.Sci.Technol.* **2**:270-280.

24. Daleau P, Khalifa M and Turgeon J (1997) Effects of cadmium and nisoldipine on the delayed rectifier potassium current in guinea pig ventricular myocytes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **281**:826-833.

25. Demolombe S, Baro I, Pereon Y, Bliek J, Mohammad-Panah R, Pollard H, Morid S, Mannens M, Wilde A, Barhanin J, Charpentier F and Escande D (1998) A dominant negative isoform of the long QT syndrome 1 gene product. *J.Biol.Chem.* **273**:6837-6843.

26. Deschenes I and Tomaselli GF (2002) Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Letters* **528**:183-188.

27. Ehrlich JR, Pourrier M, Weerapura M, Ethier N, Marmabachi AM, Hebert TE and Nattel S (2004) KvLQT1 modulates the distribution and biophysical properties of HERG. A novel alpha-subunit interaction between delayed rectifier currents. *J.Biol.Chem.* **279**:1233-1241.

28. Embark HM, Bohmer C, Vallon V, Luft F and Lang F (2003) Regulation of KCNE1-dependent K(+) current by the serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) isoforms. *Pflugers Arch.* **445**:601-606.

29. Eriksson H (1995) Heart failure: a growing public health problem. *J.Intern.Med.* **237**:135-141.

30. Fu GS, Meissner A and Simon R (1997) Repolarization dispersion and sudden cardiac death in patients with impaired left ventricular function. *Eur.Heart J.* **18**:281-289.

31. Furukawa T, Myerburg RJ, Furukawa N, Kimura S and Bassett AL (1994) Metabolic inhibition of ICa,L and IK differs in feline left ventricular hypertrophy. *Am.J.Physiol* **266**:H1121-H1131.

32. Gillis AM, Geonzon RA, Mathison HJ, Kulisz E, Lester WM and Duff HJ (1998) The effects of barium, dofetilide and 4-aminopyridine (4-AP) on ventricular repolarization in normal and hypertrophied rabbit heart. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **285**:262-270.

33. Gintant GA (1995) Regional differences in IK density in canine left ventricle: role of IK,s in electrical heterogeneity. *Am.J.Physiol* **268**:H604-H613.

34. Gogelein H, Bruggemann A, Gerlach U, Brendel J and Busch AE (2000) Inhibition of IKs channels by HMR 1556. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **362**:480-488.

35. Grunnet M, Jespersen T, MacAulay N, Jorgensen NK, Schmitt N, Pongs O, Olesen SP and Klaerke D (2003) KCNQ1 channels sense small changes in cell volume. *J.Physiol*.

36. Grunnet M, Jespersen T, Rasmussen HB, Ljungstrom T, Jorgensen NK, Olesen SP and Klaerke DA (2002) KCNE4 is an inhibitory subunit to the KCNQ1 channel. *J.Physiol* **542**:119-130.

37. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391**:85-100.

38. Han W, Wang Z and Nattel S (2001) Slow delayed rectifier current and repolarization in canine cardiac Purkinje cells. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **280**:H1075-H1080.

39. Hulme JT, Scheuer T and Catterall WA (2004) Regulation of cardiac ion channels by signaling complexes: role of modified leucine zipper motifs. *J.Mol.Cell Cardiol.* **37**:625-631.

40. Iost N, Virag L, Opincariu M, Szecsi J, Varro A and Papp JG (1998) Delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. *Cardiovasc.Res.* **40**:508-515.

41. Jiang M, Cabo C, Yao J, Boyden PA and Tseng G (2000) Delayed rectifier K currents have reduced amplitudes and altered kinetics in myocytes from infarcted canine ventricle. *Cardiovasc.Res.* **48**:34-43.

42. Jiang M, Tseng-Crank J and Tseng GN (1997) Suppression of slow delayed rectifier current by a truncated isoform of KvLQT1 cloned from normal human heart. *J.Biol.Chem.* **272**:24109-24112.

43. Kääb S, Hinterseer M, Näbauer M and Steinbeck G (2003) Sotalol testing unmasks altered repolarization in patients with suspected acquired long-QT-syndrome-a case-control pilot study using i.v. sotalol. *Eur.Heart J.* **24**:649-657.

44. Kääb S and Näbauer M (2001) Diversity of ion channel expression in health and disease. *Eur.Heart J.Supplements* **3**:K31-K40.

45. Kääb S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA, Marban E and Tomaselli GF (1996) Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ.Res.* **78**:262-273.

46. Kapiloff MS (2002) Contributions of protein kinase A anchoring proteins to compartmentation of cAMP signaling in the heart. *Mol.Pharmacol.* **62**:193-199.

47. Keating MT and Sanguinetti MC (1996) Molecular genetic insights into cardiovascular disease. *Science* **272**:681-685.

48. Keating MT and Sanguinetti MC (2001) Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* **104**:569-580.

49. Kiehn J, Lacerda AE, Wible B and Brown AM (1996) Molecular physiology and pharmacology of HERG. Single-channel currents and block by dofetilide. *Circulation* **94**:2572-2579.

50. Kleiman RB and Houser SR (1989) Outward currents in normal and hypertrophied feline ventricular myocytes. *Am.J.Physiol* **256**:H1450-H1461.

51. Kupershmidt S, Yang IC, Sutherland M, Wells KS, Yang T, Yang P, Balser JR and Roden DM (2002) Cardiac-enriched LIM domain protein fhl2 is required to generate I(Ks) in a heterologous system. *Cardiovasc.Res.* **56**:93-103.

52. Kurokawa J, Chen L and Kass RS (2003) Requirement of subunit expression for cAMP-mediated regulation of a heart potassium channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**:2122-2127.

53. Lacroix D, Gluais P, Marquie C, D'Hoinne C, Adamantidis M and Bastide M (2002) Repolarization abnormalities and their arrhythmogenic consequences in porcine tachycardia-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc.Res.* **54**:42-50.

54. Lee LG, Connell CR and Bloch W (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* **21**:3761-3766.

55. Lesage F, Attali B, Lakey J, Honore E, Romey G, Faurobert E, Lazdunski M and Barhanin J (1993) Are Xenopus oocytes unique in displaying functional IsK channel heterologous expression? *Receptors.Channels* **1**:143-152.

56. Li D, Melnyk P, Feng J, Wang Z, Petrecca K, Shrier A and Nattel S (2000) Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation* **101**:2631-2638.

57. Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M and Nattel S (1996) Evidence for two components of delayed rectifier K+ current in human ventricular myocytes. *Circ.Res.* **78**:689-696.

58. Li GR, Lau CP, Ducharme A, Tardif JC and Nattel S (2002) Transmural action potential and ionic current remodeling in ventricles of failing canine hearts. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **283**:H1031-H1041.

59. Li, G. R., Sun, H., Feng, J. and Nattel, S. (1998) Ionic mecanisms of the action potential prolongation in failing human ventricular cells. Pace 21, 877. Abstract.

60. Liu DW and Antzelevitch C (1995) Characteristics of the delayed rectifier current (IKr and IKs) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker IKs contributes to the longer action potential of the M cell. *Circ.Res.* **76**:351-365.

61. Lodge NJ and Normandin DE (1997) Alterations in Ito1, IKr and Ik1 density in the BIO TO-2 strain of syrian myopathic hamsters. *J.Mol.Cell Cardiol.* **29**:3211-3221.

62. Lu Z, Kamiya K, Opthof T, Yasui K and Kodama I (2001) Density and kinetics of I(Kr) and I(Ks) in guinea pig and rabbit ventricular myocytes explain different efficacy of I(Ks) blockade at high heart rate in guinea pig and rabbit: implications for arrhythmogenesis in humans. *Circulation* **104**:951-956.

63. Marban E (2002) Cardiac channelopathies. *Nature* **415**:213-218.

64. Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR and Kass RS (2002) Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* **295**:496-499.

65. McDonald TV, Yu Z, Ming Z, Palma E, Meyers MB, Wang KW, Goldstein SA and Fishman GI (1997) A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I(Kr). *Nature* **388**:289-292.

66. Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C and Sanguinetti MC (2000) A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:12329-12333.

67. Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, Haurogne K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Le Marec H and Bennett V (2003) Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* **421**:634-639.

68. Moss AJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Locati E and Carleen E (1985) The long QT syndrome: a prospective international study. *Circulation* **71**:17-21.

69. Myerburg RJ, Kessler KM and Castellanos A (1992) Sudden cardiac death. Structure, function, and time-dependence of risk. *Circulation* **85**:I2-10.

70. Näbauer, M., Barth, A. and Kääb, S. (1997) Repolarization in pig left ventricle: Absence of a relevant Ito1 and control by IKr and IKs. Circulation 96(I), 500. Abstract.

71. Näbauer M, Beuckelmann DJ and Erdmann E (1993) Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ.Res.* **73**:386-394.

72. Näbauer M, Beuckelmann DJ, Überfuhr P and Steinbeck G (1996) Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* **93**:168-177.

73. Nakajima I, Watanabe H, Iino K, Saito T and Miura M (2002) Ca2+ overload evokes a transient outward current in guinea-pig ventricular myocytes. *Circ.J.* **66**:87-92.

74. Neher E and Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**:799-802.

75. Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C and Backx PH (2001) The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I(to)) in normal and diseased myocardium. *J.Mol.Cell Cardiol.* **33**:851-872.

76. Pak PH, Nuss HB, Tunin RS, Kääb S, Tomaselli GF, Marban E and Kass DA (1997) Repolarization abnormalities, arrhythmia and sudden death in canine tachycardia-induced cardiomyopathy. *J.Am.Coll.Cardiol.* **30**:576-584.

77. Pereon Y, Demolombe S, Baro I, Drouin E, Charpentier F and Escande D (2000) Differential expression of KvLQT1 isoforms across the human ventricular wall. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **278**:H1908-H1915.

78. Piccini M, Vitelli F, Seri M, Galietta LJ, Moran O, Bulfone A, Banfi S, Pober B and Renieri A (1999) KCNE1-like gene is deleted in AMME contiguous gene syndrome: identification and characterization of the human and mouse homologs. *Genomics* **60**:251-257.

79. Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canun S, Bendahhou S, Tsunoda A, Donaldson MR, Iannaccone ST, Brunt E, Barohn R, Clark J, Deymeer F, George AL, Jr., Fish FA, Hahn A, Nitu A, Ozdemir C, Serdaroglu P, Subramony SH, Wolfe G, Fu YH and Ptacek LJ (2001) Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* **105**:511-519.

80. Priori SG, Aliot E, Blomstrom-Lundqvist C, Bossaert L, Breithardt G, Brugada P, Camm AJ, Cappato R, Cobbe SM and Di Mario C (2001) Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal* **22**:1374-1450.

81. Priori SG, Napolitano C and Schwartz PJ (1999) Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation* **99**:529-533.

82. Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M, Vicentini A, Spazzolini C, Nastoli J, Bottelli G, Folli R and Cappelletti D (2003) Risk Stratification in the Long-QT Syndrome. *N.Engl.J.Med.* **348**:1866-1874.

83. Rae J, Cooper K, Gates P and Watsky M (1991) Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J.Neurosci.Methods* **37**:15-26.

84. Ramakers C, Doevedans PA, Vos MA and Antzelevitch C (2000) KCNQ1 and KCNE1 expression is reduced in dogs with chronic AV block. *Biophys.J.* **78**:220A.

85. Ramakers C, Vos MA, Doevendans PA, Schoenmakers M, Wu YS, Scicchitano S, Iodice A, Thomas GP, Antzelevitch C and Dumaine R (2003) Coordinated down-regulation of KCNQ1 and KCNE1 expression contributes to reduction of I(Ks) in canine hypertrophied hearts. *Cardiovasc.Res.* **57**:486-496.

86. Rasmussen HS, Allen MJ, Blackburn KJ, Butrous GS and Dalrymple HW (1992) Dofetilide, a novel class III antiarrhythmic agent. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **20 Suppl 2**:S96-105.

87. Roden DM (2001) Pharmacogenetics and drug-induced arrhythmias. *Cardiovasc.Res.* **50**:224-231.

88. Roden DM, Lazzara R, Rosen M, Schwartz PJ, Towbin J and Vincent GM (1996) Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. The SADS Foundation Task Force on LQTS. *Circulation* **94**:1996-2012.

89. Roden DM and Spooner PM (1999) Inherited long QT syndromes: a paradigm for understanding arrhythmogenesis. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* **10**:1664-1683.

90. Rose J, Zheng MQ, Juang G, Kong W, O'Rourke B and Tomaselli GF (1999) Delayed rectifier current in heart failure: Depressed funktion without changes in protein expression or protein level. *Circulation* **100**:I-425.

91. Ryder KO, Bryant SM and Hart G (1993) Membrane current changes in left ventricular myocytes isolated from guinea pigs after abdominal aortic coarctation. *Cardiovasc.Res.* **27**:1278-1287.

92. Sanguinetti MC (1999) Dysfunction of delayed rectifier potassium channels in an inherited cardiac arrhythmia. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **868**:406-413.

93. Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL and Keating MT (1996) Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* **384**:80-83.

94. Sanguinetti MC and Jurkiewicz NK (1991) Delayed rectifier outward K+ current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am.J.Physiol* **260**:H393-H399.

95. Sanguinetti MC and Jurkiewicz NK (1992) Role of external Ca2+ and K+ in gating of cardiac delayed rectifier K+ currents. *Pflugers Arch.* **420**:180-186.

96. Sanguinetti MC and Jurkiewicz NK (1990) Two components of cardiac delayed rectifier K+ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J.Gen.Physiol* **96**:195-215.

97. Sans S, Kesteloot H and Kromhout D (1997) The burden of cardiovascular diseases mortality in Europe. Task Force of the European Society of Cardiology on Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe. *Eur.Heart J.* **18**:1231-1248.

98. Schreieck J, Wang Y, Gjini V, Korth M, Zrenner B, Schomig A and Schmitt C (1997) Differential effect of beta-adrenergic stimulation on the frequency-dependent electrophysiologic actions of the new class III antiarrhythmics dofetilide, ambasilide, and chromanol 293B. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* **8**:1420-1430.

99. Schroeder BC, Waldegger S, Fehr S, Bleich M, Warth R, Greger R and Jentsch TJ (2000) A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* **403**:196-199.

100. Shimizu W and Antzelevitch C (2000) Effects of a K(+) channel opener to reduce transmural dispersion of repolarization and prevent torsade de pointes in LQT1, LQT2, and LQT3 models of the long-QT syndrome. *Circulation* **102**:706-712.

101. Sicouri S and Antzelevitch C (1991) A subpopulation of cells with unique electrophysiological properties in the deep subepicardium of the canine ventricle. The M cell. *Circ.Res.* **68**:1729-1741.

102. Sicouri S, Moro S and Elizari MV (1997) d-Sotalol Induces Marked Action Potential Prolongation and Early Afterdepolarizations in M but Not Epicardial or Endocardial Cells of the Canine Ventricle. *J.Cardiovasc.Pharmacol.Ther.* **2**:27-38.

103. Suessbrich H, Schonherr R, Heinemann SH, Attali B, Lang F and Busch AE (1997) The inhibitory effect of the antipsychotic drug haloperidol on HERG potassium channels expressed in Xenopus oocytes. *Br.J.Pharmacol.* **120**:968-974.

104. Sun ZQ, Thomas GP and Antzelevitch C (2001) Chromanol 293B inhibits slowly activating delayed rectifier and transient outward currents in canine left ventricular myocytes. *J.Cardiovasc.Electrophysiol.* **12**:472-478.

105. Suto F, Cahill SA, Greenwald I and Gross GJ (2001) Early onset of QT interval prolongation and IKr downregulation in rabbits with compensated complete heart block. *J.Am.Coll.Cardiol.* **37**:91A.

106. Swan H, Saarinen K, Kontula K, Toivonen L and Viitasalo M (1998) Evaluation of QT interval duration and dispersion and proposed clinical criteria in diagnosis of long QT syndrome in patients with a genetically uniform type of LQT1. *J.Am.Coll.Cardiol.* **32**:486-491.

107. Swan H, Viitasalo M, Piippo K, Laitinen P, Kontula K and Toivonen L (1999) Sinus node function and ventricular repolarization during exercise stress test in long QT syndrome patients with KvLQT1 and HERG potassium channel defects. *J.Am.Coll.Cardiol.* **34**:823-829.

108. Takumi T, Ohkubo H and Nakanishi S (1988) Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* **242**:1042-1045.

109. Teng S, Ma L, Zhen Y, Lin C, Bahring R, Vardanyan V, Pongs O and Hui R (2003) Novel gene hKCNE4 slows the activation of the KCNQ1 channel. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **303**:808-813.

110. The CONSENSUS Trial Study Group (1987) Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N.Engl.J.Med.* **316**:1429-1435.

111. The SOLVD Investigators (1991) Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N.Engl.J.Med.* **325**:293-302.

112. Thomas GP, Gerlach U and Antzelevitch C (2003) HMR 1556, A Potent and Selective Blocker of Slowly Activating Delayed Rectifier Potassium Current. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **41**:140-147.

113. Thomas GP, Vos MA and Antzelevitch C (2001) The effect of volume overload hypertrophy on transmural distribution of the delayed rectifier (IKr and IKs) and transient outward (Ito) currents in the canine heart. *Pace* **24**:597.

114. Tinel N, Diochot S, Borsotto M, Lazdunski M and Barhanin J (2000a) KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J.* **19**:6326-6330.

115. Tinel N, Diochot S, Lauritzen I, Barhanin J, Lazdunski M and Borsotto M (2000b) M-type KCNQ2-KCNQ3 potassium channels are modulated by the KCNE2 subunit. *FEBS Lett.* **480**:137-141.

116. Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA and Orlando C (2002) Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal.Biochem.* **309**:293-300.

117. Tristani-Firouzi M and Sanguinetti MC (1998) Voltage-dependent inactivation of the human K+ channel KvLQT1 is eliminated by association with minimal K+ channel (minK) subunits. *J.Physiol* **510 (Pt 1)**:37-45.

118. Tsuji Y, Opthof T, Kamiya K, Yasui K, Liu W, Lu Z and Kodama I (2000) Pacing-induced heart failure causes a reduction of delayed rectifier potassium currents along with decreases in calcium and transient outward currents in rabbit ventricle. *Cardiovasc.Res.* **48**:300-309.

119. Varro A, Balati B, Iost N, Takacs J, Virag L, Lathrop DA, Csaba L, Talosi L and Papp JG (2000) The role of the delayed rectifier component IKs in dog ventricular muscle and Purkinje fibre repolarization. *J.Physiol* **523 Pt 1**:67-81.

120. Varro A, Lathrop DA, Hester SB, Nanasi PP and Papp JG (1993) Ionic currents and action potentials in rabbit, rat, and guinea pig ventricular myocytes. *Basic Res.Cardiol.* **88**:93-102.

121. Veldkamp MW, van Ginneken AC, Opthof T and Bouman LN (1995) Delayed rectifier channels in human ventricular myocytes. *Circulation* **92**:3497-3504.

122. Virag L, Iost N, Opincariu M, Szolnoky J, Szecsi J, Bogats G, Szenohradszky P, Varro A and Papp JG (2001) The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. *Cardiovasc.Res.* **49**:790-797.

123. Volders PG, Sipido KR, Vos MA, Spatjens RL, Leunissen JD, Carmeliet E and Wellens HJ (1999) Downregulation of delayed rectifier K(+) currents in dogs with chronic complete atrioventricular block and acquired torsades de pointes. *Circulation* **100**:2455-2461.

124. Volk T, Nguyen TH, Schultz JH, Faulhaber J and Ehmke H (2001) Regional alterations of repolarizing K+ currents among the left ventricular free wall of rats with ascending aortic stenosis. *J.Physiol* **530**:443-455.

125. Walker NJ (2002) Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science* **296**:557-559.

126. Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD and Keating MT (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat.Genet.* **12**:17-23.

127. Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA and Keating MT (1995) SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* **80**:805-811.

128. Weerapura M, Nattel S, Chartier D, Caballero R and Hebert TE (2002) A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link? *J.Physiol* **540**:15-27.

129. Wettwer E, Amos GJ, Posival H and Ravens U (1994) Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ.Res.* **75**:473-482.

130. Xu X, Rials SJ, Wu Y, Salata JJ, Liu T, Bharucha DB, Marinchak RA and Kowey PR (2001) Left ventricular hypertrophy decreases slowly but not rapidly activating delayed rectifier potassium currents of epicardial and endocardial myocytes in rabbits. *Circulation* **103**:1585-1590.

131. Yang T and Roden DM (1996) Extracellular potassium modulation of drug block of IKr. Implications for torsade de pointes and reverse use-dependence. *Circulation* **93**:407-411.

132. Yang T, Snyders DJ and Roden DM (1997a) Rapid inactivation determines the rectification and [K+]o dependence of the rapid component of the delayed rectifier K+ current in cardiac cells. *Circ.Res.* **80**:782-789.

133. Yang WP, Levesque PC, Little WA, Conder ML, Shalaby FY and Blanar MA (1997b) KvLQT1, a voltage-gated potassium channel responsible for human cardiac arrhythmias. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:4017-4021.

134. Yazawa K and Kameyama M (1990) Mechanism of receptor-mediated modulation of the delayed outward potassium current in guinea-pig ventricular myocytes. *J.Physiol* **421**:135-150.

135. Yu H, Wu J, Potapova I, Wymore RT, Holmes B, Zuckerman J, Pan Z, Wang H, Shi W, Robinson RB, El Maghrabi MR, Benjamin W, Dixon J, McKinnon D, Cohen IS and Wymore R (2001) MinK-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ.Res.* **88**:E84-E87.

136. Yue L, Feng J, Li GR and Nattel S (1996) Transient outward and delayed rectifier currents in canine atrium: properties and role of isolation methods. *Am.J.Physiol* **270**:H2157-H2168.

137. Zhang M, Jiang M and Tseng GN (2001) minK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as beta subunit of cardiac transient outward channel? *Circ.Res.* **88**:1012-1019.

138. Zipes DP and Wellens HJ (1998) Sudden cardiac death. *Circulation* **98**:2334-2351.

139. Zygmunt AC, Eddlestone GT, Thomas GP, Nesterenko VV and Antzelevitch C (2001) Larger late sodium conductance in M cells contributes to electrical heterogeneity in canine ventricle. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **281**:H689-H697.

140. Zygmunt AC, Goodrow RJ and Antzelevitch C (2000) I(NaCa) contributes to electrical heterogeneity within the canine ventricle. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **278**:H1671-H1678.

8 Dank

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Steinbeck für die Aufnahme in seine Klinik.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Michael Näbauer und Herrn Priv. Doz. Dr. med. Stefan Kääb gilt mein besonderer Dank für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe und die engagierte und kompetente Betreuung. Sie ermöglichte mir den Einstieg in das spannende Gebiet der zellulären und molekularen kardialen Elektrophysiologie.

Herrn Dr. med. Andreas Barth und Herrn Dr. med. Martin Hinterseer danke ich ganz herzlich für viele praktische Hinweise und Anleitungen, Ihre besondere Hilfsbereitschaft, sowie für ein konstruktives und freundschaftliches Arbeitsklima.

Besonderer Dank gilt Frau Heike Kartmann und Frau Bianka Hildebrand für die engagierte Hilfe bei den molekularbiologischen Untersuchungen und Messungen.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. med. Peter Lohse und seiner Arbeitsgruppe im Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Universität München – Großhadern, möchte ich mich für die freundliche und kompetente Hilfe bei der Etablierung der quantitativen real time PCR bedanken.

Für die Überlassung der Myokardproben bin ich Herrn Prof. Dr. med. Eckart Kreuzer und Priv. Doz. Dr. med. Peter Überfuhr, Herzchirurgische Klinik, Klinikum der Universität München – Großhadern, zu Dank verpflichtet.

Der Rudolf und Brigitte Zenner Stiftung gilt mein Dank für die finanzielle Unterstützung durch ein Stipendium während der experimentellen Arbeiten.

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Ludwig Andreas Zwermann

Geboren am: 17. August 1975 in München

Schulbildung

Grundschule Gauting *1982 bis 1986*

Otto-von-Taube-Gymnasium Gauting *1986 bis 1995*

Erteilung der Allgemeinen Hochschulreife am 30. Juli 1995

Studium

Medizinische Fakultät der LMU München *1995 bis 2001*

Ärztliche Vorprüfung am 10. September 1997

erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 18. September 1998

zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 07. September 2000

dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 31. Oktober 2001

Famulaturen

Innere Medizin: Medizinische Klinik I, Klinikum der LMU München, Großhadern

Anästhesiologie: Rotkreuzkrankenhaus München

Arbeitsmedizin und Allgemeinmedizin: Medizinischer Dienst, Flughafen München GmbH

Innere Medizin: Raigmore Hospital, Inverness, Schottland

Praktisches Jahr

Innere Medizin: Medizinische Klinik I, Klinikum der LMU München, Großhadern

Plastische Chirurgie und Neurochirurgie: Royal Hobart Hospital, Tasmanien, Australien

Unfall- und Wiederherstellungschirurgie: Krankenhaus München Harlaching

Anästhesiologie: Klinik für Anästhesiologie, Klinikum der LMU München, Großhadern

Beruf

Arzt im Praktikum *Dezember 2001 bis Mai 2003*

Medizinische Klinik I, Klinikum der LMU München, Großhadern

Assistenzarzt *seit Juni 2003*

Medizinische Klinik I, Klinikum der LMU München, Großhadern